

**PENGARUH VOLUME TERHADAP AKTIVITAS ENZIM AMILASE
YANG DIHASILKAN OLEH *Bacillus subtilis***

SKRIPSI

**Oleh:
FAIZAH FITRI AMALIA
NIM. 17630103**



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

**PENGARUH VOLUME TERHADAP AKTIVITAS ENZIM AMILASE
YANG DIHASILKAN OLEH *Bacillus subtilis***

SKRIPSI

**Oleh:
FAIZAH FITRI AMALIA
NIM. 17630103**

**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**

**PENGARUH VOLUME TERHADAP AKTIVITAS ENZIM AMILASE YANG
DIHASILKAN OLEH *Bacillus subtilis***

SKRIPSI

Oleh:
FAIZAH FITRI AMALIA
NIM. 17630103

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diajui
Tanggal : 20 Juni 2024

Pembimbing I



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

Pembimbing II



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

Mengetahui,
Kepala Program Studi


Rachmawati Angsti, M.Si
NIP. 19810801 200801 2 010

**PENGARUH VOLUME TERHADAP AKTIVITAS ENZIM AMILASE YANG
DIHASILKAN OLEH *Bacillus subtilis***

SKRIPSI

Oleh:
FAIZAH FITRI AMALIA
NIM. 17630103

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 20 Juni 2024

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

Mengetahui,
Ketua Program Studi


Rachmatwati Ningsih, M.Si
NIP. 19810811 200801 2 010

LEMBAR PERSEMBAHAN

بسم الله الرحمن الرحيم

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. Puji syukur Alhamdulillahirabbil alamin saat ini penulis telah menyelesaikan penulisan tugas akhir dalam bentuk skripsi ini untuk melengkapi persyaratan mendapatkan gelar Sarjana Sains (S.Si). Tulisan ini saya persembahkan kepada seseorang yang selalu mengingatkan saya betapa berartinya kehidupan ini yang menjadikan saya selalu yang pertama dalam hidup saya ia adalah “Suami”. Kedua, kepada mereka “Soda Gembira” yang selalu menyemangati dan membantu saya dalam keadaan titik terendah dan dalam keadaan optimal saya. Terakhir kata, kupersembahkan hasil karya ilmiah ini untuk masa depan saya semoga dengan adanya karya ilmiah ini bisa bermanfaat bagi pembaca

PERNYATAAN PERNYATAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Faizah Fitri Amalia
NIM : 17630103
Fakultas/Jurusan : Sains dan Teknologi/Kimia
Judul Penelitian : Pengaruh Volume Terhadap Aktivitas Enzim Amilase yang
Dihasilkan Oleh *Bacillus Subtiltis*

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa hasil penelitian saya ini tidak terdapat unsur-unsur penjiplakan karya penelitian atau karya ilmiah yang pernah dilakukan atau dibuat oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata hasil penelitian ini terbukti terdapat unsur-unsur jiplakan, maka saya bersedia untuk mempertanggungjawabkan, serta diproses sesuai peraturan yang berlaku.

Malang, 25 Juni 2024
Yang Membuat Pernyataan,


Faizah Fitri Amalia
NIM. 17630103

KATA PENGANTAR

Puji Syukur alhamdulillah atas kehadiran Allah SWT, atas Ridho, Inayah dan atas izin dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Skripsi ini. Shalawat dan salam penulis haturkan kepada Nabi Muhammad SAW yang selalu menyebarkan dan mengembangkan ajaran Islam kepada umatnya.

Selanjutnya, penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih yang tak terhingga kepada semua pihak yang telah membantu kelancaran penyusunan Skripsi ini, baik berupa dorongan moril maupun materiil. Penulis yakin tanpa bantuan dan dukungan tersebut, sulit rasanya bagi penulis untuk menyelesaikan Skripsi ini. Dengan ini, penulis ingin menyampaikan ucapan terimakasih dan penghargaan setinggi-tingginya kepada:

1. Kedua orang tua penulis tercinta serta keluarga yang telah memberikan dukungan moral, berupa do'a, dan nasihat sehingga penyusunan Skripsi ini dapat terselesaikan.
2. Prof. Dr. H. M. Zainuddin, MA, selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. 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. Karena atas bimbingan, pengarahan, kesabaran, dan motivasinya penyusunan Skripsi ini dapat terselesaikan.
6. Akyunul Jannah, M.Si., M.P, selaku Dosen pembimbing II yang telah sabar dalam membantu dan membimbing penyusunan Skripsi ini. Segenap *civitas* akademika Program Studi Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
7. Teman-teman Program Studi Kimia angkatan 2017, terkhusus suami saya yang paling berpengaruh dalam memberi saya motivasi dalam pengerjaan skripsi ini.

Sebagai seorang manusia “*Al-insanu makanul khotu’ wannisyan*” manusia tempatnya salah dan lupa dan dengan keterbatasan ilmu pengetahuan yang dikuasai, penulis menyadari bahwa dalam penulisan Skripsi ini masih sangat jauh dari kata sempurna sehingga membutuhkan kritik, saran, dan bimbingan yang bersifat membangun. Akhir kata penulis berharap semoga Skripsi ini dapat bermanfaat khususnya bagi penulis sendiri maupun pembaca. Terima kasih.

Malang, 25 Juni 2024

Penulis

MOTTO

“Jangan Pernah Lelah untuk berbuat baik”

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	Error! Bookmark not defined.
HALAMAN PENGESAHAN	Error! Bookmark not defined.
LEMBAR PERSEMBAHAN	iv
PERNYATAAN PERNYATAN KEASLIAN TULISAN	Error! Bookmark not defined.
KATA PENGANTAR	vi
MOTTO	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
ABSTRAK	xiv
ABSTRACT	xv
مستخلص البحث	xvi
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
1.5 Batasan Masalah	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Enzim Amilase	6
2.2 Aplikasi Enzim Amilase	7
2.3 Bacillus subtilis dan Kajian Al-Qur'an	8
2.4 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim Amilase	9
2.5 Pati	10
2.6 Pengujian Aktivitas Enzim Amilase	12
2.7 Media NA	13
2.8 Media NB	13
BAB III METODE PENELITIAN	14
3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan	14
3.2 Alat dan Bahan Penelitian	14
3.2.1 Alat	14
3.2.2 Bahan	14
3.3 Rancangan Penelitian	14

3.4 Tahapan Penelitian	15
3.5 Pelaksanaan Penelitian	15
3.5.1 Sterilisasi Alat	15
3.2.3 Pembuatan Media	16
3.5.3 Peremajaan Bakteri <i>Bacillus subtilis</i>	17
3.5.4 Uji Kualitatif <i>Bacillus subtilis</i>	17
3.5.5 Pembuatan Inokulum <i>Bacillus subtilis</i>	17
3.5.6 Produksi Enzim Amilase	18
3.5.7 Pembuatan Kurva Standar Glukosa	18
3.5.8 Uji Aktivitas Enzim Amilase Terhadap Pengaruh Volume	18
3.5.9 Analisis Data	19
BAB IV PEMBAHASAN.....	20
4.1 Peremajaan Bakteri <i>Bacillus subtilis</i> dan Kajian dalam Islam.....	20
4.2 Uji Kualitatif <i>Bacillus subtilis</i>	22
4.3 Produksi Enzim Amilase	23
4.4 Kurva Standart Glukosa	24
4.5 Uji Aktivitas Enzim Amilase <i>Bacillus subtilis</i>	25
BAB V PENUTUP.....	29
5.1 Kesimpulan	29
5.2 Saran.....	29
DAFTAR PUSTAKA.....	30
LAMPIRAN.....	34

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1 Pengaruh volume terhadap aktivitas enzim amilase	15
Tabel 4.1 Aktivitas Enzim Variasi Volume	27
Tabel 4.2 Hasil Uji lanjut beda nyata jujur (Tukey')	28

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Struktur Amilase.....	6
Gambar 2.2 Struktur Amilosa	11
Gambar 2.3 Struktur Amilopektin pada Pati	11
Gambar 4.1 Peremajaan Bakteri	20
Gambar 4.2 Hasil Uji Kualitatif <i>Bacillus subtilis</i>	23
Gambar 4.3 Kurva Standart Glukosa	25
Gambar 4.4 Hidrolisis Pati.....	26
Gambar 4.5 Aktivitas Enzim di berbagai volume	27

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Rancangan Penelitian.....	34
Lampiran 2. Diagram Alir	35
Lampiran 3. Perhitungan dan Pembuatan Larutan	37
Lampiran 4. Kurva Standar Glukosa.....	39
Lampiran 5. Pengukuran Absorbansi Sampel	40
Lampiran 6. Konsentrasi Glukosa	40
Lampiran 7. Perhitungan Aktivitas Enzim Amilase	41
Lampiran 8. Hasil Analisis One Way ANOVA.....	42
Lampiran 9. Dokumentasi	43

ABSTRAK

Amalia, Faizah., F. 2024. Pengaruh Volume Terhadap Aktivitas Enzim Amilase yang dihasilkan oleh *Bacillus subtilis*. Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing I : Dr. Anik Maunatin, S.T. M.P. Pembimbing II : Dr. Akyunul Jannah, S.Si, M.P

Bacillus subtilis adalah spesies bakteri yang sangat beragam yang dapat tumbuh pada berbagai lingkungan. Spesies ini memiliki sel induk. Merupakan bakteri gram positif, membentuk endospora, dan dapat tumbuh pada suhu mesofilik, ini karena *Bacillus subtilis* tumbuh di tempat yang bersuhu tinggi. Bakteri ini sangat berpotensi dalam produksi enzim amilase. Dalam pengaplikasian enzim amilase juga banyak sekali penggunaannya diantaranya : untuk industri seperti deterjen, tekstil, fermentasi, kertas, industri farmasi, makanan, gula, deterjen laundry, porselen dll. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui bagaimana perbedaan dalam volume enzim amilase yang dihasilkan oleh *Bacillus subtilis* terhadap aktivitasnya dan untuk meningkatkan efisiensi yang murah, ramah dalam industri. Reagen dinitrosalisilat-asam (DNS) digunakan untuk melakukan uji gula reduksi untuk mengetahui aktivitas enzim amilase. Dalam penelitian ini rancangan acak lengkap (RAL) digunakan dengan satu variable. Variasi volumenya adalah 0.5 mL, 1 mL, 1,5 mL, 2 mL, dan 2.5 mL. setelah itu data diuji secara statistik menggunakan analisis variasi (ANOVA). Berdasarkan hasil uji statistik, variasi volume signifikan berpengaruh terhadap aktivitas enzim amilase *Bacillus subtilis*. Enzim amilase tertinggi terjadi pada 0,5 mL dengan nilai 112,92847 U/mL, dan aktivitas enzim amilase terendah terjadi pada 2,5 mL dengan nilai 26,73959 U/mL. Uji lanjutan dilakukan dengan uji Tukey's yang digunakan untuk menguji perbedaan diantara variasi volume dan hasilnya bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan antara volume 1 mL, 1,5 mL, 2 mL, dan 2,5 mL.

Kata Kunci: *Volume, Enzim Amilase, Bacillus subtilis*

ABSTRACT

Amalia, Faizah ., F. 2024 . Influence Volume Against Activity Enzyme Amylase produced by *Bacillus subtilis* . Department of Chemistry, Faculty Science and Technology , Maulana Malik Ibrahim State Islamic University Malang. Supervisor I: Dr. Anik Maunatin, ST. MP Supervisor II: Dr. Akyunul Jannah, S.Si , MP

Bacillus subtilis is species very bacteria as varied as possible grows on a variety environment .Species This own form cell parent , is gram positive bacteria , forming endospores , and can grows at temperature mesophilic . This Because *Bacillus subtilis* grows in warm places tall . Bacteria This very potential in production enzyme amylase . In There are also many applications very its use including : for industries such as detergent, textile , fermentation , paper , pharmaceutical industry , food , sugar , laundry detergent , porcelain etc . Objective from study This is For know How difference in enzyme volume amylase produced by *Bacillus subtilis* in its activity and to increase efficiency in a cheap, friendly manner in the industry.Reagent dinitrosalicylic acid (DNS) is used For do a sugar test reduction For know activity enzyme amylase . In study This design random complete (RAL) is used with one variable. Variation the volume are 0.5 mL, 1 mL, 1.5 mL, 2 mL, and 2.5 mL. after that's tested data in a way statistics use analysis variation (ANOVA). Based on the results of statistical tests, volume variations significantly influence the activity of the *Bacillus subtilis* amylase enzyme. The highest amylase enzyme occurred in 0.5 mL with a value of 112,92847 U/mL, and the lowest amylase enzyme activity occurred in 2.5 mL with a value of 26,73959 U/mL. Further tests were carried out using the Tukey's test which was used to test the differences between volume variations and the result was that there were no significant differences between the volumes of 1 mL, 1.5 mL, 2 mL and 2.5 mL.

Keywords : Volume , Enzyme Amylase , *Bacillus subtilis*

مستخلص البحث

ماليا، فائزة. ٢٠٢٤. تأثير حجم إنزيم الأميليز الذي ينتج بالعصية - باسلوس سبتيليس إلى أنشطته. قسم الكيمياء، كلية العلوم والتكنولوجيا، الجامعة الإسلامية الحكومية مولانا مالك إبراهيم مالانج. المشرف الأول: الدكتورة أنيك ماوناتين، بكالوريوس في الهندسة، ماجستير في الغذاء. المشرف الثاني الدكتورة أكيونول جنة ، ماجستير التعليم الإسلامي

العصوية الرقيقة يكون صنف بكتيريا جدا متنوعة قدر الإمكان ينمو على مجموعة متنوعة بيئة . صنف هذا ملك استمارة خلية والدين ، هو البكتيريا إيجابية الجرام ، وتشكيل الأبواغ الداخلية ، ويمكن ينمو في درجة الحرارة محب للاعتدال . هذا لأن *العصوية الرقيقة* ينمو في الأماكن الدافئة طويل . بكتيريا هذا جدا محتمل في إنتاج إنزيم الأميليز . في هناك أيضا العديد من التطبيقات جدا استخدامه بما في ذلك : للصناعات مثل المنظفات ، النسيج ، التخمر ، الورق ، صناعة الأدوية ، المواد الغذائية ، السكر ، منظفات الغسيل ، الخزف إلخ . موضوعي من يذاكر هذا يكون ل يعرف كيف اختلاف في حجم الانزيم الأميليز التي تنتجها باسلوس سبتيليس في نشاطها و يزيد كفاءة تطبيق في صناعة .

كاشف يتم استخدام حمض دينيترو ساليسيليك (DNS) ل قم بإجراء اختبار السكر تخفيض ل يعرف نشاط إنزيم الأميليز . في يذاكر هذا تصميم عشوائي يتم استخدام كامل (RAL) مع متغير واحد . تفاوت الحجم هي 0.5 مل، 1 مل، 1.5 مل، 2 مل، 2.5 مل . بعد هذه بيانات تم اختبارها بطريقة إحصائية يستخدم تحليل الاختلاف (ANOVA).

بناءً على نتائج الاختبارات الإحصائية، تؤثر اختلافات الحجم بشكل كبير على نشاط إنزيم باسلوس سبتيليس . أعلى إنزيم أميليز حدث في 0.5 مل بقيمة 112,92847 وحدة/مل، وأقل نشاط لإنزيم الأميليز حدث في 2 مل بقيمة 26,73959 وحدة/مل. تم إجراء المزيد من الاختبارات باستخدام اختبار توكي الذي تم استخدامه لاختبار الاختلافات بين اختلافات الحجم وكانت النتيجة عدم وجود فروق ذات دلالة إحصائية بين أحجام 1 مل، 2,5 مل، 2 مل و 2.5 مل

الكلمات المفتاحية : الحجم ، الإنزيم/الأميليز ، العصوية الرقيقة

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Enzim banyak digunakan dikalangan industri terutama yang paling penting dalam pembuatan bir, pembuatan kue, tekstil, farmasi, pengolahan pati, dan juga deterjen. Enzim amilase juga bekerja pada pati, glikogen, dan *oligosakarida*. *B. Subtillis*, *B. Stearothermophilus*, *B. Licheniformis*, dan *B. Amyloliquefaciens* dikenal dengan penghasil α -amilase yang baik dan mereka banyak digunakan dalam produksi komersial enzim untuk berbagai aplikasi (Demirkan, 2011). Enzim merupakan salah satu ciptaan Allah SWT dan apa yang diciptakan-NYA akan memiliki hikmat yang dapat dimanfaatkan bahwa sesuai dengan firman Allah SWT dalam surah Al-an'am 59:

وَعِنْدَهُ مَفَاتِحُ الْغَيْبِ لَا يَعْلَمُهَا إِلَّا هُوَ ۚ وَيَعْلَمُ مَا فِي الْبَرِّ وَالْبَحْرِ ۚ وَمَا تَسْقُطُ مِنْ وَرَقَةٍ إِلَّا يَعْلَمُهَا وَلَا حَبَّةٌ فِي ظُلُمَاتٍ الْأَرْضِ وَلَا رَطْبٌ وَلَا يَابِسٌ إِلَّا فِي كِتَابٍ مُبِينٍ

Artinya: *"Dan pada sisi Allah-lah kunci-kunci semua yang ghaib; tidak ada yang mengetahuinya kecuali Dia sendiri, dan Dia mengetahui apa yang di daratan dan di lautan, dan tiada sehelai daun pun yang gugur melainkan Dia mengetahuinya (pula), dan tidak jatuh sebutir biji-pun dalam kegelapan bumi, dan tidak sesuatu yang basah atau yang kering, melainkan tertulis dalam kitab yang nyata (Lauh Mahfudz)".*

Berdasarkan surat Al-an'am 59 bahwa Allah SWT menjelaskan bahwa tidak ada manusia yang mampu mengalihkan perhatian Allah, sekecil apapun suatu peristiwa dimuka bumi ini. Hal ini membuktikan bahwa jika Allah tidak mencipta, maka Allah tidak mempunyai tujuan dan kegunaan. Demikian dengan enzim,

manusia dan aktivitas proses metabolisme dalam tubuhnya dikontrol dengan seoptimal mungkin.

Enzim α -amilase mampu memecahkan pati dengan menghidrolisis 1,4-glikosidik yang ada didalam rantai amilopektin dan amilosa sehingga produk akhir hidrolisis ini adalah ikatan polisakarida dimana menghasilkan dekstrin rantai pendek (Kompleks & Urease, 2019) (Witazora *et al.*, 2021). Enzim amilase berfungsi untuk menghidrolisis pati menjadi molekul karbohidrat yang lebihsederhana yakni maltosa dan glukosa dimana pati yang belum terhidrolisis sempurna menjadi glukosa menghasilkan produk yang disebut dekstrin. Produksi enzim amilase saat ini telah mencapai skala tinggi yakni 25% perdagangan enzim (Ningsih *et al.*, 2012).

Berbagai fungsi dan pengaplikasian dari enzim dapat diamati dengan ketelitian ilmiah dan hal ini dapat dijelaskan dalam surat al-Baqarah ayat 164:

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمُوتِ وَالْأَرْضِ وَاخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ وَالْفُلْكِ الَّتِي تَجْرِي فِي الْبَحْرِ بِمَا يَنْفَعُ النَّاسَ وَمَا أَنْزَلَ اللَّهُ مِنَ السَّمَاءِ مِنْ مَّاءٍ فَأَحْيَا بِهِ الْأَرْضَ بَعْدَ مَوْتِهَا وَبَثَّ فِيهَا مِنْ كُلِّ دَابَّةٍ وَتَصْرِيفِ الرِّيْحِ وَالسَّحَابِ الْمُسَخَّرِ بَيْنَ السَّمَاءِ وَالْأَرْضِ لَآيَاتٍ لِّقَوْمٍ يَعْقِلُونَ

Artinya: “*Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, silih bergantinya malam dan siang, bahtera yang berlayar di laut membawa apa yang berguna bagi manusia, dan apa yang Allah turunkan dari langit berupa air, lalu dengan air itu Dia hidupakan bumi sesudah mati (kering)-nya dan Dia sebarkan di bumi itu segala jenis hewan, dan pengisaran angin dan awan yang dikendalikan antara langit dan bumi; sungguh (terdapat) tanda-tanda (keesaan dan kebesaran Allah) bagi kaum yang memikirkan.*”

Berdasarkan ayat diatas dapat dijelaskan bahwa makhluk hidup tidak mencakup hanya tentang manusia namun hewan, tumbuhan, bakteri dan

mikroorganisme yang dapat dipelajari didalam mikrobiologi yang membahas tentang mikroba, jenis mikroba yang ada di alam, struktur sel dan fungsi suatu mikroba, metabolisme mikroba, pertumbuhan dan faktor lingkungan mikroba (Putri *et al.*, 2023).

Keuntungan Amilase dalam kehidupan sangat berperan penting dalam suatu industri diantaranya; farmasi, tekstil, sirup, pembuatan roti, selain itu amilase dirancang untuk industri deterjen juga jika tercampur dengan enzim protease dan lipase sebagai pencuci noda pakaian dan dalam industri makanan untuk pembuatan sirup maka perlunya sumber amilase dari bahan baku yang mudah didapat (Tazkiah *et al.*, 2019) (Ariandi, 2016). Selain itu keuntungan *Bacillus subtilis* merupakan spesies bakteri yang terbukti digunakan untuk bioremediasi dimana bioremediasi sendiri memanfaatkan metabolisme mikroba sebagai pendegradasi hidrokarbon untuk mengubah polutan menjadi senyawa yang tidak berbahaya (Wardhani & Titah, 2021). Menurut (Raul *et al.*, 2014) bahwa *Bacillus subtilis* merupakan spesies yang dianggap sebagai sumber amilase yang paling penting dan telah sering digunakan untuk produksi enzim, seperti fermentasi Solid State (SSF).

Pada penelitian ini digunakan pengaruh volume terhadap aktivitas enzim dari bakteri *Bacillus subtilis* sebagai sumber agar mendapatkan aktivitas enzim amilase dan keunggulan dari menggunakan bakteri ini menunjukkan bahwa Isolat *Bacillus subtilis* adalah isolat penghasil amilase tertinggi dengan aktivitas sebesar 54.19×10^2 U/ml/Menit yang dihasilkan setelah 44 jam inkubasi (Naiola *et al.*, 2017). Menurut (Prihatiningsih & Djatmiko, 2016) bahwa enzim amilase *Bacillus subtilis* dalam penelitiannya menunjukkan aktivitas sebesar 0,802 Unit/ml selama 30 menit inkubasi dan untuk *Bacillus sp* menunjukkan aktivitas sebesar 4,8-29,1 Unit/ml

selama 30 menit inkubasi. Menurut (Setyahadi *et al.*, 2014) bahwa aktivitas enzim amilase bakteri *bacillus* sebesar 38.96 U/ml diinkubasi selama 6 jam. Dengan menggunakan variasi volume enzim kita juga bisa mengetahui bahwa hasil analisis yang didapatkan apabila semakin tinggi volume enzim yang ditambahkan maka semakin tinggi pula aktivitas enzim yang dihasilkan karena menggunakan hidrolisis secara enzimatis dan enzim bekerja secara spesifik sehingga produk yang dihasilkan sesuai dengan yang diinginkan (Salsabila & Fahrurroji, 2021).

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini yaitu bagaimana pengaruh volume enzim amilase yang diproduksi oleh *Bacillus subtilis*. terhadap aktivitasnya?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui bagaimana pengaruh volume enzim amilase yang diproduksi oleh *Bacillus subtilis*. terhadap aktivitasnya.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Memberikan informasi terhadap perkembangan ilmu pengetahuan khususnya biokimia tentang mikroorganisme yang dapat menghasilkan enzim dan dapat dimanfaatkan pada berbagai industri.
2. Memberikan informasi terkait potensi bakteri *Bacillus subtilis* dalam memproduksi enzim amilase.

3. Memberikan informasi tentang volume optimal terhadap aktivitas enzim amilase yang diproduksi oleh bakteri *Bacillus subtilis*.
4. Memberikan informasi untuk penelitian selanjutnya sehingga dapat lebih mengembangkan potensi bakteri *Bacillus subtilis*. sebagai agen mikroorganisme yang menghasilkan enzim amilase.

1.5 Batasan Masalah

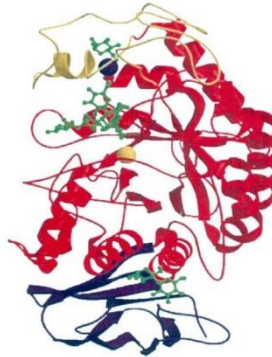
1. Bakteri *Bacillus subtilis* yang digunakan merupakan isolate bakteri yang diperoleh dari FMIPA Universitas Brawijaya Malang.
2. Variasi perlakuan yang digunakan pada volume adalah 0,5 mL, 1 mL, 1,5 mL, 2 mL, dan 2,5 mL.
3. Konsentrasi substrat yang digunakan adalah pati 1 % pada pH 7.
4. Parameter yang dianalisis adalah aktivitas enzim amilase yang diproduksi bakteri *Bacillus subtilis* yang ditunjukkan dengan pengukuran nilai aktivitas enzim yang dihasilkan (U/mL).

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Enzim Amilase

Enzim merupakan biokatalisator yang berfungsi sebagai katalis dalam proses biologi, enzim yang luas dalam penggunaannya adalah enzim amilase, lipase dan protease yang merupakan enzim hidrolitik pemecah senyawa makromolekul karbohidrat, lemak, dan protein. Enzim berfungsi sebagai katalisator dimana senyawa yang meningkatkan kecepatan reaksi kimia. Setiap enzim memiliki aktivitas maksimum pada suhu tertentu, aktivitas enzim akan semakin meningkat dengan bertambahnya suhu hingga suhu optimum tercapai setelah itu kenaikan suhu lebih lanjut akan menyebabkan aktivitas enzim menurun (Supriyatna *et al.*, 2015).



Gambar 2.1 Struktur Amilase (Souza, 2010)

Dalam struktur tiga dimensi struktur amilase terdiri dari 512 asam amino rantai oligosakarida dengan berat molekul 5,76 domain A ditunjukkan dalam bentuk warna merah, domain B berwarna kuning dan domain C berwarna ungu, ion kalsium ditunjukkan pada bola biru dan ion klorida pada bola kuning. Struktur hijau yang terikat pada situs aktif dan pada situs pengikatan permukaan (Souza, 2010).

Mekanisme kerja enzim α -amilase terdiri dari dua tahap: langkah pertama adalah pemecahan amilosa menjadi maltosa dan maltotriosa yang terjadi secara acak. Penguraian ini terjadi sangat cepat dan disertai dengan penurunan viskositas yang cepat. Tahap kedua terjadi dengan terbentuknya glukosa dan maltosa sebagai produk akhir dan tidak terjadi secara acak. Keduanya merupakan efek enzim α -amilase pada molekul amilosa. Didalam molekul amilopektin, aksi α -amilase membentuk oligosakarida yang terdiri dari glukosa, maltosa, banyak dekstrin yang dibatasi α , dan empat atau lebih glukosa dengan ikatan α -1,6-glikosidik (Ariandi, 2016).

2.2 Aplikasi Enzim Amilase

Secara khusus enzim amilase mencakup 30% produksi enzim didunia, berbagai macam aplikasi enzim amilase diantaranya : untuk industri seperti deterjen, tekstil, fermentasi, kertas, industri farmasi, makanan, gula, deterjen laundry, porselen, sebagai bahan anti-staling dalam pembuatan kue. Amilase berasal dari sumber mikroorganisme, tumbuhan dan hewan, enzim mikroba yang paling tepat dalam pengaplikasian industri adalah spesies *Bacillus*, *Bacillus Amyloliquefaciens*, *Bacillus Licheniformis*, *Bacillus Stearothermophilus* dan *Bacillus subtilis* Selain itu pengaplikasian enzim digunakan dalam menghidrolisis pati, enzim pengubah pati juga digunakan dalam sejumlah enzim lainnya (Hassan *et al.*, 2011) (Maarel & Veen, 2002).

2.3 *Bacillus subtilis* dan Kajian Al-Qur'an

إِنَّ اللَّهَ لَا يَسْتَحْيِي أَنْ يَضْرِبَ مَثَلًا مَّا بَعُوضَةً فَمَا فَوْقَهَا ۚ فَأَمَّا الَّذِينَ ءَامَنُوا 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 tiada segan membuat perumpamaan berupa nyamuk atau yang lebih rendah dari itu. Adapun orang-orang yang beriman, maka mereka yakin bahwa perumpamaan itu benar dari Tuhan mereka, tetapi mereka yang kafir mengatakan: "Apakah maksud Allah menjadikan ini untuk perumpamaan?". Dengan perumpamaan itu banyak orang yang disesatkan Allah, dan dengan perumpamaan itu (pula) banyak orang yang diberi-Nya petunjuk. Dan tidak ada yang disesatkan Allah kecuali orang-orang yang fasik.” (Qs: Al-Baqarah:26)

Berdasarkan ayat diatas beberapa mufassir seperti Hamka, ath-Thabari, al-Maraghi, dan Imam an-Nawawi juga mendukung bahwa makna kata ba’udhah berarrti “nyamuk” memberikan penjelasan kepada kita bahwa Allah SWT tidaksegan atau keberatan menyebut makhluk ini (nyamuk) dalam kitab sucinya, manusia pada umumnya dianggap sebagai makhluk kecil, tidak berguna dan membawa virus yang menular.

Bacillus subtilis merupakan bakteri berbentuk batang yang bersifat gram negative, mempunyai spora, dan merupakan bakteri anaerob fakultatif yang dapat bergerak secara periflagellata. Mikroorganisme ini sering digunakan sebagai indikator kontaminasi karena menjadi resisten yang dilapisi spora yang melindunginya. Bakteri yang memiliki sifat kontaminan adalah *Bacillus sp*, *Streptococcus sp*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas* dan *Sarcina*, dari keseluruhan bakteri yang sering terjadi kontaminasi adalah bakteri *Bacillus subtilis* (Ariyadi, T. Dewi, 2011).

Bacillus subtilis Merupakan spesies bakteri yang sangat beragam yang dapat tumbuh pada berbagai lingkungan, mempunyai bentuk sel induk, merupakan bakteri gram positif, membentuk endospora, dan dapat tumbuh pada kisaran suhu mesofilik. Karena salah satu tempat ditemukannya *B. Subtilis* adalah pada lingkungan bersuhu tinggi, maka spesies bakteri ini tergolong mesofil (Fitriani *et al.*, 2013).

2.4 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim Amilase

Keberhasilan memproduksi suatu enzim itu sendiri dilihat dari produksi yang tinggi. Faktor-faktor yang mempengaruhi keberhasilan produksi suatu enzim adalah suhu, pH dan substrata yang mengandung kadar pati yang tinggi. Suatu enzim pada suhu berlebih akan mengakibatkan terjadinya denaturasi pada suatu enzim, hal ini disebabkan enzim adalah rangkaian asam amino yang sistem kerjanya berkaitan dengan suhu lingkungan. pH juga mempengaruhi aktivitas enzim. pH merupakan keberadaan ion hidrogen. Aktivitas enzim akan berbeda-beda pada penguraianya apabila enzim dalam keadaan ionisasi yang sesuai. Aktivitas enzim sangat dipengaruhi oleh konsentrasi ion hidrogen. Sebab asam amino yang merupakan sisi aktif enzim hanya bersedia berfungsi apabila berada dalam keadaan ionisasi yang tepat. Jika pH terlalu asam atau pun terlalu basa akan terjadi denaturasi pada enzim. Denaturasi itu sendiri dimaksudkan enzim akan menjadi tidak aktif. Juga konsentrasi substrata yang menjadi perhatian para peneliti dalam memproduksi enzim amilase bakteri (Izzatinnisa & Utami, 2020).

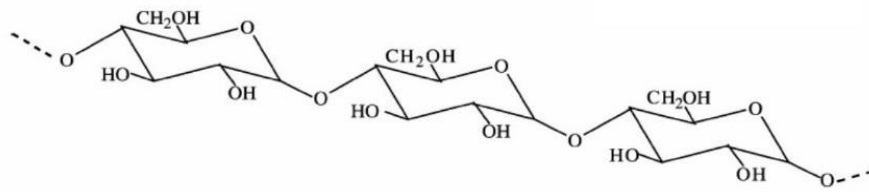
Diantaranya adalah faktor lingkungan, faktor suhu, faktor pH, faktor substrat, faktor lama inkubasi, jumlah inokulum dan faktor lain yang didapat oleh

eksperimen. Jenis mikrobanya juga berperan penting dalam enzim yang dihasilkan karena untuk menghasilkan kualitas dan kuantitas suatu enzim perlunya optimal kondisi yang diketahui suatu karakterisasi dari bakteri yang akan digunakan, dalam faktor lingkungan (Izzatinnisa & Utami, 2020)(Tarigan, 2015).

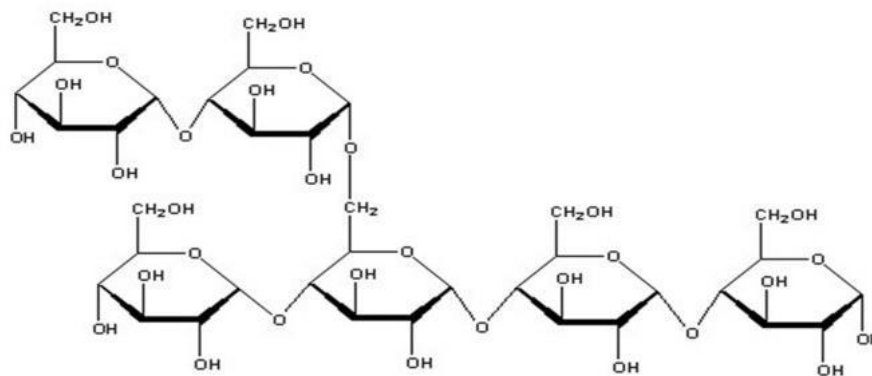
Proses hidrolisa adalah proses pemecahan rantai molekul polimer menjadi molekul penyusunnya yang lebih sederhana. Saat ini, proses hidrolisa polimer pati menjadi molekul yang lebih sederhana telah menjadi salah satu tahapan penting dalam dunia industri. Hidrolisa pati dapat dilakukan dengan dua cara yaitu dengan menggunakan asam atau enzim pemecah pati yang sering digunakan asam amilase. Penggunaan enzim amilase lebih dimintai karena ramah lingkungan, pemecahan yang terjadi lebih spesifik dan tidak menimbulkan rasa yang menyimpang pada produk akhir. Proses hidrolisis pati menggunakan enzim amilase dapat mencapai derajat hidrolis pati hingga 42%-97% tergantung jenis substrat dan waktu inkubasi (Nangin & Sutrisno, 2015).

2.5 Pati

Pati merupakan polimer glukosa dengan rumus molekul $(C_6H_{10}O_5)_n$. Pembentukan polimer pati diawali dengan terbentuknya ikatan glukosidik yaitu ikatan antara molekul glukosa melalui oksigen atom karbon pertama. Pati dibagi menjadi dua dalam jenisnya yakni amilosa dan amilopektin. Amilosa adalah polimer linier yang terdiri dari ribuan unit glukosa dengan ikatan α -1,4-glukosidik. Tipe kedua adalah amilopektin yang memiliki ikatan α -1,6-glukosidik pada sekitar gugus sehingga menghasilkan rantai bercabang (Nangin & Sutrisno, 2015).



Gambar 2.2 Struktur Amilosa (Nangin & Sutrisno, 2015).



Gambar 2.3 Struktur Amilopektin pada Pati (Denila, 2011).

Karbohidrat yang terdiri dari delapan atau lebih unit monosakarida disebut polisakarida. Pati merupakan polisakarida yang banyak ditemukan pada tumbuhan. Senyawa ini disimpan dalam bentuk butiran dengan ukuran dan sifat tertentu untuk setiap jenis tumbuhan (Denila, 2011). Enzim amilase mengalami tiga tahapan utama dalam pemrosesan substrat pati, yaitu gelatinisasi, likuifikasi, dan sakarifikasi. Ketiga proses ini mengkonsumsi banyak energi, sehingga meningkatkan biaya hidrolisis bahan pati. Salah satu cara untuk mengurangi tingkat konsumsi energi ini adalah dengan menggunakan enzim amilase yang dapat memecah pati tanpa melalui proses gelatinisasi (pati mentah). Enzim Amilase yang paling banyak dikembangkan adalah enzim yang berasal dari mikroba. Karena memiliki banyak keuntungan : waktu produksi cepat, mudah diubah, dan tidak memerlukan banyak tempat (Nangin & Sutrisno, 2015). Beberapa tanaman yang memiliki konsentrasi

pati yang tinggi diantaranya ; ubi kayu sebesar 84,9% , tepung sorgum sebesar 80,42% , padi sebesar 78,9% dan jagung sebesar 72.4% (Denila, 2011)(Noerwijati, 2015).

2.6 Pengujian Aktivitas Enzim Amilase

Pengujian dalam aktivitas enzim α -amilase pada dasarnya dapat dilakukan dengan menggunakan tiga pengamatan utama : peningkatan daya reduksi, penurunan intensitas warna biru, dan perubahan kerapatan optik. Peningkatan kekuatan reduksi diamati dengan mengukur produk berupa gula pereduksi dari substrat pati. Menurunnya intensitas warna biru pada senyawa kompleks iodin-pati disebabkan oleh berkurangnya jumlah substrat akibat kekuatan enzim yang menghidrolisis pati. Perubahan densitas optik terjadi karena pelepasan substrat dari gugus kromoforik ke dalam pelarut (Howard, 2015).

Adapun pengujian aktivitas enzim amilase secara kualitatif menggunakan uji iodin sedangkan secara kuantitatif menggunakan metode DNS (Dinitrosalisilat) jika uji iodium mengukur aktivitas enzim alfa-amilase dalam kemampuannya mereduksi warna biru tua. Uji iodium hanya dapat digunakan dengan larutan pati dan pereaksi warna, yang bahan utamanya terdiri dari larutan iodium (I_2) dan kalium iodide (KI) kompleks pati-iodin larut dalam air dan memberikan efek warna biru tua, namun polisakarida dan monosakarida lain yang tidak memiliki struktur alfa-heliks yang sama tidak membentuk kompleks dengan iodin. Uji kuantitatif dari enzim α -amilase dengan menggunakan metode DNS (Dinitrosalisilat) dimana salah satu cara yang dapat dipakai berdasarkan pada jumlah gula pereduksi yang terbentuk (Nisak, 2020).

2.7 Media NA

Medium *Nutrient Agar* (NA) merupakan medium serbuk berwarna kuning-putih berbentuk padat karena mengandung agar sebagai bahan pemadatan. komposisi utama media agar adalah karbohidrat dan protein yang terdapat pada ekstrak daging dan pepton sesuai dengan kebutuhan sebagian besar bakteri. Medium nutrisi agar merupakan salah satu media jenis yang paling umum digunakan untuk pertumbuhan sebagian besar bakteri (Thawil, Andriyana,D., Novalina, 2020).

Secara fisiknya media ini akan berbentuk padat karena terdapat kandungan agar sebagai pematatnya. Komposisi dari media ini yakni karbohidrat dan protein yang terdapat pada ekstrak daging dan pepton yang terdapat di ekstrak daging dan pepton digunakan dengan sesuai kebutuhan Sebagian besar bakteri (Thohari, 2019). Media *Nutrient Agar* (NA) merupakan media yang sudah teruji secara klinis dalam pertumbuhan bakteri, sehingga proses metabolisme yang terjadi atau berlangsung secara optimal (Juariah & Sari, 2018).

2.8 Media NB

Budidaya mikroorganisme dilakukan dengan menggunakan berbagai media pertumbuhan. Media pertumbuhan terdiri dari beberapa jenis, antara lain: bakteri dari media pertumbuhan yang universal atau umum ke media selektif yang berbeda. NB (*Nutrient Broth*) termasuk dalam media umum yang biasa digunakan untuk bercocok tanam. NB diformulasikan dengan kombinasi sumber karbon dan nitrogen untuk mampu memenuhi kebutuhan nutrisi bakteri. Komposisi NB terdiri dari ekstrak daging sapi sebagai sumber karbon dan pepton sebagai sumber nitrogen (Wahyuningsih & Zulaika, 2019).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari sampai Juli 2023 di Laboratorium Biokimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu seperangkat alat gelas, timbangan analitik, spatula, bunsen, botol semprot, hot plate, penangas air, inkubator, kawat ose, vortex, tip, mikropipet, *sentrifuge*, shaker, oven, dan termometer. Sedangkan pengukuran aktivitas enzim amilase menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini di antaranya bakteri *Bacillus subtilis* yang didapat dari Universitas Brawijaya Malang, *Aquadest*, NA (*Nutrient Agar*), dan YPS (*yeast pepton starch*). Sedangkan proses uji aktivitas dan optimasi enzim amilase menggunakan larutan Iodin, buffer fosfat 1 M pH 7, aluminium foil, alkohol 70%, dan reagen DNS.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental laboratorik yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh volume enzim terhadap aktivitas enzim amilase yang dihasilkan *Bacillus subtilis*. dengan variasi volume yang digunakan yaitu 0,5 mL,

1 mL, 1,5 mL, 2 mL, dan 2,5 mL. Rancangan penelitian ini menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan pengulangan dua kali, adapun data yang didapatkan pada penelitian ini berupa aktivitas enzim amilase.

Tabel 3.1 Pengaruh volume terhadap aktivitas enzim amilase

No	Volume (mL)	Aktivasi Enzim (U/mL)
1	0,5	
2	1	
3	1,5	
4	2,5	

Kondisi volume optimum ditandai dengan titik aktivitas enzim amilase tinggi.

3.4 Tahapan Penelitian

Pada penelitian ini memiliki tahapan penelitian sebagai berikut:

1. Sterilisasi Alat
2. Pembuatan media
3. Peremajaan bakteri *Bacillus subtilis*
4. Uji Kualitatif *Bacillus subtilis*
5. embuatan inokulum *Bacillus subtilis*
6. Produksi enzim amilase
7. Uji pengaruh volume
8. Analisis data

3.5 Pelaksanaan Penelitian

3.5.1 Sterilisasi Alat

Seperangkat alat gelas yang akan digunakan disterilisasi terlebih dahulu. Proses sterilisasi dilakukan dengan cara dicuci dengan bersih terlebih dahulu lalu dikeringkan. Setelah itu seperangkat alat gelas dibungkus dengan kertas dan dimasukkan ke dalam plastik yang tahan panas. Kemudian dilakukan sterilisasi

dengan *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan antara 15-17.5 psi (Andriani, 2016).

3.2.3 Pembuatan Media

3.5.2.1 media Nutrient Agar

Media *Nutrient Agar* dibuat dengan cara dilarutkan 2 g NA bubuk dalam 100 mL aquades kemudian dihomogenkan di atas hotplate *stirrer*. Sebagian larutan NA tersebut dituangkan ke dalam tabung reaksi bertujuan untuk memelihara isolat di dalam media agar miring. Kemudian disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C tekanan 15 psi selama 15 menit. Setelah itu diletakkan miring hingga dingin dan terbentuk agar (Arista *et al.*, 2013; Irawati, 2016)

3.5.2.2 Media Nutrient Broth

Media *Nutrient Broth* (NB) dibuat dengan melarutkan *nutrient broth powder* sebanyak 0,8 gram ke dalam 100 mL aquades sambil diaduk dengan *stirrer* dan dipanaskan hingga mendidih. Setelah mendidih dan semua bahan larut sempurna, media NB disterilkan dalam *autoclave* (Agustiarini & Permata Wijaya, 2021).

3.5.2.3 Media YPS (*Yeast Peptone Starch*)

Media yang digunakan sebagai media isolasi dan produksi enzim amilase pada penelitian ini adalah media YPS (*Yeast Peptone Starch*) yang mengandung 0,5 g *yeast extract*, 1 g *peptone*, 0,1 g KH_2PO_4 , 0,5 g NaCl, dan 1 g pati sebagai sumber karbon. Semua bahan tersebut ditambahkan ke dalam *aquades* sebanyak 100 mL serta dipanaskan dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* hingga mendidih dan terlarut. Setelah itu media tersebut dimasukkan ke dalam botol UC 100 mL dan disterilisasi menggunakan *autoclave* (Naiola *et al.*, 2017) (Soeka, 2015).

3.5.3 Peremajaan Bakteri *Bacillus subtilis*

Peremajaan bakteri *Bacillus subtilis* pertama yang dilakukan yakni sterilisasi alat dan media setelah itu diinokulasikan isolat pada media NA (*Nutrient Agar*) miring. Kemudian dilakukan inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C (Wibowo *et al.*, 2021) (Aronggear *et al.*, 2022)

3.5.4 Uji Kualitatif *Bacillus subtilis*

Isolat *Bacillus subtilis* hasil peremajaan diambil 1-2 ose koloni bakteri kemudian digoreskan secara streak plate pada media uji kualitatif lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Kemudian bakteri *Bacillus subtilis* pada media uji ditambahkan 1% iodin hingga menutupi seluruh permukaan cawan lalu diamati (Izzatinnisa & Utami, 2020).

3.5.5 Pembuatan Inokulum *Bacillus subtilis*.

Inokulum Isolat bakteri hasil dari peremajaan diambil 1-2 ose kemudian diinokulasikan dalam NB sebanyak 25 mL kemudian dishaker selama 18 jam pada suhu ruang dengan kecepatan 100 rpm (Khoiriyah & Ardiningsih, 2014) (Mafrudhotin, 2022) (Rizki, 2018). Kemudian dilakukan pengukuran OD diambil 2 tabung reaksi yang berisi blangko dan hasil inokulum yang telah di shaker selama 18 jam sebanyak 5 ml kemudian dihitung OD menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan Panjang gelombang 600 nm kemudian dilakukan pembuatan inokulum kerja OD 0,5 (Khoiriyah & Ardiningsih, 2014) (Mafrudhotin, 2022) (Rizki, 2018).

3.5.6 Produksi Enzim Amilase

Enzim Amilase diproduksi dengan menggunakan inokulum yang sebelumnya telah diproduksi tahapan awal yang dilakukan pertama diambil 10 mL inokulum bakteri yang telah diinkubasi pada *shaker inkubator*, kemudian dimasukkan ke dalam 90 mL media YPS secara *aseptis*. Setelah itu diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Larutan yang didapatkan disentrifugasi selama 15 menit pada suhu 4°C dengan kecepatan 5.000 rpm . Adapun supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar enzim amilase (Rizki, 2018) (Izzatinnisa & Utami, 2020) (Luang-In *et al.*, 2019).

3.5.7 Pembuatan Kurva Standar Glukosa

Larutan standar glukosa dibuat dalam konsentrasi yang berbeda yakni 25; 50; 100; 200; dan 400 mg/mL dimasukkan 1 mL larutan standar glukosa ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 1 mL reagen DNS ke setiap tabung reaksi. Lalu campuran ini dipanaskan dengan air mendidih selama 10 menit menggunakan waterbath. Setelah itu larutan dibiarkan dingin pada suhu ruang kemudian ditambahkan larutan K-Na tartrat sebanyak 1 mL. Setelah itu ditambahkan *aquades* hingga volumenya menjadi 5 mL. Selanjutnya, diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 540 nm (Mauliya, 2023).

3.5.8 Uji Aktivitas Enzim Amilase Terhadap Pengaruh Volume

Pengujian aktivitas enzim amilase terhadap pengaruh volume menggunakan metode DNS untuk menentukan gula pereduksi. Larutan pati 1 % diambil sebanyak 1 mL. Setelah itu dilakukan penambahan ekstrak kasar enzim sesuai variasi yakni 0,5 mL, 1 mL, 1,5 mL, 2 mL, dan 2,5 mL. Larutan tersebut diinkubasi selama 60

menit pada suhu 30°C. Kemudian ditambahkan 1 mL DNS dan 1 mL Kna-Tartat. Setelah itu, dituangkan *aquades* hingga volumenya masing-masing 10 mL lalu di-vortex. Larutan yang telah di-vortex kemudian dianalisis absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm (SOEKA, 2015) (Izzatinnisa & Utami, 2020) (Mauliya, 2023).

Aktivitas enzim amilase dapat diketahui setelah dianalisis absorbansinya dan dihitung berdasarkan persamaan 3.1 (Susilawati *et al.*, 2015) (Lestari, 2018)

$$\text{Aktivitas Enzim} = \frac{\text{Konsentrasi Glukosa}}{\text{BM Glukosa}} \times \left[\frac{v}{p.q} \right] \times fp \dots \dots \dots (3.1)$$

Keterangan :

BM Glukosa = berat molekul glukosa sebesar 180 g/mol

v = volume total sampel pada tabung

p = volume ekstrak kasar enzim

q = waktu inkubasi

fp = faktor pengenceran.

Dari hasil yang didapat akan dilakukan uji menggunakan SPSS.

3.5.9 Analisis Data

Data hasil uji aktivitas enzim amilase kemudian dianalisis menggunakan metode one ways ANOVA untuk mengetahui pengaruh variasi volume. Jika terdapat hasil yang berbeda yang signifikan maka dilakukan uji lanjutan (Wahidah *et al.*, 2022) (Simanjuntak *et al.*, 2021).

BAB IV

PEMBAHASAN

4.1 Peremajaan Bakteri *Bacillus subtilis* dan Kajian dalam Islam

Bakteri untuk proses produksi enzim menggunakan isolate bakteri *Bacillus subtilis* dari FMIPA Universitas Brawijaya Malang. Bakteri baru ini disimpan dalam kulkas kemudian dilakukan peremajaan bakteri dimana peremajaan ini bertujuan agar bakteri yang diperoleh dalam keadaan aktif dan muda sehingga dapat melakukan metabolisme dan untuk pengecekan agar mengetahui aktivitas adanya enzim amilolitik selain itu agar bakteri mendapatkan nutrisi yang cukup (Mauliya, 2023) (Wahidah *et al.*, 2022).

Media *agar nutrient* adalah media bubuk berwarna kuning-putih, mengandung agar dan bersifat padat jika digunakan. Dalam peremajaan digunakan media NA (*Nutrient Agar*) miring karena medium ini mengandung protein dan karbohidrat yang diperoleh dari ekstrak daging dan pepton yang memenuhi kebutuhan sebagian besar bakteri (Maryam *et al.*, 2015) (Nurhidayanti, 2022) (Wahyuningsih & Zulaika, 2019).



Gambar 4.1 Peremajaan Bakteri

Gambar diatas merupakan hasil dari peremajaan bakteri. Dalam perlakuan peremajaan bakteri *Bacillus subtilis* dilakukan didalam LAF (*Laminar Air Flow*) secara aseptis menggunakan jarum ose agar biakan dalam bakteri tidak terinfeksi dengan bakteri lain atau bisa disebut juga tidak terkontaminasi. Isolat bakteri baru diambil 1-3 ose kemudian dimasukkan ke dalam media NA (*Nutrient Agar*) miring setelah itu bakteri yang sudah diisolasi diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C (Maryam *et al.*, 2015) (Nurhidayanti, 2022) (Wahyuningsih & Zulaika, 2019).

Fase pada pertumbuhan bakteri memiliki beberapa fase diantaranya: fase lag yaitu fase adaptasi, fase log yaitu fase eksponensial, fase stagnan yaitu fase stasioner dan fase kematian. Berdasarkan hasil dari gambar 4.1 menunjukkan bahwa bakteri yang sudah diregenerasi berhasil diremajakan hal ini ditandai dengan terbentuknya koloni baru berwarna kuning-putih pada media pertumbuhan. Dalam kajian islam banyak hal yang membahas tentang bakteri dan pertumbuhannya salah satunya dalam surat Al-Mulk ayat 3 sebagai berikut:

الَّذِي خَلَقَ سَبْعَ سَمَاوَاتٍ طِبَاقًا ۚ مَا تَرَىٰ فِي خَلْقِ الرَّحْمَنِ مِن تَفْوُتٍ ۚ فَارْجِعِ الْبَصَرَ هَلْ تَرَىٰ مِن فُطُورٍ

Artinya: “Yang telah menciptakan tujuh langit berlapis-lapis. Kamu sekali-kali tidak melihat pada ciptaan Tuhan Yang Maha Pemurah sesuatu yang tidak seimbang. Maka lihatlah berulang-ulang, adakah kamu lihat sesuatu yang tidak seimbang? (Qs Al-Mulk: 3)

Pada ayat ini dijelaskan bahwa salah satu tanda kekuasaan Allah adalah Dia menciptakan tujuh langit yang bertingkat-tingkat dan tanpa memiliki kecacatan, tidak berlubang atau retak, tidak memiliki kejanggalan atau ketidak-seimbangan maka lihatlah langit berkali-kali dan cermatilah makhluk yang besar ini, kamu tidak

akan melihat adanya suatu kekurangan. Dengan cara yang sama, suatu zat yang disekresikan oleh mikroba memiliki kemampuan untuk mendorong pertumbuhan organisme lain dengan menjaga keseimbangan antara bakteri dan mikroba.

4.2 Uji Kualitatif *Bacillus subtilis*

Tujuan dilakukannya uji kualitatif ini agar mengetahui kemampuan yang dimiliki bakteri *Bacillus subtilis* dalam menghasilkan enzim amilase dengan cara Isolat *Bacillus subtilis* hasil dari peremajaan diambil 1-2 ose koloni bakteri kemudian digoreskan secara *streak plate* pada media uji kualitatif kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang lalu ditambahkan 1% iodin hingga menutupi seluruh permukaan cawan dan terakhir diamati. Adapun aktivitas enzim amilase yang dihasilkan diketahui dengan uji ini dengan ada atau tidaknya zona bening yang terbentuk disekitar koloni bakteri yang ditumbuhkan dalam media NA (*Nutrient Agar*) (Zuniz Prastika, 2018). menurut Zahidah & Shovitri, (2013) bahwa zona bening yang terbentuk pada medium yang telah ditambahkan larutan iodin menentukan aktivitas amilase. Enzim amilase ekstraseluler memiliki kemampuan untuk menghidrolisis pati (amilosa dan amilopektin) yang terkandung dalam medium *starch agar*. Akibatnya pati yang telah terdegradasi tidak dapat berikatan dengan I₂, yang menghasilkan zona bening di sekitar koloni bakteri. Ikatan antara pati dan I₂ membuat daerah yang patinya belum terhidrolisis berwarna biru ungu. Berikut hasil dari uji kualitatif *Bacillus subtilis*.



Gambar 4.2 Hasil Uji Kualitatif *Bacillus subtilis*

4.3 Produksi Enzim Amilase

Media adalah bahan yang terdiri dari campuran nutrisi yang digunakan untuk menumbuhkan mikroorganisme. Media yang diketahui komposisinya secara rinci disebut media sintetik. Adapun media yang digunakan untuk produksi enzim berupa media YPS (*Yeast Peptone Starch*) pati atau *starch* berfungsi sebagai sumber karbon yang memicu terjadinya produksi enzim amilase (Asadullah, 2014). Pada aktivitas enzim amilase terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi kerja suatu enzim diantaranya faktor yang berada pada kondisi optimum, konsentrasi enzim, konsentrasi substrat, suhu, pengaruh pH, pengaruh inhibitor (Ischak, Salimi, 2017). Untuk mengetahui jumlah bakteri yang tersedia, inokulum *Bacillus subtilis* diukur nilai OD menggunakan spektrofotometer uv-vis dengan Panjang gelombang 600 nm dengan hasil sebesar 1,4470. Nilai OD pada inokulum diukur dan kemudian diencerkan hingga nilai OD 0.5. ini dilakukan untuk memastikan bahwa jumlah bakteri yang digunakan untuk setiap perlakuan adalah sama (Mauliya, 2023). Menurut Agustiarini & Permata Wijaya, (2021) nilai OD 0,5 pada bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus* didapatkan absorbansi sebesar 1,493 dan 1,559 dengan jumlah sel bakteri sebesar $1,3 \times 10^9$ CFU/mL dan $8,1 \times 10^8$ CFU/mL .

Menurut Chalim, (2021) nilai OD 0,5 W. *Confusa* didapatkan absorban sebesar 2,1378 dengan jumlah bakteri sebesar $1,4 \times 10^{-9}$ CFU/mL.

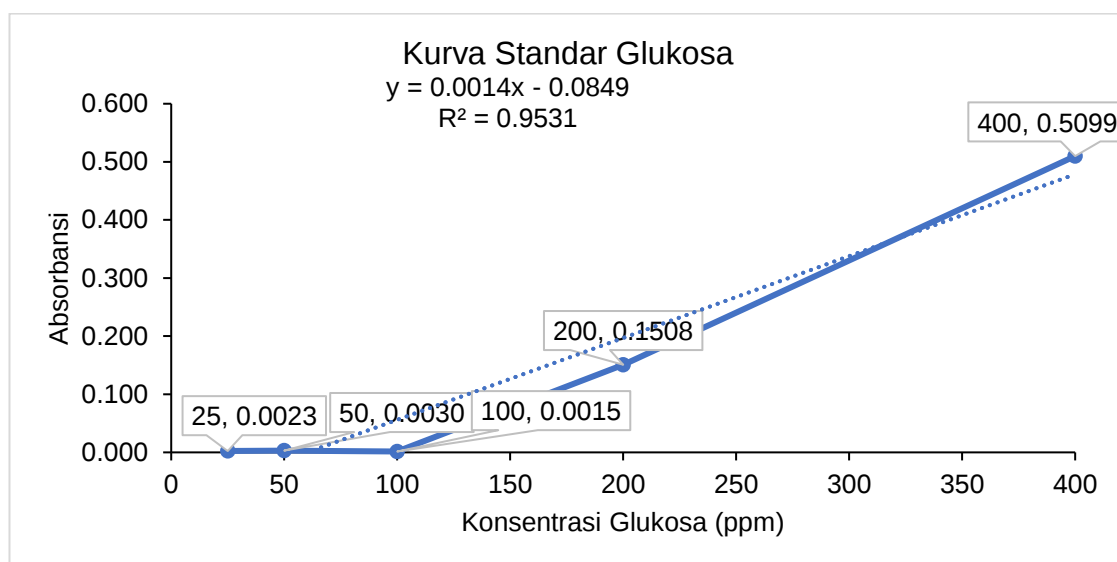
Untuk mendapatkan ekstrak kasar enzim amilase, senrifugasi digunakan. Prinsip yang digunakan untuk memisahkan ekstrak kasar enzim dari sel bakteri *Bacillus subtilis* dan membuat supernatan dari ekstrak kasar enzim amilase. Sel bakteri *Bacillus subtilis* yang memiliki berat molekul lebih besar dari ekstrak kasar enzim amilase mengendap dan terpisah dari ekstrak kasar enzim amilase yang memiliki berat molekul lebih rendah. Sentrifugasi dilakukan pada suhu rendah yaitu 4°C, untuk menghindari denaturasi karena energi panas yang dihasilkan oleh gesekan molekul(Naiola *et al.*, 2017) (Izzatinnisa & Utami, 2020) (SOEKA, 2015) (Mauliya, 2023).

4.4 Kurva Standart Glukosa

Analisis kuantitatif bertujuan untuk mengetahui kadar karbohidrat awal atau glukosa yang ada pada sampel glukosa (Pati). Ini dilakukan dengan menggunakan metode pengukuran gula pereduksi yaitu glukosa dengan DNS (*Dinitrosalicylic*), dan menggunakan spektrofotometer untuk mengukur absorbansinya. Yang dilakukan pertama adalah membuat larutan glukosa standart dan kurva standart. Ketika gula dipanaskan untuk mereduksi 3,5-*dinitrosalicylic* (DNS) menjadi asam 3-amino-5nitrosalicylic jika terbentuk produk tereduksi berwarna coklat yang digunakan untuk menentukan konsentrasi gula. Karena itu untuk menguji jumlah glukosa, Panjang gelombang 540 nm dipilih karena Panjang gelombang ini memungkinkan warna merah kecoklatan terserap (terabsorbansi) sepenuhnya.

Glukosa dapat bereaksi dengan DNS sehingga kadarnya dapat diukur secara spektrofotometrik dengan mengolah nilai absorbansi (Galung, 2021).

Dengan menggunakan kurva standart glukosa, konsentrasi 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm, 400 ppm dibuat. Konsentrasi ini menunjukkan aktivitas enzim amilase untuk menghasilkan gula reduksi, dan persamaan yang dihasilkan dari kurva standart dan absorbansi sampel dapat digunakan untuk menentukan konsentrasi dan aktivitas enzim amilase (Galung, 2021)(Mauliya, 2023). Untuk larutan glukosa standart, persamaan regresi linear antara konsentrasi (X) dan absorbansi (Y) adalah sebesar $y = 0,0014x - 0,0849$ dan $R^2 = 0,9531$.

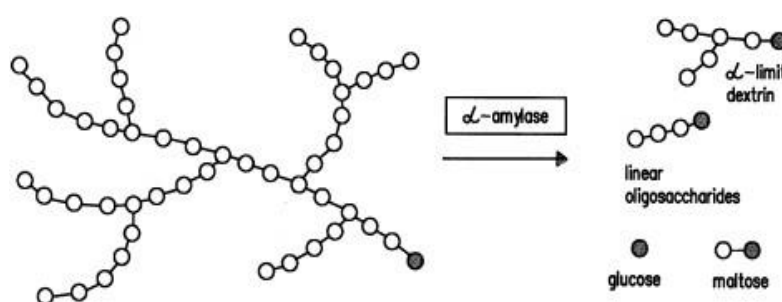


Gambar 4.3 Kurva Standart Glukosa

4.5 Uji Aktivitas Enzim Amilase *Bacillus subtilis*

Enzim amilase dapat berasal dari berbagai sumber, seperti mikroorganisme, tanaman, atau binatang. Penggunaan enzim dari mikroorganisme memiliki beberapa kelebihan, seperti lebih mudah untuk mengisolasinya, lebih sederhana daripada enzim yang berasal dari tumbuhan atau hewan, dan lebih mudah dikendalikan selama proses pembuatan. Amilase adalah salah satu jenis enzim yang

memainkan peran penting dalam industri. Proses hidrolisis pati menjadi molekul karbohidrat yang lebih sederhana, maltosa dan glukosa, dilakukan oleh enzim amilase. Pati yang belum terhidrolisis sepenuhnya menjadi glukosa juga menghasilkan produk akhir yang disebut dekstrin. Produksi enzim amilase saat ini mencapai tingkat yang sangat tinggi, menguasai sekitar 25% perdagangan enzim (Ningsih *et al.*, 2012).



Gambar 4.4 Hidrolisis Pati (Howard, 2015)

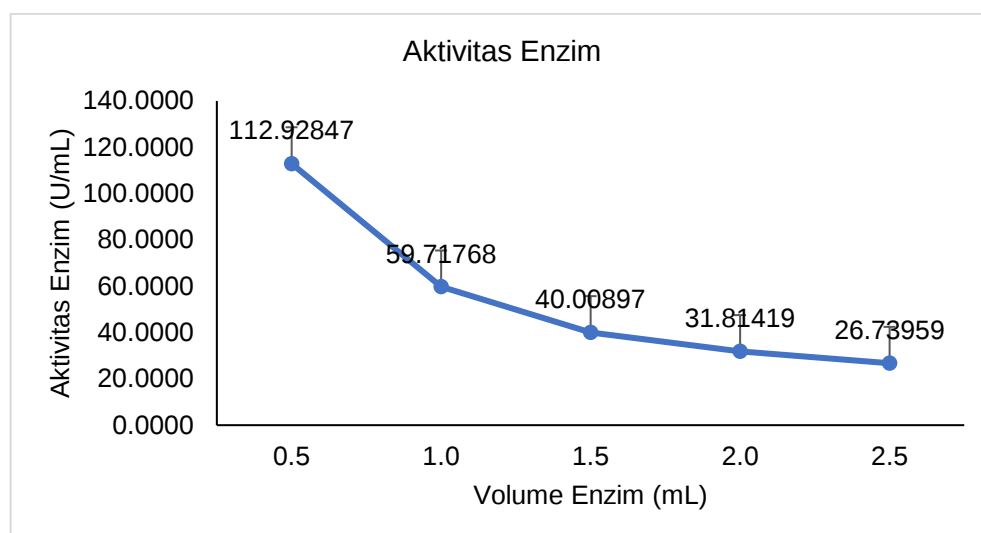
Catatan: (●) residu α -D-glukosa pereduksi; (○) residu α -D-glukosa nonpereduksi

Enzim α -amilase yang menghasilkan dekstrin secara endoamilase berasal dari jamur dan bakteri termotabil (*Bacillus subtilis*, *Bacillus Stearothermophilus*, dan *Streptococcus bovis*). Adapun mekanisme pemutusan ikatan α -1,4-glikosidik oleh enzim α -amilase, Sebagian besar enzim α -amilase memotong karbohidrat rantai Panjang secara endoamilase, tetapi beberapa memotong karbohidrat secara eksoamilase, tergantung dari sumbernya. Dektrin, limit dekstrin, oligosakarida, dan turunan siklodextrin adalah hasil penguraian α -amilase. Dektrin adalah produk antara pati dan dekstroza atau glukosa, dan limit dekstrin adalah campuran oligosakarida dengan rantai lebih pendek (Howard, 2015).

Tabel 4.1 Aktivitas Enzim Variasi Volume

Variasi Volume (mL)	Rerata Aktivitas Enzim (U/mL)
0,5	112,92847
1	59,71768
1,5	40,00897
2	31,81419
2,5	26,73959

Pada tabel 4.1 menunjukkan aktivitas enzim berdasarkan volume ekstrak kasar enzim. Absorption sampel digunakan untuk menghitung persamaan hasil kurva standar glukosa.

**Gambar 4.5** Aktivitas Enzim di berbagai volume

Pada gambar 4.6 menunjukkan bahwa nilai hasil pengujian aktivitas enzim pada berbagai volume mengalami penurunan seiring peningkatan volume enzim. Dengan volume 0,5 mL, aktivitas enzim amilase mencapai puncaknya dengan 112,92847 U/mL. namun aktivitas enzim turun dengan tingginya volume karena kejenuhan enzim dan gangguan interaksi enzim substrat karena akumulasi enzim yang berlebihan, oleh karena itu konsentrasi substrat sangat penting untuk memaksimalkan aktivitas enzim karena pada saat kecepatan reaksi maksimum,

enzim menjadi jenuh oleh substratnya dan tidak dapat berfungsi lebih cepat (Ramadhan & Wikandari, 2021).

Hasil uji ANOVA pada variasi volume ditampilkan dalam lampiran 8 yang menunjukkan nilai $F_{\text{tabel}} < F_{\text{hitung}}$ ($4,7374 < 261,733$) dengan nilai $\text{sig.} < \alpha$ ($0,000 < 0,05$) sehingga dapat dinyatakan bahwa variasi volume memberikan pengaruh signifikan terhadap aktivitas enzim amilase yang dihasilkan oleh *Bacillus subtilis* sehingga dilakukan uji lanjutan (Tukey's) agar mengetahui adanya perbedaan antar variasi volume 0,5-2,5 mL yang menunjukkan bahwa terdapat perbedaan nyata antar volume (Nopiyanti *et al.*, 2016).

Tabel 4.2 Hasil Uji lanjut beda nyata jujur (Tukey')

Volume (mL)	Rata-Rata Subset (α)	Notasi
0,5	112,92848	a
1	59,71768	ab
1,5	40,00897	b
2	31,81419	c
2,5	26,73959	d

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa variasi volume mempengaruhi aktivitas enzim amilase. Aktivitas enzim amilase mencapai puncak tertinggi sebesar 112,92847 U/mL di volume 0,5 mL dan terendah sebesar 26,73959U/mL di volume 2,5 mL.

5.2 Saran

Melakukan uji dengan faktor lain yang mempengaruhi aktivitas enzim misalnya dengan pH, Substrat, dan suhu

DAFTAR PUSTAKA

- Agustiarini, V., & Permata Wijaya, D. (2021). Jurnal Penelitian Sains. *Jurnal Penelitian Sains*, 21(3), 163–167.
- Andriani, R. (2016). *Pengenalan Alat-Alat Laboratorium Mikrobiologi Untuk Mengatasi*. 1(1).
- Ariandi. (2016). *Pengenalan Enzim Amilase (Alpha Amylase) dan Reaksi Enzimatiknya Menghidrolisis Amilosa Pati Menjadi Glukosa*. 07(1), 74–82.
- Ariyadi, T. Dewi, S. S. (2011). Pengaruh Sinar Ultra Violet Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Bacillus* sp. Sebagai Bakteri Kontaminan. *Jurnal Kesehatan*, 10, 98–107.
- Aronggear, A., Somar, E., Santoso, B. B., & Massora, M. (2022). DAYA HAMBAT EKTRAK ASETON 70% DAUN BUAH HITAM (*Haplolobus* sp.) TERHADAP BAKTERI *S.aureus*, *S.typhi*, *E.coli*, *B.subtilis*. *Prosiding Seminar Nasional MIPA UNIPA*, 2022, 164–170. <https://doi.org/10.30862/psnmu.v7i1.24>
- Asadullah, M. (2014). *Isolasi Bakteri Amilolitik Dari Bekatul Dan Uji Kemampuan Untuk Produksi Enzim Amilase Kasar Pada Berbagai Jenis Media Produksi*.
- Demirkan, E. (2011). Production, purification, and characterization of α -amylase by *Bacillus subtilis* and its mutant derivatives. *Turkish Journal of Biology*, 35(6), 705–712. <https://doi.org/10.3906/biy-1009-113>
- Denila, A. I. (2011). Pengaruh Penambahan Sorbitol Terhadap Stabilitas Enzim α -Amilase Dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148. *Skripsi*, 24.
- Fitriani, A., Supriyanti, F. M. T., & Heryanto, T. E. (2013). Penentuan aktivitas amilase kasar termofil. *Bionatura Jurnal Ilmu-Ilmu Hayati Dan Fisik*, 15(2), 107–113.
- Galung, F. S. (2021). Journal of Agritech Science, Vol 5 No 1, Mei 2021 ANALISIS KANDUNGAN KARBOHIDRAT (GLUKOSA) PADA SALAK GOLLA – GOLLA. *Journal of Agritech Science*, 5(1), 10–14.
- Hassan, S. A., Ali, S. A., Abbasi, A., & Kamal, M. (2011). Purification and biochemical characterization of a Ca^{2+} - independent, thermostable and acidophilic α -amylase from *Bacillus* sp. RM16. *African Journal of Biotechnology*, 10(32), 6082–6089. <https://doi.org/10.5897/AJB10.2292>
- Howard, W. (2015). Pengujian aktivitas enzim amilase. *Teknologi Industri Institut Teknologi Bandung*, 10(02), 1–12.
- Irawati, R. (2016). Karakterisasi pH, Suhu dan Konsentrasi Substrat pada Enzim Selulase Kasar yang Diproduksi Oleh *Bacillus circulans*. *Skripsi*, Fakultas Sains dan Teknologi. Universitas Islam N.
- Ischak, Salimi, B. (2017). *Biokimia Dasar 1* (Issue september 2016).
- Izzatinnisa, & Utami, U. dan A. M. (2020). Karakterisasi Enzim Amilase dari Bakteri *Bacillus megaterium* pada variasi suhu, pH dan konsentrasi Substrat. *Jurnal Riset Biologi Dan Aplikasinya*, 2(50), 18–25.

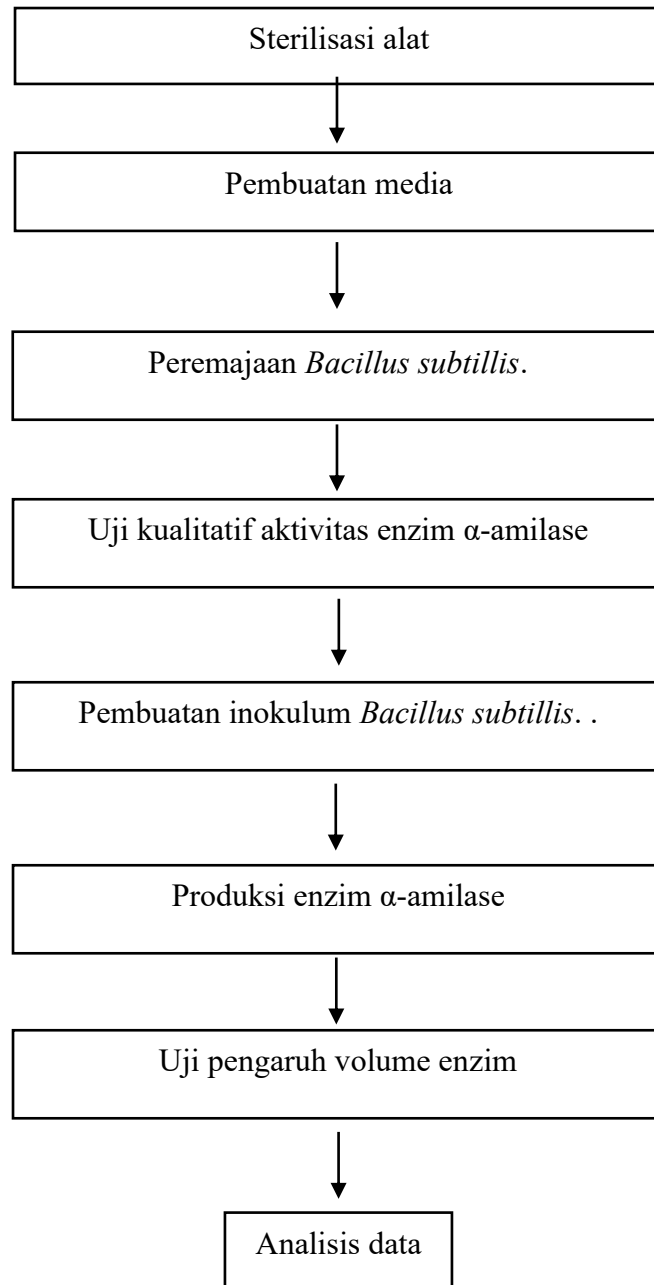
- Juariah, S., & Sari, W. (2018). PEMANFAATAN LIMBAH CAIR INDUSTRI TAHU SEBAGAI MEDIA ALTERNATIF PERTUMBUHAN *Bacillus* sp. *Lontar Physics Today*, 1(1), 38–44.
- Khoiriyah, H., & Ardiningsih. (2014). Penentuan Waktu Inkubasi Optimum Terhadap Aktivitas Bakteriosin. *Jkk*, 3(1), 7–12.
- Kompleks, P., & Urease, I. (2019). *Al-Kimia*. 7(1).
- Lestari, D. P. (2018). Aktivitas Enzim Pencernaan Udang Vaname yang diberikan pakan berbahan tepung. *Perikanan*, 17(1), 1–14.
- 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 and Pharmacology Journal*, 12(3), 1061–1068. <https://doi.org/10.13005/bpj/1735>
- Maarel, M. J. E. C. Van Der, & Veen, B. Van Der. (2002). *Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family*. 94, 137–155.
- Mafrudhotin, N. (2022). Produksi dan Karakterisasi Bakteriosin *Lactobacillus Plantarum* FNCC 0026 Yang diisolasi dari Asinan Sayur. In *γ787* (Issue 8.5.2017).
- Maryam, St., Juniasti, S., & Kosman, R. (2015). Uji Aktivitas ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL BUAH BELIMBING WULUH (*Averrhoa bilimbi* L.) ASAL KOTA WATAMPONE. *Jurnal Ilmiah As-Syifaa*, 7(1), 60–69. <https://doi.org/10.33096/jifa.v7i1.21>
- Mauliya, V. (2023). PENGARUH VARIASI pH TERHADAP AKTIVITAS ENZIM AMILASE DARI BAKTERI. In *Program Studi Kimia Fakultas Sains Dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang*.
- Naiola, E., Mikrobiologi, B., Lipi, B., & Raya Juanda, J. (2017). Karakterisasi Amilase Dari Isolat Bakteri Yang Berasal Dari Bali Dan Lombok. *Jurnal Biologi Indonesia*, III(1), 0–7.
- Nangin, D., & Sutrisno, A. (2015). ENZIM AMILASE PEMECAH PATI MENTAH DARI MIKROBA : KAJIAN PUSTAKA *Raw Starch Degrading Amylase Enzyme from Microbes : A Review*. 3(3), 1032–1039.
- Ningsih, D. R., Rastuti, U., & Kamaludin, R. (2012). Karakterisasi enzim amilase dari bakteri *Bacillus amyloliquefaciens*. *Pengembangan Sumber Daya Pedesaan Dan Kearifan Lokal Berkelanjutan*, 39–45.
- Nisak, C. (2020). Optimasi Aktivitas Enzim α -amilase dari jamur *Penicillium Sublateritium* Pada Variasi Suhu. In *Sustainability (Switzerland)* (Vol. 14, Issue 2).
- Noerwijati, K. (2015). Upaya Modifikasi Pati Ubikayu Melalui Pemuliaan Tanaman. *Buletin Palawija*, 13(1), 92–100.
- Nopiyanti, H., Agustriani, F., & Melki, dan. (2016). SKRINING *Nypa fruticans* SEBAGAI ANTIBAKTERI *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* DAN *Staphylococcus aureus* SCREENING of *Nypa fruticans* AS ANTIBACTERIAL OF

- Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* AND *Staphylococcus aureus*. *Maspari Journal*, 8(2), 83–90.
- Nurhidayanti, N. (2022). Perbandingan Media Alternatif Kacang Kedelai dan Media Nutrient Agar Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus*. *Indobiosains*, 4(2), 47. <https://doi.org/10.31851/indobiosains.v4i2.7997>
- Prihatiningsih, N., & Djatmiko, H. A. (2016). Enzim Amilase Sebagai Komponen Antagonis *Bacillus Subtilis* B315 Terhadap *Ralstonia Solanacearum* Kentang. *Jurnal Hama Dan Penyakit Tumbuhan Tropika*, 16(1), 10. <https://doi.org/10.23960/j.hptt.11610-16>
- Putri, D. M., Ristiani, L., & Hasanah, Q. (2023). Peran Enzim dalam Proses Metabolisme Menurut Al-Quran dan Hadist. *ISTISYFA: Journal of Islamic Guidance and Conseling*, 2(1), 194–206.
- Ramadhan, B., & Wikandari, P. R. (2021). Review Artikel: Aktivitas Enzim Amilase Dari Bakteri Asam Laktat (Karakteristik Dan Aplikasi) Review Article: Activities Enzyme Amylase From Lactat Acid Bacteria (Characterization and Application). *UNESA Journal of Chemistry*, 10(2), 109–120.
- 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. <https://doi.org/10.1155/2014/568141>
- Rizki, S. (2018). Pengaruh Konsentrasi Inokulum dan Lama Fermentasi Terhadap Aktivitas Antibakteri Bakteriosin yang dihasilkan oleh *Lactobacillus Plantarum*. In *Gender and Development* (Vol. 120, Issue 1).
- Salsabila, A. L., & Fahrurroji, I. (2021). Hidrolisis Pada Sintesis Gula Berbasis Pati Jagung. *Edufortech*, 6(1). <https://doi.org/10.17509/edufortech.v6i1.33289>
- Setyahadi, S., Nurrahman, M. I., & Gozan, M. (2014). Pengaruh Kecepatan Agitasi pada Media Sintesis untuk Produksi α -Amilase dari *Bacillus amyloliquefaciens* T1. *Journal of Agro-Based Industry*, 31(1), 16–21.
- Simanjuntak, E., Kusdiyantini, E., & Lunggani, A. T. (2021). Pengaruh variasi sumber karbon terhadap aktivitas enzim isolat khamir Ep A dari limbah kulit buah nanas madu (*Ananas comocus* L.). *NICHE Journal of Tropical Biology*, 4(1), 1–7.
- SOEKA, Y. S. (2015). Kemampuan *Bacillus licheniformis* dalam menghasilkan enzim α -amilase. 1, 1162–1166. <https://doi.org/10.13057/psnmbi/m010534>
- Souza. (2010). APPLICATION OF MICROBIAL -AMYLASE IN INDUSTRY – A REVIEW Paula Monteiro de Souza; Pérola de Oliveira e Magalhães Departamento de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 850–861.
- Supriyatna, A., Amalia, D., Jauhari, A. A., & Holydaziah, D. (2015). *DARI LARVA*. IX(2), 18–32.

- Susilawati, I. O., Batubara, U. M., & Riany, H. (2015). Analisis Aktivitas Enzim Amilase yang Berasal Dari Bakteri Tanah di Kawasan Universitas Jambi. *Semirata*, 4(1), 359–367.
- Tarigan, W. F. (2015). *Karakterisasi Enzim Selulase dari Bakteri Selulolitik Bacillus Sp.* 95(2), 443–452.
- Tazkiah, N. P., Rosahdi, T. D., & Supriadin, A. (2019). Isolasi dan Karakterisasi Enzim Amilase dari Biji Nangka (*Artocarpus heterophyllus*). *Al-Kimiya*, 4(1), 17–22. <https://doi.org/10.15575/ak.v4i1.5079>
- Thawil, Andriyana, D., Novalina, D. (2020). Studi Literatur : Pertumbuhan Bakteri pada Media Alternatif Pengganti Nutrient Agar. *Journal Unisayogya*, 1–11.
- Thohari, N. (2019). *pemanfaatan tepung kacang hijau*. 08, 02.
- Wahidah, T. H., Mustikaningtyas, D., Widiatningrum, T., & Dewi, P. (2022). Pengaruh Faktor Lingkungan terhadap Pertumbuhan *Trichoderma* spp. dan Aktivitas Enzim Amilase dan Xilanase. *Life Science*, 11(2), 108–119.
- Wahyuningsih, N., & Zulaika, E. (2019). Perbandingan Pertumbuhan Bakteri Selulolitik pada Media Nutrient Broth dan Carboxy Methyl Cellulose. *Jurnal Sains Dan Seni ITS*, 7(2), 7–9. <https://doi.org/10.12962/j23373520.v7i2.36283>
- Wardhani, W. K., & Titah, H. S. (2021). Studi Literatur Alternatif Penanganan Tumpahan Minyak Mentah Menggunakan *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas putida* (Studi Kasus: Tumpahan Minyak Mentah Sumur YYA-1). *Jurnal Teknik ITS*, 9(2), 97–102. <https://doi.org/10.12962/j23373539.v9i2.52637>
- Wibowo, M. A., Sari, D. N., Jayuska, A., & Ardiningsih, P. (2021). KOMPOSISI KIMIA DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI MINYAK ATSIRI DAUN KAYU PUTIH (*Melaleuca cajuputi*) DARI KOTA SINGKAWANG. *Biopropal Industri*, 12(1), 1. <https://doi.org/10.36974/jbi.v12i1.6509>
- Witazora, Y., Yandri, Suhartati, T., Satria, H., & Hadi, S. (2021). Effect of glutaraldehyde addition on the stability of the α -amylase from *Bacillus subtilis* ITBCCB148. *Journal of Physics: Conference Series*, 1751(1). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1751/1/012097>
- Zahidah, D., & Shovitri, M. (2013). Isolasi , Karakterisasi dan Potensi Bakteri Aerob Sebagai Pendegradasi Limbah Organik. *Jurnal Sains Dan Seni Pomits*, 2(1), 12–15.
- Zuniz Prastika, E. (2018). Pengaruh Konsentrasi Substrat Dan Lama Waktu Inkubasi Terhadap Aktivitas Enzim Protease Yang Diproduksi Oleh *Bacillus subtilis*. *Jurusan Biologi Fakultas Sains Dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang*, 53(9), 1689–1699.

LAMPIRAN

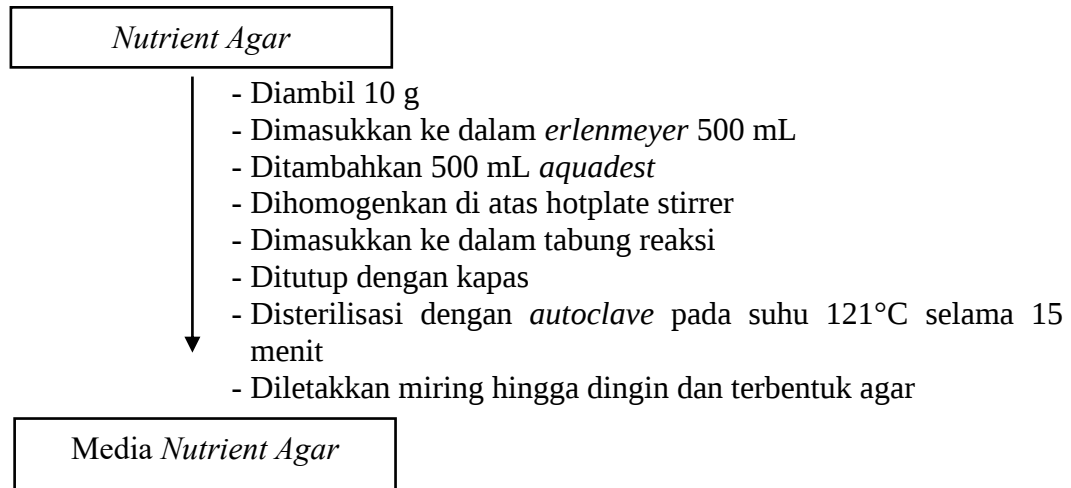
Lampiran 1. Rancangan Penelitian



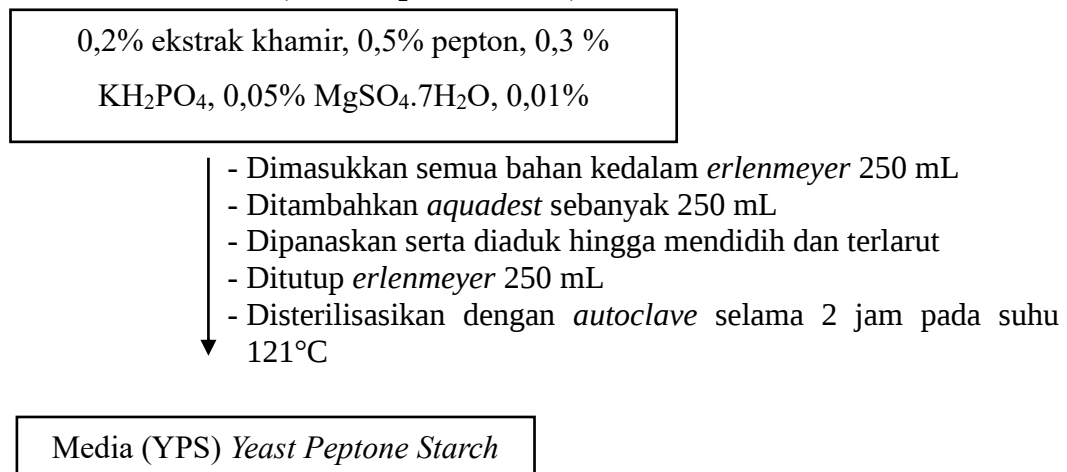
Lampiran 2. Diagram Alir

L.2.1. Pembuatan Media

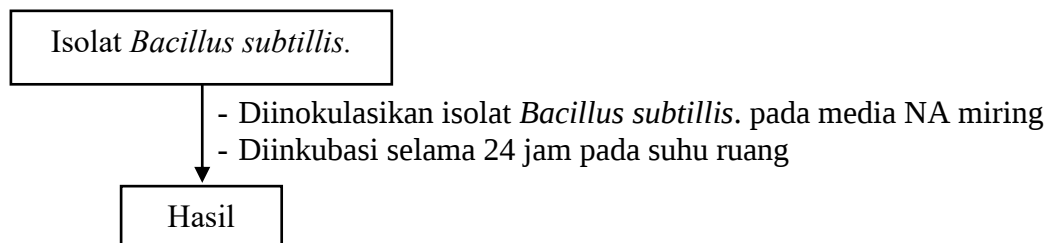
L.2.1.1. Media *Nutrient Agar*



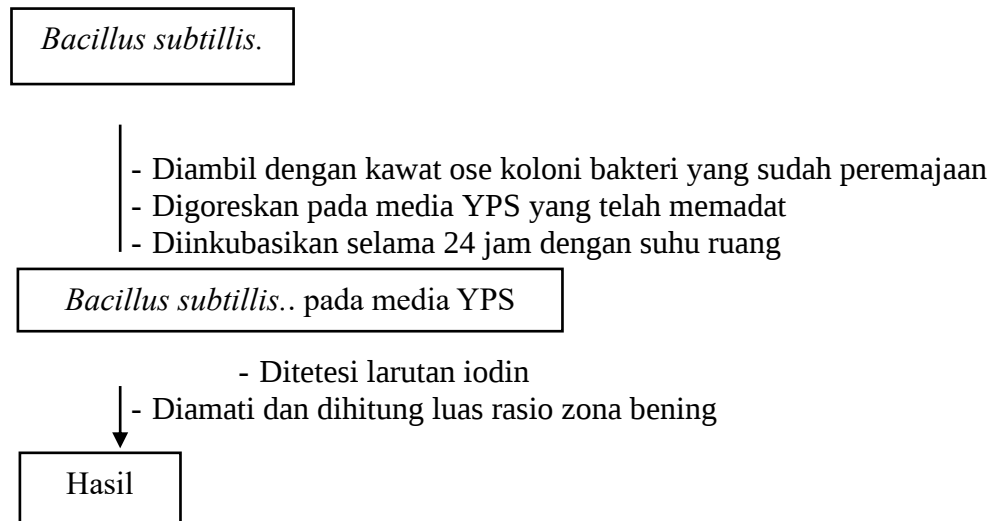
L.2.1.2. Media YPS (*Yeast Peptone Starch*)



L.2.2. Peremajaan Bakteri *Bacillus subtilis*.

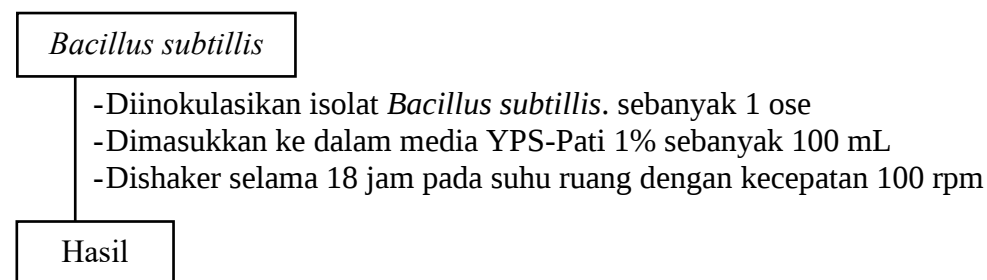


L.2.3. Uji Aktivitas Enzim Amilase Secara Kualitatif

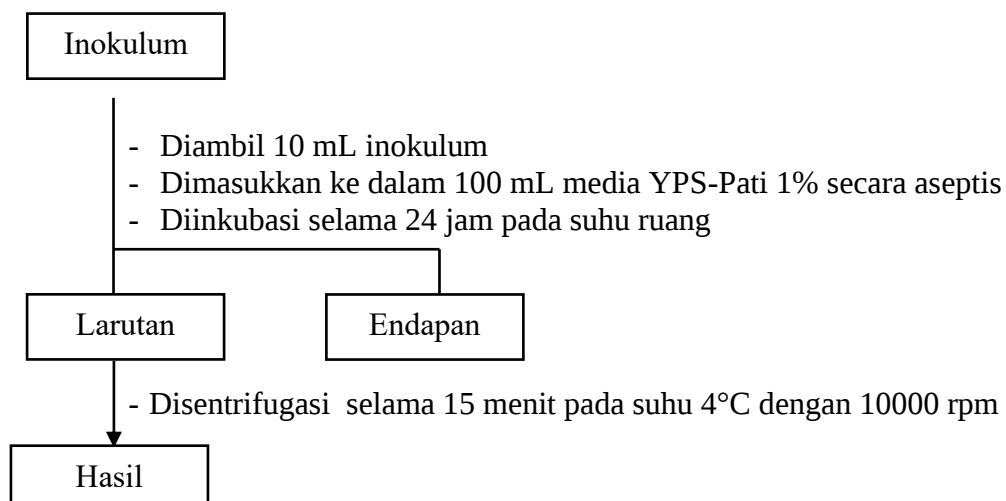


s

L.2.4. Pembuatan Inokulum



L.2.5. Produksi Enzim Amilase



Uji Pengaruh Volume Enzim

Ekstrak kasar enzim

- Disiapkan 6 tabung reaksi steril
- Dimasukkan 1 mL pati 2,5% ke masing-masing tabung
- Dimasukkan ekstrak kasar enzim ke masing-masing tabung sesuai variasi volume
- Diinkubasi selama 60 menit pada suhu 37°C
- Didiamkan pada suhu ruang hingga dingin
- Ditambahkan 1mL DNS
- Ditambahkan 1 mL K-Na Tartat
- ↓ - Ditambahkan aquadest hingga volume 10 mL dan divortex
- Diamati dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis

Hasil

Lampiran 3. Perhitungan dan Pembuatan Larutan

L.3.1. Pembuatan Media dan Reagen

L.3.1.1. Media NA

Media *Nutrient Agar* dibuat dengan cara dilarutkan 2 g NA bubuk dalam 100 mL *aquadest* kemudian dihomogenkan di atas hotplate stirrer. Sebagian larutan NA tersebut dituangkan ke dalam tabung reaksi bertujuan untuk memelihara isolat di dalam media agar miring. Kemudian disterilisasi pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Setelah itu diletakkan miring hingga dingin dan terbentuk agar (Arista *et al.*, 2013; Irawati, 2016).

L.3.1.2. Media NB

Media Nutrient Broth (NB) dibuat dengan melarutkan nutrient broth powder sebanyak 0,8 gram ke dalam 100 mL aquades sambil diaduk dengan stirrer dan dipanaskan hingga mendidih (Putri *et al.*, 2019). Setelah mendidih dan semua bahan larut sempurna, media NB disterilkan dalam autoclave pada suhu 121°C tekanan 15 psi selama 15 menit (Agustiarini & Permata Wijaya, 2021)

L.3.1.3. Media YPS – Pati 1%

Media yang digunakan sebagai media isolasi dan produksi enzim amilase pada penelitian ini adalah media YPS (*Yeast Peptone Starch*) yang mengandung 0,5 g *yeast extract*, 1 g *peptone*, 0,1 g KH₂PO₄, 0,5 g NaCl, dan 1 g pati sebagai sumber karbon. Apabila dibutuhkan berbentuk padat maka ditambahkan 1 g agar. Semua

bahan tersebut ditambahkan ke dalam aquadest sebanyak 100 mL serta dipanaskan dan diaduk dengan magnetic stirrer hingga mendidih dan terlarut. Setelah itu media tersebut dimasukkan ke dalam botol UC 100 mL dan disterilisasi menggunakan *autoclave* (Naiola *et al.*, 2017; Soeka, 2015).

L.3.1.4. Larutan Iodin 1% (v/v)

Dimisalkan larutan yang diketahui adalah larutan iodin dengan konsentrasi 10% dalam 100 mL

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

$$0,1 \times V_1 = 0,01 \times 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = 1/0,1 = 10 \text{ mL}$$

Jadi, dibutuhkan 10 mL larutan iodin dalam larutan iodin 10% untuk membuat larutan iodin 1%.

L.3.1.5. Pembuatan Reagen DNS

Diambil 1 g DNS, 1 g NaOH, 0,05 g Na₂SO₃ dan 0,2 g fenol yang kemudian dilarutkan dengan *aquadest* di dalam labu takar 100 mL dan dihomogenkan. Kemudian larutan disimpan dalam botol gelap dengan suhu dingin (Wardani *et al.*, 2021).

L.3.1.6. Pembuatan Larutan Standar Glukosa 25, 50, 100, 200, dan 400 ppm

Pembuatan larutan stok glukosa baku dengan konsentrasi 500 ppm sebagai berikut,

$$\begin{aligned} \text{Larutan stok glukosa} &= \frac{0,5 \text{ g}}{100 \text{ mL aquades}} \\ &= 5 \text{ mg/mL} \end{aligned}$$

Larutan glukosa dengan konsentrasi 25, 50, 100, 200, dan 400 ppm dilakukan dengan cara pengenceran larutan glukosa baku. Pembuatan larutan glukosa tersebut sebagai berikut:

a. Membuat konsentrasi 25 ppm

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

b. Membuat konsentrasi 50 ppm

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

c. Membuat konsentrasi 100 ppm

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

d. Membuat konsentrasi 200 ppm

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

e. Membuat konsentrasi 400 ppm

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

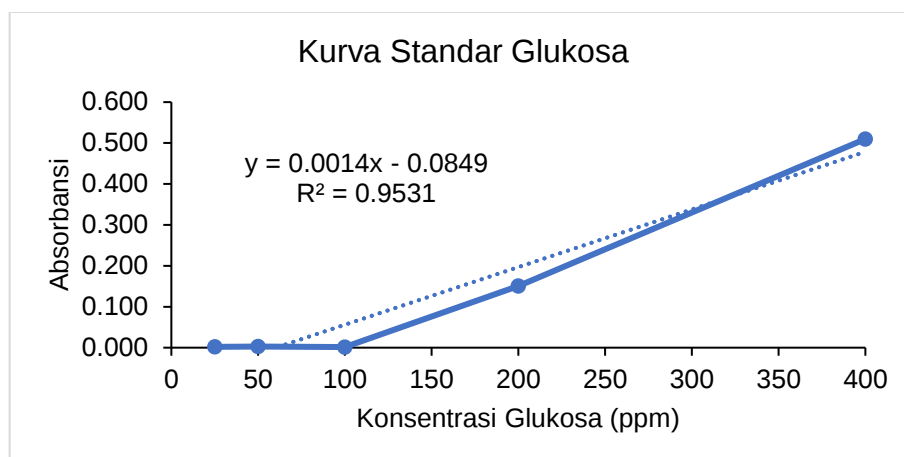
Tabel L.3.1 Perhitungan Larutan Standar Glukosa

No	Konsentrasi Glukosa (ppm)	Volume Glukosa (mL)	Volume Akuades (mL)
1	25	0,5	9,5
2	50	1	9
3	100	2	8
4	200	4	6
5	400	8	2

Lampiran 4. Kurva Standar Glukosa

Tabel L.4.1 Kurva Standar Glukosa

Konsentrasi Glukosa (ppm)	Absorbansi
25	0,0023
50	0,0030
100	0,0015
200	0,1508
400	0,5099



Lampiran 5. Pengukuran Absorbansi Sampel

Tabel L.5.1 Absorbansi Sampel

Vol. Enzim (mL)	Nilai Absorbansi		Rata-Rata
	U1	U2	
0,5	0,00140	0,00070	0,00105
1	0,00660	0,00540	0,00600
1,5	0,01170	0,00120	0,00645
2	0,02040	0,00350	0,01195
2,5	0,02900	0,00470	0,01685

Lampiran 6. Konsentrasi Glukosa

Dengan merujuk pada kurva standar glukosa yang tercantum dalam Lampiran 4, ditemukan persamaan regresi $y = 0,0014x - 0,0859$. Dengan menggunakan persamaan ini, nilai y menunjukkan **absorbansi** dan nilai x menunjukkan **konsentrasi**. Oleh karena itu, konsentrasi yang sesuai dengan absorbansi sebesar 0,0014 adalah:

$$y = 0,0014x - 0,0849$$

$$0,0014 = 0,0014x - 0,0849$$

$$x = 61,22982 \text{ g/mL}$$

Berdasarkan perhitungan tersebut diperoleh konsentrasi glukosa pada Tabel L.6.1

Tabel L.6.1 Data Konsentrasi Glukosa pada Sampel

Vol. Enzim (mL)	Konsentrasi glukosa		Rata-Rata
	U1	U2	
0,5	61,22982	60,73293	60,98138
1	64,92100	64,06919	64,49510
1,5	68,54120	61,08785	64,81453
2	74,71683	62,72049	68,71866
2,5	80,82147	63,57230	72,19689

Lampiran 7. Perhitungan Aktivitas Enzim Amilase

1 Unit Enzim = 1 Mikromol substrat per menit ($\mu\text{mol}/\text{menit}$)

$$\text{Aktivitas Enzim} = \frac{K. \text{ Glukosa } (\frac{g}{mL}) \times 1000}{BM \text{ Glukosa } (\frac{g}{mol})} \times \left[\frac{V \text{ total (mL)}}{V \text{ enzim (mL)} \times \text{waktu inkubasi (menit)}} \right]$$

Keterangan

Konsentrasi Glukosa = Tabel L.6.1

Volume Total = 10 mL

Volume Enzim = 0,5 mL; 1 mL; 1,5 mL; 2 mL; 2,5 mL

Berat Molekul Glukosa = 180 g/mol

Waktu Inkubasi = 60 menit

Jika konsentrasi glukosa sebesar 62,3571 g/mL dan volume enzim 0,5 mL, maka aktivitas enzim yang didapatkan sebesar:

$$\text{Aktivitas Enzim} = \frac{62,3571 (\frac{g}{mL})}{180 (\frac{g}{mol})} \times \left[\frac{10 (mL)}{0,5 (mL) \times 60 (menit)} \right]$$

Hasil perhitungan aktivitas enzim amilase dipresentasikan pada Tabel L.7.1

Tabel L.7.1 Data Aktivitas Enzim Amilase

Vol. Enzim (mL)	Aktivitas Enzim		Rata-Rata
	U1	U2	
0,5	113,38856	112,46839	112,92847
1	60,11204	59,32332	59,71768
1,5	42,30938	37,70855	40,00897
2	34,59112	29,03726	31,81419
2,5	29,93388	23,54530	26,73959

Lampiran 8. Hasil Analisis One Way ANOVA

Descriptives								
Aktivitas Enzim								
Volume Enzim	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0,5	2	112,92848	,651	,46008	107,0825	118,7744	112,4684	113,3886
1	2	59,71768	,558	,39436	54,7069	64,7285	59,3233	60,1120
1,5	2	40,00897	3,253	2,30041	10,7794	69,2385	37,7086	42,3094
2	2	31,81419	3,927	2,77693	-3,4701	67,0984	29,0373	34,5911
2,5	2	26,73959	4,517	3,19429	-13,8477	67,3269	23,5453	29,9339
Total	10	54,24178	33,198	10,49828	30,4930	77,9905	23,5453	113,3886

Tests of Homogeneity of Variances						
Levene Statistic				df1	df2	Sig.
Volume Enzim	Based on Mean	13047876289752363000000000000000		4	5	,000
	Based on Median	13047876289752363000000000000000		4	5	,000
	Based on Median and with adjusted df	13047876289752363000000000000000		4	1,615	,000
	Based on trimmed mean	6683058587434137000000000000000		4	5	,000

ANOVA

Volume Enzim					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	9872,108	4	2468,027	261,733	,000
Within Groups	47,148	5	9,430		
Total	9919,256	9			

U/mL

Tukey HSD ^a					
Volume Enzim		Subset for alpha = 0.05			
	N	1	2	3	4
2,5	2	26,73959			
2	2	31,81419	31,81419		
1,5	2		40,00897		
1	2			59,71768	
0,5	2				112,92848
Sig.		,528	,191	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

Lampiran 9. Dokumentasi



Hasil peremajaan bakteri



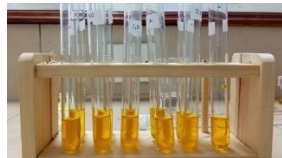
Produksi inokulum



Produksi enzim



Kurva standar setelah dipanaskan



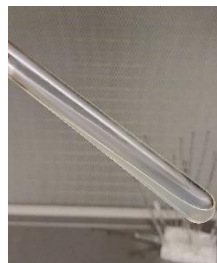
Uji aktivitas enzim setelah inkubasi



Uji aktivitas enzim setelah ditambahkan DNS, K-Na Tartat, dan *Aquadest*



Uji Aktivitas enzim setelah disentrifugasi



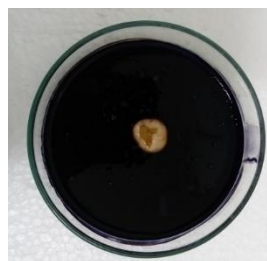
Media *nutrient agar* miring



Media *nutrient broth*



Media *yeast extract, peptone, starch* (YPS)



Uji Kualitatif *Bacillus subtilis*