

**PENGARUH JENIS SUMBER KARBON TERHADAP PRODUKSI ENZIM AMILASE  
OLEH *Bacillus subtilis***

**SKRIPSI**

Oleh:  
**ZAKY ALFIYAN RIZQO**  
NIM. 18630040



**PROGRAM STUDI KIMIA  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM  
MALANG  
2024**



**PENGARUH JENIS SUMBER KARBON TERHADAP PRODUKSI ENZIM AMILASE  
OLEH *Bacillus subtilis***

**SKRIPSI**

**Oleh:  
ZAKY ALFIYAN RIZQO  
NIM. 18630040**

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

**PROGRAM STUDI KIMIA  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM  
MALANG  
2024**



LEMBAR PERSETUJUAN

PENGARUH JENIS SUMBER KARBON TERHADAP PRODUKSI ENZIM AMILASE  
OLEH *Bacillus subtilis*

SKRIPSI

Oleh:  
Zaky Alfyan Rizqo  
NIM. 18630040

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji:  
Tanggal: 4 Juni 2024

Pembimbing I



Dr. Anik Maunatin, S.T., M.P  
NIP. 19760105 202321 2 012

Pembimbing II



Ahmad Hanapi, M.Sc  
NIP. 19851225 2023 211021

Mengetahui,  
Ketua Program Studi Kimia



Rachmawati Widesih, M.Si  
NIP. 19810811 200801 2 010



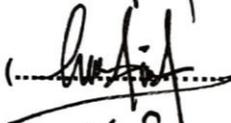
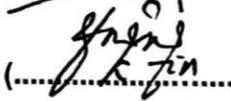
LEMBAR PENGESAHAN

PENGARUH JENIS SUMBER KARBON TERHADAP PRODUKSI ENZIM AMILASE  
OLEH *Bacillus subtilis*

SKRIPSI

Oleh:  
Zaky Alfian Rizqo  
NIM. 18630040

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi  
dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan  
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)  
Tanggal: 24 Juni 2024

Ketua Penguji	: Dr. Suci Amalia, M.Sc NIP. 19821104 200901 2 007	(..... 
Anggota Penguji I	: Fadilah Nor Laili Lutfia, M.Biotech LB. 63033	(..... 
Anggota Penguji II	: Dr. Anik Maunatin, S.T., M.P. NIP. 19760105 202321 2 012	(..... 
Anggota Penguji III	: Ahmad Hanapi, M.Sc NIP. 19851225 2023 211021	(..... 

Mengesahkan,  
Ketua Program Studi

  
Rachmawati Ningsih, M.Si  
NIP. 19840811 200801 2 010



## LEMBAR PERSEMBAHAN

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Segala puji dan syukur hamba limpahkan kepada Allah SWT. atas nikmat dan karunia yang telah Allah SWT. berikan kepada penulis. Shalawat serta salam hamba sampaikan kepada Baginda Nabi Muhammad SAW. beserta seluruh Keluarga dan sahabat Beliau.

*Alhamdulillahirabbil 'Alamin*, penulis mengucapkan banyak syukur atas terselesainya salah satu *grand quest* dalam perkuliahan yang penulis jalani. Penulis, berharap dapat dengan layak mempersembahkan tugas akhir atau skripsi ini kepada bapak Muhaimin dan Ibu Haryanti yang telah merawat, membimbing, menemani, men-*support* penulis tanpa henti, tanpa lelah. Penulis berharap ibu dan bapak diberikan umur panjang, rezeki yang lancar, kesehatan jasmani dan rohani. Terima Kasih banyak Ibu Dr. Anik Maunatin, S.T., M.P. dan bapak Ahmad Hanapi, M.Sc yang telah dengan sangat sabar dan penuh dedikasi dalam membimbing penulis selama perjalanannya. Kepada penguji saya, Ibu Dr. Suci Amalia, M.Sc, Ibu Deva Krisna Kadarani, M.Si dan Ibu Fadillah Nor Laili Lutfia, M.Biotech yang telah bersedia meluangkan waktunya untuk menguji naskah dan penelitian penulis sehingga layak disebut sebagai naskah skripsi dari penelitian kimia. Penulis juga berterima kasih kepada keluarga besar penulis yang telah dengan gigih mengingatkan penulis untuk terus maju menghadapi perjalanan penulis. Kepada Tria Oktaviani yang terkasih, terima kasih banyak atas seluruh usaha Tria dalam membantu penulis agar tetap berada dalam jadwal yang sesuai, meskipun penulis sering membuat Tria pusing dengan perilaku dan sikap penulis, penulis berharap naskah ini dapat dengan layak Tria terima sebagai bukti kegigihan penulis untuk tetap maju. *Arigathanks* kepada teman seper-*wibu*-an penulis yang telah sangat bersemangat untuk mendukung penulis dalam penelitiannya. Teman seangkatan baik dari prodi kimia maupun bukan yang telah membantu dan menolong penulis, penulis mengucapkan terima kasih banyak atas bantuannya. Teruntuk mas Yusril, Mas Rama, dan mbak Faizah, terima kasih banyak atas waktu dan ilmu yang telah diberikan kepada penulis, penulis hanya bisa berharap yang terbaik untuk jalan yang Anda semua tempuh. Dan terakhir bagi pembaca naskah ini, *The future breaking out of shades from the past*.



## LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini,

Nama : Zaky Alfian Rizqo  
NIM : 18630040  
Program Studi : Kimia  
Fakultas : Sains dan Teknologi  
Judul Penelitian : Pengaruh Jenis Sumber Karbon Terhadap Produksi Enzim Amilase oleh *Bacillus subtilis*

menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan 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 bahwa skripsi ini adalah hasil plagiat, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 03 Juni 2024  
Yang membuat pernyataan,



  
**Zaky Alfian Rizqo**  
NIM. 18630040



## KATA PENGANTAR

*Assalamualaikum Wr. Wb.*

Puji syukur atas kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan taufiq, rahmat, dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan naskah skripsi ini. Shalawat dan salam penulis haturkan kepada junjungan Nabi Muhammad SAW yang telah mengembangkan ajaran Islam di muka bumi demi keselamatan umat manusia. Penyusunan naskah skripsi ini dapat berjalan baik dan lancar juga berkat dukungan, bantuan, dan bimbingan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Kedua orang tua tercinta dan keluarga yang telah memberikan banyak *support* baik berupa materi maupun non-materi kepada penulis dalam menempuh pendidikan selama ini.
2. Prof. Dr. H. M. Zainuddin, MA., selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Prof. Dr. Sri Harini, M.Si, selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Rachmawati Ningsih, M.Si, selaku Ketua Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
5. Dr. Anik Maunatin, S.T., M.P, selaku Dosen Pembimbing I yang telah memberikan bimbingan, arahan, dan motivasi dalam proses penyusunan penelitian ini.
6. Ahmad Hanapi, M.Sc, selaku Dosen Pembimbing II yang telah memberikan bimbingan, arahan, dan motivasi dalam proses penyusunan penelitian ini.
7. Seluruh civitas akademik Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
8. Seluruh teman, kawan dan pihak yang ikut membantu penulis dalam penelitian ini.

Penulis sangat sadar dalam penulisan naskah ini, masih jauh dari kata layak, mengingat keterbatasan kemampuan dan wawasan penulis. Oleh karena itu, kritik dan saran yang bersifat membangun sangat penulis harapkan agar naskah ini menjadi semakin baik.

*Walaikumsalam Wr. Wb.*

Malang, 25 Maret 2023

Penulis



## MOTTO

*"Life is too long to end at the grave"*

Oleh Otto Apocalypse dari *insert song* berjudul '*Regression*'  
dalam *Animated Short [Thus Spoke Apocalypse]*



## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
LEMBAR PERSETUJUAN .....	iii
LEMBAR PENGESAHAN .....	v
LEMBAR PERSEMBAHAN.....	vii
LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN .....	ix
KATA PENGANTAR .....	xi
MOTTO.....	xiii
DAFTAR ISI .....	xv
DAFTAR GAMBAR .....	xvii
DAFTAR TABEL .....	xix
DAFTAR LAMPIRAN .....	xxi
ABSTRAK .....	xxiii
ABSTRACT .....	xxv
مستخلص البحث.....	xxvii
<b>BAB I: PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah .....	4
1.3. Tujuan Penelitian .....	4
1.4. Batasan Masalah .....	4
1.5. Manfaat Penelitian .....	4
<b>BAB II: TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>5</b>
2.1. <i>Bacillus subtilis</i> .....	5
2.2. Enzim Amilase .....	7
2.3. Media <i>Nutrient Agar</i> (NA).....	8
2.4. Faktor yang Mempengaruhi Produksi Enzim Amilase .....	9
2.5. Pengujian Aktivitas Enzim Amilase .....	11
2.6. Persamaan Regresi Linear .....	12
<b>BAB III: METODOLOGI PENELITIAN.....</b>	<b>15</b>
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian .....	15
3.2. Alat dan Bahan .....	15
3.2.1. Alat.....	15
3.2.2. Bahan.....	15
3.3. Rancangan Penelitian .....	15
3.4. Tahapan Penelitian .....	16
3.5. Pelaksanaan Penelitian.....	16
3.5.1. Preparasi Alat.....	16
3.5.2. Pembuatan Media .....	16
3.5.3. Peremajaan Bakteri .....	17
3.5.4. Uji Kualitatif Enzim Amilase dengan Reagen Iodida .....	17
3.5.5. Pembuatan Inokulum <i>Bacillus subtilis</i> .....	18
3.5.6. Produksi Enzim Amilase oleh <i>Bacillus subtilis</i> .....	18
3.5.7. Uji Aktivitas Enzim Amilase dengan Reagen 3,5-Dinitrosalisilat (DNS).....	18
3.5.8. Pembuatan Kurva Standar Glukosa .....	18
3.5.9. Analisis Data .....	19
<b>BAB IV: HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>21</b>
4.1. Peremajaan <i>Bacillus subtilis</i> .....	21
4.2. Uji Kualitatif Aktivitas Enzim Amilase yang Dihasilkan oleh <i>Bacillus subtilis</i> .....	22

4.3. Pembuatan Inokulum <i>Bacillus subtilis</i> .....	24
4.4. Produksi Enzim Amilase oleh <i>Bacillus subtilis</i> .....	24
4.5. Kurva Standar Glukosa .....	25
4.6. Uji Aktivitas Enzim Amilase yang Dihasilkan oleh <i>Bacillus subtilis</i> .....	26
4.7. Enzim Amilase dari <i>Bacillus subtilis</i> dalam Perspektif Keislaman.....	28
<b>BAB V: KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....	<b>31</b>
5.1. Kesimpulan .....	31
5.2. Saran.....	31
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	<b>33</b>
<b>LAMPIRAN</b> .....	<b>40</b>

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 <i>Bacillus subtilis</i> .....	6
Gambar 2.2 Struktur 3D amilase.....	7
Gambar 2.3 Mekanisme reaksi enzim amilase.....	8
Gambar 2.4 Struktur Amilosa (a) dan amilopektin (B).....	11
Gambar 2.5 Mekanisme reaksi DNS.....	12
Gambar 2.6 Grafik persamaan garis regresi linear.....	12
Gambar 4.1 Hasil Peremajaan <i>Bacillus subtilis</i> .....	22
Gambar 4.2 Hasil uji kualitatif produksi enzim oleh <i>Bacillus subtilis</i> .....	23
Gambar 4.3 Ilustrasi reaksi antara amilosa dan iodine.....	23
Gambar 4.4 Kurva standar larutan glukosa.....	25
Gambar 4.5 Reaksi reduksi DNS oleh glukosa.....	26
Gambar 4.6 Aktivitas enzim amilase <i>Bacillus subtilis</i> .....	27
Gambar L.4 Kurva standar glukosa.....	49



## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Perbandingan amilosa dan amilopektin dari beberapa sumber pati.....	10
Tabel 3.1 Rancangan pengaruh jenis sumber karbon terhadap produksi enzim amilase .....	16
Tabel 4.1 Hasil uji lanjut beda nyata jujur ( <i>Tukey's</i> ) .....	28
Tabel L.4 Nilai hasil pengukuran absorbansi untuk pembuatan kurva standar .....	49
Tabel L.5 Nilai hasil pengukuran absorbansi variasi jenis sumber karbon .....	49
Tabel L.6.1 Konsentrasi (ppm) dari variasi jenis sumber karbon .....	50
Tabel L.6.2 Aktivitas enzim (U <sub>mL</sub> <sup>-1</sup> ) dari variasi jenis sumber karbon.....	50



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Rancangan Penelitian .....	40
Lampiran 2. Diagram Alir .....	41
Lampiran 2.1. Pembuatan Media Peremajaan Bakteri .....	41
Lampiran 2.2 Pembuatan Media Uji Kualitatif ( <i>Starch Agar</i> ).....	41
Lampiran 2.3 Pembuatan Media Inokulum dengan Menggunakan <i>Nutrient Broth</i> (NB).....	42
Lampiran 2.4 Pembuatan Media Uji Aktivitas Enzim Amilase ( <i>Starch Broth</i> ).....	42
Lampiran 2.5 Pembuatan Larutan Substrat 1% W/V .....	42
Lampiran 2.6 Pembuatan Reagen Dns .....	43
Lampiran 2.7 Larutan Kna-Tartrat 40% W/V .....	43
Lampiran 2.8 Reagen Iodin.....	43
Lampiran 2.9 Larutan Standar Glukosa .....	44
Lampiran 2.10 Peremajaan Bakteri.....	44
Lampiran 2.11 Uji Kualitatif Aktivitas Enzim Amilase dengan Reagen Iodida .....	44
Lampiran 2.12 Pembuatan Inokulum <i>Bacillus Subtilis</i> Dengan <i>Optical Density</i> 0,5 .....	45
Lampiran 2.13 Produksi Enzim Amilase dari <i>Bacillus Subtilis</i> .....	45
Lampiran 2.14 Pembuatan Kurva Standar Glukosa .....	46
Lampiran 2.15 Uji Kuantitatif Aktivitas Enzim Amilase dengan Metode Dns .....	46
Lampiran 3. Perhitungan dan Pembuatan Larutan.....	47
Lampiran 3.1. Pembuatan Media Inokulum $OD_{600} = 0,5$ .....	47
Lampiran 3.2 Pembuatan Larutan dan Reagen.....	47
Lampiran 3.2.1 Larutan Kna-Tartrat 40% .....	47
Lampiran 3.2.2 Reagen DNS .....	47
Lampiran 3.2.3 Reagen Iodin.....	47
Lampiran 3.2.4 Larutan Glukosa Standar.....	48
Lampiran 4. Pembuatan Kurva Standar Glukosa .....	49
Lampiran 5. Pengukuran Absorbansi Sampel .....	49
Lampiran 6. Perhitungan Konsentrasi Glukosa dan Aktivitas Enzim Amilase .....	50
Lampiran 7. Hasil Statistik <i>One Way Anova</i> .....	51
Lampiran 8. Dokumentasi .....	52



## ABSTRAK

Rizqo, Zaky Alfiyan. 2024. Pengaruh Jenis Sumber Karbon Terhadap Produksi Enzim Amilase oleh *Bacillus subtilis*. Pembimbing I: Dr. Anik Maunatin, S.T., M.P.; Pembimbing II: Ahmad Hanapi, M.Sc.

**Kata Kunci:** Jenis Sumber Karbon, Enzim Amilase, Metode DNS, *Bacillus subtilis*

Enzim Amilase adalah enzim yang berperan sebagai katalis dalam reaksi hidrolisis rantai panjang polisakarida menjadi monosakarida. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh dari jenis sumber karbon pada produksi enzim amilase yang diproduksi oleh *Bacillus subtilis*. Sumber karbon yang digunakan dalam penelitian ini adalah *soluble starch*, pati kentang, pati jagung, pati singkong dan pati gandum. Uji kualitatif dalam penelitian ini dilakukan dengan mengamati zona yang bening yang terbentuk pada media agar sedangkan uji aktivitas enzim amilase dilakukan menggunakan reagen asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS) yang kemudian diukur absorbansinya dengan instrumen spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 540 nm. Terdapat zona yang bening pada media agar di sekitar koloni bakteri yang menunjukkan adanya aktivitas enzim amilase dan aktivitas enzim amilase yang diperoleh pada penelitian ini adalah *Soluble starch* memiliki aktivitas 0,0115 U<sub>mL</sub><sup>-1</sup>; pati kentang 0,0125 U<sub>mL</sub><sup>-1</sup>; pati jagung 0,0110 U<sub>mL</sub><sup>-1</sup>; pati singkong 0,0117 U<sub>mL</sub><sup>-1</sup> dan; pati gandum 0,0120 U<sub>mL</sub><sup>-1</sup>. Aktivitas enzim amilase terbesar adalah pati kentang dengan aktivitas 0,0125 U<sub>mL</sub><sup>-1</sup>, sedangkan aktivitas terkecil adalah pati jagung dengan aktivitas 0,0110 U<sub>mL</sub><sup>-1</sup>.



## ABSTRACT

Rizqo, Zaky Alfiyan. 2024. The Influence of Carbon Sources on the Production of Amylase Enzymes by *Bacillus subtilis*. Supervisor I: Dr. Anik Maunatin, S.T., M.P; Supervisor II: Ahmad Hanapi M.Sc.

**Keyword:** Types of Carbon Sources, Amylase Enzyme, DNS Method, *Bacillus subtilis*

Amylase enzyme is an enzyme that acts as a catalyst in the hydrolysis reaction of long chain polysaccharides into monosaccharides. This research aims to determine the effect of the type of carbon source on the production of the amylase enzyme produced by *Bacillus subtilis*. The carbon sources used in this research were soluble starch, potato starch, corn starch, cassava starch and wheat starch. The qualitative test in this research was carried out by observing the clear zone formed on the agar medium, while the amylase enzyme activity test was carried out using 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) reagent and the absorbance was then measured using a UV-Vis spectrophotometer at a wavelength of 540 nm. There is a clear zone on the agar media around the bacterial colony which indicates the presence of amylase enzyme activity and the amylase enzyme activity obtained in this study is Soluble starch has an activity of 0.0115 U/mL<sup>-1</sup>; potato starch 0.0125 U/mL<sup>-1</sup>; corn starch 0.0110 U/mL<sup>-1</sup>; cassava starch 0.0117 U/mL<sup>-1</sup> and; wheat starch 0.0120 U/mL<sup>-1</sup>. The greatest amylase enzyme activity was in potato starch, with an activity of 0.0125 U/mL<sup>-1</sup>, while the smallest activity was in corn starch, with an activity of 0.0110 U/mL<sup>-1</sup>.



## مستخلص البحث

رزقي، زاكي الفيّان. ٢٠٢٤. تأثير أنواع مصادر الكربون على إنتاج الأوكسدة الألومازية *Bacillus subtilis*. المشرفة ١: انيك موناتين، S.T.,  
M.P. المشرفة ٢: احمد حنفي M.Sc.

الكلمة الأساسية: أنواع مصادر الكربون، إنزيم الأميليز، طريقة DNS، *Bacillus subtilis*

إنزيم الأميليز هو إنزيم يعمل كمحفز في تفاعل التحلل المائي للسكريات قليلة التعدد طويلة السلسلة إلى سكريات أحادية. يهدف هذا البحث إلى تحديد تأثير نوع مصدر الكربون على إنتاج إنزيم الأميليز الذي تنتجه بكتيريا *Bacillus subtilis* مصادر الكربون المستخدمة في هذا البحث هي النشا القابل للذوبان ونشا البطاطس ونشا الذرة ونشا الكسافا ونشا القمح. تم إجراء الاختبار النوعي في هذه الدراسة من خلال ملاحظة المنطقة الصافية المتكونة على وسط الآجار، بينما تم إجراء اختبار نشاط إنزيم الأميليز باستخدام كاشف حمض ٥،٣-دينيتروزاليسيليك (DNS)، والذي تم بعد ذلك قياس امتصاصه باستخدام UV-Vis قياس الطيف الضوئي بطول موجي ٥٤٠ نانومتر. هناك منطقة واضحة على وسط الآجار حول المستعمرة البكتيرية مما يشير إلى وجود نشاط إنزيم الأميليز ونشاط إنزيم الأميليز الذي تم الحصول عليه في هذه الدراسة هو النشا القابل للذوبان الذي يبلغ نشاطه ٠،٠١١٥ وحدة / مليلتر؛ نشا البطاطس ٠،٠١٢٥ وحدة/مليلتر؛ نشا الذرة ٠،٠١١٠ وحدة / مليلتر؛ نشا الكسافا ٠،٠١١٧ وحدة / مليلتر و؛ نشا القمح ٠،٠١٢٠ وحدة/مليلتر. وكان أكبر نشاط لإنزيم الأميليز في نشاء البطاطس، حيث بلغ نشاطه ٠،٠١٢٥ وحدة/مليلتر، بينما كان أقل نشاط في نشاء الذرة، حيث بلغ نشاطه ٠،٠١١٠ وحدة/مليلتر.



# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Enzim merupakan biomolekul yang berupa protein yang berfungsi sebagai agen yang mempercepat reaksi biokimia atau disebut dengan biokatalis dalam organisme. Enzim juga dapat diekstraksi dari organisme tertentu dan kemudian dapat digunakan untuk kebutuhan komersil. Peran ini tampak dalam berbagai kebutuhan industri yang dibuktikan dengan kebutuhan pasar terhadap enzim secara global pada tahun 2022 tercatat sebesar 12,46 miliar USD dan diperkirakan akan melampaui angka 20,5 miliar USD pada tahun 2030. Hal ini disebabkan oleh angka pertumbuhan dari *Compound Annual Growth Rate* (CAGR) atau tingkat pertumbuhan tahunan gabungan diperkirakan mencapai 6,42% pada periode 2022 hingga 2030. Pertumbuhan ini juga dipicu oleh pandemi COVID-19 yang membuat masyarakat lebih memperhatikan kesehatan dibandingkan sebelum pandemi. Selain itu, perkembangan teknologi dalam industri enzim juga menjadi faktor lain yang memicu permintaan pasar enzim yang tinggi (Precedences Research, 2022; Robinson, 2015).

Enzim dapat diperoleh dari tiga sumber utama yakni mikroorganisme, binatang dan tumbuhan. Mikroorganisme seperti fungi, bakteri, dan *yeast* memiliki andil paling besar dalam produksi enzim karena mikroorganisme mudah diperoleh serta tingkat pertumbuhan dan ekstraksi enzim yang relatif cepat dibandingkan dengan enzim yang diekstraksi dari hewan dan tumbuhan. Hal ini didukung dengan kemampuan mikroorganisme untuk menghasilkan enzim yang spesifik sehingga mampu menekan biaya produksi. Enzim yang dihasilkan oleh berbagai sumber tersebut dapat dibagi dalam beberapa kelas utama serta dibagi lagi dalam beberapa sub kelas berdasarkan reaksi enzimatiknya. Kelas utama dalam pembagian enzim meliputi oksidoreduktase, transferase, hidrolase, liase, isomerase, dan ligase (Robinson, 2015; Singh dkk., 2016).

Enzim amilase termasuk ke dalam enzim hidrolase karena mampu menghidrolisis polisakarida dari substrat yaitu pati kemudian mengubahnya menjadi glukosa yaitu monosakarida. Enzim amilase yang paling umum ditemukan adalah alfa amilase, beta amilase dan glucoamilase dimana faktor yang membedakan ketiga enzim ini adalah bagian ikatan glikosidik yang dihidrolisis. Bakteri yang dapat menghasilkan enzim amilase antara lain adalah famili *Bacillus*. Apabila dibandingkan dengan mikroorganisme lain, famili *Bacillus* memiliki keunggulan kapasitas dalam sekresi protein seperti enzim yang tinggi. Selain itu, bakteri dari famili *bacillus* mampu tumbuh dengan baik pada media dengan sumber karbon yang murah, memiliki metabolisme endogen yang berbeda sehingga mampu bertahan dalam kondisi fermentasi industri. Kemampuan ini merupakan hasil evolusi dari famili *Bacillus* dalam manipulasi genetika sel sehingga famili *Bacillus* mampu merekonstruksi metabolisme

sekunder dan menyesuaikan kondisi lingkungan hidupnya sehingga famili *Bacillus* sangat baik dijadikan inang rekayasa genetika (Gu dkk., 2018).

Famili *Bacillus* yang umum digunakan dalam produksi adalah *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans* dan *Bacillus flavothermus*. Beberapa spesies dari famili *Bacillus* seperti *Bacillus subtilis* dan *Bacillus licheniformis* telah diakui aman untuk manusia atau *Generally Recognized as Safe* (GRAS) yang telah menunjang dan memberikan pengaruh besar dalam produksi berbagai obat-obatan. Selain dalam produksi berbagai obat-obatan famili *Bacillus* terutama *Bacillus subtilis* telah digunakan di berbagai produksi lain secara masif dan cepat dalam kurun waktu beberapa dekade terakhir dan menjadi produsen utama bagi beberapa produksi senyawa penting dalam industri seperti enzim, berbagai macam protein, antibiotik, vitamin, dan asam amino. Senyawa yang diproduksi oleh *Bacillus subtilis* berperan besar dalam berbagai sektor perindustrian seperti dalam industri pangan, kosmetik, kimia, dan farmasi. Oleh karena itu, famili *Bacillus* dipilih untuk memproduksi berbagai produk baik berupa bahan mentah, biopolimer, dan protein (Daniel dkk., 2017; Fincan & Enez, 2022; Gu dkk., 2018; Shukla dkk., 2015; Su dkk., 2020).

Keberadaan mikroorganisme yang mampu menghasilkan senyawa yang penuh manfaat ini telah disinggung dalam Al-Qur'an yakni dalam surat Al-Baqarah ayat 26 yang berbunyi (Tim Penyempurnaan Terjemahan Al-Qur'an, 2019):

﴿ إِنَّ اللَّهَ لَا يَسْتَحْيِي أَنْ يَضْرِبَ مَثَلًا مَّا بَعُوضَةً فَمَا فَوْقَهَا ۗ فَأَمَّا الَّذِينَ آمَنُوا فَيَعْلَمُونَ أَنَّهُ الْحَقُّ مِنْ رَبِّهِمْ ۗ وَأَمَّا الَّذِينَ كَفَرُوا فَيَقُولُونَ مَاذَا أَرَادَ اللَّهُ بِهَذَا مَثَلًا ۗ يُضِلُّ بِهِ كَثِيرًا وَيَهْدِي بِهِ كَثِيرًا ۗ وَمَا يُضِلُّ بِهِ إِلَّا الْفَاسِقِينَ ۗ﴾

Artinya: "Sesungguhnya Allah tidak segan membuat perumpamaan seekor nyamuk atau yang lebih kecil daripada itu. Adapun orang-orang yang beriman mengetahui bahwa itu kebenaran dari Tuhannya. Akan tetapi, orang-orang kafir berkata, "Apa maksud Allah dengan perumpamaan ini?" Dengan (perumpamaan) itu banyak orang yang disesatkan-Nya. Dengan itu pula banyak orang yang diberiNya petunjuk. Namun, tidak ada yang Dia sesatkan dengan (perumpamaan) itu, selain orang-orang fasik."

Lafadz بعوضة memiliki arti nyamuk menurut Imam Al-Qurthuby maupun Imam Al-Suyuty, beliau menafsirkan lafadz tersebut secara literal. Berbeda dengan Imam Al-Maraghi yang menafsirkan bahwa lafadz tersebut juga dikaitkan dengan lafadz berikutnya yakni فما فوقها yang bermakna segala sesuatu yang berada dibawahnya yakni dalam ukuran. Hal ini dapat mengisyaratkan keberadaan mikroorganisme karena makhluk ini memiliki ukuran yang jauh lebih kecil dibandingkan dengan nyamuk. Sebab turunnya ayat ini (*Asbabu al-Nuzul*) memiliki banyak riwayat dengan berbagai dasar akan tetapi menurut Al-Imam Ibnu Jarir Al-Tabari berpendapat bahwa pendapat dari Ibnu Mas'ud dan Ibnu Abbas lebih tepat yakni Allah SWT. tidak segan memberikan perumpamaan yang gandumal dari makhluk kecil seperti nyamuk

atau bahkan lebih rendah dari itu untuk membungkam orang-orang munafik yang meragukan kebesaran-Nya karena menggunakan makhluk yang amat kecil dalam kalam-Nya (Agus Salim, 2022).

Meskipun mikroorganisme tidak dapat dilihat dengan menggunakan mata secara langsung karena ukurannya yang sangat kecil, akan tetapi makhluk hidup ini sangat berguna dalam berbagai aspek. Salah satu aspek tersebut adalah penggunaan mikroorganisme dalam industri untuk memperoleh produk yang diinginkan seperti enzim amilase. Produksi enzim amilase dalam bidang industri juga melibatkan beberapa faktor guna meningkatkan hasil produksi seperti mengoptimalkan lingkungan hidup bakteri seperti jenis sumber karbon. Jenis sumber karbon yang digunakan untuk menghasilkan enzim amilase dari bakteri dapat diperoleh dari beberapa jenis sumber karbon seperti karbohidrat alam baik berupa monosakarida (fruktosa, glukosa dan galaktosa), disakarida (maltosa, laktosa dan sukrosa) maupun oligosakarida. Selain itu, limbah atau residu dari agroindustri seperti molase, ampas tebu dan sekam padi juga dilaporkan mampu menjadi sumber karbon untuk produksi enzim amilase. Penggunaan karbohidrat alam sebagai sumber karbon dapat menjadi bahan mentah yang ekonomis serta tersedia melimpah di Indonesia yang kaya akan sumber daya alamnya. Meski Indonesia memiliki kekayaan alam melimpah yang dapat digunakan sebagai sumber karbon untuk produksi enzim amilase namun pada masa ini Indonesia masih mengimpor enzim amilase dalam jumlah yang besar (Deb dkk., 2013; Hussain dkk., 2013; Lestari dkk., 2013; Simair dkk., 2017).

Penggunaan jenis sumber karbon yang berbeda akan mempengaruhi jumlah enzim amilase yang dihasilkan oleh mikroorganisme. Hal ini telah dilaporkan oleh beberapa penelitian sebelumnya seperti penelitian yang dilakukan oleh Soeka (2016) mengidentifikasi bakteri liar yang diasumsikan sebagai *Bacillus subtilis* menghasilkan aktivitas enzim sebesar  $14,51 \text{ UmL}^{-1}$  menggunakan sumber karbon berupa *soluble starch*; Sreekanth (2013) menggunakan *Bacillus sp.* CFR 67 menunjukkan bahwa sumber karbon terbaik adalah glukosa (aktivitas enzim  $62,4 \pm 1,52^e \text{ UmL}^{-1}$ ) dan; penelitian yang dilakukan oleh Özdemir menunjukkan bahwa jenis sumber karbon berupa pati yang terbaik adalah *soluble starch* dengan aktivitas enzim sebesar  $4250 \text{ UmL}^{-1}$ . Berdasarkan penelitian tersebut, dapat disimpulkan bahwa sumber karbon mempengaruhi aktivitas enzim amilase yang dihasilkan oleh *Bacillus subtilis*.

Oleh karena itu, penulis tertarik untuk membuat penelitian dengan judul "Pengaruh jenis sumber karbon terhadap produksi enzim amilase oleh *Bacillus subtilis*" dengan harapan mampu mengoptimalkan pemanfaatan sumber karbon dari bahan alam yang tersedia melimpah di Indonesia untuk skala industri sehingga biaya untuk impor enzim dalam negeri dapat ditekan dengan baik.

## 1.2. Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah bagaimana pengaruh jenis sumber karbon terhadap produksi enzim amilase oleh *Bacillus subtilis*?

## 1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh jenis sumber karbon terhadap produksi enzim amilase oleh *Bacillus subtilis*.

## 1.4. Batasan Masalah

Batasan masalah pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Bakteri yang digunakan adalah *Bacillus subtilis* yang diperoleh dari koleksi kultur bakteri Laboratorium Mikrobiologi FMIPA Universitas Brawijaya Malang pada tanggal 29 Oktober 2023.
2. Waktu inkubasi untuk produksi enzim amilase selama 24 jam pada suhu ruang.
3. Jenis sumber karbon yang yaitu *soluble starch*, pati kentang, pati jagung, pati singkong dan, pati gandum.

## 1.5. Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah untuk mengoptimalkan penggunaan berbagai jenis sumber karbon pada media terhadap produksi enzim amilase oleh *Bacillus subtilis*.

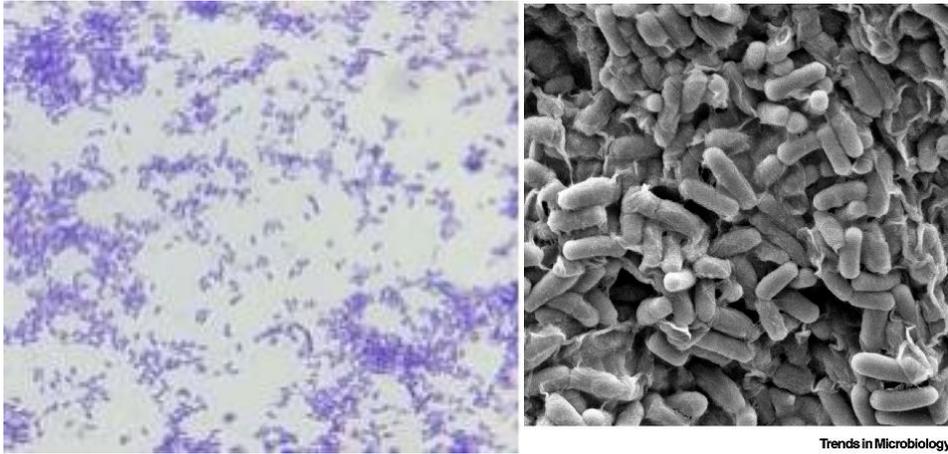
## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. *Bacillus subtilis*

*Bacillus subtilis* merupakan bakteri mesofil tanah aerobik yang mudah berkembang, memiliki gram positif, dengan bentuk sel berupa batang, serta umumnya memiliki panjang berkisar antara 2 – 6  $\mu\text{m}$  dengan diameter berkisar 1  $\mu\text{m}$ . Pertumbuhan *Bacillus subtilis* dinilai jauh lebih cepat dibandingkan bakteri lain dari segi siklus fermentasinya dalam produksi enzim amilase. bakteri lain yang digunakan adalah *Saccharomyces cerevisiae*. Bakteri *Saccharomyces cerevisiae* memiliki siklus fermentasi sekitar 180 jam sedangkan *Bacillus subtilis* hanya membutuhkan waktu sekitar 48 jam. Sel *Bacillus subtilis* memiliki satu membran yang memudahkan sekresi protein dari dalam sel sehingga mampu mempermudah langkah yang diperlukan untuk mensekresikan protein dibandingkan dengan bakteri lain seperti *Escherichia coli*. Salah satu protein tersebut adalah enzim amilase yang digunakan *Bacillus subtilis* untuk mengubah pati dari lingkungannya menjadi glukosa dimana glukosa digunakan untuk metabolisme sehingga mampu berkembang biak dengan baik. Taksonomi dari *Bacillus subtilis* adalah sebagai berikut (Errington & Aart, 2020; Fehler dkk., 2022; Su dkk., 2020; Zalma & El-Sharoud, 2021):

Kerajaan : Bakteria  
Filum : Firmicutes  
Kelas : *Bacili*  
Ordo : Bacillales  
Famili : Bacillaceae  
Genus : *Bacillus*  
Spesies : *Subtilis*

Suhu pertumbuhan pada *Bacillus subtilis* berkisar antara 20 – 37°C dengan pH berkisar antara 5 – 9. Suhu pertumbuhan dari *Bacillus subtilis* bergantung pada strain sehingga setiap strain baru yang dikultur akan memiliki suhu optimal tersendiri. Hal ini dibuktikan oleh berbagai laporan tentang suhu optimum dari *Bacillus subtilis*. Sidorova dkk (2020) melaporkan bahwa suhu optimal 25 °C dengan ph 8 dan 30°C dengan pH 7 – 8. Dash dkk. (2015) melaporkan bahwa suhu optimal pertumbuhan berada pada 37°C dengan pH 8. Ravindar (2013) melaporkan bahwa suhu optimal pertumbuhan berada pada 32°C dengan pH 7. Pada kondisi pertumbuhan tertentu, *Bacillus subtilis* memiliki kecenderungan untuk membentuk rantai panjang yang dihubungkan oleh bagian sel yang tidak memiliki dinding sel. *Bacillus subtilis* akan membentuk dan melepaskan endospora jika kondisi lingkungan menjadi ekstrim (Dash dkk., 2015; Errington & Aart, 2020; Ravindar & Elangovan, 2013; Sidorova dkk., 2020).



Trends in Microbiology

**Gambar 2.1** *Bacillus subtilis* (Kovács, 2019; Purwaningsih & Wulandari, 2021)

Bakteri memang memiliki ukuran yang sangat kecil dan terlihat tidak memiliki manfaat yang besar, akan tetapi sesungguhnya bakteri memiliki manfaat yang sangat besar dalam berbagai bidang. Banyaknya manfaat yang dimiliki bakteri ini juga dikuatkan oleh firman Allah SWT. di dalam Al-quran surat Ali Imran ayat 191 yang berbunyi (Tim Penyempurnaan Terjemahan Al-Qur'an, 2019):

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

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

Lafadz الذين merujuk kepada orang-orang berakal yang dalam setiap kegiatan kehidupan sehari-harinya, dia selalu memikirkan, merenungkan dan mampu mengambil manfaat dari seluruh ciptaan Allah SWT. baik yang berukuran besar maupun kecil, yang tampak maupun tak tampak oleh mata manusia. Selain mengagumi dan merenungkan ciptaan Allah SWT. mereka juga berdzikir kepada-Nya dalam kondisi apapun, baik dalam kegiatan sehari-hari maupun dalam majlis atau forum tertentu yang membahas kebesaran-Nya dari sudut pandang studi manapun serta berkata bahwa mereka bersaksi tidaklah Allah SWT. menciptakan segala sesuatu itu sia-sia melainkan memiliki hikmah dan tujuan dibalik ciptaan itu semua, bersaksi tidak ada sekutu bagi-Nya, memohon limpahan taufik agar mampu beramal saleh dalam rangka menjalankan perintah-Nya dan menjauhi larangan-Nya, serta memohon perlindungan dari murka-Nya agar selamat dari pedihnya azab neraka (Tim Penyempurnaan Terjemahan Al-Qur'an, 2019).

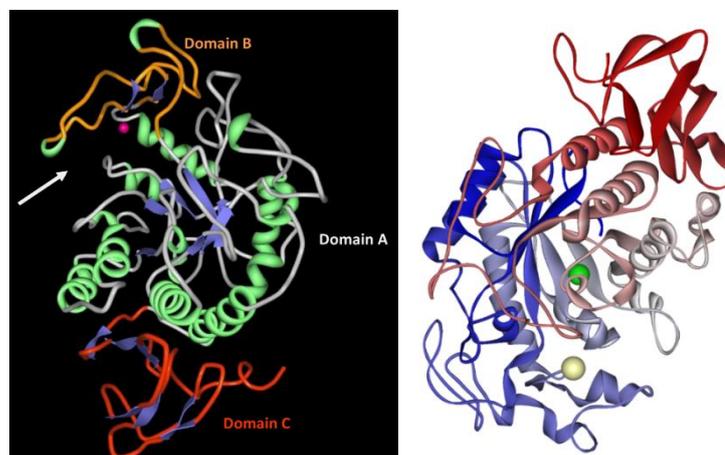
Salah satu ciptaan-Nya yang sangat berperan penting dalam bidang industri mikroorganisme adalah *Bacillus subtilis* karena sifatnya yang mampu mengeluarkan berbagai enzim hidrolase ke dalam media kultur secara langsung serta berperan sebagai penghasil riboflavin (Errington & Aart, 2020).

## 2.2. Enzim Amilase

Enzim Amilase merupakan kelompok enzim yang menghidrolisis ikatan glikosidik yang berada dalam polisakarida seperti pati menjadi monosakarida. Alfa amilase, beta amilase dan gluco amilase adalah enzim amilase yang paling umum ditemukan. Enzim amilase yang berasal dari mikroorganisme yang diklasifikasikan sebagai amilase berada dalam beberapa *Enzyme Commission* (EC) yakni transferase (EC 2), hidrolase (EC 3) dan isomerase (EC 5) namun kebanyakan enzim yang digolongkan sebagai amilase berada dalam kelas hidrolase. Enzim alfa amilase adalah enzim amilase dengan *Enzyme Commission Number* (EC 3.2.1.1) yang berperan sebagai katalis dalam reaksi hidrolisis ikatan  $\alpha$ , yakni ikatan 1-4 glikosidik yang ada di bagian dalam rantai polisakarida. Enzim beta amilase (EC 3.2.1.2) akan menghidrolisis ikatan glikosidik yang berada dekat dengan ujung rantai gugus alfa *nonreducing*. Enzim glucoamilase memiliki mekanisme yang sama dengan beta amilase namun hasil enzimatik yang dihasilkan hanya beta-D-glukosa tanpa produk samping. Enzim amilase secara umum harus memiliki empat syarat utama yakni (Taniguchi & Honnda, 2009; Zhang dkk., 2017):

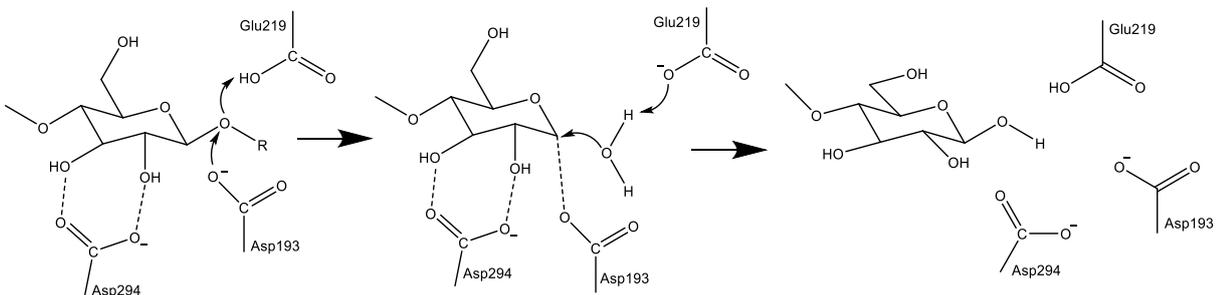
1. Memiliki empat hingga tujuh *Conserved Region*.
2. Memiliki domain katalis  $(\beta/\alpha)_8$  (dikenal juga dengan TIM Barrel yang awalnya ditemukan pada struktur enzim triosa-fosfat isomerase).
3. Menjalankan reaksi biokimia yang dikatalisis oleh asam  $\beta$ 5-glutamat sebagai donor proton, untaian  $\beta$ 4-aspartat sebagai dasar atau nukleofil dan asam  $\beta$ 7-aspartat sebagai penstabil transisi.

Struktur enzim amilase secara umum memiliki rantai tunggal polipeptida yang terlipat menjadi tiga domain yang berbeda, yakni A, B dan C. Struktur pusat dari domain A terdiri atas barel bertipe  $(\beta/\alpha)_8$  pada N-terminal atau dikenal dengan TIM-barel. Domain B terletak pada tonjolan di antara lembar ketiga  $\beta$ -sheet dan bagian lanjutan  $\alpha$ -helix dari TIM-barel. Domain B terhubung dengan pusat domain A oleh ikatan disulfida. Kedua domain ini membentuk sebuah celah yang mengikat substrat atau dikenal dengan sisi aktif enzim. Domain C terbentuk dari untaian  $\beta$  pada bagian terminal C. Letak dari domain B dan C ada pada sisi yang berlawanan dari domain A (Kumari dkk., 2012; Mobini-Dehkordi & Afzal Javan, 2012).



**Gambar 2.2** Struktur 3D amilase (Mobini-Dehkordi & Afzal Javan, 2012; Zhang dkk., 2017)

Mekanisme enzim amilase dalam memecah pati secara molekuler dapat dibedakan menjadi dua yang ditunjukkan oleh produk reaksinya. Apabila produk reaksi yang memiliki gugus anomer tidak mengalami perubahan dari substratnya maka enzim amilase tersebut termasuk ke dalam *retaining enzyme* misalnya adalah enzim alfa amilase. Apabila produk reaksi memiliki gugus anomer berbeda atau terbalik dari gugus awal maka termasuk ke dalam *inverting enzyme* misalnya adalah beta amilase dan glucoamilase. Pemecahan polisakarida menjadi monosakarida pada enzim amilase dibantu oleh residu asam amino pada sisi aktifnya contohnya enzim amilase dari *Pseudomonas stutzeri* yang dibantu oleh tiga residu asam amino yakni asam glutamat 219, asam aspartat 294 dan asam aspartat 193. Tahapan reaksi molekulernya adalah pengikatan substrat oleh asam aspartat 294 kemudian asam glutamat 219 akan mendonorkan protonnya ke atom oksigen pada ikatan glikosidik substrat. Reaksi tersebut akan menghasilkan ion okso karbonium dengan keadaan transisi lalu akan membentuk ikatan kovalen intermediet. Selanjutnya molekul H<sub>2</sub>O akan menyerang ikatan oksigen dengan residu asam aspartat 193. Asam glutamat akan menerima atom H dari molekul H<sub>2</sub>O dan residu asam aspartat 193 membentuk gugus karboksil baru pada molekul glukosa seperti ilustrasi pada Gambar 2.3 (Nangin & sutrisno, 2015; Taniguchi & Honnda, 2009):



**Gambar 2.3** Mekanisme reaksi enzim amilase (Nangin dan sutrisno, 2015)

Enzim amilase adalah salah satu enzim yang paling populer karena digunakan sangat luas terutama di dalam bidang industri karena memiliki potensi yang besar. Industri yang umum menggunakan enzim amilase mencakup industri pangan, fermentasi, tekstil, kertas, detergen dan industri di bidang farmasi. Penggunaan enzim semakin meluas seiring dengan kemajuan keilmuan bioteknologi sehingga aplikasi enzim amilase merambah ke bidang klinik, medis, kimia analisis, *starch saccharification* serta dalam bidang pembuatan bir dan industri penyulingan (Souza & Magalhães, 2010).

### 2.3. Media Nutrient Agar (NA)

Media pertumbuhan bakteri setidaknya memerlukan air, sumber karbon, sumber nitrogen dan beberapa mineral yang sesuai untuk tumbuh dan berkembang. Air berperan dalam melarutkan nutrisi, membantu reaksi hidrolisis dan sebagai sarana transportasi. Sumber

karbon merupakan komponen paling melimpah dan sangat berperan dalam proses molekul karbon seperti lemak dan karbohidrat. Sumber nitrogen sangat mudah ditemui dalam banyak komponen pada media kultur baik berupa sumber nitrogen organik maupun sumber nitrogen anorganik. Sedangkan mineral yang umum dibutuhkan bakteri dalam tumbuh dan berkembang adalah fosfat, sulfat, magnesium dan kalsium (Bonnet dkk., 2020).

*Nutrient Agar* (NA) telah dikenal sebagai media budidaya mikro organisme yang tidak memerlukan perlakuan ataupun nutrisi khusus. Media ini dipilih karena komposisi pembuatannya yang cukup mudah serta dapat mencakup nutrisi yang diperlukan oleh mikro organisme dalam berkembang serta kemampuan media NA dalam mereplikasi mikro organisme secara masif. Secara umum, komposisi media NA adalah pepton, ekstrak daging sapi dan agar. Pepton berperan sebagai sumber nitrogen organik seperti asam amino dan rantai panjang peptida. Ekstrak daging sapi mengandung senyawa yang larut dalam air seperti karbohidrat, vitamin, beberapa senyawa nitrogen organik dan juga garam. Sedangkan agar berperan sebagai bahan yang memadatkan komponen lain. Komposisi media NA umumnya dapat dimodifikasi sesuai dengan kebutuhan dan kriteria penelitian agar dapat menghasilkan data yang optimal (Zimbro & Power, 2009).

#### **2.4. Faktor yang Mempengaruhi Produksi Enzim Amilase**

Produksi enzim secara umum dipengaruhi oleh kondisi lingkungan dan nutrisi dari media yang digunakan. Kondisi lingkungan yang penting dalam produksi enzim adalah suhu, waktu inkubasi dan pH. Selain kondisi lingkungan, nutrisi dari media juga mempengaruhi produksi enzim dari mikroorganisme. Nutrisi pada media mencakup sumber karbon, sumber nitrogen, ion logam serta mineral lain yang diperlukan mikroorganisme dalam berkembangbiak dan produksi enzim (Demirkan dkk., 2017; Dutta dkk., 2016; Simair dkk., 2017).

Kondisi lingkungan dan nutrisi media berpengaruh terhadap laju produksi enzim amilase karena bakteri yang berperan dalam produksi memiliki kondisi lingkungan dan nutrisi tertentu agar dapat menghasilkan enzim yang optimum. Kondisi lingkungan *Bacillus subtilis* yang umum diketahui memiliki rentang pH 6 hingga 7 akan tetapi sumber lain menyebutkan bahwa rentang maksimal oleh *Bacillus subtilis* berkisar antara pH 5 – 9. Suhu optimum *Bacillus subtilis* berada pada rentang 35 – 45°C. Sedangkan masa inkubasi berkisar antara 48 hingga 72 jam. Kondisi lingkungan yang melebihi atau kurang dari uraian tersebut akan menghambat atau bahkan mematikan bagi *Bacillus subtilis* (Akcan dkk., 2009; Al-Johani dkk., 2016; Dash dkk., 2015; Raul dkk., 2014; Simair dkk., 2017).

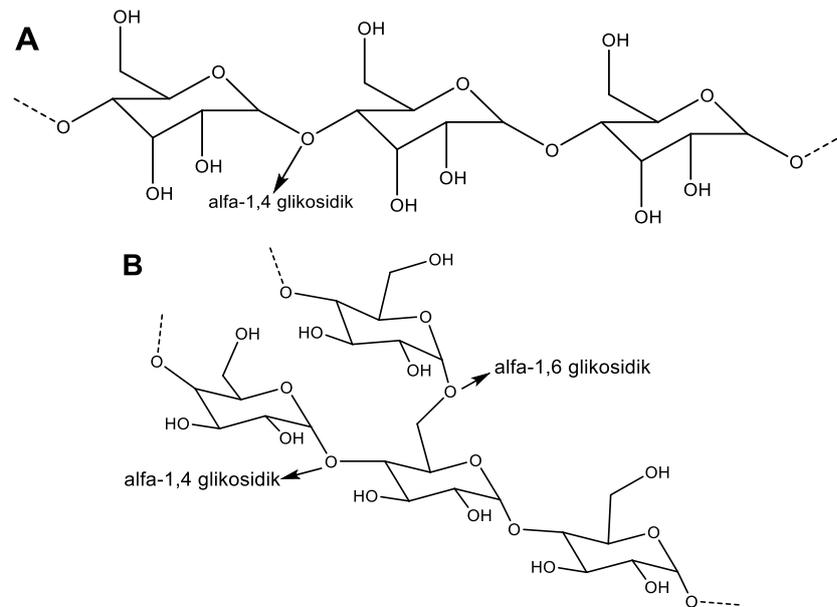
Sumber karbon merupakan nutrisi yang penting bagi pertumbuhan bakteri secara umum sebagai sumber makanan dalam proses metabolisme bakteri. *Bacillus subtilis* dapat hidup diberbagai media selama media tersebut mengandung glukosa serta gula sederhana lain sebagai sumber karbonnya. Pati merupakan kumpulan glukosa dan gula sederhana lain (polisakarida) yang dihubungkan dengan berbagai macam ikatan dalam berbagai ukuran

untuk membentuk rantai panjang. Pati umumnya ditemukan dalam tumbuhan sehingga memiliki bentuk dan komposisi pati yang berbeda. Pati terdiri dari tiga jenis kristalinitas, yaitu tipe A yang umumnya berasal dari pati sereal seperti pati jagung. Tipe B umumnya ditemukan dari pati umbi-umbian seperti kentang dan tipe C yang mengandung pola kristalinitas polimorfik tipe A dan B yang umumnya ditemukan dalam pati kacang-kacangan (Cornejo-Ramírez dkk., 2018; Harwood dkk., 2013; Zakaria dkk., 2017).

Sifat pati seperti penyerapan air, gelatinisasi, kerentanan terhadap reaksi enzimatik bergantung pada kandungan amilosa, amilopektin dan ukuran granulanya. Selain itu, sifat fungsional pati juga dipengaruhi oleh faktor lain seperti struktur pati, modifikasi kimia, komposisi sistem, pH dan kekuatan ikatan ionik dari media yang digunakan. Struktur pati dipengaruhi oleh persebaran amilosa dan amilopektin sedangkan perbandingan amilosa dan amilopektin tersebut dipengaruhi oleh sumber pati berasal baik secara kultur maupun kondisi geografi tanaman tersebut tumbuh yang ditampilkan pada Tabel 2.1. Pati yang memiliki rantai amilosa yang memiliki perbandingan lebih banyak dari rantai amilopektin akan lebih mudah dihidrolisis karena tidak memiliki percabangan yang mengurangi efektivitas enzim amilase. Amilosa memiliki struktur linear dengan pengulangan rantai  $\alpha$ -D (1,4) glikosidik sedangkan amilopektin memiliki struktur bercabang yang terdiri dari rantai pendek  $\alpha$ -D (1,4) glikosidik yang dihubungkan oleh rantai  $\alpha$ -D (1,6) glikosidik. Struktur amilosa dan amilopektin diilustrasikan pada Gambar 2.4 (Zakaria dkk., 2017).

**Tabel 2.1** Perbandingan amilosa dan amilopektin dari beberapa sumber pati

<b>Jenis sumber karbon</b>	<b>Amilosa (%)</b>	<b>Amilopektin (%)</b>
Pisang	17 – 24	76 – 83
Jagung	17 – 25	75 – 83
Kentang	17 – 24	76 – 83
Beras	15 – 35	65 – 85
Sorgum	25	75
Singkong	19 – 22	28 – 81
Gandum	20 – 25	75 – 80



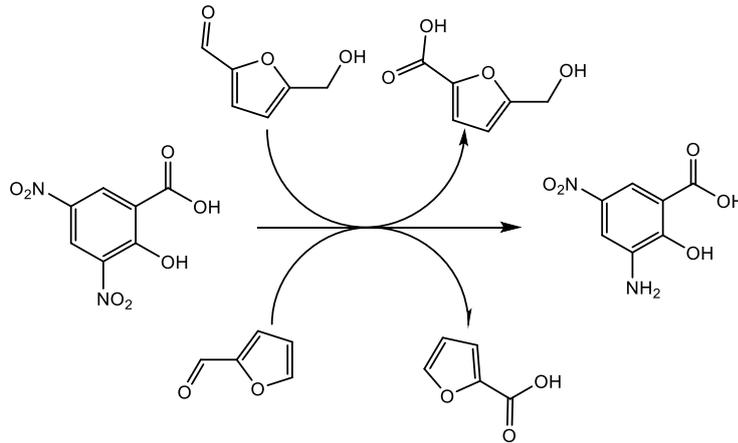
**Gambar 2.4** Struktur Amilosa (a) dan amilopektin (B) (Zakaria dkk., 2017)

## 2.5. Pengujian Aktivitas Enzim Amilase

Pengujian aktivitas enzim amilase yang dihasilkan oleh *Bacillus subtilis* terbagi menjadi dua tahap yakni uji kualitatif dan uji kuantitatif. Pengujian kualitatif bertujuan untuk mengetahui keberadaan enzim amilase yang ditandai dengan munculnya zona bening disekitar bakteri. Terbentuknya zona bening disekitar bakteri adalah akibat dari hasil reaksi antara amilum dan enzim amilase yang disekresikan oleh *Bacillus subtilis*. Iodin ( $I_2$ ) akan bereaksi dengan amilum untuk membentuk senyawa kompleks yang berbentuk *helix* berwarna warna biru gelap, sedangkan di sekitar bakteri memberikan warna bening karena amilum telah terhidrolisis menjadi gula sederhana. Iodin merupakan senyawa yang sulit larut dalam air, sehingga perlu ditambahkan kalium iodida sebagai katalis agar dapat larut dalam air. Senyawa iodin dan kalium iodida akan membentuk ion triiodida yang berperan sebagai akseptor pada senyawa kompleks amilum-iodin sedangkan amilum berperan sebagai donor. Reaksi senyawa kompleks ini hanya terjadi pada senyawa polisakarida yang dihubungkan oleh ikatan  $\alpha$  pada rantai karbonnya. Pati umumnya mengandung dua polisakarida yakni amilosa dan amilopektin. Amilosa memiliki banyak sekali monomer yang mengandung ikatan  $\alpha$ -D-glukosa yang terhubung pada C #1 dan C #4 pada monomer berikutnya (Daniel dkk., 2017; Goedecke, 2016; Istia'nah dkk., 2020).

Pengujian secara kuantitatif dilakukan dengan menggunakan metode DNS (asam 3,5-dinitrosalisilat). Metode ini umum digunakan dalam biokimia untuk mengetahui total gula pereduksi dalam suatu larutan yang mengandung karbohidrat. Indikasi keberadaan karbohidrat adalah terbentuknya senyawa ANS atau asam 3-amino-5-nitrosalisilat yang menampilkan warna merah kecoklatan pada panjang gelombang *visible* dengan absorbansi maksimum pada 540 nm. Prinsip dasar dari reaksi ini adalah mereduksi salah satu gugus nitro dalam DNS menjadi ANS serta oksidasi yang terjadi pada gugus aldehid pada reaktan yaitu

gula pereduksi menjadi gugus asam karboksilat ditunjukkan pada Gambar 2.5 dimana gula pereduksi yang digunakan adalah fruktosa (Deshavath dkk., 2020).



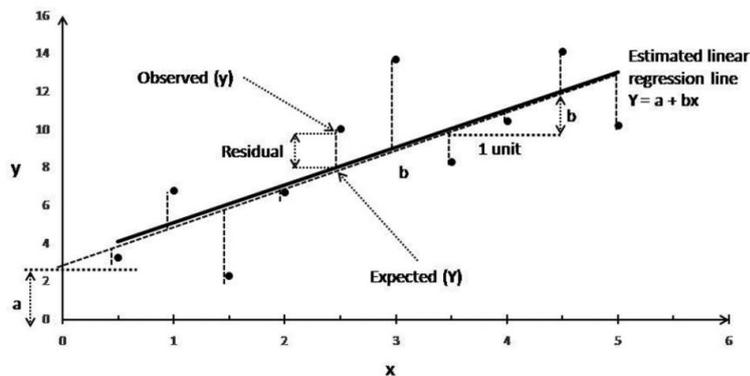
**Gambar 2.5** Mekanisme reaksi DNS (Deshavath dkk., 2020)

**2.6. Persamaan Regresi Linear**

Analisis regresi linear dapat diartikan sebagai pengamatan suatu sampel yang diplotkan menjadi sebuah garis yang paling sesuai terhadap variabel yang diuji. Regresi linear sederhana memiliki dua variabel yang dapat disebut sebagai variabel *x* dan variabel *y*. garis yang paling sesuai ini disebut dengan garis kuadrat terkecil atau *least squares line* sehingga jumlah kuadrat dari seluruh residu (jarak vertikal pada setiap titik dari garis dasar) adalah minimum dimana garis ini secara matematis dapat dituliskan sebagai berikut (Aggarwal & Ranganathan, 2017):

$$y = a + bx \dots\dots\dots 2.1$$

Dimana, *x* merupakan nilai dari variabel *independent* atau variabel bebas. *y* merupakan nilai dari variabel *dependent* atau variabel tetap untuk setiap nilai *x* yang ada. *a* merupakan *intercept* atau nilai perkiraan yang mewakili nilai *y* ketika *x* = 0. *b* merupakan *slope* atau sering dikenal dengan koefisien regresi atau gradien adalah nilai yang mewakili jumlah perubahan nilai rata-rata dari *y* tiap penambahan satu nilai *x* (Aggarwal & Ranganathan, 2017).



**Gambar 2.6** Grafik persamaan garis regresi linear (Aggarwal & Ranganathan, 2017)

Hubungan antara dua variabel tersebut juga dapat didefinisikan dengan menggunakan koefisien determinasi atau *Coefficient of Determinations* yang sering dilambangkan dengan  $R^2$  atau *R-squared*. Koefisien ini melambangkan perbandingan variasi dari suatu variabel yakni variabel tetap terhadap variabel lain (variabel bebas) dalam suatu regresi. Secara matematis koefisien ini dapat dituliskan sebagai (Kasuya, 2019)

$$R^2 = 1 - \frac{\text{Residual Sum of Square}}{\text{Total Sum of Square}} \dots\dots\dots 2.2,$$

dimana residual sum of square bernilai,

$$\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 \dots\dots\dots 2.3,$$

sedangkan total sum of square bernilai,

$$\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2 \dots\dots\dots 2.4$$

$y_i$  melambangkan nilai variabel tetap yang diperkirakan oleh garis regresi linear untuk titik data ke- $i$  sehingga nilai dari  $R^2$  berada diantara 0 hingga 1 atau 0 hingga 100% karena nilai dari residual sum of square memiliki nilai antara 0 hingga jumlah kuadrat dari  $y$  (sum of square of  $y$ ) (Kasuya, 2019).



## BAB III METODOLOGI PENELITIAN

### 3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dari Rabu, 11 Oktober 2023 hingga Jumat, 14 Mei 2024 di Laboratorium Bioteknologi, Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana malik Ibrahim Malang.

### 3.2. Alat dan Bahan

#### 3.2.1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah seperangkat alat gelas yang meliputi cawan petri; tabung reaksi; gelas beaker; gelas arloji; gelas ukur; pipet; botol kaca kosong; rak tabung reaksi; bola hisap; timbangan analitik; bunsen; spatula; botol semprot; *hot plate stirrer* dan *stirrer*; penangas air; inkubator; aluminium foil; jarum ose; kulkas atau lemari pendingin; *laminar air flow (LAF)*; *vortex*; mikropipet dan tip; *autoclave*; *centrifuge*; *shaker*; *cling wrap*; plastik bening tahan panas; oven; termometer dan *water bath*. Pengukuran aktivitas enzim amilase menggunakan instrumentasi spektrofotometer UV-Vis.

#### 3.2.2. Bahan

Bahan yang dibutuhkan pada penelitian ini berupa kultur *Bacillus subtilis* dari Laboratorium Mikrobiologi FMIPA Universitas Brawijaya. Selain itu, dibutuhkan *nutrient agar*; agar bakterial; *nutrient broth*; *soluble starch*; pepton; natrium klorida (NaCl); ekstrak *yeast*; magnesium sulfat heptahidrat ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ); kalium dihidrogen fosfat ( $KH_2PO_4$ ); glukosa ( $C_6H_{12}O_6$ ); sumber karbon yang berupa pati kentang, pati jagung, pati singkong dan, pati gandum; larutan KNa-tartrat ( $NaKC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$ ) 40% (w/v); reagen 3,5-dinitrosalisilat (DNS); reagen iodine dan; akuabides. Bahan lain yang dibutuhkan adalah alkohol 70% untuk desinfektan, spiritus, kertas label, tisu, kapas.

### 3.3. Rancangan Penelitian

Penelitian diawali dengan menguji kemampuan *Bacillus subtilis* dalam memproduksi enzim amilase melalui zona bening yang terbentuk pada media setelah menuang reagen iodine di sekitar koloni. Berikutnya adalah menguji pengaruh jenis sumber karbon terhadap produksi enzim amilase yang dihasilkan oleh *Bacillus subtilis* dengan variasi sumber karbon yaitu *soluble starch*, pati kentang, pati jagung, pati singkong dan, pati gandum. Kemudian, data yang diperoleh dari pengaruh jenis sumber karbon dianalisis menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan pengulangan 3 (tiga) kali. Penyusunan rancangan dari data aktivitas yang diperoleh ditampilkan dalam Tabel 3.1:

**Tabel 3.1** Rancangan pengaruh jenis sumber karbon terhadap produksi enzim amilase

Jenis sumber karbon	Ulangan ke-			Aktivitas enzim
	1	2	3	
<i>Soluble starch</i>				
Pati kentang				
Pati jagung				
Pati singkong				
Pati gandum				

### 3.4. Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian yang akan dilaksanakan adalah sebagai berikut:

1. Preparasi alat
2. Pembuatan media
3. Peremajaan bakteri
4. Uji kualitatif aktivitas enzim amilase dengan reagen iodida
5. Pembuatan inokulum *Bacillus subtilis*
6. Produksi enzim amilase oleh *Bacillus subtilis*
7. Uji aktivitas enzim amilase dengan reagen 3,5-dinitrosalisilat (DNS)
8. Pembuatan kurva standar glukosa
9. Analisis data

### 3.5. Pelaksanaan Penelitian

#### 3.5.1. Preparasi Alat

Preparasi yang dilakukan adalah dengan memasukkan seperangkat alat yang diperlukan ke dalam *autoclave* pada suhu minimal 121°C dengan tekanan 15 psi selama 20 menit. Alat yang dapat masuk ke dalam instrumen *autoclave* hanya alat yang tahan terhadap panas. (Mustapha dkk., 2021).

#### 3.5.2. Pembuatan Media

Media peremajaan bakteri dibuat dengan melarutkan 2 g media *Nutrient Agar Powder* dalam 100 mL aquades kemudian dipanaskan dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* dalam gelas beaker 250 mL hingga homogen. Setelah larutan homogen, ±6 mL larutan media dituang ke dalam tabung reaksi lalu, ditutup dengan menggunakan penutup kapas dan *clingwrap* kemudian disterilkan menggunakan *autoclave* dengan suhu 121°C; 15 psi selama ± 20 menit. Selanjutnya, media didiamkan dengan keadaan miring hingga mengeras lalu disimpan dalam kulkas. (Hudaya dkk., 2014; Merck, 2005; Napitupulu dkk., 2019).

Media Uji Kualitatif adalah media *starch agar* yang dibuat dari 1 g *soluble starch*; 0,5 g pepton; 0,3 g NaCl dan 2 g bubuk agar bakterial yang dilarutkan menggunakan 100 mL

aquades dalam erlenmeyer 250 mL. Larutan media kemudian dihomogenkan dan dipanaskan di atas *hotplate* hingga larutan media berwarna kuning bening. Kemudian erlenmeyer 250 mL ditutup dengan menggunakan kapas dan *clingwrap* dan disterilkan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C; 15 psi selama ±20 menit. Media Uji Kualitatif yang telah steril dituang secara aseptik ke dalam cawan petri hingga rata dengan permukaan cawan. Selanjutnya, media didiamkan hingga mengeras serta ditutup dengan *clingwrap* agar tidak terkontaminasi (Simair dkk., 2017; Susilawati dkk., 2015).

0,8 g bubuk media *Nutrient Broth* dilarutkan dalam 100 mL akuabides dalam gelas beaker 100 mL. Larutan media kemudian dihomogenkan dan dipanaskan di atas *hotplate* hingga larutan berwarna kuning bening. Larutan media inokulum kemudian dibagi menjadi dua bagian sama rata dan dimasukkan ke dalam dua botol kaca yang berbeda (masing-masing 50 mL). Setiap botol kaca ditutup dengan penutup kapas dan *clingwrap* lalu disterilkan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C; 15 psi selama ±20 menit. Media disimpan dalam kulkas setelah suhu botol sama dengan suhu ruang (Merck, 2005).

Media produksi enzim amilase adalah media *starch broth* yang dibuat dari 1 g variasi jenis sumber karbon yakni *soluble starch*, pati kentang, pati jagung, pati singkong dan pati gandum; 1 g ekstrak *yeast*, 0,1 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  dan 0,2 g  $KH_2PO_4$  yang dilarutkan menggunakan 100 mL aquades dalam gelas beaker 250 mL di atas *hotplate* menggunakan *stirrer* hingga larutan menjadi homogen dan bening. Kemudian larutan media produksi dituangkan ke dalam botol kaca dan ditutup menggunakan penutup kapas dan *cling wrap* lalu disterilkan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C; 15 psi selama ±20 menit. Media disimpan dalam kulkas setelah suhu botol sama dengan suhu ruang (Istia'nah dkk., 2020; Luang-In dkk., 2019; Simair dkk., 2017).

### 3.5.3. Peremajaan Bakteri

Isolat *Bacillus subtilis* diambil sebanyak satu ose secara aseptik dan diinokulasikan pada media *nutrient agar* miring dengan metode *streak plate* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Msarah dkk., 2020; Pranay dkk., 2019).

### 3.5.4. Uji Kualitatif Enzim Amilase dengan Reagen Iodida

Isolat *Bacillus subtilis* hasil peremajaan diinokulasi pada media *Starch Agar* lalu, diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dalam inkubator. Media kemudian ditambahkan dengan larutan iodin hingga permukaan media tertutup seluruhnya lalu diamati zona bening yang terbentuk. Zona bening yang terbentuk merupakan indikator bahwa bakteri yang diuji mampu menghasilkan enzim amilase (Hu & Liu, 2021).

### 3.5.5. Pembuatan Inokulum *Bacillus subtilis*

Isolat *Bacillus subtilis* hasil peremajaan sebanyak 2 ose dimasukkan dalam 50 ml media *Nutrient Broth* (NB). Kemudian dishaker dengan kecepatan 100 rpm pada suhu ruang dan diinkubasi selama 18 jam kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 600 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Derakhti dkk., 2012; Garg & Kaur, 2013).

### 3.5.6. Produksi Enzim Amilase oleh *Bacillus subtilis*

Prosedur uji pengaruh jenis sumber karbon dan konsentrasinya terhadap produksi enzim amilase dibuat dengan menginokulasikan 10 mL inokulum *Bacillus subtilis* ke dalam 100 mL media produksi enzim selama 24 jam pada suhu 37°C dalam *shaker incubator*. Setiap jenis sumber karbon yaitu *soluble starch*, pati kentang, pati jagung, pati singkong dan pati gandum dibuatkan satu larutan sampel dengan kadar 1 g pati dalam 100 mL akuabides. Setelah inkubasi selesai, larutan sampel disentrifugasi dengan pada 10.000g selama 15 menit dengan suhu 4°C. Ekstrak enzim kasar yang diperoleh akan berada dalam supernatan, yang kemudian dilanjutkan dengan uji aktivitas enzim amilase (Istia'nah dkk., 2020; Luang-In dkk., 2019; Simair dkk., 2017).

### 3.5.7. Uji Aktivitas Enzim Amilase dengan Reagen 3,5-Dinitrosalisilat (DNS)

Tabung reaksi yang telah diisi dengan 1 mL substrat (1% w/v larutan pati) ditambahkan dengan 1 mL sampel enzim dari masing-masing perlakuan dan 1 mL buffer fosfat pH 7, kemudian diinkubasi selama 60 menit dalam inkubator dengan suhu 37°C. Kemudian tepat setelah inkubasi selesai, tabung reaksi sampel dipindahkan ke dalam penangas air mendidih ( $\pm 70^\circ\text{C}$ ) selama 5 menit lalu didinginkan pada suhu ruang. Kemudian masing-masing larutan sampel ditambahkan dengan 1 mL reagen DNS; 1 mL larutan KNa-tartrat 40%; dan 5 mL akuabides. Kemudian larutan sampel divortex selama 30 detik dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm (Simair dkk., 2017).

Aktivitas enzim amilase diperoleh melalui persamaan 3.1 sebagai berikut (Nisa dkk., 2020):

$$\text{Aktivitas Enzim} = \frac{\text{Konsentrasi Glukosa}}{\text{Berat Molekul} \times \text{waktu inkubasi}} \times \frac{\text{Volume Total}}{\text{Volume Enzim}} \dots\dots\dots 3.1$$

Dimana, Aktivitas Enzim (Unit/mL); Berat Molekul Glukosa (180,16 g/mol); Waktu Inkubasi (menit); Volume Total Enzim+Substrat (mL); Volume Enzim (mL).

### 3.5.8. Pembuatan Kurva Standar Glukosa

Kurva standar glukosa dibuat berdasarkan persamaan garis regresi linear yang menunjukkan hubungan antara nilai absorbansi dan kadar glukosa. Nilai absorbansi diperoleh dari nilai serapan spektrofotometer UV-Vis larutan standar glukosa yang telah direaksikan dengan reagen DNS pada panjang gelombang 540 nm dimana nilai absorbansi merupakan sumbu *y* atau variabel *dependent* sedangkan kadar glukosa merupakan sumbu *x* atau variabel

*independent*. Berdasarkan persamaan garis regresi linear sederhana, dapat diketahui kadar glukosa sebanding dengan nilai  $x$  sesuai dengan persamaan garis regresi linear (Aggarwal & Ranganathan, 2017; Fitriani dkk., 2013):

$$y = a + bx$$

$$x = \frac{y-a}{b} \dots\dots\dots 3.2$$

Larutan standar glukosa dibuat dengan variasi konsentrasi 20, 30, 40, 50, dan 60 ppm yang dimasukkan ke dalam masing-masing tabung reaksi. Setiap tabung reaksi ditambahkan 1 mL larutan standar glukosa dan 1 mL reagen DNS. Kemudian dipanaskan dalam air mendidih selama 5 menit lalu didinginkan hingga suhu ruang dan ditambahkan 1 mL larutan K-Na-Tartrat 40% (garam *Rochell*) dan 7 mL akuabides. Larutan glukosa kemudian diukur nilai absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm (Deshavath dkk., 2020; Nisa dkk., 2020; Rajbhar dkk., 2016).

### 3.5.9. Analisis Data

Data yang diperoleh dalam penelitian ini adalah data kualitatif dan data kuantitatif. Data kualitatif yang diperoleh dari verifikasi keberadaan enzim amilase oleh *Bacillus subtilis* dengan mengamati pembentukan zona bening yang berada di sekitar koloni bakteri disajikan dalam bentuk teks deskriptif. Kemudian data yang diperoleh dari pengaruh jenis sumber karbon terhadap produksi enzim amilase oleh *Bacillus subtilis* dianalisis dengan metode *One Way ANOVA* menggunakan aplikasi *Statistical Product and Service Solutions (SPSS Statistic)* versi 27.0.1.0, apabila terdapat perbedaan nyata signifikan maka akan dilanjutkan dengan uji lanjut beda nyata jujur (*Tukey's*).



## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

*Bacillus subtilis* yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari koleksi kultur bakteri Laboratorium Mikrobiologi FMIPA Universitas Brawijaya yang diuji untuk mengetahui aktivitas enzim amilase. Variasi perlakuan pada penelitian ini adalah jenis sumber karbon yaitu *soluble starch*, pati kentang, pati jagung, pati singkong dan pati gandum. Garis besar prosedur penelitian dilakukan dalam dua tahap yakni uji kualitatif menggunakan reagen iodine dan produksi enzim amilase yang selanjutnya akan diuji secara kuantitatif untuk mengetahui aktivitas enzimnya. Pengujian secara kuantitatif dilakukan dengan menggunakan reagen asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS) dengan kontrol berupa sumber karbon *soluble starch* serta menggunakan blanko yang berisi aquades sebagai pengganti enzim. Blanko tersebut digunakan sebagai faktor pengoreksi terhadap larutan dan reagen yang digunakan dalam penelitian ini sehingga nilai absorbansi dari blanko harus nol (Ananda, 2019).

Seluruh prosedur penelitian dilakukan secara aseptik serta seluruh alat tahan panas yang digunakan harus steril. Metode aseptik adalah sebuah keterampilan peneliti dalam menjalankan prosedur dan kondisi yang terkendali sehingga mencegah adanya kontaminasi dari aspek manapun baik dari bakteri yang berasal dari dalam lingkungan kerja maupun luar lingkungan kerja serta dari senyawa organik maupun senyawa anorganik. Sterilisasi alat dilakukan menggunakan instrumen *autoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi selama 20 menit yang bertujuan untuk membunuh bakteri dan mikroorganisme kontaminan lain yang tidak diinginkan (Mustapha dkk., 2021; Siddiquee, 2017).

#### 4.1. Peremajaan *Bacillus subtilis*

Kultur *Bacillus subtilis* yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari koleksi kultur bakteri Laboratorium Mikrobiologi FMIPA Universitas Brawijaya. *Bacillus subtilis* merupakan bakteri mesofil, maka penyimpanan dalam kulkas dengan suhu kurang dari 20°C akan memperlambat pertumbuhan bakteri sehingga mampu memperpanjang masa hidup bakteri. Peremajaan bakteri bertujuan untuk menyediakan lingkungan yang sesuai dengan pertumbuhan bakteri serta untuk memelihara mikroorganisme pada kondisi laboratorium. Selain itu, peremajaan juga bertujuan untuk mempertahankan stabilitas genetik dan aktivitas biokimia dari bakteri tersebut (Jufri, 2020; Malarvizhi & Subramanian, 2020; Zalma & El-Sharoud, 2021).

Media pertumbuhan bakteri yang digunakan adalah media *Nutrient Agar* dengan permukaan miring di dalam tabung reaksi atau dikenal *Nutrient Agar Slant* adalah media umum yang digunakan untuk membiakkan bakteri yang mampu memberikan kondisi yang baik untuk pertumbuhan bakteri. Bubuk *Nutrient Agar* yang digunakan merupakan produk dari Sigma-Aldrich No. 70148 yang mengandung agar, ekstrak daging, pepton, natrium klorida (NaCl),

dan *yeast extract*. Agar adalah *solidifying agent* yang dapat membentuk media menjadi semi-solid. Ekstrak daging berperan dalam menyediakan sumber nitrogen, vitamin dan beberapa mineral penting untuk pertumbuhan bakteri. Pepton berfungsi untuk menyediakan sumber nitrogen tambahan serta asam amino untuk pertumbuhan bakteri. Natrium klorida berfungsi untuk menjaga tekanan osmotik antara media dan sel bakteri sehingga bakteri dapat tumbuh serta menyediakan elektrolit untuk transpor zat antar media dan bakteri. *Yeast extract* menyediakan vitamin kompleks, asam amino tambahan dan mineral lain yang sangat penting untuk pertumbuhan bakteri (Liang dkk., 2023; Merck, 2005; Pathmanathan dkk., 2016).

*Bacillus subtilis* diremajakan di dalam instrumen *Laminar Air Flow* (LAF) secara aseptik. Kultur bakteri diambil menggunakan kawat ose yang telah dibakar di atas api bunsen hingga merah menyala untuk membunuh seluruh kontaminan yang ada. Setelah dibakar, kawat ose harus didinginkan dengan menyentuhkan ujung kawat ose pada ujung luar media *Nutrient agar* miring supaya *Bacillus subtilis* tidak mati akibat panas. Kemudian *Bacillus subtilis* yang telah berada di kawat ose digoreskan dengan metode *streak plate* pada media NA miring dan diinkubasi selama 24 jam. Metode *streak plate* adalah metode penggoresan bakteri pada media solid yang digoreskan secara zig-zag dengan menggunakan kawat ose yang berbahan logam. Produksi enzim amilase tertinggi oleh *Bacillus subtilis* terjadi setelah 24 jam inokulasi bakteri pada media. Hal ini terjadi karena bakteri telah memasuki fase stasioner sehingga fase log (*exponential phase*) bakteri telah berakhir dimana pada fase stasioner *Bacillus subtilis* berfokus dalam mengsekresikan enzim amilase untuk melakukan metabolisme. Pada fase sebelumnya yakni fase log, *Bacillus subtilis* berfokus memperbanyak sel bakteri sehingga sekresi enzim amilase tidak sebanyak pada fase stasioner (Dash dkk., 2015; Merck, 2005; Siddiquee, 2017).



**Gambar 4.1** Hasil Peremajaan *Bacillus subtilis*

#### **4.2. Uji Kualitatif Aktivitas Enzim Amilase yang Dihasilkan oleh *Bacillus subtilis***

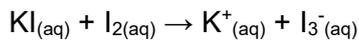
Uji kualitatif dilakukan untuk mengetahui kemampuan *Bacillus subtilis* dalam memproduksi enzim amilase dengan menumbuhkan bakteri pada media *Starch Agar*. *Bacillus subtilis* digoreskan membentuk titik tunggal di tengah media *starch agar* kemudian media diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator dengan suhu 37°C. Setelah 24 jam inkubasi, ditambahkan larutan iodin ke dalam media hingga menutupi seluruh permukaannya. Aktivitas

enzim amilase akan menunjukkan zona bening disekitar koloni (Daniel dkk., 2017; Hu & Liu, 2021).

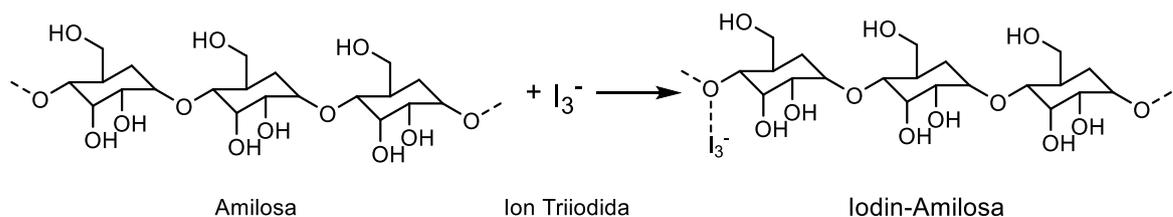


**Gambar 4.2** Hasil uji kualitatif produksi enzim oleh *Bacillus subtilis*

Warna biru gelap pada media *starch agar* dari Gambar 4.2 berasal dari ikatan kompleks antara iodine dengan amilosa atau pati yang terdapat dalam media *starch agar*. Reagen Iodin dibuat dengan melarutkan kristal iodine ( $I_2$ ) dalam larutan kalium iodida (KI). Iodin akan bereaksi dengan KI membentuk ion triiodida dan ion kalium agar lebih mudah larut dalam aquades yang mengikuti persamaan berikut (Brust dkk., 2020; Daniel dkk., 2017; Fleischer, 2019; Goedecke, 2016):



Reagen tersebut berikatan dengan heliks amilosa sebagai senyawa  $I_2$  atau ion  $I_3^-$  dan menghasilkan warna biru gelap atau keunguan jika konsentrasi iodine-iodida terlalu tinggi. Ilustrasi reaksi antara heliks amilosa dan reagen iodine membentuk kompleks amilosa-iodine ditunjukkan pada Gambar 4.3 (Pesek & Silaghi-Dumitrescu, 2024; Santamaria-Echart dkk., 2021).



**Gambar 4.3** Ilustrasi reaksi antara amilosa dan iodine (Santamaria-Echart dkk., 2021)

Zona bening yang berada di sekitar koloni *Bacillus subtilis* pada Gambar 4.2 mengkonfirmasi bahwa *Bacillus subtilis* mampu menghasilkan enzim amilase. Enzim amilase akan menghidrolisis pati (amilosa) dari media menjadi gula sederhana seperti glukosa atau maltosa sehingga reaksi pembentukan kompleks iodine-amilosa yang memberikan warna biru gelap pada media tidak terjadi (Hu & Liu, 2021; Pesek & Silaghi-Dumitrescu, 2024; Zhang dkk., 2017).

### 4.3. Pembuatan Inokulum *Bacillus subtilis*

Produksi enzim amilase yang dihasilkan oleh *Bacillus subtilis* diawali dengan membuat inokulum *Bacillus subtilis* dengan *optical density* 0,5 ( $OD_{600} = 0,5$ ). pengukuran OD inokulum menggunakan spektrofotometer UV-Vis adalah salah satu metode yang digunakan untuk mengetahui konsentrasi atau jumlah mikroorganisme dalam media cair. Panjang gelombang 600 nm dipilih secara spesifik untuk mengukur OD karena panjang gelombang tersebut aman dan tidak membahayakan bakteri sampel dibandingkan dengan panjang gelombang yang lebih rendah maupun lebih tinggi karena bakteri menerima sinar ultra violet yang terlalu tinggi. Pemilihan panjang gelombang maksimal tersebut bukan berdasarkan sinar yang diabsorpsi oleh bakteri, akan tetapi berdasarkan hamburan cahaya (*Light Scattering*) dari keberadaan sel bakteri. Selain itu, panjang gelombang 600 nm juga merupakan panjang gelombang yang sesuai dengan warna komplementer dari media inokulum *Bacillus subtilis* sehingga pengukuran kepadatan bakteri dalam inokulum dapat ditentukan dengan akurat. Nilai 0,5 adalah tingkat kekeruhan bakteri dalam larutan inokulum yang digunakan penulis dalam penelitian ini untuk menyetarakan variabel yang digunakan dalam seluruh proses produksi enzim amilase dimana jumlah bakteri pada  $OD_{600} = 0,5$  berkisar antara  $5 \times 10^7$  hingga  $25 \times 10^7$ . Selain itu, pada  $OD_{600} = 0,5$  *Bacillus subtilis* memiliki cukup nutrisi dan ruang dalam media inokulum yang seimbang sehingga pertumbuhan antar sel bakteri dapat berjalan dengan baik tanpa ada gangguan yang signifikan. Apabila konsentrasi bakteri terlalu tinggi atau terlalu rendah akan mengganggu akurasi dari tahap perlakuan penelitian berikutnya (Arrieta dkk., 2006; Beal dkk., 2019; Fukuda, 2023; Stevenson dkk., 2016).

Larutan media inokulum yang diperoleh adalah 1,5018 sehingga harus diambil sebanyak 16,647 mL dan ditambahkan 33,353 mL larutan inokulum tanpa bakteri maka akan diperoleh larutan inokulum kerja dengan  $OD_{600} = 0,5$ .

### 4.4. Produksi Enzim Amilase oleh *Bacillus subtilis*

Enzim amilase yang dihasilkan oleh *Bacillus subtilis* merupakan enzim ekstraseluler. Enzim ekstraseluler adalah enzim yang disekresikan bakteri ke lingkungannya untuk memecah pati menjadi molekul yang lebih sederhana agar mampu melewati membran sel sehingga molekul tersebut bisa menjadi nutrisi bagi bakteri. Prosedur produksi enzim amilase oleh *Bacillus subtilis* terdiri dari tiga tahap utama yakni pembuatan inokulum bakteri, proses produksi, dan pemisahan sentrifugal antara bakteri dan enzim yang dihasilkan pada suhu dingin (Susilawati dkk., 2015).

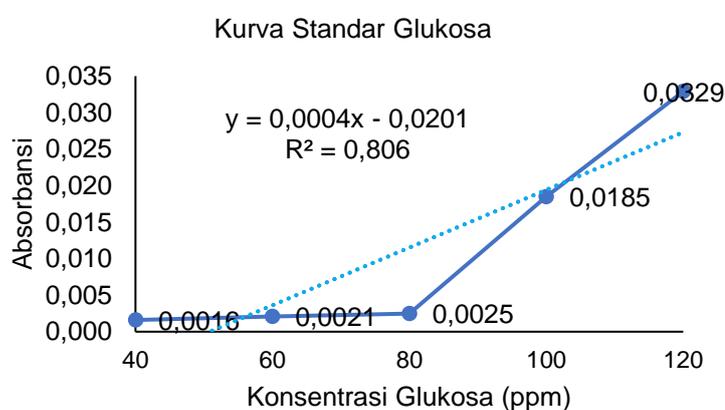
Inokulum *Bacillus subtilis* ditambahkan ke dalam media fermentasi atau media *starch broth* dengan perbandingan 10 mL inokulum untuk 100 mL media. Variasi jenis sumber karbon yang digunakan yaitu *soluble starch*, pati kentang, pati jagung, pati singkong dan pati gandum dalam media adalah fokus utama dari penelitian yang dilakukan penulis. Kemudian seluruh media dengan variasi tersebut diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Larutan media

fermentasi mengalami perubahan warna dari kuning bening menjadi kuning keruh karena pertumbuhan *Bacillus subtilis* yang diinokulasikan sebelumnya. Selain itu, ada juga kemungkinan adanya larutan pati yang tidak larut sempurna sehingga membuat larutan media fermentasi menjadi keruh. Media fermentasi diinkubasi di atas *shaker incubator* untuk meningkatkan aerasi media, mendistribusikan nutrisi media secara merata kepada bakteri sehingga bakteri dapat tumbuh secara optimal dalam media cair (Frantz dkk., 2022; Simair dkk., 2017; Wang dkk., 2022).

Ekstraksi enzim amilase kasar dilakukan dengan menggunakan metode sentrifugasi pada 10.000g dengan suhu 4°C selama 15 menit. Proses pemisahan dilakukan pada suhu 4°C untuk menjaga stabilitas enzim amilase dari denaturasi akibat panas. Selain itu, 10.000g memiliki cukup gaya gravitasi untuk memisahkan enzim amilase yang lebih ringan dari sel bakteri dan pati yang mungkin masih tersisa dalam media serta kontaminan terlarut yang lebih berat sehingga meningkatkan kemurnian enzim amilase yang diperoleh. Setelah sentrifugasi selesai, akan ada dua lapisan dalam tabung *sentrifuge* yakni lapisan *supernatan* (jernih dan berada di atas) yang mengandung ekstrak kasar enzim amilase dan filtrat (terbentuk endapan di dasar tabung *sentrifuge*) yang mengandung zat terlarut yang tidak diinginkan (Berk, 2013; Khusniati dkk., 2021; Tvarijonaviciute dkk., 2019).

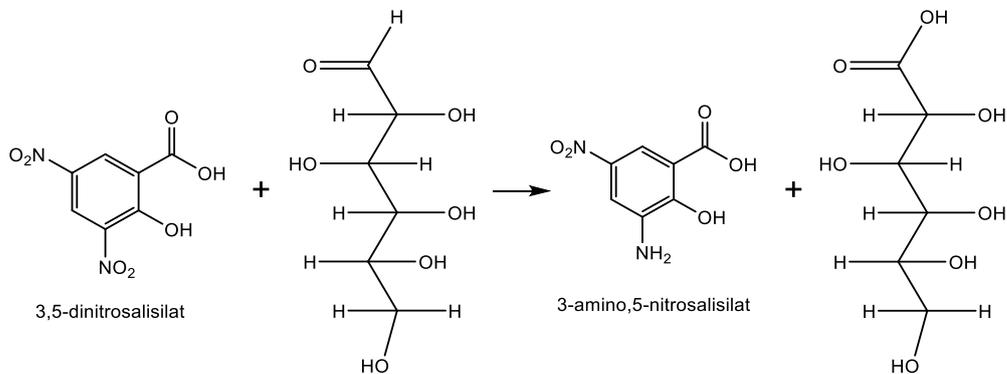
#### 4.5. Kurva Standar Glukosa

Kurva standar glukosa merepresentasikan hubungan antara gula pereduksi yang telah diketahui konsentrasinya dan nilai absorbansinya. Gula pereduksi yang digunakan harus direaksikan terlebih dulu dengan reagen DNS sehingga menghasilkan larutan berwarna kuning yang memiliki panjang gelombang 540 nm. Diagram dari gula pereduksi tersebut dapat digunakan untuk menentukan konsentrasi dari sampel gula. Diagram pada Gambar 4.4 menunjukkan nilai  $R^2$  sebesar 0,806 dengan persamaan regresi linear untuk absorbansi pada sumbu x dan konsentrasi pada sumbu y adalah  $y = 0,0004x - 0,0201$ . Variasi konsentrasi glukosa yang digunakan adalah 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, 100 ppm, 120 ppm (Deshavath dkk., 2020; Rajbhar dkk., 2016).



**Gambar 4.4** Kurva standar larutan glukosa

Pembuatan kurva standar tersebut menggunakan metode DNS dimana reagen DNS akan bereaksi dengan monosakarida terlarut yang berupa glukosa. Gugus aldehid dalam glukosa akan mereduksi asam 3,5-dinitrosalisilat menjadi 3-amino,5-nitrosalisilat atau ANS sehingga mengubah warna larutan menjadi tampak berwarna kuning dengan panjang gelombang maksimal pada 540 nm. Reaksi reduksi DNS menjadi ANS oleh gugus aldehid pada glukosa diilustrasikan pada Gambar 4.5.



**Gambar 4.5** Reaksi reduksi DNS oleh glukosa

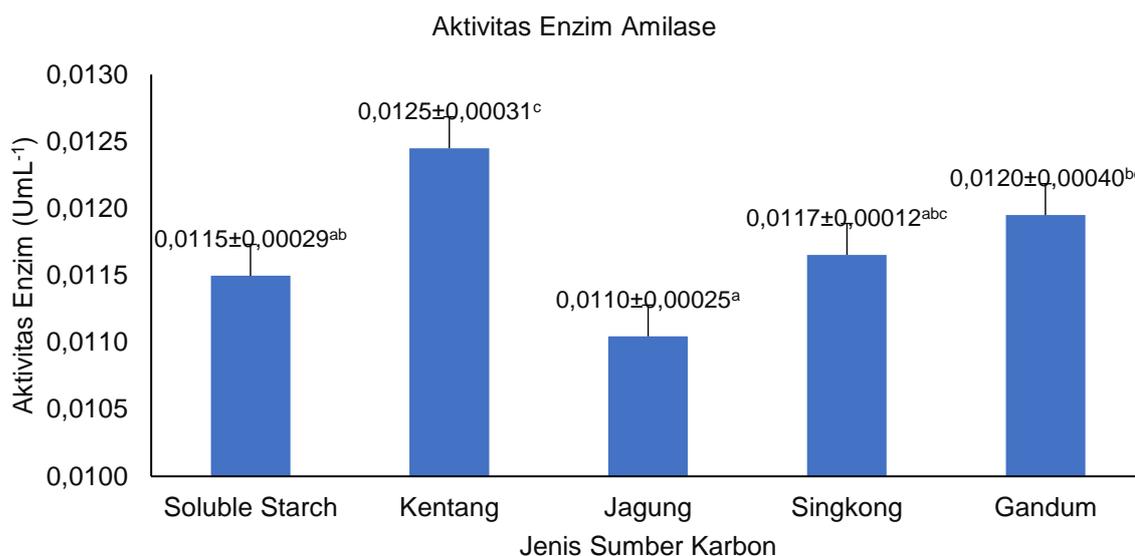
Pemanasan larutan campuran DNS dan glukosa bertujuan untuk meningkatkan energi kinetik dalam sistem. Energi kinetik tersebut akan meningkatkan frekuensi tumbukan antar molekul sehingga peluang terjadinya tumbukan efektif akan meningkat yang mengakibatkan reaksi lebih mudah terjadi. Efek yang ditimbulkan dari proses tersebut adalah meningkatnya laju reaksi dalam tabung reaksi. Penambahan garam *Rochell* (KNa Tartrat) memiliki 2 tujuan utama yakni untuk mengikat ion logam yang mungkin terlarut dalam sampel, yang mampu mengurangi keakuratan pengukuran serta untuk mencegah terjadinya endapan dimana KNa tartrat meningkatkan kelarutan glukosa sehingga akurasi pengukuran absorbansi dari masing-masing larutan glukosa akan meningkat (Miller, 1959).

#### 4.6. Uji Aktivitas Enzim Amilase yang Dihasilkan oleh *Bacillus subtilis*

Sumber karbon adalah salah satu faktor utama dalam produksi enzim amilase dari mikroorganisme seperti *Bacillus subtilis* karena berperan sebagai sumber energi untuk pertumbuhan mikroorganisme. Penelitian ini berfokus pada pengaruh jenis sumber karbon terhadap produksi enzim amilase dari *Bacillus subtilis*. Aktivitas enzim amilase yang dihasilkan oleh *Bacillus subtilis* diukur berdasarkan absorbansi dari instrumen spektrofotometer UV-Vis dengan menggunakan persamaan regresi linear yang diperoleh dari pembuatan kurva standar.

Aktivitas enzim amilase pada variasi jenis sumber karbon menghasilkan nilai yang berbeda-beda. Berdasarkan Gambar 4.6, *soluble starch* memiliki aktivitas  $0,0115 \text{ UmL}^{-1}$ ; pati kentang memiliki aktivitas  $0,0125 \text{ UmL}^{-1}$ ; pati jagung memiliki aktivitas  $0,0110 \text{ UmL}^{-1}$ ; pati singkong memiliki aktivitas  $0,0117 \text{ UmL}^{-1}$  dan; pati gandum memiliki aktivitas  $0,0120 \text{ UmL}^{-1}$ . Hasil aktivitas enzim amilase ditampilkan pada Gambar 4.6.

Setiap pati menghasilkan aktivitas enzim yang berbeda karena kandungan rasio amilosa dan amilopektin, bentuk, struktur serta sumber pati berasal. Faktor utama yang mempengaruhi adalah rasio dan distribusi amilosa dan amilopektin dalam pati terkait, dimana amilosa akan lebih mudah dihidrolisis oleh enzim amilase dibandingkan dengan amilopektin karena percabangan  $\alpha$ -1,6 glikosidik dalam amilopektin akan mempersulit reaksi enzimatik dari enzim amilase. Selain itu, Tingkat gelatinisasi pati juga berpengaruh terhadap aktivitas enzim amilase dimana semakin mudah memecah pati karena gelatinisasi akan meningkatkan akses enzim amilase ke dalam pati (Baks dkk., 2008; Özdemir dkk., 2011; Zakaria dkk., 2017).



**Gambar 4.6** Aktivitas enzim amilase *Bacillus subtilis*

Hasil penelitian terdahulu telah melaporkan bahwa aktivitas enzim dipengaruhi oleh jenis sumber karbon. penelitian yang dilakukan oleh Soeka (2016) mengidentifikasi bakteri liar yang diasumsikan sebagai *Bacillus subtilis* menghasilkan aktivitas enzim sebesar 14,51 U<sub>mL</sub><sup>-1</sup> menggunakan sumber karbon berupa *soluble starch*; Sreekanth (2013) menggunakan *Bacillus sp.* CFR 67 menunjukkan bahwa sumber karbon terbaik adalah glukosa (aktivitas enzim 62,4 ± 1,52<sup>e</sup> U<sub>mL</sub><sup>-1</sup>) dan; penelitian yang dilakukan oleh Özdemir yang mengidentifikasi bakteri yang diisolasi dari area kampus yaitu *Bacillus subtilis* yang menunjukkan bahwa jenis sumber karbon berupa pati yang terbaik adalah *soluble starch* dengan aktivitas enzim sebesar 4250 U<sub>mL</sub><sup>-1</sup>.

Hasil analisis statistik menggunakan *One Way ANOVA* pada variasi jenis sumber karbon terhadap aktivitas enzim amilase ditampilkan dalam Lampiran 7. yang menunjukkan nilai  $F_{hitung} > F_{tabel}$  (9,708 > 4,667) dengan nilai sig. <  $\alpha$  (0,002 < 0,05) sehingga dapat dinyatakan bahwa variasi jenis sumber karbon memberikan pengaruh signifikan terhadap aktivitas enzim amilase yang dihasilkan oleh *Bacillus subtilis* sehingga dapat dilanjutkan dengan uji lanjut beda nyata jujur (*Tukey's*) untuk mengetahui adanya perbedaan antar jenis sumber karbon. Uji lanjut beda nyata jujur (*Tukey's*) ditunjukkan pada Tabel 4.1. Hasil analisis jenis sumber karbon dengan aktivitas enzim amilase tertinggi pada penelitian ini adalah pati

kentang dengan aktivitas enzim amilase sebesar  $0,0125 \text{ U mL}^{-1}$  yang tidak memiliki perbedaan signifikan dengan pati gandum dan pati singkong. Jenis sumber karbon dengan aktivitas terendah adalah pati jagung dengan aktivitas enzim sebesar  $0,0110 \text{ U mL}^{-1}$  yang tidak memiliki perbedaan signifikan dengan *soluble starch* dan pati singkong.

**Tabel 4.1** Hasil uji lanjut beda nyata jujur (*Tukey's*)

Jenis Sumber Karbon	Rata-Rata Subset ( $\alpha = 0,05$ )	Notasi
Pati Jagung	0,0110	a
<i>Soluble Starch</i>	0,0115	ab
Pati Singkong	0,0117	abc
Pati Gandum	0,0120	bc
Pati Kentang	0,0125	c

#### 4.7. Enzim Amilase dari *Bacillus subtilis* dalam Perspektif Keislaman

Al-qur'an dan hadis tidak membahas secara eksplisit tentang enzim dan manfaatnya secara terperinci, akan tetapi ada beberapa ayat dan hadis yang menunjukkan kekuasaan Allah SWT dalam mengatur, menjaga, memelihara dan menetapkan segala ciptaan-Nya sebagaimana enzim secara spesifik hanya mampu mengkatalis reaksi enzimatik dan tidak dapat bereaksi mengkatalis reaksi non enzimatik seperti enzim amilase yang hanya mampu menghidrolisis ikatan  $\alpha$ -1,4 glikosidik yang berada dalam rantai amilosa atau amilopektin menjadi glukosa. Salah satu ayat dalam kitab suci Al-Qur'an yang menjelaskan tentang hal tersebut adalah surat al-Qamar ayat 49 (Tim Penyempurnaan Terjemahan Al-Qur'an, 2019; Zhang dkk., 2017):

إِنَّا كُلَّ شَيْءٍ خَلَقْنَاهُ بِقَدَرٍ ﴿٤٩﴾

Artinya: "Sesungguhnya Kami menciptakan segala sesuatu sesuai dengan ukuran."

Ayat ini merupakan salah satu ayat yang menjelaskan bahwa Allah SWT telah menetapkan ukuran dan ketentuan seluruh makhluk ciptaan-Nya. Selain surah Al-Qamar ayat 49, terdapat ayat lain yang menyatakan hal yang sama yakni surat al-Furqan ayat 2 yang berbunyi (Al-Dimasiqy, 2004; Tim Penyempurnaan Terjemahan Al-Qur'an, 2019):

..... وَخَلَقَ كُلَّ شَيْءٍ فَقَدَرَهُ تَقْدِيرًا ﴿٢﴾

Artinya: "..... Dia telah menciptakan segala sesuatu, lalu menetapkan ukuran-ukurannya dengan tepat."

Ibn Katsir menuturkan bahwa lafadz yang merujuk pada kalimat isim *قدر* yang berarti ketetapan dalam kedua ayat ini dapat diartikan sebagai ketetapan mutlak sehingga penulis mengasumsikan bahwa ketetapan mutlak yang dimaksud adalah hukum alam baik hukum fisika maupun kuantum. Kemampuan, fungsi, mekanisme reaksi, proses keberadaan, kondisi penyokong, kelebihan dan kelemahan enzim yang diteliti dalam penelitian ini termasuk dalam

hukum alam tersebut. Penelitian yang dilakukan penulis hanyalah satu bagian dari ketetapan tak terbatas yang telah ditetapkan oleh-Nya jauh sebelum keberadaan langit dan bumi. Hal tersebut telah disebutkan dalam hadis yang diriwayatkan oleh Muslim No. 2653 dalam Kitabnya *shahih muslim* yang berbunyi (an-Naisaburi, 2012):

إِنَّ اللَّهَ كَتَبَ مَقَادِيرَ الْخَلْقِ قَبْلَ أَنْ يَخْلُقَ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضَ بِخَمْسِينَ أَلْفَ سَنَةٍ

Artinya: “Sesungguhnya Allah SWT telah menetapkan takdir-takdir makhluk-Nya, lima puluh ribu tahun sebelum Allah SWT menciptakan langit dan bumi”

Berdasarkan ayat Al-Qur'an dan hadis tersebut dapat ditarik garis besar bahwa mikroorganisme, enzim dan benda-benda renik lainnya telah ditetapkan oleh Allah SWT bahkan sejak sebelum diciptakannya langit dan bumi, baik berupa lingkungan hidup mikroorganisme, cara mikroorganisme mengolah makanannya, zat yang disekresikan oleh mikroorganisme tersebut, dan ketetapan lainnya. Penulis dalam penelitian ini menemukan bahwa sumber karbon yang dapat digunakan dalam produksi enzim amilase dapat berpengaruh terhadap enzim amilase yang dihasilkan dari *Bacillus subtilis* dimana sumber karbon terbaik berasal dari pati kentang dengan aktivitas enzim sebesar 0,0623 UmL<sup>-1</sup>. Pada penelitian lain yang dilakukan oleh Özdemir menunjukkan bahwa jenis sumber karbon berupa pati yang terbaik adalah *soluble starch* dengan aktivitas enzim sebesar 4250 UmL<sup>-1</sup> (Özdemir dkk., 2011).



## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **5.1. Kesimpulan**

Berdasarkan penelitian yang telah dilaksanakan oleh penulis, diperoleh data berupa aktivitas enzim amilase. Variasi sumber karbon yang digunakan penulis mempengaruhi secara signifikan aktivitas enzim amilase dengan sumber karbon tertinggi adalah pati kentang dengan aktivitas enzim sebesar  $0,0125 \text{ UmL}^{-1}$  sedangkan sumber karbon terendah adalah pati jagung dengan aktivitas enzim sebesar  $0,0110 \text{ UmL}^{-1}$ .

#### **5.2. Saran**

Saran yang dapat penulis berikan adalah mengkaji lebih lanjut pengaruh distribusi amilosa dan amilopektin dalam berbagai jenis sumber karbon yang dapat meningkatkan produksi enzim amilase.



## DAFTAR PUSTAKA

- Aggarwal, R., & Ranganathan, P. (2017). Common Pitfalls in Statistical Analysis: Linear Regression Analysis. *Perspectives in Clinical Research*, 8(2), 100–102. <https://doi.org/10.4103/2229-3485.203040>
- Agus Salim, A. (2022). Perumpamaan “Nyamuk” Di Dalam Al-Qur’an. *Jurnal Asy-Syukriyyah*, 23(2), 203–216. <https://doi.org/10.36769/asy.v23i2.235>
- Akcan, N., Uyar, F., & Güven, A. (2009). Submerged Kültürü ile *Bacillus subtilis* RSKK96’dan  $\alpha$ -Amilaz Üretimi. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2010.3036>
- Al-Dimasiqy, I. ad-D. A. al-F. I. I. A. I. K. I. Z. al-B. (2004). *Tafsir Ibnu Katsir (Ghoffar, M. Abdul, Penerjemah)* (M. Y. Harun, F. Okbah, Y. A. Q. Jawas, T. S. Alkatsiri, F. Dloifur, M. Bamu’allim, H. N. Wahid, & A. I. Al-Atsari, Ed.; cetakan keempat, Vol. 1–8). Pustaka Imam Asy-Syafi’i.
- 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>
- Ananda, M. S. (2019). Uji Kadar Sulfat pada Air Minum dalam Kemasan (AMDK) Secara Spektrofotometri UV-Vis. *Amina*, 1(1), 35–38.
- an-Naisaburi, M. bin al-H. al-Q. (2012). *Ensiklopedia Hadis: Shahih Muslim 2* (T. Wijaya & N. Ni’amurrahman, Ed.). Almahira. <https://opac.perpusnas.go.id/DetailOpac.aspx?id=906238#>
- Arrieta, M. C., Leskiw, B. K., & Kaufman, W. R. (2006). Antimicrobial Activity in The Egg Wax of The African Cattle Tick *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology*, 39(3–4), 297–313. <https://doi.org/10.1007/s10493-006-9014-5>
- Baks, T., Bruins, M. E., Matser, A. M., Janssen, A. E. M., & Boom, R. M. (2008). Effect of Gelatinization and Hydrolysis Conditions on the Selectivity of Starch Hydrolysis with  $\alpha$ -Amylase from *Bacillus licheniformis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(2), 488–495. <https://doi.org/10.1021/jf072217j>
- Beal, J., Haddock-Angelli, T., Gershater, M., Sanchania, V., Buckley-Taylor, R., Baldwin, G., Farny, N., Tennant, R., & Rutten, P. (2019). *Calibration Protocol-Plate Reader Abs600 (OD) Calibration with Microsphere Particles V.2 Forked from Calibration Protocol-Particle Standard Curve with Microspheres*. <https://doi.org/10.17504/protocols.io.549g8z6>
- Berk, Z. (2013). Centrifugation. Dalam *Food Process Engineering and Technology* (hlm. 241–257). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415923-5.00009-5>
- Bonnet, M., Lagier, J. C., Raoult, D., & Khelaifia, S. (2020). Bacterial Culture Through Selective and Non-Selective Conditions: The Evolution of Culture Media in Clinical Microbiology. *New Microbes and New Infections*, 34, 100622. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2019.100622>

- Brust, H., Orzechowski, S., & Fettke, J. (2020). Starch and glycogen analyses: Methods and techniques. *Biomolecules*, 10(7), 1–24. <https://doi.org/10.3390/biom10071020>
- 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>
- Daniel, J. C., V, S., & S, S. (2017). Influence of Media Components and pH on The Production of Alpha Amylase from *Bacillus sp.* SJC B03. *Indian Journal of Applied Microbiology*, 20(01), 55–62. <https://doi.org/10.46798/ijam.2017.v20i01.007>
- Dash, B. K., Rahman, M. M., & Sarker, P. K. (2015). Molecular Identification of a Newly Isolated *Bacillus subtilis* BI19 and Optimization of Production Conditions for Enhanced Production of Extracellular Amylase. *BioMed Research International*, 2015, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2015/859805>
- Deb, P., Talukdar, S. A., Mohsina, K., Sarker, P. K., & Sayem, S. A. (2013). Production and Partial Characterization of Extracellular Amylase Enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* P-001. *SpringerPlus*, 2(1), 154–165. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-154>
- Demirkan, E., Sevgi, T., & Başkurt, M. (2017). Optimization of Physical Factors Affecting the Production of the  $\alpha$ -Amylase from a Newly Isolated *Bacillus sp.* M10 Strain. *Karaelmas Fen ve Müh. Derg.*, 7(1), 23–30. <http://fbd.beun.edu.tr>
- Derakhti, S., Shojaosadati, S. A., Hashemi, M., & Khajeh, K. (2012). Process Parameters Study of  $\alpha$ -Amylase Production in a Packed-Bed Bioreactor Under Solid-State Fermentation With Possibility of Temperature Monitoring. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 42(3), 203–216. <https://doi.org/10.1080/10826068.2011.599466>
- Deshavath, N. N., Mukherjee, G., Goud, V. V., Veeranki, V. D., & Sastri, C. V. (2020). Pitfalls in the 3, 5-dinitrosalicylic Acid (DNS) Assay for The Reducing Sugars: Interference of Furfural and 5-hydroxymethylfurfural. *International Journal of Biological Macromolecules*, 156, 180–185. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.045>
- Dutta, P., Deb, A., & Majumdar, S. (2016). Optimization of the Medium for the Production of Extracellular Amylase by the *Pseudomonas stutzeri* ISL B5 Isolated from Municipal Solid Waste. *International Journal of Microbiology*, 2016, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2016/4950743>
- Errington, J., & Aart, L. T. van der. (2020). Microbe Profile: *Bacillus subtilis*: Model Organism for Cellular Development, and Industrial Workhorse. *Microbiology*, 166(5), 425–427. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000922>
- Fehler, A. O., Kallehauge, T. B., Geissler, A. S., González-Tortuero, E., Seemann, S. E., Gorodkin, J., & Vinther, J. (2022). Flagella Disruption in *Bacillus subtilis* Increases Amylase Production Yield. *Microbial Cell Factories*, 21(1), 131. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01861-x>
- Fincan, S. A., & Enez, B. (2022). Production of  $\alpha$ -Amylase from *Bacillus megaterium* MD-1. *Türk Doğa ve Fen Dergisi*. <https://doi.org/10.46810/tdfd.1170755>

- Fitriani, A., Supriyanti, F. M. T., & Heryanto, T. E. (2013). Penentuan Aktivitas Amilase Kasar Termofil *Bacillus subtilis* Isolat Kawah Gunung Darajat Garut, Jawa Barat. *Jurnal Ilmu-Ilmu Hayati dan Fisik*, 15(2), 107–113.
- 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>
- Frantz, E., Huang, J., Han, D., & Steckl, A. J. (2022). The Effect of Nutrient Broth Media on PEDOT:PSS Gated OECTs for Whole-Cell Bacteria Detection. *Biosensors and Bioelectronics: X*, 12, 100268. <https://doi.org/10.1016/j.biosx.2022.100268>
- Fukuda, N. (2023). Apparent Diameter and Cell Density of Yeast Strains with Different Ploidy. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-28800-z>
- Garg, D., & Kaur, D. M. (2013). Extraction, Purification and Characterization of Enzyme Amylase from *Bacillus amyloliquefaciens*. *International Journal of Advances in Engineering Science*, 3(3), 158–159.
- Goedecke, C. (2016). Why Does Iodine Turn Starch Blue? *ChemViews*. <https://doi.org/10.1002/chemv.201600103>
- Gu, Y., Xu, X., Wu, Y., Niu, T., Liu, Y., Li, J., Du, G., & Liu, L. (2018). Advances and Prospects of *Bacillus subtilis* Cellular Factories: From Rational Design to Industrial Applications. *Metabolic Engineering*, 50, 109–121. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.05.006>
- Harwood, C. R., Pohl, S., Smith, W., & Wipat, A. (2013). *Bacillus subtilis*. Model Gram-Positive Synthetic Biology Chassis. Dalam *Bacillus subtilis* (hlm. 87–117). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417029-2.00004-2>
- Hu, Q., & Liu, J. (2021). Production of  $\alpha$ -Amylase by *Bacillus subtilis* QM3 and its Enzymatic Properties. *Open Access Library Journal*, 08(03), 1–8. <https://doi.org/10.4236/oalib.1107291>
- Hudaya, A., Radiastuti, N., Sukandar, D., & Djajanegara, I. (2014). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Air Bunga Kecombrang Terhadap Bakteri *E. coli* dan *S. aureus* Sebagai Bahan Pangan Fungsional. *Jurnal Biologi*, 7(1), 9–15.
- Hussain, I., Siddique, F., Shahid Mahmood, M., & Ahmed, S. I. (2013). A Review of The Microbiological Aspect of  $\alpha$ -Amylase Production. *International Journal Of Agriculture and Biology*, 15, 1029–1034. <http://www.fspublishers.org>
- 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), 11–17. <https://journal.unesa.ac.id/index.php/risetbiologi>
- Jufri, R. F. (2020). The Effect of Environmental Factors on Microbial Growth. *Journal La Lifesci*, 01(01), 12–17. <https://media.neliti.com/media/publications/299344-the-effect-of-environmental-factors-on-m-fa9bc4e9.pdf>
- Kasuya, E. (2019). On the Use of  $r$  and  $r$  Squared in Correlation and Regression. *Ecological Research*, 34(1), 235–236. <https://doi.org/10.1111/1440-1703.1011>
- Khusniati, T., Trilestari, D. A., Yuningtyas, S., & Sulistiani. (2021). The Stability of Alpha-Amylase from *Leuconostoc Mesenteroides* EN 17-11 and *Lactobacillus Plantarum*

- B110 at Various Storage Times and Temperatures. *AIP Conference Proceedings*, 2331, 050015. <https://doi.org/10.1063/5.0041793>
- Kovács, Á. T. (2019). *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology*, 27(8), 724–725. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.03.008>
- Kumari, A., Singh, K., & M. Kayastha, A. (2012).  $\alpha$ -Amylase: General Properties, Mechanism and Biotechnological Applications - A Review. *Current Biotechnology*, 1(1), 98–107. <https://doi.org/10.2174/2211550111201010098>
- Lestari, P., Richana, N., & Masriani, R. (2013). Potential Use of an Extracellular Enzyme of  $\alpha$ -Amylase from Indigenous Indonesian Mesophilic Bacteria. *Indonesian Journal of Agricultural Science*, 14(1), 7. <https://doi.org/10.21082/ijas.v14n1.2013.p7-14>
- Liang, X., Gong, T., Chen, J.-J., Chen, T.-J., Yang, J. L., & Zhu, P. (2023). Influence of Long-Term Agar-Slant Preservation at 4 °C on the Recombinant Enzyme Activity of Engineered Yeast. *Fermentation*, 9(104), 1–11. <https://doi.org/10.3390/fermentation9020104>
- 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>
- Malarvizhi, R. C., & Subramanian, P. (2020). Formulation of Alternative and Cost Effective Growth Medium for Beneficial Microorganisms using Post Biomethanated Distillery Spentwash. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 9(2), 1557–1565. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2020.902.179>
- Mauliya, V. (2023). *Pengaruh Variasi pH Terhadap Aktivitas Enzim Amilase dari Bakteri Bacillus sp. [Skripsi]*. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Merck. (2005). *Microbiology Manual 12th Edition* (12 ed.). Merck. [www.laboquimia.es](http://www.laboquimia.es)
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Mobini-Dehkordi, M., & Afzal Javan, F. (2012). Application of Alpha-Amylase in Biotechnology. *Journal of Biology and Today's World*, 1(1), 39–50. <https://doi.org/10.15412/J.JBTW.01010104>
- Msarah, M. J., Ibrahim, I., Hamid, A. A., & Aqma, W. S. (2020). Optimization 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>
- Mustapha, M. T., Uzun Ozsahin, D., Uzun, B., & Ozsahin, I. (2021). Application of Fuzzy TOPSIS in The Sterilization of Medical Devices. Dalam I. Ozsahin, D. U. Ozsahin, & B. Uzun (Ed.), *Applications of Multi-Criteria Decision-Making Theories in Healthcare and Biomedical Engineering* (hlm. 197–216). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824086-1.00013-X>
- Nangin, D., & sutrisno, A. (2015). Enzim Amilase Pemecah Pati Mentah dari Mikroba: Kajian Pustaka. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, 3(3), 1032–1039.

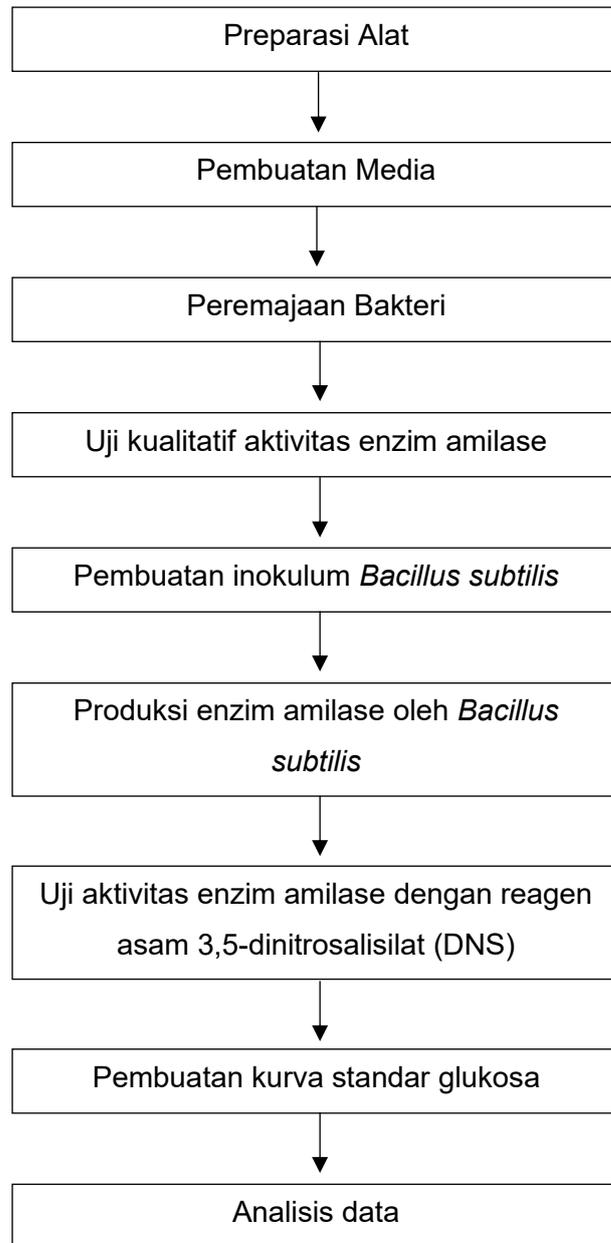
- Napitupulu, H. G., Rumengan, I. F. M., Wullur, S., Ginting, E. L., Rimper, J. R. T. S. L., & Toloh, B. H. (2019). *Bacillus sp.* As a Decomposition Agent in The Maintenance of *Brachionus rotundiformis* Which Uses Raw Fish as a Source of Nutrition. *Jurnal Ilmiah Platax*, 7(1), 158. <https://doi.org/10.35800/jip.7.1.2019.22627>
- 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), 42–49. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d220106>
- Özdemir, S., Matpan, F., Güven, K., & Baysal, Z. (2011). Production and Characterization of Partially Purified Extracellular Thermostable  $\alpha$ -Amylase by *Bacillus subtilis* In Submerged Fermentation (SMF). *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 41(4), 365–381. <https://doi.org/10.1080/10826068.2011.552142>
- Pathmanathan, S., Ravimannan, N., Sathyaruban, S., & Uthayasooryan, M. (2016). Formulation of Alternative Culture Media for Bacterial and Fungal Growth. *Der Pharmacia Lettre*, 8(1), 431–436. <https://www.researchgate.net/publication/298082374>
- Pesek, S., & Silaghi-Dumitrescu, R. (2024). The Iodine/Iodide/Starch Supramolecular Complex. *Molecules*, 29(3), 1–15. <https://doi.org/10.3390/molecules29030641>
- Pranay, K., Padmadeo, S. R., & Prasad, B. (2019). Production of Amylase from *Bacillus subtilis sp.* Strain KR1 Under Solid State Fermentation on Different Agrowastes. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 21, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101300>
- Precedences Research. (2022). *Enzymes Market Global Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends, Regional Outlook, and Forecast 2022 – 2030*. Precedence Research. <https://www.precedenceresearch.com/enzymes-market>
- Purwaningsih, D., & Wulandari, D. (2021). Uji Aktivitas Antibakteri Hasil Fermentasi Bakteri Endofit Umbi Talas (*Colocasia esculenta L*) terhadap Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. *Jurnal Sains dan Kesehatan*, 3(5), 750–759. <https://doi.org/10.25026/jsk.v3i5.622>
- Rajbhar, K., Dawda, H., & Mukundan, U. (2016). Quantitative Spectrophotometric Estimation of Specific Monosaccharides by DNSA Method. *International Journal of Research & Development Organisation*, 2(1), 112–126.
- Raul, D., Biswas, T., Mukhopadhyay, S., Kumar Das, S., & Gupta, S. (2014). Production and Partial Purification of Alpha Amylase from *Bacillus subtilis* (MTCC 121) Using Solid State Fermentation. *Biochemistry Research International*, 2014, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2014/568141>
- Ravindar, D. J., & Elangovan, N. (2013). Molecular Identification of Amylase Producing *Bacillus subtilis* and Detection of Optimal Conditions. *Journal of Pharmacy Research*, 6(4), 426–430. <https://doi.org/10.1016/j.jopr.2013.04.001>
- Robinson, P. K. (2015). Enzymes: Principles and Biotechnological Applications. *Essays in Biochemistry*, 59, 1–41. <https://doi.org/10.1042/bse0590001>
- Santamaria-Echart, A., Fernandes, I., Barreiro, F., Corcuera, M. A., & Eceiza, A. (2021). Advances in Waterborne Polyurethane and Polyurethane-urea Dispersions and Their Eco-friendly Derivatives: A Review. *Polymers*, 13(3), 1–32. <https://doi.org/10.3390/polym13030409>

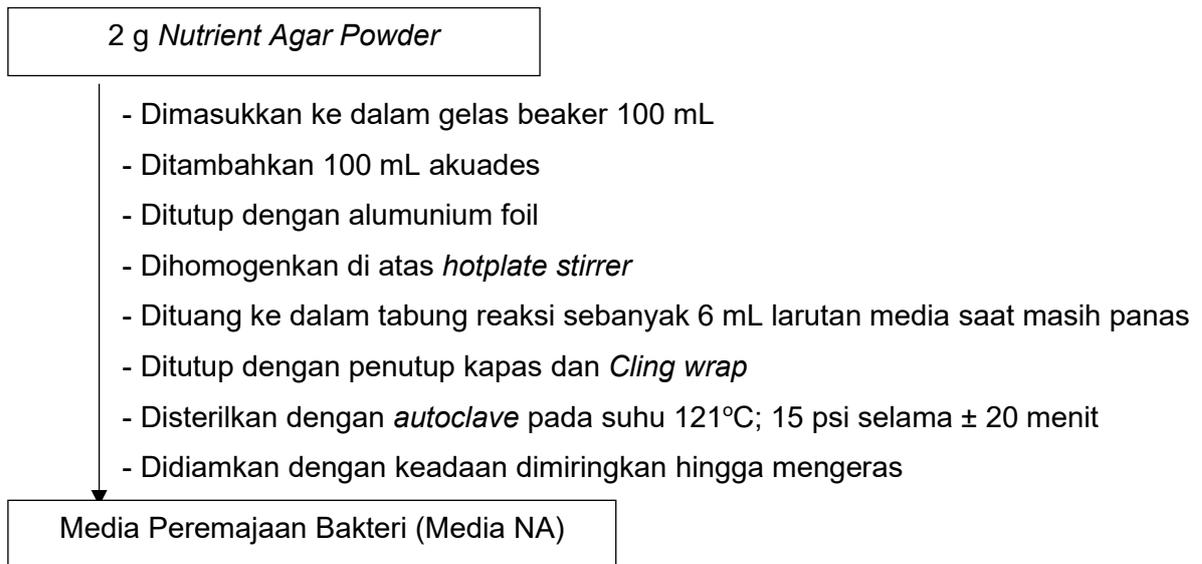
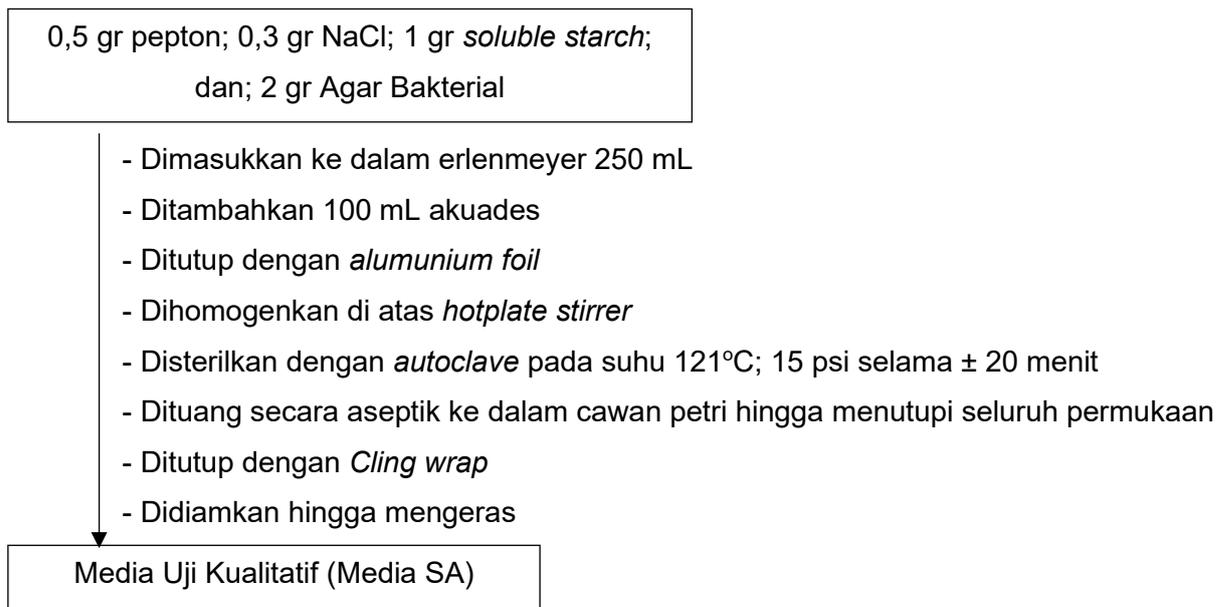
- Shukla, K., Singh, P., Singh Mahatma, R., Chitrakoot, G., Vishwavidyalaya, G., & Sharma, R. (2015). Amylases: an Overview with Special Reference to Alpha Amylase. Dalam *Article in Journal of Global Biosciences*. www.mutagens.co.in
- Siddiquee, S. (2017). The Basic Concept of Microbiology. Dalam *Practical Handbook of the Biology and Molecular Diversity of Trichoderma Species from Tropical Regions* (1 ed., hlm. 1–15). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-64946-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-64946-7_1)
- Sidorova, T. M., Asaturova, A. M., Homyak, A. I., Zhevnova, N. A., Shternshis, M. V., & Tomashevich, N. S. (2020). Optimization of Laboratory Cultivation Conditions for The Synthesis of Antifungal Metabolites by *Bacillus Subtilis* strains. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(7), 1879–1885. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.05.002>
- 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>
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., & Mehta, P. K. (2016). Microbial Enzymes: Industrial Progress in 21st Century. 3 *Biotech*, 6(2), 174. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0485-8>
- Souza, P. M. de, & Magalhães, P. de O. e. (2010). Application of Microbial  $\alpha$ -Amylase in Industry - A Review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(4), 850–861. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000400004>
- Stevenson, K., McVey, A. F., Clark, I. B. N., Swain, P. S., & Pilizota, T. (2016). General Calibration of Microbial Growth in Microplate Readers. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep38828>
- Su, Y., Liu, C., Fang, H., & Zhang, D. (2020). *Bacillus subtilis*: a Universal Cell Factory for Industry, Agriculture, Biomaterials and Medicine. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 173. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01436-8>
- Susilawati, I. O., Batubara, U. M., & Riany, H. (2015). Analisis Aktivitas Enzim Amilase yang Berasal Dari Bakteri Tanah di Kawasan Universitas Jambi. *Semirata: Bidang MIPA BKS-PTN Barat*, 4(1), 359–367.
- Taniguchi, H., & Honnda, Y. (2009). Amylases. Dalam *Encyclopedia of Microbiology* (hlm. 159–173). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00130-9>
- Tim Penyempurnaan Terjemahan Al-Qur'an. (2019). Terjemahan Al-Qur'an Edisi Penyempurnaan. Dalam *Alquran dan tafsirnya* (1 ed., Nomor 6). Lajnah Pentashihan Mushaf Al-Qur'an.
- Tvarijonaviciute, A., Escribano, D., Tecles, F., Cerón, J. J., Cugat, R., Lamy, E., Damia, E., Rubio, M., P Rubio, C., & Barranco, T. (2019). Changes of Salivary Biomarkers Under Different Storage Conditions: Effects of Temperature and Length of Storage. *Biochemia medica*, 29(1), 94–111. <https://doi.org/10.11613/BM.2019.010706>
- Wang, H., Ren, T., Xu, Y., Xie, C., & Ni, Y. (2022). Studies on Calibration of Shaking Incubator. 2022 5th World Conference on Mechanical Engineering and Intelligent Manufacturing (WCMEIM), 917–922. <https://doi.org/10.1109/WCMEIM56910.2022.10021556>

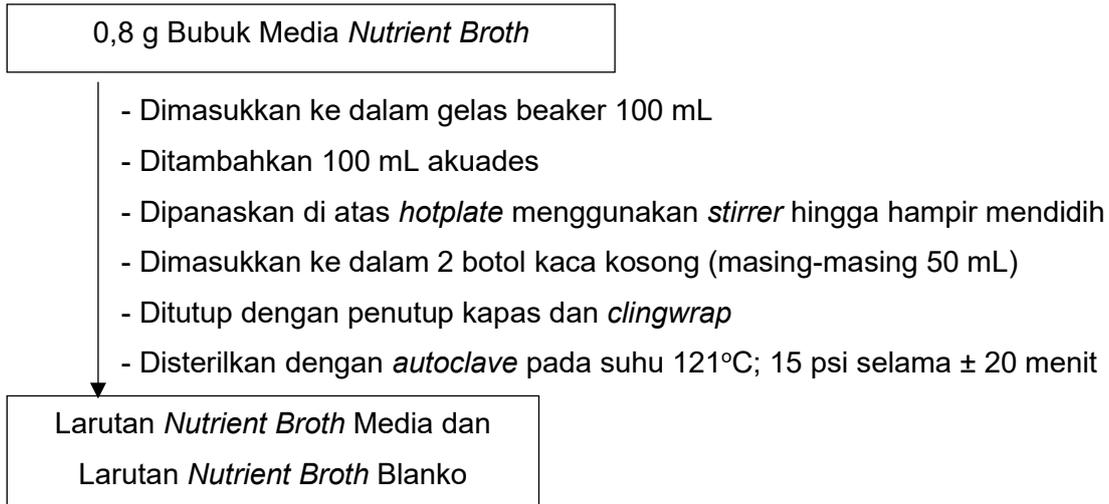
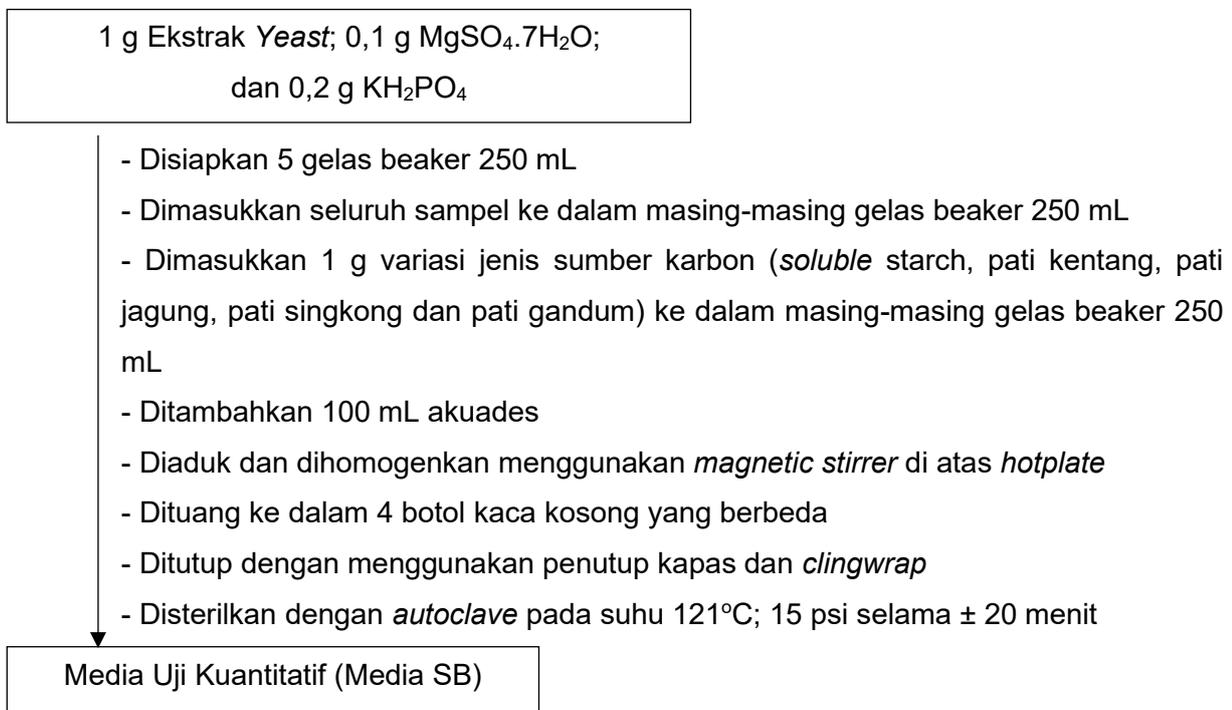
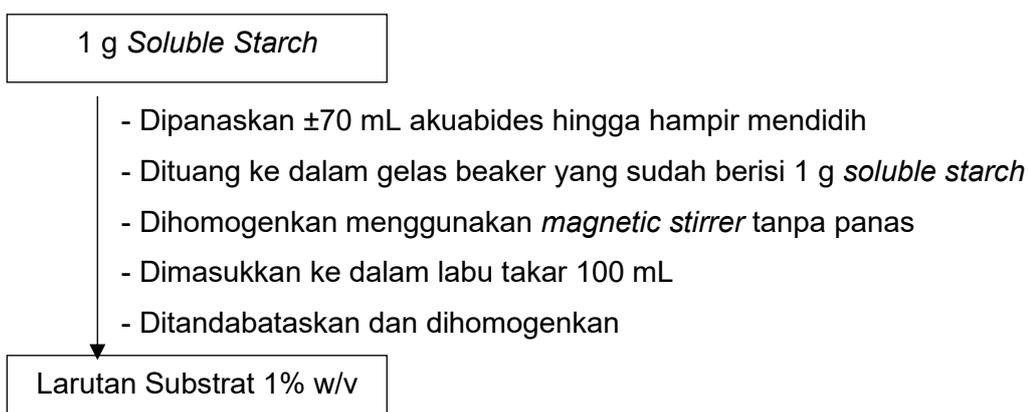
- Zakaria, N. H., Muhammad, N., & Abdullah, M. M. A. B. (2017). Potential of Starch Nanocomposites for Biomedical Applications. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 209(1), 012087. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/209/1/012087>
- Zalma, S. A., & El-Sharoud, W. M. (2021). Diverse Thermophilic Bacillus Species with Multiple Biotechnological Activities are Associated within The Egyptian Soil and Compost Samples. *Science Progress*, 104(4), 1–12. <https://doi.org/10.1177/00368504211055277>
- Zhang, Q., Han, Y., & Xiao, H. (2017). Microbial  $\alpha$ -Amylase: A Biomolecular Overview. *Process Biochemistry*, 53, 88–101. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.11.012>
- Zimbro, M. J., & Power, D. A. (2009). *Difco & BBL Manual: Manual of Microbiological Culture Media* (M. J. Zimbro, D. A. Power, S. M. Miller, G. E. Wilson, & J. A. Johnson, Ed.; 2 ed.). Becton Dickinson and Company. [https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwix9fP53OGAAxUs8zgGHWY8BZUQFnoECCUQAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.bd.com%2Fdocuments%2Fguides%2Fuser-guides%2FDS\\_CM\\_Difco-and-BBL-culture-media-manual\\_UG\\_EN.pdf&usg=AOvVaw3x6A6uAcaHVZ1NF9y](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwix9fP53OGAAxUs8zgGHWY8BZUQFnoECCUQAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.bd.com%2Fdocuments%2Fguides%2Fuser-guides%2FDS_CM_Difco-and-BBL-culture-media-manual_UG_EN.pdf&usg=AOvVaw3x6A6uAcaHVZ1NF9y)

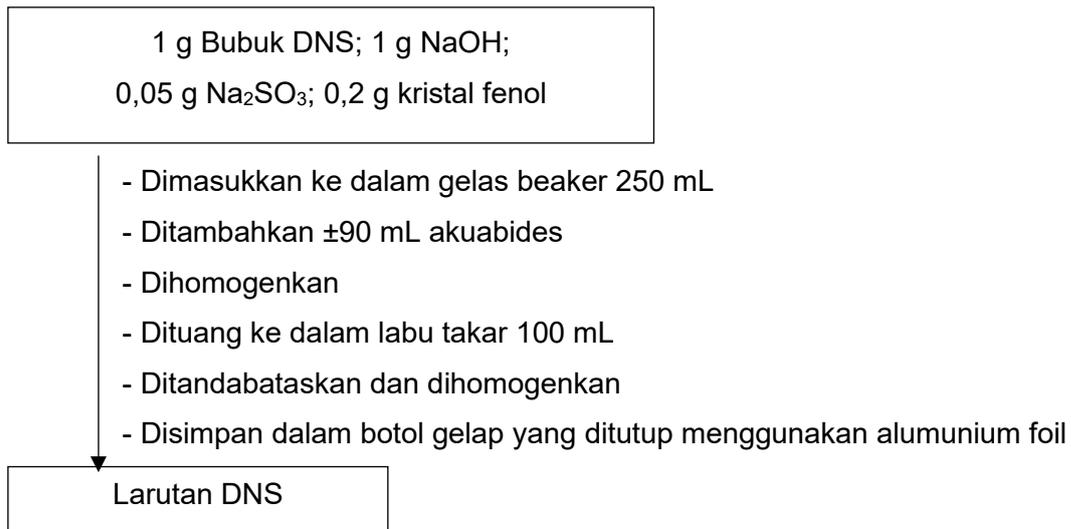
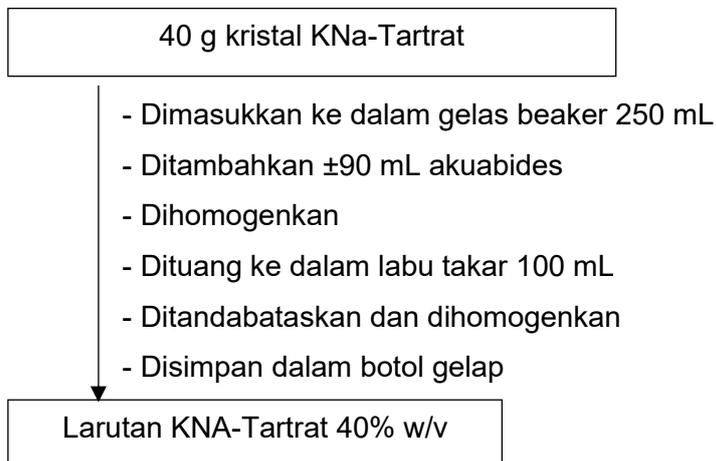
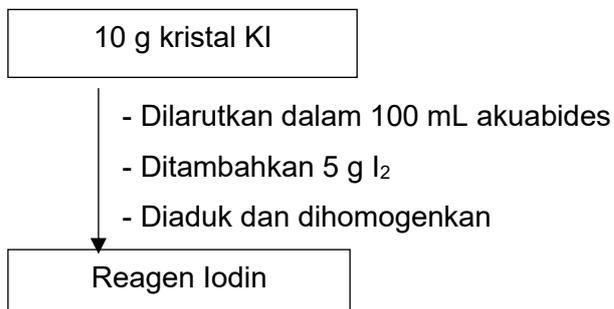
## LAMPIRAN

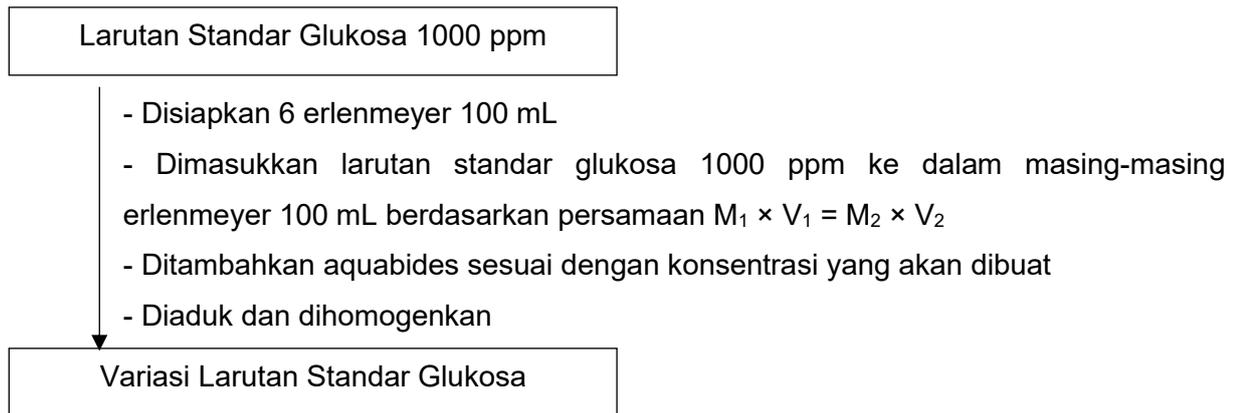
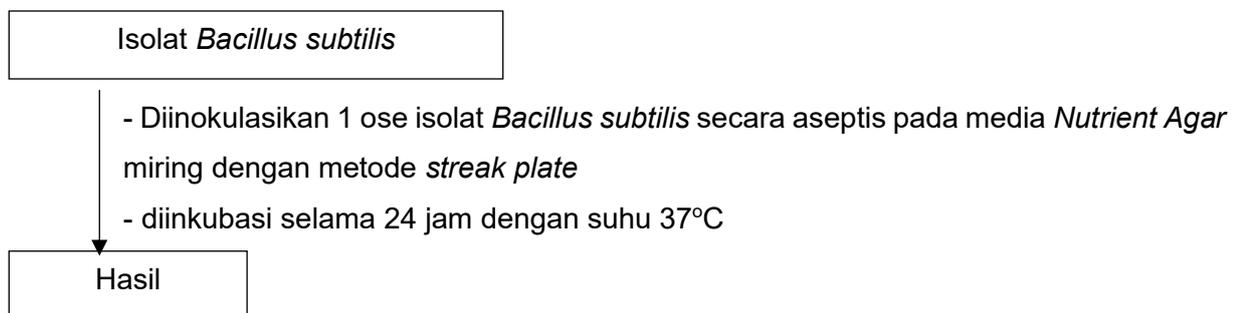
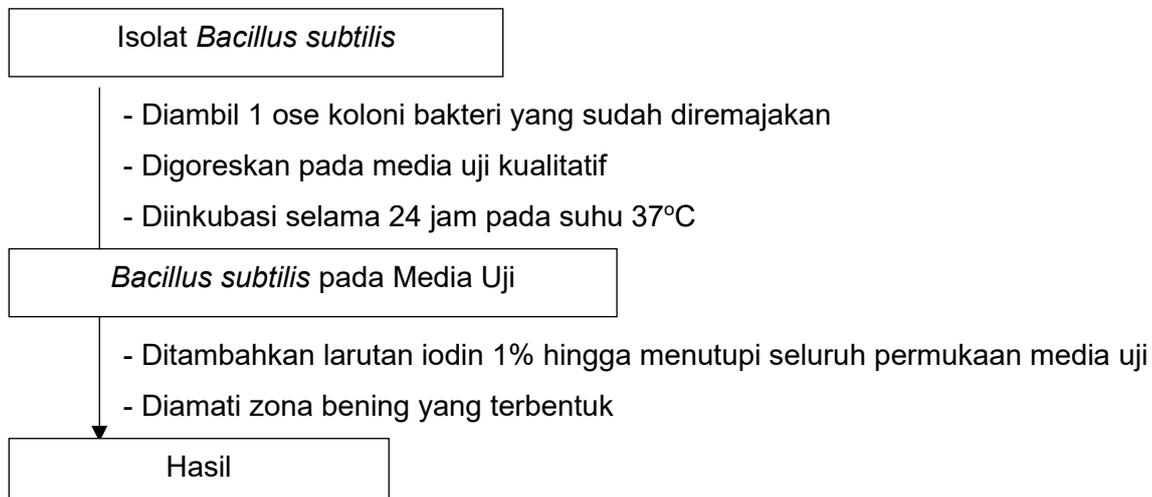
### Lampiran 1. Rancangan Penelitian



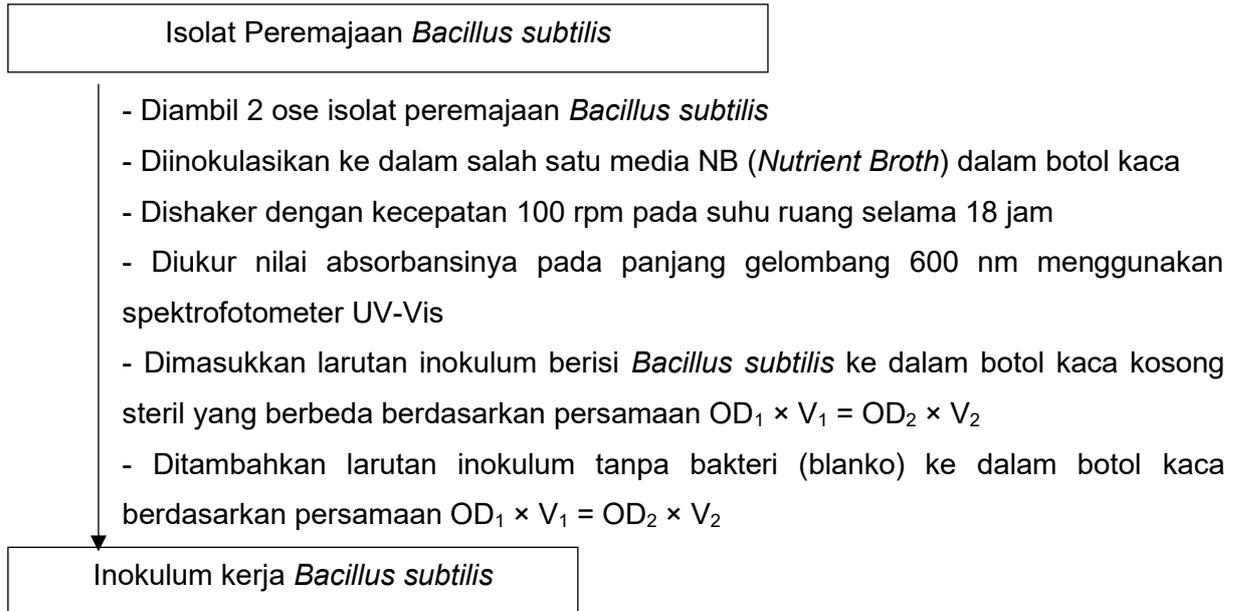
**Lampiran 2. Diagram Alir****Lampiran 2.1. Pembuatan Media Peremajaan Bakteri****Lampiran 2.2 Pembuatan Media Uji Kualitatif (*Starch Agar*)**

**Lampiran 2.3** Pembuatan Media Inokulum dengan Menggunakan *Nutrient Broth* (NB)**Lampiran 2.4** Pembuatan Media Uji Aktivitas Enzim Amilase (*Starch Broth*)**Lampiran 2.5** Pembuatan Larutan Substrat 1% w/v

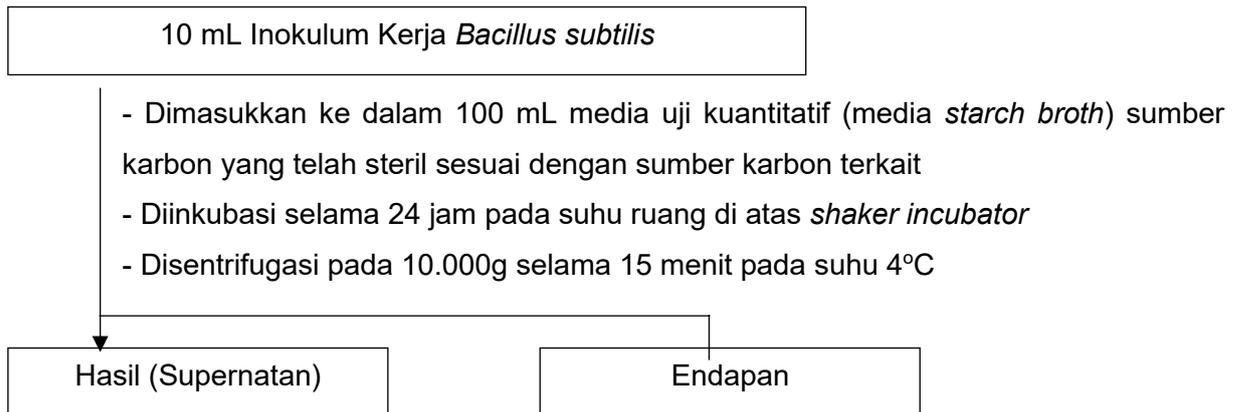
**Lampiran 2.6** Pembuatan Reagen DNS**Lampiran 2.7** Larutan KNa-Tartrat 40% w/v**Lampiran 2.8** Reagen Iodin

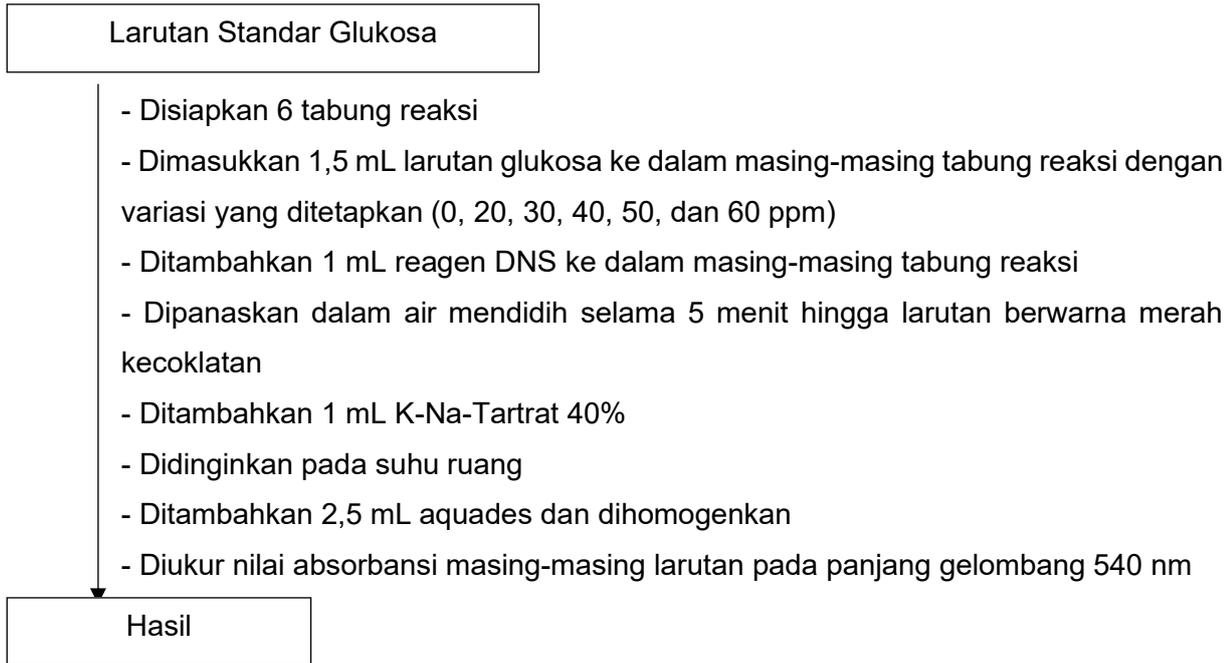
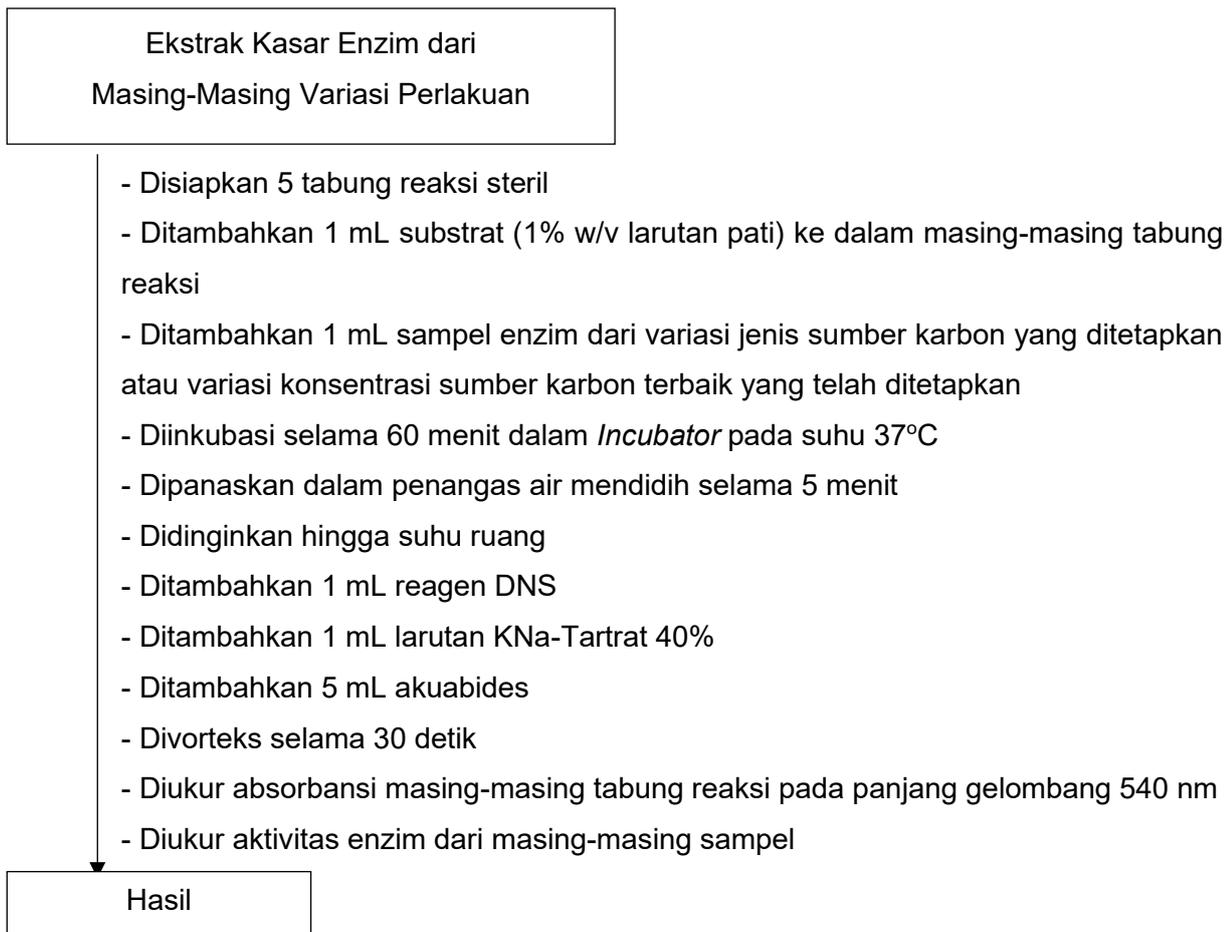
**Lampiran 2.9** Larutan Standar Glukosa**Lampiran 2.10** Peremajaan Bakteri**Lampiran 2.11** Uji Kualitatif Aktivitas Enzim Amilase dengan Reagen Iodida

### Lampiran 2.12 Pembuatan Inokulum *Bacillus subtilis* dengan *Optical Density* 0,5



### Lampiran 2.13 Produksi Enzim Amilase dari *Bacillus subtilis*



**Lampiran 2.14** Pembuatan Kurva Standar Glukosa**Lampiran 2.15** Uji Kuantitatif Aktivitas Enzim Amilase dengan Metode DNS

### Lampiran 3. Perhitungan dan Pembuatan Larutan

#### Lampiran 3.1. Pembuatan Media Inokulum $OD_{600} = 0,5$

Inokulum kerja yang digunakan memiliki konsentrasi  $OD_{600} = 0,5$ . Pengukuran OD yang diperoleh dari spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 600 nm disesuaikan berdasarkan persamaan  $Kons_1 \times Vol_1 = Kons_2 \times Vol_2$  dimana  $Kons_1$  adalah konsentrasi *Bacillus subtilis* inokulum media yang setara dengan absorbansinya;  $Vol_1$  adalah volume bakteri yang harus diambil dari inokulum media;  $Kons_2$  adalah konsentrasi bakteri yang diharapkan yakni 0,5;  $Vol_2$  adalah volume inokulum kerja yang diharapkan yakni 50 mL. Jika diasumsikan penulis mendapatkan nilai absorbansi 1,5018 maka, perhitungan yang harus dilakukan adalah (Beal dkk., 2019; Fukuda, 2023; Stevenson dkk., 2016):

Volume inokulum media yang harus diambil

$$\begin{aligned} Vol_1 &= \frac{Kons_2 \times Vol_2}{Kons_1} \\ &= \frac{0,5 \times 50 \text{ mL}}{1,5018} \\ &= 16,647 \text{ mL} \end{aligned}$$

Volume inokulum blanko yang harus diambil

$$\begin{aligned} \text{Vol. inokulum Blanko} &= \text{vol. inokulum kerja} - Vol_1 \text{ (Volume inokulum media)} \\ &= 50 \text{ mL} - 16,647 \text{ mL} \\ &= 33,353 \text{ mL} \end{aligned}$$

### Lampiran 3.2 Pembuatan Larutan dan Reagen

#### Lampiran 3.2.1 Larutan KNa-Tartrat 40%

Larutan K-Na-Tartrat 40% dibuat dengan melarutkan 40 g padatan larutan KNa-Tartrat dalam 100 mL aquabides dalam erlenmeyer 250 mL (Nisa dkk., 2020).

#### Lampiran 3.2.2 Reagen DNS

Reagen DNS dibuat dengan melarutkan 1 g bubuk 3,5-dinitrosalisilat; 1 g NaOH; 0,05 g  $Na_2SO_3$ ; dan 0,2 g fenol dalam 100 mL akuades serta dihomogenkan dan ditandabatkan menggunakan labu takar 100 mL. Reagen DNS dimasukkan dalam botol gelap dan disimpan di dalam kulkas (Mauliya, 2023).

#### Lampiran 3.2.3 Reagen Iodin

Reagen Iodin dibuat dengan melarutkan 10 g kalium iodida ke dalam 100 mL aquades kemudian ditambahkan 5 g iodin ke dalam larutan tersebut. Seluruh larutan dibuat di dalam gelas beaker 250 mL (Daniel dkk., 2017).

### Lampiran 3.2.4 Larutan Glukosa Standar

Larutan glukosa baku (1000 ppm) dibuat dengan melarutkan 0,1 g glukosa dalam 100 mL akuabides. Kemudian larutan glukosa baku ditandabatkan dan dihomogenkan menggunakan labu takar 100 mL. Kemudian untuk membuat variasi konsentrasi larutan glukosa, dapat menggunakan persamaan pengenceran yakni  $M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$ , dimana  $M_1$  adalah konsentrasi glukosa baku (1000 ppm);  $V_1$  adalah volume glukosa baku;  $M_2$  adalah Konsentrasi larutan glukosa yang diinginkan;  $V_2$  adalah volume larutan glukosa yang diinginkan. Penulis menggunakan labu takar 10 mL sebagai acuan volume larutan glukosa yang diinginkan dengan perhitungan sebagai berikut:

Larutan Glukosa Standar 40 ppm

$$\begin{aligned} 1000 \text{ ppm} \times V_1 &= 40 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL} \\ V_1 &= \frac{40 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL}}{1000 \text{ ppm}} \\ &= 0,4 \text{ mL} \end{aligned}$$

Larutan Glukosa Standar 60 ppm

$$\begin{aligned} 1000 \text{ ppm} \times V_1 &= 60 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL} \\ V_1 &= \frac{60 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL}}{1000 \text{ ppm}} \\ &= 0,6 \text{ mL} \end{aligned}$$

Larutan Glukosa Standar 80 ppm

$$\begin{aligned} 1000 \text{ ppm} \times V_1 &= 80 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL} \\ V_1 &= \frac{80 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL}}{1000 \text{ ppm}} \\ &= 0,8 \text{ mL} \end{aligned}$$

Larutan Glukosa Standar 100 ppm

$$\begin{aligned} 1000 \text{ ppm} \times V_1 &= 100 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL} \\ V_1 &= \frac{100 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL}}{1000 \text{ ppm}} \\ &= 1,0 \text{ mL} \end{aligned}$$

Larutan Glukosa Standar 120 ppm

$$\begin{aligned} 1000 \text{ ppm} \times V_1 &= 120 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL} \\ V_1 &= \frac{120 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL}}{1000 \text{ ppm}} \\ &= 1,2 \text{ mL} \end{aligned}$$

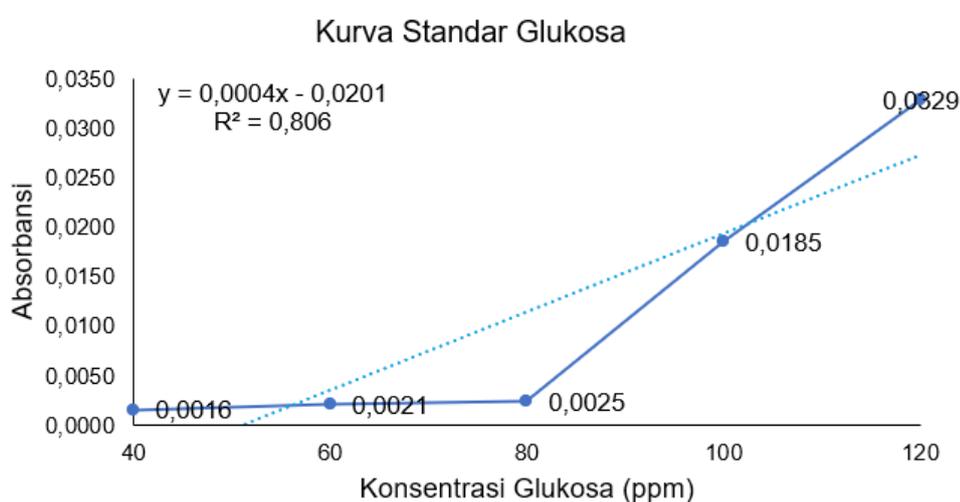
#### Lampiran 4. Pembuatan Kurva Standar Glukosa

Kurva standar glukosa adalah garis regresi linear dari nilai absorbansi (sumbu y) dengan variasi konsentrasi glukosa (sumbu x). Data nilai absorbansi dan konsentrasi glukosa yang digunakan adalah sebagai berikut:

**Tabel L.4** Nilai hasil pengukuran absorbansi untuk pembuatan kurva standar

Konsentrasi Glukosa (ppm)	Nilai Absorbansi
40	0,0016
60	0,0021
80	0,0025
100	0,0185
120	0,0329

Berdasarkan data tersebut diperoleh kurva standar glukosa sebagai berikut:



**Gambar L.4** Kurva standar glukosa

#### Lampiran 5. Pengukuran Absorbansi Sampel

Data nilai absorbansi dari sampel larutan glukosa yang berhasil dipecah oleh enzim amilase yang dihasilkan oleh *Bacillus subtilis* dengan variasi sumber karbon adalah sebagai berikut:

**Tabel L.5** Nilai hasil pengukuran absorbansi variasi jenis sumber karbon

Jenis Sumber Karbon	Nilai Absorbansi		
	Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III
<i>Soluble Starch</i>	0,0048	0,0038	0,0048
Kentang	0,0057	0,0067	0,0071
Jagung	0,0040	0,0030	0,0035
Singkong	0,0047	0,0046	0,0051
Gandum	0,0044	0,0060	0,0059

**Lampiran 6.** Perhitungan Konsentrasi Glukosa dan Aktivitas Enzim Amilase

Konsentrasi glukosa dan nilai absorbansi larutan dihubungkan oleh persamaan regresi linear dari kurva standar glukosa yang diperoleh dari lampiran 4 dimana sumbu y merepresentasikan nilai absorbansi sedangkan sumbu x merepresentasikan konsentrasi glukosa. Persamaan regresi yang diperoleh adalah  $y = bx \pm a$  sehingga konsentrasi yang diperoleh adalah:

$$y = bx \pm a$$

$$x = \frac{y \pm a}{b}$$

Berdasarkan persamaan tersebut diperoleh konsentrasi glukosa sebagai berikut:

**Tabel L.6.1** Konsentrasi (ppm) dari variasi jenis sumber karbon

Jenis Sumber Karbon	Konsentrasi (ppm)		
	Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III
<i>Soluble Starch</i>	62,9873	60,4557	62,9873
Kentang	65,2658	67,7975	68,8101
Jagung	60,9620	58,4304	59,6962
Singkong	62,7342	62,4810	63,7468
Gandum	61,9747	66,0253	65,7722

Aktivitas Enzim amilase diperoleh menggunakan persamaan,

$$\text{Aktivitas Enzim} = \frac{\text{Konsentrasi Glukosa}}{\text{Berat Molekul} \times \text{waktu inkubasi}} \times \frac{\text{Volume Total}}{\text{Volume Enzim}}$$

dengan berat molekul glukosa adalah  $180,163 \text{ g/mol}$ ; waktu inkubasi adalah 60 menit; volume total adalah 10 mL; volume enzim adalah 1 mL; sehingga diperoleh nilai aktivitas enzim dengan satuan  $\text{U mL}^{-1}$  sebagai berikut:

**Tabel L.6.2** Aktivitas enzim ( $\text{U mL}^{-1}$ ) dari variasi jenis sumber karbon

Jenis Sumber Karbon	Aktivitas Enzim Amilase ( $\text{U mL}^{-1}$ )			
	Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III	Rata-Rata
<i>Soluble Starch</i>	0,0117	0,0112	0,0117	0,0115
Kentang	0,0121	0,0125	0,0127	0,0125
Jagung	0,0113	0,0108	0,0110	0,0110
Singkong	0,0116	0,0116	0,0118	0,0117
Gandum	0,0115	0,0122	0,0122	0,0120

## Lampiran 7. Hasil Statistik *One Way ANOVA*

### Descriptives

Aktivitas Enzim

	N	Mean	Std Deviation	Std Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
<i>Soluble Starch</i>	3	0,01153	0,00029	0,00017	0,01082	0,01225	0,01120	0,01170
Pati Kentang	3	0,01243	0,00031	0,00018	0,01167	0,01319	0,01210	0,01270
Pati Jagung	3	0,01103	0,00025	0,00015	0,01041	0,01166	0,01080	0,01130
Pati Singkong	3	0,01167	0,00012	0,00007	0,01138	0,01195	0,01160	0,01180
Pati Gandum	3	0,01197	0,00040	0,00023	0,01096	0,01297	0,01150	0,01220
Total	15	0,01173	0,00054	0,00014	0,01143	0,01203	0,01080	0,01270

### Tests of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Aktivitas Enzim	Based on Mean	1,526	4	10	0,267
	Based on Median	0,180	4	10	0,943
	Based on Median and with adjusted df	0,180	4	5,817	0,940
	Based on trimmed mean	1,319	4	10	0,328

### ANOVA

Aktivitas Enzim

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	0,000	4	0,000	9,708	0,002
Within Groups	0,000	10	0,000		
Total	0,000	14			

### Aktivitas Enzim

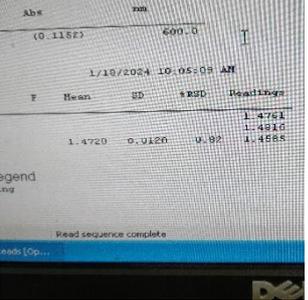
Tukey HSD<sup>a</sup>

JenisSumberKarbon	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Pati Jagung	3	0,01103		
Soluble Starch	3	0,01153	0,01153	
Pati Singkong	3	0,01167	0,01167	0,01167
Pati Gandum	3		0,01197	0,01197
Pati Kentang	3			0,01243
Sig.		0,126	0,405	0,053

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

## Lampiran 8. Dokumentasi

 <p>Media Nutrient Agar Miring</p>	 <p>Hasil Peremajaan Bakteri <i>Bacillus subtilis</i></p>	 <p>Media Uji Kualitatif (Media <i>Starch Agar</i>)</p>																								
 <p>Hasil Uji Kualitatif</p>	 <p>Media Nutrient Broth (Inokulum Media dan Blanko)</p>	 <table border="1"> <thead> <tr> <th>Abx</th> <th>nm</th> <th>Mean</th> <th>SD</th> <th>RESD</th> <th>Reading</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>(0.1182)</td> <td>600.0</td> <td>1.4720</td> <td>0.0126</td> <td>0.92</td> <td>1.4761</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>1.4816</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>1.4588</td> </tr> </tbody> </table> <p>Pengukuran Nilai OD Bakteri</p>	Abx	nm	Mean	SD	RESD	Reading	(0.1182)	600.0	1.4720	0.0126	0.92	1.4761						1.4816						1.4588
Abx	nm	Mean	SD	RESD	Reading																					
(0.1182)	600.0	1.4720	0.0126	0.92	1.4761																					
					1.4816																					
					1.4588																					
 <p>Media <i>Nutrient Broth</i> (Inokulum Kerja)</p>	 <p>Media <i>Starch Broth</i> untuk Produksi Enzim Amilase</p>	 <p>Inkubasi media <i>Starch Broth</i> pada <i>shaker Incubator</i></p>																								
 <p>Proses ekstraksi enzim kasar dari media <i>Starch</i> <i>Broth</i></p>	 <p>Ekstrak Enzim Kasar</p>	 <p>Uji Kuantitatif Ekstrak Kasar Enzim dari Masing-Masing Variasi</p>																								

