

**ISOLASI BAKTERI AMILOLITIK DARI BEKATUL DAN UJI  
KEMAMPUAN UNTUK PRODUKSI ENZIM AMILASE KASAR PADA  
BERBAGAI JENIS MEDIA PRODUKSI**

**SKRIPSI**

Oleh :  
**M. ASADULLAH**  
**NIM. 09630049**



**JURUSAN KIMIA**  
**FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI**  
**UNIVERSITAS ISLAM NEGERI (UIN) MAULANA MALIK IBRAHIM**  
**MALANG**  
**2014**

**ISOLASI BAKTERI AMILOLITIK DARI BEKATUL DAN UJI  
KEMAMPUAN UNTUK PRODUKSI ENZIM AMILASE KASAR PADA  
BERBAGAI JENIS MEDIA PRODUKSI**

**SKRIPSI**

**Diajukan Kepada:**

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

**Oleh:**

**M. ASADULLAH  
NIM. 09630049**

**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI (UIN) MAULANA MALIK IBRAHIM  
MALANG**

**2014**

**SURAT PERNYATAAN  
ORISINALITAS PENELITIAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : M. Asadullah

NIM : 09630049

Fakultas/Jurusan : Sains dan Teknologi/Kimia

Judul Penelitian : Isolasi Bakteri Amilolitik Dari Bekatul dan Uji Kemampuan Untuk  
Produksi Enzim Amilase Kasar Pada Berbagai Jenis Media  
Produksi

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 mempertanggung jawabkan, serta diproses sesuai peraturan yang berlaku.

Malang, 08 Juli 2014

Yang Membuat Pernyataan,

M. Asadullah

NIM. 09630049

**ISOLASI BAKTERI AMILOLITIK DARI BEKATUL DAN UJI  
KEMAMPUAN UNTUK PRODUKSI ENZIM AMILASE KASAR PADA  
BERBAGAI JENIS MEDIA PRODUKSI**

**SKRIPSI**

Oleh:  
**M. Asadullah**  
**NIM. 09630049**

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji :  
Tanggal : 08 Juli 2014

Pembimbing I

Pembimbing II

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

Tri Kustono Adi, M. Sc  
NIP. 19710311 200312 1 002

Mengetahui,  
Ketua Jurusan Kimia  
Fakultas Sains dan Teknologi  
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang

Elok Kamilah Hayati, M.Si  
NIP.19790620 200604 2 002

**ISOLASI BAKTERI AMILOLITIK DARI BEKATUL DAN UJI  
KEMAMPUAN UNTUK PRODUKSI ENZIM AMILASE KASAR PADA  
BERBAGAI JENIS MEDIA PRODUKSI**

**SKRIPSI**

Oleh:  
**M. ASADULLAH**  
**NIM. 09630049**

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi  
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan  
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)  
Tanggal : 08 Juli 2014

Penguji Utama : Diana Candra Dewi, M. Si (.....)  
NIP. 19770720 200312 2 001  
Ketua Penguji : Eny Yulianti, M. Si (.....)  
NIP. 19760611 200501 2 006  
Sekretaris Penguji : Akyunul Jannah, S. Si., M.P (.....)  
NIP. 19750410 200501 2 009  
Anggota Penguji : Tri Kustono Adi, M. Sc (.....)  
NIP. 19710311 200312 1 002

Mengesahkan,  
Ketua Jurusan Kimia  
Fakultas Sains dan Teknologi  
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang

Elok Kamilah Hayati, M.Si  
NIP. 19790620 200604 2 002

## Lembar Persembahan

**Ku persembahkan karya sederhana ku ini untuk :**

Kedua Orangtuaku, Guru/dosenku, Asatidz yang dengan sabar mengajarkan, membimbing serta meluangkan waktunya yang tak dapat tergantikan dengan apapun termasuk perhatian mereka, Semoga Allah limpahkan ni'mat, rahmat, hidayah serta kemudahan kepada mereka. Amin Ya Rabb

Karya ini tak sebesar jerih payahmu dalam mendidik, mendoakan, membimbing serta berkorban. Untuk Ayahanda tercinta Mukim S. Pdl dan ibunda Salbiah yang senantiasa mencurahkan segala dukungan, serta doa-doa yang tak terhitung. Motivator terhebat dalam setiap langkah penulis, terutama dalam menyelesaikan studi.

Adik yang saya cintai karena Allah, M. Nur Hidayat yang sebentar lagi akan mendapatkan gelar S. Pdl jua, dan Shaumai Agustina Adik Tercinta

## MOTTO

**“Jangan Jadikan Masalah Itu Sebagai Beban, Namun  
Jadikanlah Masalah Itu Sebagai Sarana Tarbiyah  
(Pembelajaran) Dalam Pendewasaan Diri dan Perbaikan  
Pribadi”**

**“Terkadang Kita Perlu Salah Untuk Mengetahui Yang  
Benar, Terkadang Kita Perlu Keliru Untuk Mengetahui Yang  
Tepat. Jangan Berpangku Tangan Menunggu Orang Lain,  
Namun Kerjakanlah Karena Kita Akan Belajar Dari  
Kesalahan-kesalahn Kita – Lab Biotek 2013-2014”**

**“Rasa Takut Adalah Jalan Menuju Sisi Gelap Pribadi Kita,  
Maka Hendaklah Kita Berkerja Hanya Karena Allah, Apapun  
Itu Niatkan Semata-mata Hanya Untuk Allah”**

## KATA PENGANTAR

*Assalamu'alaikum Wr. Wb*

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas segala rahman dan rahim-Nya yang diberikan kepada penulis hingga dapat menyelesaikan skripsi ini dengan judul ” **Isolasi Bakteri Amilolitik Dari Bekatul Dan Uji Kemampuan Untuk Produksi Enzim Amilase Kasar Pada Berbagai Jenis Media Produksi**”.

Shalawat serta salam senantiasa terlimpahkan kepada Nabi besar Muhammad SAW yang dengan sabar membimbing umatnya menuju keadaan penuh ilmu dan naungan tata krama yakni *Ad-dinul Islam*.

Penulis menyadari bahwa baik dalam perjalanan studi maupun penyelesaian skripsi ini banyak memperoleh bimbingan dan motivasi dari berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis menyampaikan terima kasih banyak kepada:

1. Prof. Dr. H. Mudjia Rahardjo, M.Si selaku rektor Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Dr. drh. Hj. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si selaku Dekan Fakultas sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Ibu Akyunul Jannah, S.Si, M.P selaku pembimbing I dan ibu Anik Maunatin, S.T, M.P selaku konsultan serta bapak Tri Kustono Adi, M. Sc selaku pembimbing II.
5. Ibu Eny Yulianti M. Si dan Ibu Diana Candra Dewi M. Si selaku penguji.
6. Bapak dan Ibu penulis yang selalu membimbing, mendidik, mengarahkan, mendukung dan senantiasa mendoakan hingga proses penulisan skripsi ini terselesaikan terutama kepada Ibu Akyunul Janna S. Si, M.P dan Ibu Anik Maunatin, S.T, M.P serta bapak Tri Kustono Adi, M. Sc .
7. Teman-teman kimia (Ina, Ririn, Ulva, Suci, Iza, Mas Hendi, MbK Danar, MbK Wildha, MbK Zahra, Anang, Umi, Lu'ul, David, Farid, Erwan dan semua yang tidak bisa disebutkan satu persatu).
8. Para Asatidz dan Santri di PPDU beserta semua pihak yang telah membantu penyelesaian skripsi ini baik materi maupun moril.

Dengan bekal dan kemampuan yang terbatas, penulis menyadari masih banyak kesalahan dan kekurangan dalam penulisan skripsi ini. Akhirnya, tiada kata selain harapan semoga skripsi ini bermanfaat sesuai dengan maksud dan tujuannya. Amin Ya rabbal Alamin.

*Wassalamu'alaikum Wr. Wb.*

Malang, 08 Juli 2014

Penulis

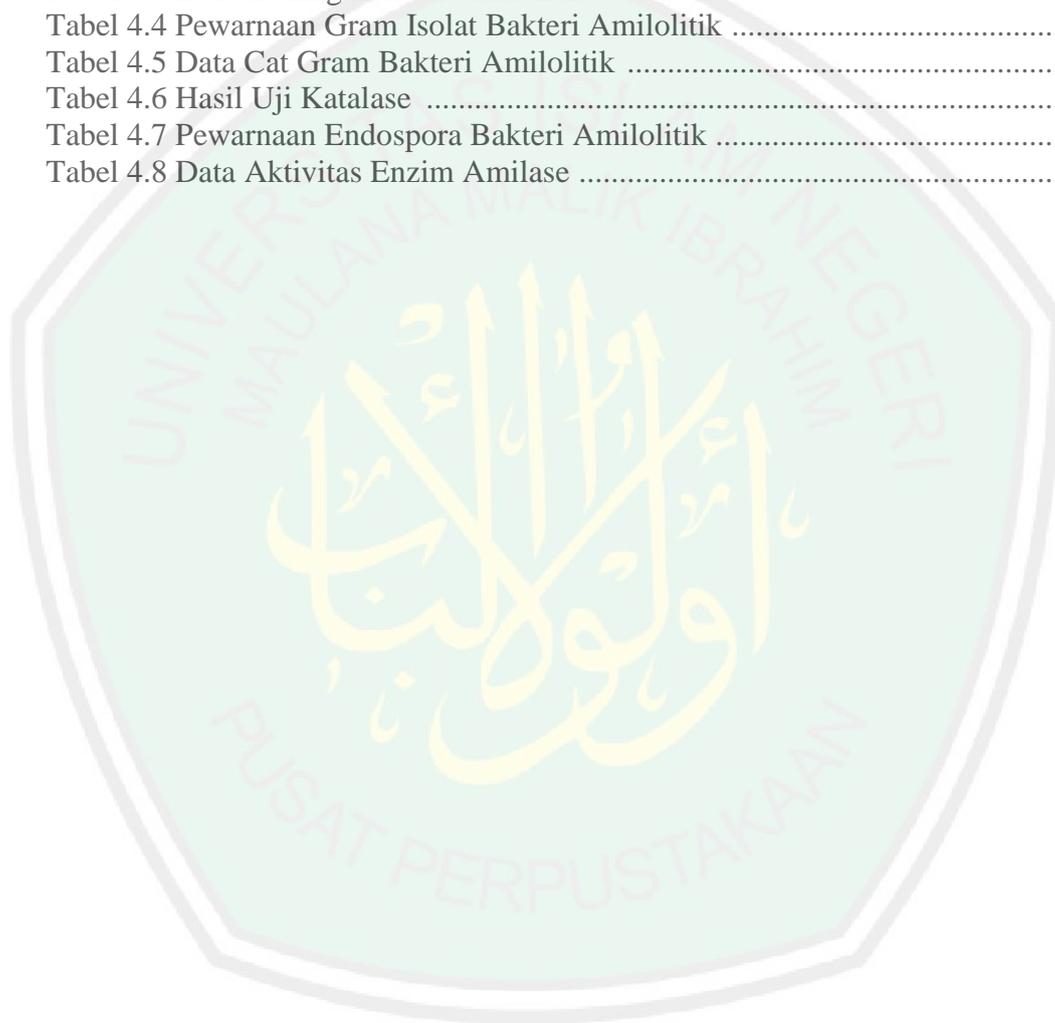
## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>i</b>
<b>SURAT PERNYATAAN .....</b>	<b>ii</b>
<b>LEMBAR PERSETUJUAN .....</b>	<b>iii</b>
<b>LEMBAR PENGESAHAN .....</b>	<b>iv</b>
<b>LEMBAR PERSEMBAHAN .....</b>	<b>v</b>
<b>MOTTO .....</b>	<b>vi</b>
<b>KATA PENGANTAR.....</b>	<b>vii</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>ix</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>xi</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>xii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>xiii</b>
<b>ABSTRAK .....</b>	<b>xiv</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xv</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	7
1.3 Tujuan .....	8
1.4 Batasan Masalah .....	8
1.5 Manfaat .....	8
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>9</b>
2.1 Bekatul .....	9
2.2 Bakteri Amilolitik .....	14
2.3 Enzim Amilase .....	15
2.4 Media Pertumbuhan .....	20
2.5 Penentuan Aktivitas Enzim Amilase dengan Metode DNS .....	25
2.6 Pewarnaan Gram .....	27
2.7 Kurva Pertumbuhan .....	30
<b>BAB III METODOLOGI .....</b>	<b>32</b>
3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan Penelitian .....	32
3.2 Alat dan Bahan .....	32
3.2.1 Alat .....	32
3.2.2 Bahan .....	32
3.3 Rancangan Penelitian .....	33
3.4 Tahap Penelitian .....	33
3.5 Pelaksanaan Penelitian .....	34
3.5.1 Tahap Preparasi Alat dan Bahan .....	34
3.5.2 Pembuatan Media .....	35
3.5.2.1 Media Selektif Amilolitik .....	35
3.5.3 Isolasi dan Seleksi Bakteri dari Bekatul .....	36
3.5.4 Uji Bakteri Penghasil Amilase secara Kualitatif .....	36
3.5.5 Identifikasi Makroskopis dan Mikroskopis Bakteri .....	37
3.5.5.1 Identifikasi Makroskopis .....	37

3.5.5.2 Identifikasi Mikroskopis .....	38
3.5.5.2.1 Pewarnaan Gram .....	38
3.5.5.2.2 Uji Katalase .....	39
3.5.5.2.3 Pewarnaan Endospora .....	39
3.5.6 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri Amilolitik .....	39
3.5.7 Pembuatan Inokulum .....	40
3.5.8 Produksi Enzim Amilase Pada Berbagai Jenis Media .....	40
3.5.9 Analisis Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Amilase dengan Metode DNS .....	41
3.5.9.1 Pembuatan Kurva Standar Glukosa .....	41
3.5.9.2 Uji Aktivitas Enzim Amilase .....	41
3.5.10 Analisis Data .....	42
<b>BAB IV PEMBAHASAN .....</b>	<b>43</b>
4.1 Isolasi dan Seleksi Bakteri dari Bekatul .....	43
4.2 Uji Bakteri Penghasil Amilase Secara Kualitatif .....	45
4.3 Karakterisasi Makroskopis dan Mikroskopis Bakteri Amilolitik .....	49
4.3.1 Pewarnaan Gram .....	49
4.3.2 Uji Katalase .....	54
4.3.3 Pewarnaan Endospora .....	56
4.4 Kurva Pertumbuhan Bakteri .....	60
4.5 Produksi Enzim Amilase Oleh Isolat BK1 pada Berbagai Jenis Media Pertumbuhan .....	63
4.6 Analisis Kadar Glukosa dengan Metode DNS .....	65
4.7 Kedudukan Bekatul dalam Perspektif Islam .....	68
<b>BAB V KESIMPULAN .....</b>	<b>71</b>
5.1 Kesimpulan .....	71
5.2 Saran .....	71
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>72</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>80</b>

## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Kandungan Senyawa Bekatul .....	13
Tabel 2.2 Komposisi Kimia Onggok .....	23
Tabel 4.1 Karakter Morfologi Koloni Bakteri dari Bekatul .....	44
Tabel 4.2 Bentuk Koloni Bakteri Amilolitik Hasil Isolasi .....	45
Tabel 4.3 Zona Bening Bakteri Amilolitik .....	48
Tabel 4.4 Pewarnaan Gram Isolat Bakteri Amilolitik .....	50
Tabel 4.5 Data Cat Gram Bakteri Amilolitik .....	52
Tabel 4.6 Hasil Uji Katalase .....	55
Tabel 4.7 Pewarnaan Endospora Bakteri Amilolitik .....	57
Tabel 4.8 Data Aktivitas Enzim Amilase .....	64



## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Bekatul .....	9
Gambar 2.2 Amilosa .....	14
Gambar 2.3 Reaksi DNS dengan Gula .....	26
Gambar 2.4 Kristal Violet dan Safranin .....	28
Gambar 2.5 <i>Malachite green</i> .....	29
Gambar 2.6 <i>Dipicolinic acid</i> (Komponen Asam Amino Endospora) .....	29
Gambar 2.7 Kurva Pertumbuhan Bakteri .....	30
Gambar 4.1 Mekanisme Kerja Enzim Amilase .....	46
Gambar 4.2 Mekanisme Reaksi Antara Pati dan Iodin .....	49
Gambar 4.3 Perbedaan Dinding Sel Bakteri Gram Positif dan Bakteri Gram Negatif .....	51
Gambar 4.4 Ikatan Ionik Antara Kristal Violet dengan Dinding Sel Bakteri .....	52
Gambar 4.5 Interaksi Antara Kristal Iodin dengan Dinding Sel Bakteri .....	53
Gambar 4.6 Ikatan Ionik Antara Safranin dengan Dinding Sel .....	53
Gambar 4.7 Ikatan Ionik Antara Malachite Green dengan Kompleks Asam dipiklonat-kalsium-peptidoglikan (endospora bakteri) .....	59
Gambar 4.8 Ikatan Ionik Antara Safranin dengan Dinding Sel (peptidoglikan) Bakteri .....	60
Gambar 4.9 Data Kurva Pertumbuhan Bakteri Isolat BK1 .....	62
Gambar 4.10 Reaksi Glukosa Dengan Pereaksi .....	68

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Diagram Alir Penelitian .....	80
Lampiran 2	Pembuatan Reagen .....	87
Lampiran 3	Menentukan Kurva Standar Glukosa .....	91
Lampiran 4	Pengukuran Absorbansi dan Aktivitas Ekstrak Kasar Amilase .....	92
Lampiran 5	Dokumentasi .....	95



## ABSTRAK

Asadullah, M. 2014. Isolasi Bakteri Amilolitik dari Bekatul dan Uji Kemampuan Untuk Produksi Enzim Amilase Kasar Pada Berbagai Jenis Media Produksi. Skripsi. Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing : (I) Akyunul Jannah, S. Si, M.P. (II) Tri Kustono Adi, M. Sc.

Kata Kunci : bekatul, amilase, isolasi bakteri, aktivitas enzim.

---

Enzim amilase dapat diproduksi oleh berbagai jenis mikroba dan umumnya oleh jenis bakteri dan kapang. Bakteri amilolitik dapat diperoleh dari endogenus bekatul yang memiliki kadar pati tinggi. Tujuan penelitian ini untuk mengisolasi bakteri amilolitik dari bekatul dan uji kemampuannya dalam produksi enzim pada berbagai jenis media.

Penelitian ini terdiri dari dua tahap. Tahap pertama melakukan isolasi dan seleksi bakteri amilolitik dari bekatul dan tahap kedua untuk mengetahui pengaruh jenis media yaitu bekatul onggok dan dedak terhadap produksi enzim amilase oleh bakteri amilolitik terpilih hasil isolasi dari bekatul. Aktivitas enzim amilase didapatkan dari analisa kadar glukosa menggunakan metode 3,5-dinitrosalisilat (DNS).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa bakteri amilolitik yang ditemukan sebanyak lima isolat berdasarkan pengamatan makroskopis dan mikroskopis yaitu BK1, BK2, BK3, BK4 dan BK5 dan dari kelima isolat tersebut didapatkan isolat terbaik yaitu BK1 karena memiliki zona bening tertinggi. Produksi enzim amilase pada berbagai jenis media yaitu dedak, bekatul dan onggok menggunakan isolat BK1 dan didapatkan aktivitas enzim menggunakan media bekatul lebih besar daripada dedak yaitu sebesar  $6.6264 \times 10^{-3}$  dan  $6.2950 \times 10^{-3}$  dan onggok sebesar  $4.1136 \times 10^{-3}$ . Aktivitas enzim amilase tertinggi dihasilkan pada substrat bekatul.

## ABSTRACT

Asadullah, M. 2014. Isolation of Amylolytic Bacteria From Rice Bran and Test Capabilities of Amylase Enzyme Production Rough In Different Types of Media Production. Thesis. Chemistry Department, Faculty of Science and Technology of Islamic State University of Maulana Malik Ibrahim Malang. Advisor : Akyunul Jannah, S. Si, M.P and Tri Kustono Adi, M. Sc

Keywords : Rice Bran, Amylase, Isolation of Bacteria, Enzyme Activity.

---

Amylase enzyme can be produced by different types of microbes and generally by the type of bacteria and fungi. Amylolytic bacteria can be obtained from endogenous rice bran which has a high starch content. The purpose of this research was to isolate amylytic bacteria from rice bran and test capabilities in the production of enzymes in various types of media.

The research consist of two phases. The first phase is isolating and selecting of amylytic bacteria from rice bran and the second phase is determining the influence of medias (cassava, rice bran and bran) toward amylase enzyme production by amylytic bacteria isolated from rice bran selected. Amylase enzyme activity obtained from the analysis of glucose levels using the 3,5-dinitrosalisilat (DNS).

The results of this research showed that is a five isolates which are based on macroscopic and microscopic observations, that RB1, RB2, RB3, RB4 and RB5. From the five isolates, it is obtained the best isolates that RB1 because it has the highest clear zone. Production of amylase enzyme on various types of media, those are rice bran, bran and cassava use isolates RB1 can be obtained that using media rice bran and bran larger than the amount of  $6.6264 \times 10^{-3}$  and  $6.2950 \times 10^{-3}$  and cassava  $4.1136 \times 10^{-3}$ . The highest activity of the enzyme amylase is produced on a substrate of rice bran.

## ملخص

أسد الله.م.2014. عزل البكتيريا محلل النشا من نخالة واختبار قدراته لإنتاج أنزيم الأميليز الخام في أنواع مختلفة من الإنتاج الإعلامي. الأطروحة. قسم الكيمياء، كلية العلوم والتكنولوجيا في جامعة مولانا مالك إبراهيم مالانج. المشرف : أعين الجنة الماجستير و تري كسطانو عدي الماجستير

الكلمات الرئيسية: نخالة الأرز، الأميليز، والعزلة البكتيرية، نشاط انزيم.

يمكن أن تنتج انزيم الأميليز من قبل أنواع مختلفة من الميكروبات وعموما نوع من البكتيريا. ويمكن الحصول على البكتيريا محلل النشا من نخالة الأرز المحلية التي لديها نسبة عالية من النشا. وكان الغرض من هذه الدراسة لعزل البكتيريا محلل النشا من نخالة الأرز وقدرات الاختبار في إنتاج الإنزيمات في أنواع مختلفة من وسائل الإعلام.

تتألف الدراسة من مرحلتين. المرحلة الأولى من العزلة واختيار محلل النشا من نخالة البكتيريا والمرحلة الثانية لتحديد تأثير نوع من وسائل الإعلام أن نخالة الكسافا والنخالة ضد انزيم الأميليز الإنتاج من البكتيريا المعزولة من محلل النشا نخالة الأرز المنتخبة. ونشاط انزيم تم الحصول عليها باستخدام وسائل طرق 3,5-dinitrosalisilat (DNS)

أظهرت نتائج هذه الدراسة أن البكتيريا محلل النشا وجد خمس عزلات بناء على الملاحظات العيانية والمجهرية وهي BK1، BK2، BK3، BK4 وBK5 والعزلات التي تم الحصول عليها من أفضل خمسة يعني BK1 لأنه يحتوي على أعلى منطقة واضحة. إنتاج إنزيم الأميليز على أنواع مختلفة باستخدام العزلات BK1 ونشاط انزيم تم الحصول عليها باستخدام وسائل الإعلام نخالة ونخالة الأرز أكبر من مبلغ  $6.6264 \times 10^{-3}$  و  $6.2950 \times 10^{-3}$  والكسافا وعند  $4.1136 \times 10^{-3}$ . يتم إنتاج أعلى نشاط انزيم الأميليز من على ركيزة من نخالة الأرز.

## BAB I

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

Allah SWT Berfirman dalam Surat Ar-Rahman :

وَالْأَرْضَ وَضَعَهَا لِلْأَنَامِ ﴿١٠﴾ فِيهَا فَكِهَةٌ وَالنَّخْلُ ذَاتُ الْأَكْمَامِ ﴿١١﴾ وَالْحَبُّ ذُو  
الْعَصْفِ وَالرَّيْحَانُ ﴿١٢﴾ فَبِأَيِّ آلَاءِ رَبِّكُمَا تُكَذِّبَانِ ﴿١٣﴾

Artinya : *Dan bumi telah dibentangkannya untuk makhluknya. Didalamnya ada buah-buahan dan pohon kurma yang mempunyai kelopak mayang. Dan biji-bijian yang berkulit dan bunga-bunga yang harum baunya. Maka nikmat Rabb-mu yang manakah yang kamu dustakan (QS. 55 : 10-13)*

Ayat diatas secara global menggambarkan betapa besar sifat kasih sayang Allah SWT kepada seluruh makhluknya. Maksud dari kalimat وَالْحَبُّ ذُو الْعَصْفِ yakni kulit yang menutupinya, dan yang dimaksud فَبِأَيِّ آلَاءِ رَبِّكُمَا تُكَذِّبَانِ adalah nikmat Rabb kalian yang manakah – wahai sekalian manusia dan jin – yang kalian dustakan? (Ibnu Katsir, 2004). Maksud dari biji-bijian yang berkulit adalah segala jenis tanaman yang menghasilkan biji-bijian yang memiliki kulit pelindung, yang akan menjaga rasa, warna, aroma serta kandungan nutrisinya seperti padi, gandum dan lain sebagainya. *Maka nikmat tuhanmu yang manakah yang kamu dustakan* maksudnya adalah nikmat yang manakah yang kita dustakan dari penciptaan biji-bijian ini beserta fungsi dan kandungan dalam kulit mapun dalam biji-bijian ini.

Penggunaan enzim amilase dalam industri akhir-akhir ini terus meningkat, sementara kebutuhan akan enzim di Indonesia masih tergantung kepada produk

impor (Anindyawati, 2009). Enzim amilase banyak digunakan dalam industri makanan, minuman, tekstil, farmasi dan detergen (Whittaker, 1994). Seperti enzim  $\alpha$ -amilase berfungsi menyediakan gula hidrolisis pati sehingga dapat dimanfaatkan untuk produksi sirup glukosa ataupun sirup fruktosa yang mempunyai tingkat kemanisan tinggi dalam pembuatan roti, dan makanan bayi. Dalam industri tekstil enzim  $\alpha$ -amilase digunakan untuk membantu dalam proses penghilangan pati, yang digunakan sebagai perekat untuk melindungi benang saat ditenun agar lentur (Setiasih, 2006). Hal ini dikarenakan enzim bersifat sangat spesifik dibandingkan dengan katalis anorganik, efisien, beroperasi pada kondisi lunak, aman, mudah dikontrol, dapat menggantikan bahan kimia yang berbahaya, dan dapat didegradasi secara biologis, selain itu juga mempunyai nilai ekonomi tinggi (Long-Liu Lin dkk, 1998).

Enzim amilase dapat diproduksi oleh berbagai jenis mikroba dan umumnya oleh jenis bakteri dan kapang, hal ini dapat diperoleh dari berbagai sumber diantaranya hewan, lingkungan, dan limbah yang mengandung kadar pati tinggi (Anindyawati, 2009). Namun enzim amilase yang dihasilkan dari tanaman, hewan menghasilkan enzim yang sedikit dibandingkan mikroorganisme (Maranatha. 2007). Menurut Poernomo (2003), pemilihan bakteri sebagai sumber enzim mempunyai beberapa keuntungan bila dibandingkan enzim yang diisolasi dari tanaman, hewan, maupun fungi sebab sel bakteri relatif lebih mudah ditumbuhkan, kecepatan tumbuh relatif lebih cepat, skala produksi sel lebih mudah ditingkatkan bila dikehendaki, produksi yang lebih besar, biaya produksi relatif rendah, kondisi selama produksi tidak tergantung oleh adanya pergantian

musim, dan waktu yang dibutuhkan dalam proses produksi lebih pendek. Selain itu bakteri juga mempunyai beberapa kelebihan diantaranya, bakteri merupakan mikroorganisme yang banyak terdapat di tanah, produksi massa bakteri juga lebih mudah dan lebih cepat dari pada mikroorganisme lain seperti jamur (Yuliar, 2008).

Beberapa mikroorganisme yang dapat digunakan dalam produksi amilase adalah *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Lactobacillus* sp, *Proteus* sp, *Pseudomonas* sp, *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp, *Rhizopus* sp, *Mucor* sp, dan *Neurospora* sp (Budiyanto, 2002). Indriyanto (1995) telah melakukan isolasi enzim  $\alpha$ -amilase dari *Bacillus subtilis* dalam media bekatul. Dewi (2005) juga melaporkan  $\alpha$ -amilase dari *Rhizopus oryzae* mampu menghasilkan gula reduksi sebesar 15,347 mg/mL melalui proses sakarifikasi pada substrat bekatul 20%.

Isolasi bakteri amilolitik dari berbagai sumber juga telah banyak dilakukan. Tresnawati, dkk (2004) telah melakukan isolasi bakteri amilolitik yang toleran pH 9 dari tanah di taman wisata alam situ gunung Sukabumi didapatkan 16 isolat bakteri yang mampu tumbuh pada media yang mengandung pati (tepung singkong) dengan pH 9. Lima isolat di antaranya menghasilkan zona bening di sekitar koloni. Hal tersebut menunjukkan adanya aktivitas amilase ekstraselular. Tiga isolat yang menghasilkan zona bening terbesar yaitu isolat H 1.1, H 3.1, dan TL 1.1. Ketiga isolat tersebut masing-masing memiliki aktivitas spesifik sebesar 4.128 U/mg, 0 U/mg, dan 0 U/mg. Dari hasil pengukuran, isolat yang memiliki aktivitas amilase hanya isolat H 1.1 yaitu sebesar 0.161 U/ml. Raharjo (2008) juga telah melakukan isolasi dan karakterisasi  $\alpha$ -amilase isolat bakteri amilolitik

asidofilik dari taman Nasional rawa Aopa Watumaohai isolat bakteri TR 1 dengan aktivitas amilolitik tertinggi merupakan koloni berwarna kuning keruh dengan permukaan cembung, bentuk tepian koloni tidak rata, sel batang dan bersifat Gram negatif. Aktivitas dan kadar protein optimum diperoleh pada ekstraksi  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  60 % (b/v). Aktivitas spesifik  $\alpha$ -amilase dalam bentuk ekstrak kasar adalah 0,038 U/mg enzim, setelah ekstraksi dengan  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  60% (b/v) adalah 0,146 U/mg enzim dengan tingkat kemurnian 3,8 dan setelah dialisis adalah 0,255 U/mg enzim dengan tingkat kemurnian 6,7. Konsentrasi substrat optimum (amilosa) adalah 1,25 % (b/v). Asnani (2009) juga telah menentukan aktivitas amilase, lipase dan protease dari cacing *Peryonix excavatus* dan didapatkan Ekstrak kasar dan fraksi ammonium sulfat cacing *P.excavatus* mempunyai aktivitas enzim amilase dengan suhu dan pH optimum pada enzim amilase adalah 60 °C (fraksi 30%; 15.268 unit/mL) dan pH 7 (fraksi 70%; 10.335 unit/mL).

Penelitian ini akan dilakukan isolasi bakteri penghasil enzim amilase dari bekatul. Pemanfaatan bekatul ini sangat mendukung dikarenakan komposisi bekatul kaya akan karbohidrat khususnya amilosa. Adapun komposisi bekatul antara lain, protein 14 %, lemak 18 %, karbohidrat 36 % (selulosa 8,7-11,4 % dan hemiselulosa 9,6-12,8 %), amilosa 25-32 %, abu 10 % dan serat kasar 12 % maka hasil samping ini cukup potensial untuk dikembangkan dan digunakan sebagai media isolasi mikroorganisme khususnya bakteri amilolitik (Hermanianto, 1997).

Mikroorganisme membutuhkan nutrisi untuk mendukung pertumbuhan selnya baik karbohidrat, protein, makronutrien maupun mikronutrien (Prescott, dkk. 1999). Raharjo, dkk (2008) melaporkan bahwa penambahan pati ke dalam

media tumbuh diharapkan dapat menginduksi sel-sel bakteri untuk memproduksi dan mensekresikan enzim-enzim ekstraselulernya, khususnya enzim  $\alpha$ -amilase. Putri, dkk (2012) melaporkan bahwa isolasi dan karakterisasi bakteri asam laktat amilolitik selama fermentasi growol, makanan tradisional Indonesia didapatkan bahwa bakteri yang memiliki kemampuan amilolitik dan mampu tumbuh pada media tinggi pati seperti fermentasi growol (makanan tradisional berbasis kasava). Selain itu pemanfaatan sagu sebagai sumber karbon juga telah dilakukan Melliawati, dkk (2006) pada seleksi mikroorganisme potensial untuk fermentasi sagu didapatkan kesebelas jenis mikroorganisme amilolitik tumbuh subur di media padat yang mengandung pati sagu 2 % sebagai satu-satunya sumber karbon dan energi. Kapang dan khamir yang diuji mampu menghidrolisis pati sagu menjadi gula monosakarida dan atau disakarida. Kemampuan mikroorganisme dalam menghidrolisis pati sagu berbeda di antara jenis kapang dan khamir. Kapang KTU-1 adalah kapang lokal yang mempunyai potensi sebagai kapang terbaik yang menghasilkan enzim amiloglukosidase dan gula. Akumulasi gula tertinggi diperoleh 18.485 ppm dan aktivitas amiloglukosidase dicapai 3. 583 unit. Gula yang dihasilkan pada akhir fermentasi adalah galaktosa dan fruktosa. Kapang KTU-2 mempunyai kemampuan sebagai penghidrolisis pati sagu menjadi 3 jenis gula monosakarida (sukrosa, fruktosa dan laktosa). *Rhizopus* IFO. R. 5442 menghasilkan asam tertinggi 5,85 mg/mL dan biomasa sel diperoleh antara 0,5-1,74 g berat kering/100 mL media.

Pemanfaatan beberapa limbah sebagai media produksi enzim amilase juga telah digunakan. Sebayang (2005) melaporkan pada isolasi dan pengujian

aktivitas enzim  $\alpha$ -amilase dari *Aspergillus niger* dengan menggunakan media campur onggok dan dedak didapatkan aktivitas spesifik ekstrak kasar enzim  $\alpha$ -amilase adalah 5.45 unit/mg. Hidayat (2006) melaporkan pada fermentasi asam laktat oleh *Rhizopus orizae* pada sampel Tapioka Lampung (TL), Singkong Tanpa Kupas (STK), dan Onggok Tapioka (OT) menunjukkan, Tapioka Lampung memiliki kandungan pati paling tinggi yakni sebesar 83,10 %, kemudian Singkong Tanpa Kupas (STK) sebesar 71,6 % dan Onggok Tapioka sebesar 55,7 %. Nilai DE pada hasil hidrolisis asam untuk sampel Tapioka Lampung (TL), Singkong Tanpa Kupas (STK) dan Onggok Tapioka masing-masing sebesar 41,70 %, 33,37 % dan 22,30 %. Dari proses fermentasi, kadar asam laktat yang dihasilkan dari sampel Tapioka Lampung (TL), Singkong Tanpa Kupas (STK) dan Onggok Tapioka masing-masing sebesar 60,55 g/l, 18,19 g/l dan 14,82 g/l, sedangkan dari standar glukosa dihasilkan asam laktat sebesar 96,94 g/l.

Penggunaan bahan makanan yang mengandung sumber karbon sebagai substrat juga dapat dimanfaatkan. Naiola (2008) melaporkan pada isolasi dan seleksi mikroba amilolitik dari makanan fermentasi/ragi tapai gambut di Kalimantan Selatan pada penggunaan substrat tepung beras, tepung ketan, tepung singkong dan tepung jagung didapatkan aktivitas amilase yang cukup tinggi dihasilkan dalam media produksi menggunakan tepung beras dan tepung jagung masing-masing  $1,91 \times 10^2$  U/mL dan  $1,87 \times 10^2$  U/mL. Dalam media mengandung tepung ketan dan tepung singkong aktivitas amilase hampir sama yaitu sekitar  $1,25 \times 10^2$  U/mL. Dan paling rendah diperoleh apabila ditumbuhkan pada media menggunakan amilum. Selain itu pemanfaatan sumber pati dari limbah pertanian

seperti bekatul sebagai sumber nitrogen juga telah dilakukan. Kresnamurti (2001) melaporkan, substitusi bekatul sebagai sumber nitrogen untuk produksi enzim amilase oleh *Aspergillus niger* dan didapatkan aktivitas enzim tertinggi dihasilkan pada konsentrasi bekatul 8 % yaitu 1.1398 unit/ml/menit. Risma (2012) melaporkan bahwa pada penelitian tentang isolasi dan karakterisasi enzim  $\alpha$ -glukosidase dari beras lapuk, beras baru dan dedak dari tiga varietas yaitu sarinah, IR 64 dan IR 46. Aktivitas tertinggi ditemukan pada IR 46 sebesar 90,3 mU/mL. Harsono (2001) juga telah melakukan pemurnian enzim  $\alpha$ -amilase yang ditumbuhkan pada Gao, Yu dan Linko termodifikasi didapatkan sebesar 0,14176 U/mg.

Penggunaan bekatul di Indonesia selama ini masih sangat sedikit, karena penggunaannya hanya pada pakan ternak, berbeda dengan negara-negara seperti Jepang dan USA yang penggunaannya sudah di memasuki ranah farmasi dan industri makanan (Ardiansyah, 2013). Sehingga bekatul ini perlu dimanfaatkan untuk tahap isolasi enzim karena produksi enzim di Indonesia masih sangat minim. Berdasarkan latar belakang diatas, maka dilakukan penelitian tentang isolasi bakteri amilolitik dari bekatul dan uji kemampuan untuk produksi enzim amilase kasar pada berbagai jenis media.

## 1.2 Rumusan Masalah

1. Genus bakteri amilolitik apa yang dapat diisolasi dari bekatul ?
2. Bagaimana pengaruh jenis media (Bekatul, onggok dan dedak) pada produksi enzim amilase hasil isolasi dari bekatul ?

### **1.3 Tujuan**

1. Untuk mengisolasi bakteri amilolitik dari bekatul.
2. Untuk mengetahui pengaruh perbedaan jenis media (Bekatul, Onggok dan Dedak) pada produksi enzim amilase hasil isolasi dari bekatul.

### **1.4 Batasan Masalah**

1. Penelitian ini hanya mengisolasi bakteri amilolitik dari bekatul
2. Penentuan jenis bakteri hanya sebatas genus
3. Bekatul yang didapat berasal dari penggilingan di desa Asrikaton Kec. Pakis Kab. Malang

### **1.5 Manfaat Penelitian**

Manfaat dari penelitian ini adalah, dapat memberikan pemahaman dan gambaran kepada masyarakat tentang keberagaman manfaat dari bekatul sehingga nilai ekonomi dari bekatul ini dapat ditingkatkan, sehingga pemanfaatan bekatul ini dapat digunakan dalam beragam bentuk seperti isolasi dan produksi enzim amilase untuk pembuatan glukosa ataupun sirup fruktosa yang mempunyai tingkat kemanisan tinggi.

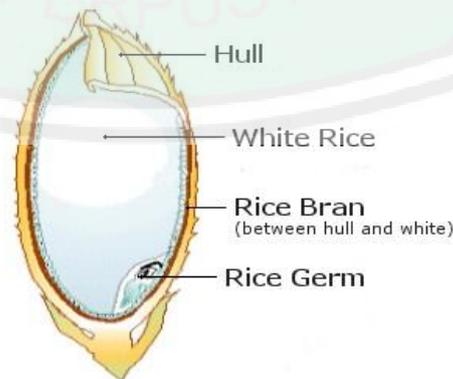
## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Bekatul

Di Indonesia, proses penyosohan beras umumnya dilakukan hanya dalam satu tahap saja. Dengan demikian, hasil samping dari sosohan tersebut, yaitu dedak dan bekatul, bercampur menjadi satu (Ardiansyah, 2010). Persentase bekatul dari gabah kering giling sekitar 10% (Widowati, 2001). Data BPS (2010) menyebutkan sebanyak 6,59 juta ton bekatul dengan pemanfaatan sebagai pakan ternak.

Bekatul merupakan hasil samping dari proses penggilingan atau penumbukan gabah menjadi beras. Pada proses tersebut terjadi pemisahan endosperma beras (yang biasa kita makan sebagai nasi) dengan bekatul yang merupakan lapisan yang menyelimuti endosperma. Berbagai penelitian menunjukkan, bekatul beras memiliki komponen gizi yang sangat dibutuhkan manusia (Astawan, 2009).



Gambar 2.1 Bekatul (*Rice Bran*) (Astawan, 2009).

Gabah padi terdiri dari 2 bagian yaitu endosperm atau butiran beras dan kulit kulit padi (sekam). Kulit padi memiliki 2 lapisan, yaitu *hull* (lapisan luar) dan *bran* (lapisan dalam). Penggilingan padi bertujuan memisahkan beras dengan sekam yang kemudian dilakukan proses penyosohan dua kali. Penyosohan I menghasilkan dedak dengan tekstur kasar karena masih mengandung sekam dan penyosohan II menghasilkan bekatul (*rice bran*) yang bertekstur halus dan tidak mengandung sekam. Penggilingan padi ini menghasilkan beras sekitar 60-65% dan bekatul sekitar 8-12%, endosperm, dan embrio (lembaga). Endosperma terdiri atas kulit ari (lapisan aleuron) dan bagian berpati. Selanjutnya, bagian endosperma tersebut akan mengalami proses penyosohan, menghasilkan beras sosoh, dedak, dan bekatul (Astawan, 2009).

Proses penyosohan merupakan proses penghilangan dedak dan bekatul dari bagian endosperma beras. Secara keseluruhan proses penggilingan padi menjadi beras akan menghasilkan 16-28% sekam, 6-11% dedak, 2-4% bekatul, dan sekitar 60% endosperma. Tujuan penyosohan untuk menghasilkan beras yang lebih putih dan bersih. Makin tinggi derajat sosoh, semakin putih dan bersih penampakan beras, tapi semakin miskin zat gizi. Pada penyosohan beras dihasilkan dua macam limbah, yaitu dedak (*rice bran*) dan bekatul (*rice polish*) (Astawan, 2009).

Bahan Pangan Dunia (FAO) telah membedakan pengertian dedak dan bekatul, dedak merupakan hasil sampingan dari proses penggilingan padi yang terdiri atas lapisan sebelah luar butiran beras (perikarp dan tegmen) dan sejumlah lembaga beras, bekatul merupakan lapisan sebelah dalam butiran beras (lapisan

aleurone/kulit ari) dan sebagian kecil endosperma berpati. Dalam proses penggilingan padi di Indonesia, dedak dihasilkan pada proses penyosohan pertama, bekatul pada proses penyosohan kedua (Astawan, 2009).

Bekatul mengandung karbohidrat cukup tinggi, yaitu 51-55 g/100 g. Kandungan karbohidrat merupakan bagian dari endosperma beras karena kulit ari sangat tipis dan menyatu dengan endosperma. Kandungan protein pada bekatul juga sangat baik, yaitu 11-13 g/100 g. Dibandingkan dengan beras, bekatul memiliki kandungan asam amino lisin yang lebih tinggi. Selain itu, bekatul merupakan sumber mineral yang sangat baik, setiap 100 gramnya mengandung kalsium 500-700 mg, magnesium 600-700 mg, dan fosfor 1.000-2.200 mg (Astawan, 2009).

Klasifikasi bekatul yang termasuk dalam klasifikasi padi adalah sebagai berikut (Anonymous, 2011<sup>a</sup>) :

Kingdom	: Plantae (Tumbuhan)
Subkingdom	: Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
Super Divisi	: Spermatophyta (Menghasilkan biji)
Divisi	: Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
Kelas	: Liliopsida (berkeping satu / monokotil)
Sub Kelas	: Commelinidae
Ordo	: Poales
Famili	: Poaceae (suku rumput-rumputan)
Genus	: <i>Oryza</i>
Spesies	: <i>Oryza sativa L.</i>

Kandungan kimia bekatul ternyata sudah diterangkan dalam Al- Qur'an surat Al-An'aam [6] ayat 95 :

﴿ إِنَّ اللَّهَ فَالِقُ الْحَبِّ وَالنَّوْمِ ۖ يُخْرِجُ الْحَيَّ مِنَ الْمَيِّتِ وَيُخْرِجُ الْمَيِّتَ مِنَ الْحَيِّ ۚ ذَٰلِكُمْ اللَّهُ فَالِقُ فَأَنَّى تُؤْفَكُونَ ﴾

Artinya: "Sesungguhnya Allah menumbuhkan butir tumbuh-tumbuhan dan biji buah-buahan. Dia mengeluarkan yang hidup dari yang mati dan mengeluarkan yang mati dari yang hidup. (Yang memiliki sifat-sifat) demikian ialah Allah, maka mengapa kamu masih berpaling?" (Al-An'aam[6]: 95).

Maksud dari kalimat يُخْرِجُ الْحَيَّ مِنَ الْمَيِّتِ وَمُخْرِجُ الْمَيِّتِ مِنَ الْحَيِّ (Dia mengeluarkan yang hidup dari yang mati dan mengeluarkan yang mati dari yang hidup) adalah hanya Allah yang dapat menciptakan kejadian ini. Hanya Allah yang dapat menyiapkan makhluk hidup untuk mengubah atom-atom mati menjadi sel-sel yang hidup. Hanya Allah yang mampu mengubah sel-sel hidup sekali lagi menjadi atom-atom mati. Hal itu dalam siklus yang tidak ada seorang pun mengetahuinya sejak kapan dimulai dan bagaimana bisa terjadi. Sementara yang bisa disimpulkan manusia hanyalah hipotesis, teori, dan probabilitas semata (Quthb, 2002).

Al-Qur'an secara tegas menyebutkan bahwa masalah menciptakan tumbuh-tumbuhan dan menghidupkan sesuatu yang mati adalah bagian dari kekuasaan Allah SWT. Kata فَالِقُ (Menumbuhkan) yang dimaksud dalam Al-qur'an adalah Allah menumbuhkan الْحَبَّ (Butir tumbuh-tumbuhan) yakni dari butir padi (gabah) tumbuh menjadi tanaman padi (*Oryza sativa L*). Sedangkan الْحَبَّ (Butir tumbuh-tumbuhan) yang dimaksud dalam Al-Qur'an adalah kandungan senyawa kimia dari tumbuh-tumbuhan yang dalam hal ini adalah kandungan senyawa kimia tumbuhan padi (*Oryza sativa L*). Bekatul merupakan kulit paling

luar dari beras dan kulit paling dalam dari sekam yang telah terkelupas melalui proses penggilingan dan penyosohan (Widowati, 2001):

Kandungan senyawa bekatul: protein 14 %, lemak 18 %, karbohidrat 36 % (selulosa 8,7-11,4 % dan hemiselulosa 9,6-12,8 %), amilosa 25-32 %, abu 10 % dan serat kasar 12 % (Ardiansyah, 2010). Kandungan gizi yang dimiliki bekatul padi, diantaranya adalah vitamin (seperti *Thiamin*, *Niacin*, vitamin B-6, vitamin E, vitamin B kompleks, dan *Riboflavin*), mineral (besi, fosfor, magnesium, kalium, potassium, kalsium, mangan, aluminium, klor, silikon, natrium dan seng) dan lain-lain (Widowati, 2001).

**Tabel 2.1 Kandungan Senyawa Bekatul**

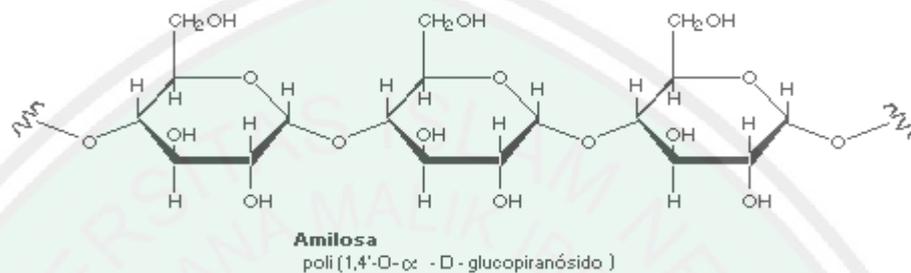
<b>Kandungan Bekatul</b>	<b>Kadar</b>
Protein	14 %
Lemak	18 %
Selulosa	8,7-11,4 %
Hemiselulosa	9,6-12,8 %
Amilosa	25-32 %
Lignin	24,4 %
Abu	10 %
Air	3,6 %

Sumber : Ardiansyah (2010)

Sundari (1995) telah melakukan penelitian Pengaruh penambahan bekatul dengan berbagai konsentrasi dalam media kultur terhadap pertumbuhan populasi (*Chlorella* sp) Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan bekatul berpengaruh terhadap pertumbuhan populasi *Chlorella* sp. Pertumbuhan populasi *Chlorella* sp yang optimum dicapai pada penambahan bekatul sebesar 4.27 gr/l.

Maksud dari kalimat *مُخْرِجُ الْمَيِّتِ مِنَ الْحَيِّ* (Dia mengeluarkan yang mati dari yang hidup) adalah hanya Allah yang dapat menciptakan kejadian ini.

(Ardiansyah, 2010) melaporkan bahwa padi (*Oryza sativa L*) menghasilkan biji dengan salah satu sisi bagiannya adalah bekatul (*Rice Bran*). 32,8% dari bekatul adalah amilosa.



Gambar 2.2 Amilosa (Ardiansyah, 2010)

## 2.2 Bakteri Amilolitik

Bakteri amilolitik merupakan salah satu kelompok mikroorganisme yang menghasilkan enzim amilase. Pada tahap awal untuk mendapatkan mikroba yang berpotensi sebagai penghasil enzim ialah dengan mengisolasi dan seleksi mikroba tersebut dari habitat alamnya. Mikroba yang diperoleh dari hasil isolasi harus memiliki kemampuan untuk melangsungkan reaksi atau menghasilkan produk yang diinginkan (Handayani *et al.*, 2002).

Menurut Poernomo (2003), pemilihan bakteri sebagai sumber enzim mempunyai beberapa keuntungan bila dibandingkan enzim yang diisolasi dari tanaman, hewan, maupun fungi sebab sel bakteri relatif lebih mudah ditumbuhkan, kecepatan tumbuh relatif lebih cepat, skala produksi sel lebih mudah ditingkatkan bila dikehendaki, produksi yang lebih besar, biaya produksi relatif rendah, kondisi selama produksi tidak tergantung oleh adanya pergantian musim, dan waktu yang dibutuhkan dalam proses produksi lebih pendek. Selain

itu bakteri juga mempunyai beberapa kelebihan diantaranya, bakteri merupakan mikroorganisme yang banyak terdapat di tanah, produksi massa bakteri juga lebih mudah dan lebih cepat dari pada mikroorganisme lain seperti jamur (Yuliar, 2008).

Bakteri amilolitik adalah jenis bakteri yang memproduksi enzim amilase dan mampu memecah pati. Genus bakteri yang termasuk kelompok bakteri amilolitik yang cukup dikenal luas ialah *Bacillus*, *Clostridium*, *Bacteriodes*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Thermus* dan *Actinomyces* (Reddy *et al.*, 2003). Amilase merupakan kelompok enzim yang menghidrolisis pati dan glikogen. Dikenal tiga jenis enzim amilolitik yaitu  $\alpha$ -amilase,  $\beta$ -amilase, dan glucoamilase. Enzim  $\alpha$ -amilase (EC.3.2.1.1,  $\alpha$ -1,4-D-glukan glukanohidrolase, endoamilase) adalah enzim yang menghidrolisis ikatan  $\alpha$ -1,4-glikosidik dari pati dan maltodekstrin secara acak dari bagian dalam molekul polisakarida menghasilkan maltosa dan beberapa oligosakarida rantai pendek (Ballschmiter *et al.*, 2006).

### 2.3 Enzim Amilase

Enzim merupakan penyusun sebagian besar protein total di dalam sel. Mikroorganisme seperti bakteri, kapang maupun khamir dapat menghasilkan berbagai macam enzim diantaranya amilase. Enzim adalah suatu katalisator protein yang dapat mempercepat reaksi kimia yang terjadi pada makhluk hidup dalam system biologi. Dalam mengkatalisis reaksi tersebut, enzim bersifat sangat spesifik, sehingga meskipun jumlah enzim ribuan dalam sel dan substratpun sangat banyak tidak akan terjadi kekeliruan (Shahib, 1992). Kemampuan enzim

yang unik dalam melaksanakan transformasi kimianya yang khas, ketika diisolasi telah meningkatkan penggunaan enzim dalam berbagai industri (Smith, 1995).

Menurut Jenni (2003), enzim merupakan larutan koloid atau katalis organik yang dihasilkan organisme. Enzim meningkatkan kecepatan reaksi dan sangat spesifik untuk reaksi yang dikatalisnya, artinya setiap jenis enzim hanya dapat bekerja pada satu macam senyawa atau reaksi kimia. Hal ini disebabkan perbedaan struktur kimia tiap enzim bersifat tetap. Enzim memegang peranan penting dalam dunia industri seperti industri tekstil, detergen, bahan pangan dan minuman, bahan kimia, obat-obatan dan industri kulit. Salah satu diantaranya adalah enzim amilase (Muchtadi *et al.*, 1992). Pada tahun 1996 Indonesia mengimpor enzim sebesar 2.490.396 Kg dengan nilai US \$ 12.181.608 (Richana *et al.*, 1999) dan terus meningkat hingga sebesar 1,6 juta US \$ pada Desember tahun 2012 (Putra *et al.*, 2013).

Amilase merupakan enzim yang bekerja menghidrolisis pati yang dapat dihasilkan oleh bakteri, fungi, tumbuhan dan hewan. Amilase yang dihasilkan oleh bakteri banyak dimanfaatkan dalam industri, terutama industri makanan, minuman, tekstil, farmasi, dan detergen. Hal ini karena umumnya amilase asal bakteri mempunyai aktivitas yang tinggi dan bersifat lebih stabil dibandingkan yang berasal dari tumbuhan dan hewan. Sebagian besar industri, seperti industri makanan dan minuman menggunakan amilase tahan asam (Whittaker 1994). Namun lain halnya dalam industri detergen yang justru menggunakan amilase basa atau alkalin. Selain itu, amilase juga mampu menghasilkan

maltooligosakarida spesifik dalam hidrolisis pati pada tingkat yang cukup tinggi (Tigue *et al.* 1995).

Pemanfaatan enzim amilase dalam bidang industri harus memperhatikan faktor penting yang sangat mempengaruhi efisiensi dan efektivitas dari enzim yang digunakan. Apabila faktor pendukung tersebut berada pada kondisi yang optimum, maka kerja enzim akan maksimal. Beberapa faktor yang mempengaruhi kerja enzim antara lain konsentrasi enzim, konsentrasi substrat, suhu, pH dan pengaruh inhibitor (Poedjiadi, dkk, 2006).

Amilase merupakan salah satu enzim yang mampu mengkatalisis proses hidrolisis ikatan ( $\alpha$ -1,4) glikosida pada senyawa polimer karbohidrat dengan rumus umum  $(C_6H_{10}O_5)_n$ . Amilase dapat digunakan untuk mengkonversi bahan-bahan berpati menjadi monomer yang lebih sederhana dalam bentuk glukosa, dekstrosa, fruktosa atau maltosa. Amilase secara konstitusi merupakan kelompok enzim yang sangat dibutuhkan dalam bidang industri dengan penguasaan pasar mencapai hampir 25% dari pasaran enzim di dunia. Oleh karena enzim ini bernilai komersil maka perlu ditemukan sumber-sumber yang cukup luas sebagai penghasil enzim amilase sesuai dengan karakteristik enzim amilase yang dibutuhkan (Carvalho, 2008). Penggunaan enzim amilase sangat besar dalam bidang pangan, farmasi dan tekstil namun enzim amilase ini masih banyak di impor (Richana *et al.*, 1999).

Amilase adalah salah satu enzim karbohidrase yang menguraikan amilum menjadi maltosa. Selama proses hidrolisis pati dengan semakin banyak jumlah ragi yang diberikan dan lama fermentasi yang singkat akan menghasilkan kadar

pati yang tinggi. Untuk menghasilkan kadar pati dalam jumlah banyak tidak membutuhkan waktu fermentasi yang terlalu lama karena semakin lama fermentasi akan semakin banyak pati yang terhidrolisa menjadi gula-gula sederhana (Dwidjoseputro, 1994).

Amilase dapat memecah ikatan pada amilum hingga terbentuk maltosa. Ada tiga macam enzim amilase, yaitu  $\alpha$  amilase,  $\beta$  amilase dan  $\gamma$  amilase. Yang terdapat dalam saliva (ludah) dan pankreas adalah  $\alpha$  amilase. Enzim ini memecah ikatan 1-4 yang terdapat dalam amilum dan disebut endo amilase sebab enzim ini memecah bagian dalam atau bagian tengah molekul amilum (Poedjiadi, 2006).

**a.  $\alpha$ -amilase (1,4- $\alpha$ -D-glukan-glukanohidrolase)**

$\alpha$ -amilase merupakan enzim ekstraseluler yang menghidrolisis ikatan 1,4- $\alpha$ -glikosida.  $\alpha$ -amilase dibentuk oleh berbagai bakteri dan fungi. Pada umumnya  $\alpha$ -amilase diproduksi oleh mikroorganisme aerob yang membutuhkan oksigen untuk pertumbuhannya. Beberapa mikroorganisme anaerob mampu memproduksi enzim  $\alpha$ -amilase seperti *Clostridium thermosulfuregenes* dan *B. stearpthermophilus* (Brock, 1986). Kapang penghasil  $\alpha$ -amilase adalah *Aspergillus oryzae*, *A. niger*, *Paecilomyces subglobosum* dan *Mucor pusilus* (Fogarty, 1983).

Golongan  $\alpha$ -amilase yang tahan pada suhu tinggi umumnya digunakan pada proses likuifikasi, sedang  $\alpha$ -amilase yang bersifat labil digunakan dalam proses sakarifikasi pada pembuatan gula cair. Kegunaan  $\alpha$ -amilase dalam berbagai kondisi sangat dipengaruhi stabilitas enzim tersebut.  $\alpha$ -amilase yang tidak stabil akan tidak efektif memecah substrat karena aktivitasnya menurun. Hal ini dapat dipertahankan dengan teknik imobilisasi kimia (Rosmimik *et al.*, 2011).

Aktivitas  $\alpha$ -amilase ditentukan dengan mengukur hasil degradasi pati, biasanya dari penurunan kadar pati yang larut atau dari kadar dekstrinnya dengan menggunakan substrat jenuh. Hilangnya substrat dapat diukur dengan pengurangan derajat pewarnaan iodium terhadap substrat. Pati yang mengandung amilosa bereaksi dengan yodium menghasilkan warna biru, sedangkan dekstrin bila bereaksi dengan yodium berwarna coklat. Keaktifan  $\alpha$ -amilase juga dapat dinyatakan dengan pengukuran viskositas dan jumlah produksi yang terbentuk. Laju hidrolisis akan meningkat bila tingkat polimerisasi menurun dan laju hidrolisis akan lebih cepat pada rantai lurus (Winarno, 1986).

Enzim  $\alpha$ -amilase terdapat pada tanaman, jaringan mamalia, dan mikroba. Enzim  $\alpha$ -amilase murni dapat diperoleh dari beberapa sumber misalnya malt (barley), ludah manusia dan pankreas. Dapat juga diisolasi dari *Aspergillus oryzae* dan *Bacillus subtilis* (Winarno, 1986).

#### **b. $\beta$ -amilase (1,4- $\alpha$ -D-glukan maltohidrolase)**

$\beta$ -amilase ditemukan pada tanaman tingkat tinggi dan mikroorganisme. Enzim  $\beta$ -amilase memecah ikatan glukosida  $\alpha$ -1,4 pada pati dan glikogen yang terjadi secara bertahap dari arah luar atau ujung rantai gula yang bukan pereduksi, karena pemotongannya dari arah luar maka enzim ini disebut eksoamilase (Winarno, 1986).

Beberapa mikroorganisme yang mampu menghasilkan enzim  $\beta$ -amilase yaitu *B. Polymyxa*, *B. Cerens*, *B. megaterium*, *Streptomyces sp*, *Pseudomonas sp*, dan *R. japonicus* (Cruger dan Anneliese, 1984). Bakteri *C. thermosulforogenes* memiliki aktivitas ekstra kasar  $\beta$ -amilase (Dirnawan *et al.*, 2000).

### c. $\gamma$ -amilase (Glukoamilase)

Glukoamilase jarang ditemukan pada bakteri, glukoamilase dihasilkan oleh beberapa fungi seperti *A. niger*, *A. oryzae*, *A. awamori* dan *R. javanicus* (Cruger dan Anneliese, 1984). Glukoamilase memecah pati dari luar dengan mengeluarkan unit-unit glukosa ujung bukan pereduksi polimer pati. Hasil reaksinya hanya glukosa, sehingga dapat dibedakan dengan  $\alpha$  dan  $\beta$  amilase.

## 2.4 Media Pertumbuhan

Media adalah suatu bahan yang terdiri atas campuran nutrisi yang dipakai untuk menumbuhkan mikroba. Media yang diketahui komposisinya secara terinci disebut media sintetik (Indriyanto, 1995). Medium sebagai tempat tumbuh dan berkembang harus menjamin ketersediaan dan kebutuhan mikroba untuk hidup dan tumbuh berkembang. Medium biasa disebut substrat. Medium harus mengandung nutrisi dan oksigen yang dibutuhkan mikroba. Mikroba berada dalam medium yang mengandung nutrisi sebagai substrat untuk tumbuh dan berkembang bercampur dengan produk-produk yang dihasilkan termasuk limbah. Medium kebanyakan berasal dari tumbuhan dan sedikit dari produk hewani. Sebagai contoh; biji-bijian (*grain*), susu (*milk*). *Natural raw material* berasal dari hasil pertanian dan hutan. Karbohidrat; gula, pati (tepung), selulosa, hemiselulosa, dan lignin. Berdasarkan bentuknya substrat dapat dibedakan menjadi: (1) Substrat cair sebagai contoh air untuk pembuatan anggur. (2) Substrat semi cair sebagai contoh media untuk pembuatan yoghurt. (3) Substrat padat sebagai contoh media yang digunakan untuk produksi tempe, oncom, kecap, kompos dsb. *Solid*

*substrate fermentation* (SSF), melibatkan jamur berfilamen, yeast atau *Streptomyces* (Nurcahyo. 2011).

Mikroba atotrof dapat tumbuh pada media sederhana karena mempunyai kemampuan mensintesis bahan organik menjadi karbohidrat, protein, asam nukleat, lipid dan vitamin. Sedangkan mikroba heterotrof menggunakan media non sintetik. Sering digunakan bahan mentah seperti pepton, ekstrak daging, ekstrak ragi sehingga media tersebut dapat digunakan oleh berbagai jenis mikroba (Indriyanto, 1995).

Komposisi media merupakan faktor yang penting bagi pertumbuhan mikroorganisme, sekaligus produksi enzim. Komponen media yang diperlukan adalah unsur dengan dua tujuan yaitu sebagai sumber energi dan bahan pembentuk sel (Darwis dan Sukarna, 1990). Karbohidrat yang merupakan sumber energi sekaligus sumber karbon telah lama dikenal, diantaranya pati. Dilihat dari susunannya pati merupakan polimer dari maltosa atau glukosa. Jumlah molekul dalam pati tergantung dari jenis tanaman asal dan sangat bervariasi. Menurut Fessenden dan Fessenden (1984), secara garis besar pati atau amilum dapat dibedakan menjadi 2 kelompok, yaitu :

#### 1. Amilosa

Menyusun 10% - 30% amilum, tidak larut dalam air dingin tetapi larut dalam air panas. Dengan iodium akan memberikan warna biru. BM 10.000 – 50.000. rantai lurus tersusun atas satuan  $\alpha$ -D-glukopiranososa. Ikatan glikosidik terjadi antara atom C nomor 1 dengan atom C nomor 4.

## 2. Amilopektin

Menyusun 70% - 90% dari pati, bersifat tidak larut dalam air dingin maupun air panas. Amilopektin dengan iodium akan memberikan warna merah sampai lembayung. BM sekitar 50.000 – 1.000.000 yang tersusun atas satuan  $\alpha$ -D-glukopiranososa. Ikatan glikosida pada rantai lurus seperti amilosa (atom C nomor 1 berikatan dengan atom C nomor 4), sedangkan ikatan cabang terjadi antara atom C nomor 1 dengan atom C nomor 6.

Pati merupakan sumber karbon yang tersedia melimpah di alam dan harganya murah. Pati terdapat pada berbagai hasil pertanian seperti beras, ketela pohon, jagung, ubi jalar dan gandum. Selain itu juga terdapat pada beberapa limbah industri pengolahan hasil pertanian seperti limbah industri tepung tapioka.

### a. Onggok

Singkong (*Manihot esculenta* Crantz) merupakan tanaman yang sangat populer di seluruh dunia, khususnya di negara-negara tropis. Di Indonesia, singkong memiliki arti ekonomi terpenting dibandingkan dengan jenis umbi-umbian yang lain. Singkong (*Manihot esculenta* Grant) merupakan salah satu bahan pangan yang utama. Di Indonesia, singkong merupakan makanan pokok ke tiga setelah padi-padian dan jagung (Chalil, 2003).

Singkong sudah lama dikenal sebagai bahan pangan sejak zaman dahulu kala, pengolahan singkong pada industri tapioka akan menghasilkan limbah padat dan cair (Tjokroadikoesoemo, 1993). Hidrolisis pati menjadi maltodekstrin (DE<20) menggunakan enzim  $\alpha$ -amilase sebagai bio katalis. Kerja enzim  $\alpha$ -amilase dalam menghidrolisis pati adalah dengan memotong ikatan 1,4  $\alpha$ -

glikosida, tapi tidak memotong ikatan 1,6- $\alpha$  glikosida. Jenis ikatan polimer pada amilosa lebih mudah dipotong oleh enzim  $\alpha$ -amilase daripada jenis ikatan polimer pada amilopektin.

Onggok merupakan hasil sampingan industri tapioka yang berbentuk padat. Dalam produksi tapioka, dari setiap ton ubi kayu dihasilkan 250 kg (25%) tapioka dan 114 kg (11,4%) onggok. Ketersediaan onggok pun terus meningkat sejalan dengan meningkatnya produksi tapioka dan semakin luasnya areal penanaman dan produksi ubi kayu (Supriyati *et al.*, 2005). Komponen penting yang terdapat dalam onggok adalah pati dan serat kasar. Kandungan tersebut berbeda untuk setiap daerah asal, jenis dan mutu ubi kayu, teknologi yang digunakan serta penanganan ampas itu sendiri. Pengolahan ubi kayu untuk mendapatkan onggok digunakan banyak air untuk membersihkan patinya, selanjutnya ampas yang diperoleh dijemur sampai kering. Syamsir (1996) menyebutkan bahwa onggok tapioka mengandung pati dalam kadar yang tergolong tinggi yaitu sebesar 79,7% dengan kadar amilosa 17% dan amilopektin 83%.

**Tabel 2.2 Komposisi Kimia Onggok**

No.	Zat	Kandungan (% berat)
1.	Karbohidrat	68,00
2.	Protein	1,57
3.	Lemak	0,26
4.	Serat Kasar	10,00
5.	Kadar Air	20,00

Syamsir (1996)

### **b. Dedak**

Dedak merupakan hasil samping dari proses penggilingan atau penumbukan gabah menjadi beras. Pada proses tersebut terjadi pemisahan endosperma beras (yang biasa kita makan sebagai nasi) dengan dedak yang merupakan lapisan yang menyelimuti endosperma.

Gabah padi terdiri dari 2 bagian yaitu endosperm atau butiran beras dan kulit kulit padi (sekam). Kulit padi memiliki 2 lapisan, yaitu *hull* (lapisan luar) dan *bran* (lapisan dalam). Penggilingan padi bertujuan memisahkan beras dengan sekam yang kemudian dilakukan proses penyosohan dua kali. Penyosohan I menghasilkan dedak dengan tekstur kasar karena masih mengandung sekam dan penyosohan II menghasilkan bekatul (*rice bran*) yang bertekstur halus dan tidak mengandung sekam. Penggilingan padi ini menghasilkan beras sekitar 60-65% dan bekatul sekitar 8-12%, endosperm, dan embrio (lembaga). Endosperma terdiri atas kulit ari (lapisan aleuron) dan bagian berpati. Selanjutnya, bagian endosperma tersebut akan mengalami proses penyosohan, menghasilkan beras sosoh, dedak, dan bekatul (Astawan, 2009).

Proses penyosohan merupakan proses penghilangan dedak dan bekatul dari bagian endosperma beras. Secara keseluruhan proses penggilingan padi menjadi beras akan menghasilkan 16-28% sekam, 6-11% dedak, 2-4% bekatul, dan sekitar 60% endosperma. Tujuan penyosohan untuk menghasilkan beras yang lebih putih dan bersih. Makin tinggi derajat sosoh, semakin putih dan bersih penampakan beras, tapi semakin miskin zat gizi. Pada penyosohan beras

dihasilkan dua macam limbah, yaitu dedak (*rice bran*) dan bekatul (*rice polish*) (Astawan, 2009).

## 2.5 Penentuan Aktivitas Enzim Amilase dengan Metode DNS

Aktivitas enzim didefinisikan sebagai suatu jumlah enzim yang dapat menyebabkan perubahan atau transformasi substrat sebanyak 1 mikromol per menit pada suhu dan lingkungan optimal selama pengukuran aktivitas berlangsung. Secara umum aktivitas enzim itu dinyatakan dalam satuan unit (U), besarnya setara dengan 16,67 nkat/mL (Dybkaer, 2001).

Aktivitas enzim amilase dihitung berdasarkan data kadar glukosa relatif sebagai mg glukosa yang dihasilkan oleh 1 mL filtrat kasar amilase. Satu Unit aktifitas enzim didefenisikan sebagai banyaknya  $\mu\text{mol}$  glukosa yang dihasilkan dari hidrolisa media pati oleh 1 mL ekstrak kasar enzim amilase selama masa inkubasi. Untuk melihat besarnya satu unit aktifitas enzim tersebut digunakan rumus (Kombong, 2004):

$$AE = \frac{C}{BM \text{ produk } \times t} \times \frac{H}{E} \dots\dots\dots (2.1)$$

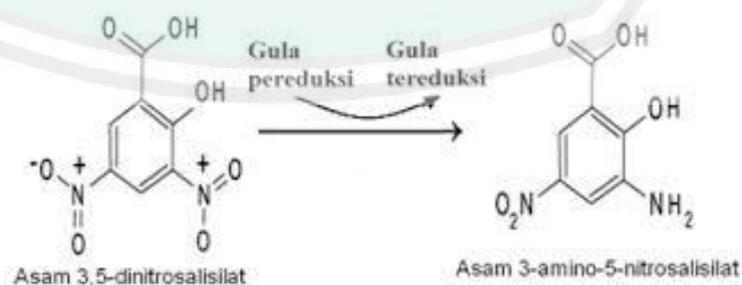
Keterangan:

- AE = Aktifitas enzim ( Unit/mL)
- C = Konsentrasi glukosa
- BM = Berat Molekul Glukosa = 180 g/mol
- t = Waktu Inkubasi (menit)
- H = Volume total enzim-substrat (mL)
- E = Volume enzim (mL)

Metode kuantitatif yang dapat digunakan dalam uji aktivitas amilase adalah dengan mengamati kadar gula tereduksi yang dihasilkan oleh hidrolisis

enzim terhadap substrat. Dari berbagai cara uji aktivitas amilase yang paling sering digunakan dalam penelitian adalah dengan menggunakan metode dinitrosalicylic acid (DNS) (Miller, 1959) atau Somogy-Nelson (Somogy, 1952).

Reaksi dengan DNS yang terjadi merupakan reaksi redoks pada gugus aldehid gula dan teroksidasi menjadi gugus karboksil. Sementara itu DNS sebagai oksidator akan tereduksi membentuk 3-amino dan asam 5-nitrosalisilat. DNS merupakan senyawa aromatis yang akan bereaksi dengan gula reduksi maupun komponen pereduksi lainnya untuk membentuk asam 3-amino-5-nitrosalisilat, suatu senyawa yang mampu menyerap dengan kuat radiasi gelombang elektromagnetik pada 540 nm. Semakin banyak komponen pereduksi yang terdapat dalam sampel, maka akan semakin banyak pula molekul asam 3-amino-5-nitrosalisilat yang terbentuk dan mengakibatkan serapan semakin tinggi. Reaksi ini berjalan dalam suasana basa. Bila terdapat gula reduksi pada sampel, maka larutan DNS yang awalnya berwarna kuning akan bereaksi dengan gula reduksi sehingga menimbulkan warna jingga kemerahan (Anonymous<sup>b</sup>, 2012 ).

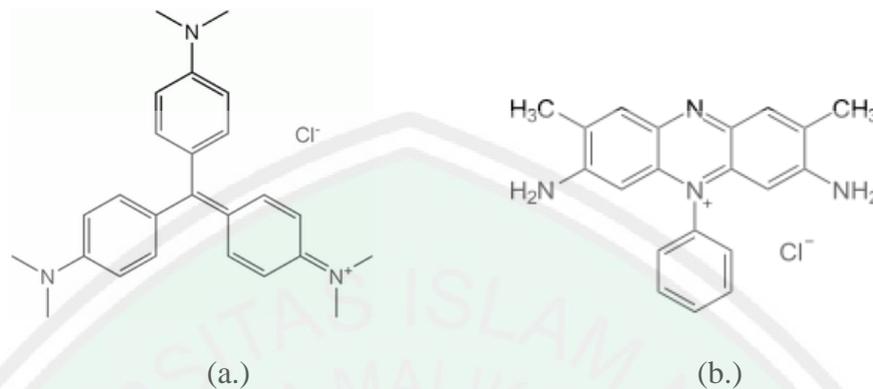


Gambar 2.3 Reaksi DNS dengan Gula

Kepekaan yang tinggi dari suatu metode dicapai apabila metode tersebut akan menghasilkan hubungan linier antara gula pereduksi yang dihasilkan dengan waktu inkubasi. Glukosa mudah didestruksi oleh oksidasi pereaksi basa yang digunakan pada pereaksi DNS. Metode Somogy-Nelson memiliki kekurangan pada perlakuan analisis yang lama dan lebih rumit (tidak nyaman) serta tingkat bahaya racunnya lebih tinggi bila dibandingkan dengan metode DNS (Muawanah, 2006).

## 2.6 Pewarnaan Gram

Prinsip dasar dari pewarnaan adalah adanya ikatan ion antara komponen selular dari bakteri dengan senyawa aktif dari pewarna yang disebut kromogen. Ikatan ion dapat terjadi karena adanya muatan listrik baik pada komponen seluler maupun pada pewarna (Umsl, 2008). Kebanyakan bakteri telah bereaksi dengan pewarna-pewarna sederhana karena sitoplasmanya bersifat basofil (suka akan basa). Zat-zat warna yang digunakan untuk pewarnaan sederhana umumnya bersifat alkalin (komponen kromofornya bersifat positif). Pewarnaan sederhana ini memungkinkan dibedakannya bakteri dengan bermacam-macam tipe morfologi (coccus, vibrio, basillus) dari bahan-bahan lainnya yang ada pada olesan yang diwarnai (Hadiotomo, 1999). Zat pewarna adalah garam yang terdiri atas ion positif dan ion negatif, salah satu di antaranya berwarna. Pada zat warna yang bersifat basa, warna terdapat pada ion positif (zat pewarna<sup>+</sup> Cl<sup>-</sup>) dan pada pewarna asam, warna akan terdapat pada ion negatif (zat pewarna<sup>-</sup> Na<sup>+</sup>) (Volk, 1993).



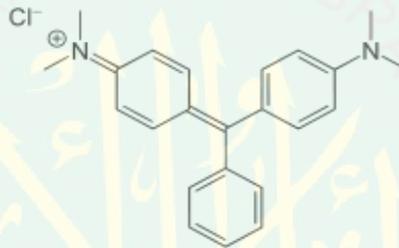
Gambar 2.4 (a). Kristal violet (hexamethyl pararosaniline), (b). Safranin (2,8-dimethyl-3,7-diamino-phenazine).

## 2.7 Pewarnaan Endospora

Bakteri ada yang merugikan yaitu bakteri patogen, tetapi juga ada yang menguntungkan yaitu bakteri non patogen. Bakteri patogen merupakan bakteri penghasil racun atau yang dikenal dengan endospora. Endospora bakteri dapat diketahui dengan Uji endospora bakteri (Fardiaz, 1992).

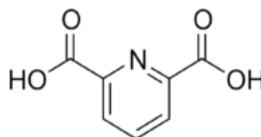
Endospora tidak mudah diwarnai dengan zat pewarna pada umumnya, tetapi sekali diwarnai, zat warna tersebut akan sulit hilang. Hal inilah yang menjadi dasar dari metode pengecatan spora secara umum. Pada metode Schaeffer-Fulton yang banyak dipakai dalam pengecatan endospora, endospora diwarnai pertama dengan malachite green dengan proses pemanasan. Larutan ini merupakan pewarna yang kuat yang dapat berpenetrasi ke dalam endospora. Setelah perlakuan malachite green, biakan sel dicuci dengan air lalu ditutup dengan cat safranin. Teknik ini akan menghasilkan warna hijau pada endospora (+) dan warna merah pada sel vegetatifnya (Fardiaz, 1992).

Dua jenis bakteri yang dapat membentuk spora misalnya *Clostridium* dan *Bacillus*. *Clostridium* adalah bakteri yang bersifat anaerobik, sedangkan *Bacillus* pada umumnya bersifat aerobik. Struktur endospora mungkin bervariasi untuk setiap jenis spesies, tapi umumnya hampir sama. Endospora bakteri merupakan struktur yang tahan terhadap keadaan lingkungan yang ekstrim misalnya kering, pemanasan, dan keadaan asam (Waluyo,2005).



Gambar 2.12 Malachite green (4-4-(dimethylamino) phenyl)

Spesies bakteri yang termasuk dalam genera *Clostridium* dan *Bacillus* memproduksi suatu struktur di dalam selnya yang disebut *endospora*. Jika sel semakin tua, maka sel vegetatif akan pecah sehingga endospora akan terlepas menjadi spora bebas. Berbeda dengan sel vegetatif, maka spora akan lebih tahan lama dalam keadaan lingkungan yang ekstrim (Fardiaz, 1992).



Gambar 2.13 Dipicolinic acid (komponen asam amino endospora).

Sel bakteri yang semakin tua terjadi pada fase stasioner. Pada fase ini beberapa spesies mikroba mensintesa berbagai produk yang tampaknya tidak

berperan penting dalam pertumbuhan sel, produk ini disebut metabolit sekunder. Metabolit sekunder biasa dilakukan oleh bakteri pembentuk endospora (Rachman, 1989).

## 2.8 Kurva Pertumbuhan



Gambar 2.14 kurva pertumbuhan bakteri.

Empat fasa dalam kurva tersebut, yaitu fasa lag, log, stasioner dan kematian. Pada fasa lag, jumlah perubahan sel sangat sedikit, sel tidak aktif karena populasi mikroba sedang mengalami aktivitas metabolisme tertentu yang meliputi DNA dan sintesis enzim, jadi tidak ada perubahan jumlah tetapi perubahan massa. Pada fasa log (exponensial) sel mulai membelah dan masuk ke dalam periode pertumbuhan, reproduksi sel paling aktif dan waktu generasinya konstan. Pada fase stasioner, laju pertumbuhan lambat sehingga jumlah bakteri yang hidup dan mati seimbang dan populasinya stabil. Penyebab terhentinya pertumbuhan bakteri pada fase ini adalah ketika konsentrasi sel sangat besar kekurangan nutrisi, akumulasi produk limbah dan lain-lain (Tortora dkk, 2001). Selama fase stasioner beberapa spesies mikroba mensintesa beberapa produk yang tidak berperan penting dalam pertumbuhan sel. Produk ini disebut metabolit sekunder. Metabolit sekunder dapat bersifat sebagai antimikroba, inhibitor enzim, promoter pertumbuhan dan banyak diantaranya memiliki sifat-sifat yang berguna

dibidang farmasi (Rachman, 1989). Pada fase kematian Jumlah kematian akhirnya melebihi jumlah sel-sel baru terbentuk dan koloni memasuki fase kematian atau penurunan fase logaritmik (Tortora dkk, 2001).



## **BAB III**

### **METODOLOGI**

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

Penelitian yang berjudul “Isolasi Bakteri Amilolitik Dari Bekatul dan Uji Kemampuan Untuk Produksi Enzim Amilase Kasar Pada Berbagai Jenis Media” ini dilaksanakan pada bulan Desember 2013, di Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi dan Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

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

##### **3.2.1 Alat**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kertas saring, inkubator, inkubator bergoyang, lemari asam, timbangan analitik, laminar, seperangkat alat gelas, *hot plate*, oven, *autoklaf*, kawat ose, shaker, *vortex*, kuvet, *spectrofotometer uv-vis*, cawan petri, bunsen dan korek api.

##### **3.2.2 Bahan**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bekatul hasil penggilingan padi yang diperoleh dari penggilingan padi di Desa Asrikaton Kec. Pakis Kab. Malang. Sampel yang digunakan untuk isolasi bakteri amilolitik adalah bekatul. Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah, aquades, alkohol 70 % untuk desinfektan, I<sub>2</sub> (KI 4 g, I<sub>2</sub> 4 g dalam akuades 600 mL), spirtus, aluminium foil, kertas label, tissue dan kapas secukupnya, reagen pewarnaan

gram (*Crystal violet* (hexamethyl pararosaniline), *Safranin* (2,8-dimethyl-3,7-diamino-phenazine), alkohol 70 %), minyak imersi, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, *green malachite* (4-4-(dimethylamino) phenyl), reagen 3,5-dinitrosalisilat (DNS), K-Na-Tartrat 40% (garam *rochelle*), buffer fosfat 0,2 M pH 7, onggok, dedak, bekatul dan media agar selektif amilolitik ditimbang dengan komposisi 0,2 % yeast ekstrak, 0,5 % pepton, 0,05 % NaCl, 0,05 % MgSO<sub>4</sub>, 0,015 % CaCl<sub>2</sub>, 2 % agar dan 1 % *soluble starch* (Santos dan Martin, 2003).

### 3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan 2 tahapan, penelitian tahap pertama dilakukan secara diskriptif kualitatif yaitu melakukan isolasi dan seleksi bakteri amilolitik dari bekatul. Isolasi dilakukan dengan menggunakan media selektif amilolitik kemudian bakteri yang didapatkan dilakukan karakterisasi secara makroskopis dan mikroskopis dan dilakukan uji produksi enzim amilase secara kualitatif. Penelitian tahapan kedua dilakukan secara diskriptif kuantitatif untuk mengetahui pengaruh jenis media produksi yaitu bekatul, onggok dan dedak terhadap produksi enzim amilase yang dihasilkan isolat bakteri amilolitik yaitu BK 1.

### 3.4 Tahapan Penelitian

1. Tahap Preparasi Alat dan Bahan.
2. Pembuatan Media.
  - a. Media selektif amilolitik (untuk isolasi bakteri)

- b. Media Isolasi *Broth* (untuk kurva pertumbuhan bakteri dan produksi enzim)
3. Isolasi dan Seleksi Bakteri dari Bekatul.
4. Uji Bakteri Penghasil Amilase secara Kualitatif.
5. Karakterisasi Bakteri Amololitik.
  - a. Morfologi Sel.
  - b. Pewarnaan Gram.
  - c. Pewarnaan Endospora.
  - d. Uji Katalase.
6. Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri.
7. Pembuatan Inokulum
8. Produksi Enzim Amilase pada Berbagai Jenis Media
9. Analisis kadar glukosa dengan Metode DNS.
  - a. Pembuatan Kurva Standar Glukosa.
  - b. Analisis Kadar Glukosa.
10. Analisis Data.

### 3.5 Pelaksanaan Penelitian

#### 3.5.1 Tahap Preparasi Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam isolasi bakteri (Erlenmeyer, kawat ose, tabung reaksi dan cawan petri) dicuci bersih kemudian dikeringkan. Cawan petri dibungkus dengan menggunakan kertas sampul kemudian dimasukkan ke dalam kantong plastik yang tahan panas. *Bluetip* dibungkus dengan kertas aluminium

kemudian dimasukkan ke dalam kantong plastik tahan panas dan erlemeyer juga dimasukkan ke dalam kantong plastik tahan panas. Selanjutnya disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121 °C, tekanan 1 atm selama 15 menit.

Bahan (bekatul) yang telah didapat dari penggilingan padi di Desa Asrikaton Kec. Pakis Kab. Malang di disimpan di tempat yang kering untuk proses selanjutnya (isolasi bakteri).

### **3.5.2 Pembuatan Media**

#### **3.5.2.1 Media Selektif Amilolitik**

Media agar selektif Amilolitik ditimbang dengan komposisi 0,2 % yeast ekstrak, 0,5 % pepton, 0,05 % NaCl, 0,05 % MgSO<sub>4</sub>, 0,015 % CaCl<sub>2</sub>, 2 % agar dan 1 % *soluble starch* (Santos dan Martin, 2003). Kemudian ditambahkan dengan aquadest sebanyak 1000 mL, dipanaskan sampai mendidih sambil diaduk hingga larut, kemudian media tersebut dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 mL dan ditutup menggunakan gulungan kapas seukuran mulut Erlenmeyer, kemudian disterilisasi dalam autoklaf dengan suhu 121 °C selama 15 menit.

Media yang digunakan untuk kurva pertumbuhan bakteri amilolitik adalah media tanpa agar yang terdiri dari 0,2 % yeast ekstrak, 0,5 % pepton, 0,05 % NaCl, 0,05 % MgSO<sub>4</sub>, 0,015 % CaCl<sub>2</sub> dan 1 % *soluble starch*. Kemudian ditambahkan dengan aquadest sebanyak 1000 mL, dipanaskan sampai mendidih sambil diaduk, kemudian media tersebut dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 mL dan ditutup menggunakan gulungan kapas seukuran mulut Erlenmeyer, kemudian disterilisasi dalam autoklaf dengan suhu 121 °C selama 15 menit.

### 3.5.3 Isolasi dan Seleksi Bakteri dari Bekatul (Ginting, 2009).

Bekatul sebanyak 5 gram dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang berisi aquades steril 45 mL dan dikocok (pengenceran  $10^{-1}$ ), kemudian diinkubasi selama 1 hari pada suhu ruang. Selanjutnya dilakukan pengenceran bertingkat sampai  $10^{-10}$  dengan mengambil 1 mL dari pengenceran sebelumnya lalu diencerkan dengan 9 mL aquadest steril. Pengenceran dilakukan untuk mengurangi kepadatan koloni yang tumbuh pada media isolasi sehingga memudahkan proses isolasi. Pengenceran  $10^{-3}$  sampai  $10^{-10}$  diambil 1 mL dan dimasukkan ke dalam cawan petri untuk ditanam secara *pour plate* menggunakan media selektif agar, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 48 jam (setiap hari diamati).

Koloni yang dihasilkan dari isolasi diamati morfologinya dan koloni yang terpisah dipindahkan pada agar miring untuk pemurnian. Pemurnian dilakukan dengan cara mengambil satu ose isolat mikroba dan menumbuhkan pada media selektif *Agar* dengan metode *streak kuadran*. Isolat murni yang didapatkan disimpan pada media miring selektif *agar* untuk perlakuan selanjutnya.

### 3.5.4 Uji Bakteri Penghasil Amilase secara Kualitatif

Semua isolat murni yang diperoleh diuji kemampuannya untuk menghasilkan enzim amilase. Pengujian pembentukan zona bening dari isolat hasil pemurnian dipakai iodine sebagai bahan pengikat pati pada media sehingga jelas dapat dibedakan antara zona bening yang terbentuk dengan area yang masih tersisa patinya. isolat-isolat bakteri diinokulasikan ke dalam media *Agar*. Kultur kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Visualisasi zona bening

dilakukan dengan larutan iodin (komposisi KI 4,0 g, I<sub>2</sub> 4,0 g, dalam 600 mL akuades) dan ditunggu selama 15 menit untuk pengamatan zona bening dan pengukuran indeks amilolitik (Fossi *et al.*, 1995). Indeks zona bening yang tinggi menunjukkan bahwa koloni tersebut diduga memiliki aktivitas enzim amilase yang tinggi dibandingkan dengan isolat-isolat yang lain. Uji bakteri selulolitik adalah perbandingan antara diameter zona bening dengan diameter koloni (Sudiana dkk, 2002).

$$\text{Ratio ZB} = \frac{\text{Diameter Zona Bening (DZB)}}{\text{Diameter Koloni Bakteri (DKB)}}$$

### 3.5.5 Identifikasi Makroskopis dan Mikroskopis Bakteri

Identifikasi bakteri amilolitik dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan makroskopis meliputi morfologi koloni, sedangkan pengamatan mikroskopis meliputi pewarnaan gram, uji katalase dan uji endospora.

#### 3.5.5.1 Identifikasi Makroskopis

Karakteristik koloni bakteri hasil inokulasi pada media selektif agar didasarkan pada :

- a. Bentuk koloni (dilihat dari atas) : berupa titik-titik, bulat, berbenang, tidak teratur, serupa akar, serupa kumaran.
- b. Permukaan koloni (dilihat dari samping) : rata, timbul – datar, melengkung, membukit serupa kawah.

- c. Tepi koloni (dilihat dari atas) : utuh, berombak, berbelah, bergerigi, berbenang, keriting.
- d. Warna koloni : keputih-putihan, kelabu, kekuning-kuningan atau hampir bening.

### 3.5.5.2 Identifikasi Mikroskopis

Identifikasi mikroskopis dilakukan untuk melihat bentuk sel bakteri dan untuk melihat kemurnian dari isolat. Pengamatan mikroskopis meliputi pewarnaan gram, uji katalase dan uji endospora. Untuk penentuan jenis bakteri dilanjutkan dengan serangkaian uji biokimia terhadap isolat yang diperoleh dengan berpedoman pada buku *Bergey's Manual Determination Bacteriology* (Holtzapfle dkk. 1994).

#### 3.5.5.2.1 Pewarnaan Gram

Bakteri amilolitik diambil sedikit dengan jarum ose secara aseptis dan disuspensikan dengan aquades yang ada di atas gelas objek. Preparat difiksasi diatas api bunsen sampai kering. Preparat ditetesi dengan larutan kristal violet, didiamkan selama 60 detik dan dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Preparat ditetesi dengan larutan iodin dan didiamkan selama 60 detik, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Preparat ditetesi dengan larutan alkohol 96 % dan didiamkan selama 30 detik, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Preparat ditetesi dengan larutan safranin dan didiamkan selama 30 detik, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Preparat ditetesi dengan minyak imersi,

preparat diamati dengan mikroskop, uji gram positif jika berwarna ungu dan negatif jika berwarna merah (Hadioetomo, 1999).

#### **3.5.5.2.2 Uji Katalase**

Uji katalase dilakukan untuk mengetahui apakah bakteri tersebut memiliki enzim katalase untuk mereduksi efek toksik  $H_2O_2$ . Uji katalase dilakukan dengan menggunakan 3 %  $H_2O_2$  yang diteteskan pada gelas objek yang berisi isolat bakteri, uji positif bila terlihat pembentukan gelembung udara (Capucino & Sherman, 1983; Lay, 1994).

#### **3.5.5.2.3 Pewarnaan Endospora**

Biakan murni bakteri amilolitik diambil sedikit secara aseptis dengan menggunakan jarum ose dan disuspensikan dengan aquades steril yang ada di gelas obyek, kemudian preparat difikasasi di atas api bunsen. Preparat ditetesi dengan *Malachit green*. Preparat diletakkan diatas kawat yang sudah dipanaskan diatas air mendidih selama 10 menit. Preparat dicuci dengan hati-hati dengan air mengalir. Preparat ditetesi dengan menggunakan safranin, didiamkan selama 30 detik, kemudian dicuci menggunakan air mengalir dan dikeringkan dengan hati-hati. Preparat diamati dengan mikroskop, uji positif jika sel vegetatif berwarna merah dan spora berwarna hijau (Lay, 1994).

#### **3.5.6 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri Amilolitik**

Pembuatan kurva pertumbuhan dilakukan dengan cara membuat stok inokulum masing-masing isolat terpilih dengan memindahkan satu ose biakan ke dalam 50 mL medium isolasi, kemudian di goyang dengan shaker pada kecepatan

125 rpm selama 24 jam. sebanyak 20 mL, masing-masing stok tersebut dipindahkan dalam 200 mL medium serupa kemudian 3 mL dari masing-masing inokulum diambil tiap 4 jam sekali sampai pada awal fase stasioner dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 600 nm dengan menggunakan *spectrofotometer uv-vis* sehingga didapatkan nilai OD (*Optical Density*). Kurva pertumbuhan ditentukan dengan membuat plot antara waktu inkubasi, glukosa yang dihasilkan dan jumlah bakteri.

### 3.5.7 Pembuatan Inokulum

Sebanyak 2 ose biakan isolat terpilih dimasukkan ke dalam 100 mL media selektif tanpa *agar*, *dishaker* pada suhu 30 °C dengan kecepatan 100 rpm sampai mencapai fase akhir logaritmik, sehingga siap digunakan untuk inokulum.

### 3.5.8 Produksi Enzim Amilase pada Berbagai Jenis Media

Produksi enzim amilase pada berbagai jenis media (bekatul, onggok dan dedak) dengan konsentrasi substrat 2 % (b/v). Inokulum kemudian diambil sebanyak 5 mL dan dipindahkan dalam 50 mL medium media tersebut dan diinkubasi pada *shaker incubator* selama 2 hari dengan kecepatan 130 rpm (Naiola, 2008). Ekstrak kasar enzim diperoleh dengan mensentrifugasi kultur pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit pada suhu 4 °C, supernatan yang diperoleh adalah ekstrak kasar enzim

### **3.5.9 Analisis Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Amilase dengan Metode DNS (Miller, 1959).**

#### **3.5.9.1 Pembuatan Kurva Standar Glukosa**

Disiapkan 6 tabung reaksi, masing-masing diisi dengan larutan glukosa dengan konsentrasi 0, 2, 4, 6, 8 dan 10 ppm. Setelah itu diambil 1 mL dari masing-masing konsentrasi dan dimasukkan kedalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan ke dalam tabung reaksi 1 mL reagen DNS dan dihomogenkan. Ditunggalkan mulut tabung dengan aluminium foil dan dipanaskan dalam air mendidih selama 5-15 menit sampai larutan berwarna merah-coklat. Kemudian ditambahkan 1 mL larutan K-Na-Tartrat 40 %. Tabung reaksi didinginkan dan ditambahkan dengan aquades hingga volumenya menjadi 10 mL dan dihomogenkan. Selanjutnya diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm.

#### **3.5.9.2 Uji Aktivitas Enzim Amilase**

Sebanyak 0,5 ml ekstrak kasar enzim hasil sentrifugasi dicampur dengan 0,5 ml substrat (pati terlarut 1 % dalam buffer fosfat 0,2 M pH 7) lalu diinkubasi selama 30 menit pada suhu 30° C. Reaksi dihentikan dengan penambahan 2 mL asam 3,5 dinitrosalisilat (DNS) kemudian dikocok kuat-kuat dengan *vortex* dan dipanaskan dalam air mendidih selama 5 menit (Shaw *et al.*, 1955). Lalu didinginkan di dalam air es selama 20 menit. Setelah dingin diukur absorbansinya pada  $\lambda = 540$  nm. Blanko mendapat perlakuan yang sama dengan sampel, namun penambahan enzim dilakukan setelah campuran dipanaskan. Satu unit aktivitas  $\alpha$ -amilase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang diperlukan untuk melepas 1

$\mu\text{mol}$  gula pereduksi/menit atau setara dengan 1  $\mu\text{mol}$  glukosa/menit (Tresnawati, 2004). Aktivitas amilase ditentukan dengan mengkonversi nilai absorbansi yang diperoleh dari konsentrasi glukosa standart, kemudian dihitung dengan menggunakan rumus (Kombong, 2004):

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

Dimana:

- AE = Aktifitas enzim ( Unit/mL)
- C = Konsentrasi glukosa
- BM = Berat Molekul Glukosa = 180 g/mol
- t = Waktu Inkubasi (menit)
- H = Volume total enzim-substrat (mL)
- E = Volume enzim (mL)

### 3.5.10 Analisis Data

Data yang telah diperoleh dalam penelitian ini meliputi data kualitatif dan kuantitatif. Data penelitian kualitatif yang diperoleh disajikan secara deskriptif meliputi karakteristik mikroskopis dan makroskopis dari masing-masing isolat. Selanjutnya data kuantitatif yang diperoleh yaitu aktivitas enzim amilolitik disajikan dalam bentuk tabel kemudian di interpretasikan sesuai data yang didapatkan.

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Isolasi dan Seleksi Bakteri dari Bekatul

Isolasi bakteri dari bekatul dilakukan untuk mendapatkan bakteri yang memiliki potensi untuk mendegradasi pati. Menurut Ardiansyah (2010) kandungan amilosa dalam bekatul sekitar 32,8 %. Kandungan amilosa dalam bekatul ini memberikan kemungkinan bahwa bakteri amilolitik mampu hidup dengan kondisi lingkungan yang kaya akan amilosa. Isolasi bakteri amilolitik pada bekatul dilakukan dengan cara perendaman menggunakan akuades steril selama 1 hari, selanjutnya dilakukan pengenceran mulai dari  $10^{-2}$  sampai  $10^{-10}$ . Pengenceran dilakukan untuk mengurangi kepadatan koloni yang tumbuh pada media isolasi sehingga memudahkan proses isolasi. Pengenceran  $10^{-3}$  sampai  $10^{-10}$  ditanam ke dalam media selektif agar dengan metode tuang (*pour plate*) dan diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Kemudian dilakukan pengamatan morfologi koloni masing-masing isolat bakteri yang diamati yaitu meliputi karakterisasi bentuk, tepi, elevasi dan warna koloni dari tiap-tiap koloni. Koloni tersebut kemudian dimurnikan dengan metode *streak kuadran* pada media agar miring dan diinkubasi kembali selama 24 jam pada suhu ruang. Koloni murni yang diperoleh digunakan sebagai stok isolat untuk uji selanjutnya.

Hasil isolasi dari bekatul diperoleh sebanyak 5 isolat yang mampu tumbuh pada media selektif agar dengan karakter morfologi koloni seperti ditunjukkan pada Tabel 4.1. isolat yang didapat selanjutnya akan diuji *screening* bakteri

amilolitik, menurut Dwijoseputro (2005), pengamatan makroskopis morfologi koloni meliputi bentuk koloni (dilihat dari atas), permukaan koloni (dilihat dari samping), tepi koloni (dilihat dari atas) dan warna koloni bakteri.

Tabel 4.1 Karakter Morfologi Koloni Bakteri dari Bekatul

No.	Kode Isolat	Morfologi Koloni			
		Bentuk	Elevasi	Tepian	Warna
1.	BK1	Bulat	Raised	Lobate	Putih
2.	BK2	Bergelombang	Flat	Lobate	Kuning
3.	BK3	Bulat	Convex	Entire	Putih
4.	BK4	Bergelombang	Flat	Lobate	Putih
5.	BK5	Bulat	Convex	Lobate	Kuning

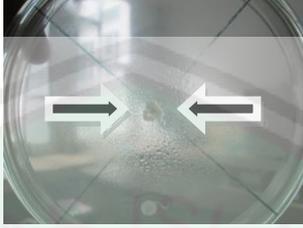
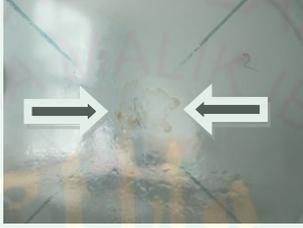
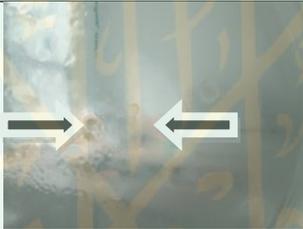
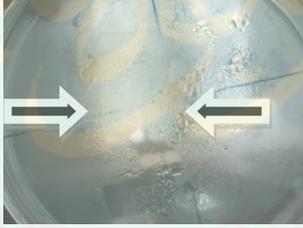
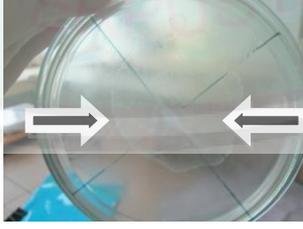
Keterangan :

BK = Bekatul

Elevasi (permukaan) = Convex (bentuk kubah), Raised (sedikit menonjol), Flat (datar).

Tepian Koloni = Entire (sangat rata), Lobate (lekukan yang jelas).

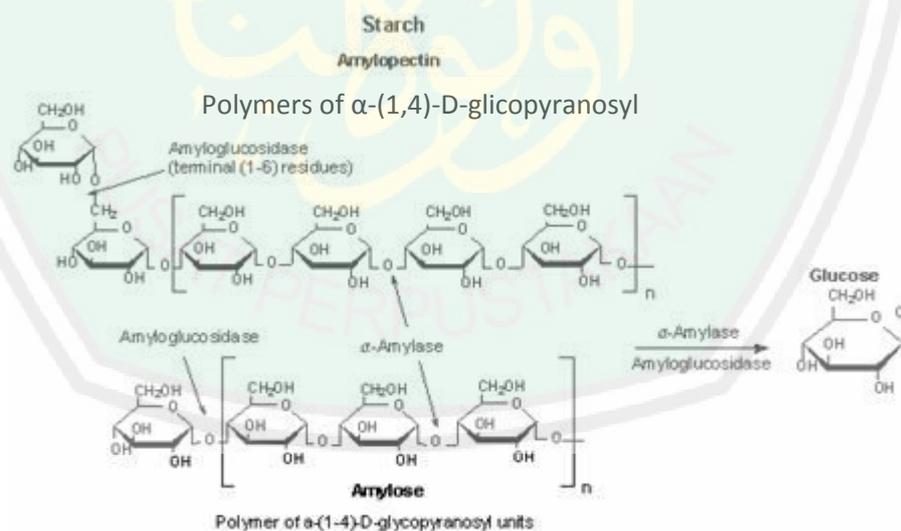
Tabel 4.2 Bentuk Koloni Bakteri Amilolitik Hasil Isolasi

No.	Kode Isolat	Bentuk Koloni	
1.	BK1		
2.	BK2		
3.	BK3		
4.	BK4		
5.	BK5		

#### 4.2 Uji Bakteri Penghasil Amilase secara Kualitatif

Uji bakteri amilolitik secara kualitatif dilakukan untuk mengetahui kemampuan isolat bakteri dalam menghasilkan enzim amilase dari ke-5 isolat yang telah berhasil diisolasi sebelumnya. Isolat yang menghasilkan amilase

ekstraseluler terlihat dari pembentukan zona bening di sekitar koloni bakteri. Pembentukan zona bening menunjukkan bahwa pati yang terdapat di dalam media dihidrolisis oleh enzim amilase menjadi senyawa yang sederhana seperti maltosa, dekstrin dan glukosa (Winarno 1983), untuk memperjelas adanya zona bening, media pati padat yang telah ditumbuhi bakteri ditetesi larutan iodium, daerah di luar zona bening akan berwarna biru setelah diberi larutan ini, warna biru yang terbentuk karena larutan ini bereaksi dengan pati yang tidak dihidrolisis. Zona bening tidak ikut terwarnai karena pada zona tersebut pati sudah terhidrolisis menjadi senyawa yang lebih sederhana seperti disakarida atau monosakarida. Enzim amilase ekstraseluler yaitu enzim yang dikeluarkan dan menghidrolisis makromolekul seperti pati yang ada di lingkungan luar sel, kemudian hasil hidrolisis diserap kembali ke dalam sel (Cruieger & Cruieger 1982).



Gambar 4.1 Mekanisme kerja enzim amilase.

Gambar 4.1 mekanisme di atas merupakan proses hidrolisis amilosa menjadi glukosa.  $\alpha$ -amilase merupakan enzim ekstraseluler yang menghidrolisis ikatan 1,4- $\alpha$ -glikosida, enzim ini memecah ikatan 1-4 yang terdapat dalam amilum

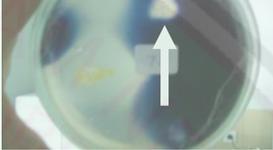
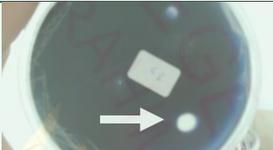
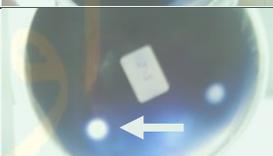
dan disebut endo amilase sebab enzim ini memecah bagian dalam atau bagian tengah molekul amilum (Poedjiadi, 2006).

Uji bakteri amilolitik secara kualitatif (*screening*) menggunakan media padat selektif agar dengan metode inokulasi. Pengujian adanya aktivitas amilolitik ditunjukkan dengan adanya zona bening pada media selektif agar setelah diberi pewarna iodine. Uji *screening* bakteri amilolitik adalah perbandingan antara diameter zona bening dengan diameter koloni (Sudiana dkk, 2002).

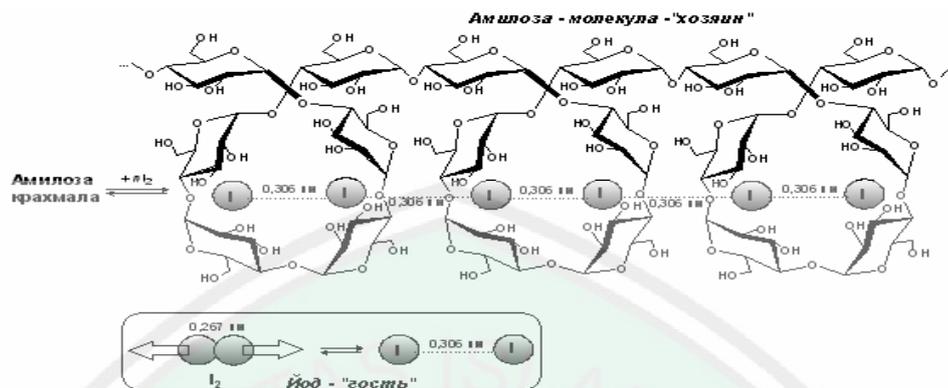
$$\text{Zona Bening} = \text{Diameter Total} - \text{Diameter Koloni}$$

Uji bakteri amilolitik secara kualitatif dengan iodine dilakukan pada 5 isolat bakteri yang telah berhasil diisolasi sebelumnya, dari hasil pengujian didapatkan 5 isolat yang mempunyai aktivitas amilolitik berupa visualisasi zona bening di sekitar koloni, yaitu BK1, BK2, BK3, BK4 dan BK5 (Tabel 4.3). Berdasarkan tingginya diameter zona bening dari masing-masing koloni yang diamati maka dipilih satu isolat dari lima isolat yang memiliki indeks diameter zona bening tertinggi yaitu isolat BK1. Zona bening yang terbentuk disekitar isolat menunjukkan adanya aktivitas isolat amilolitik, yaitu kemampuan isolat dalam menghidrolisis media selektif yang terdapat pada medium pertumbuhan dengan menghasilkan enzim amilase.

Tabel 4.3 Zona bening bakteri amilolitik

Kode Isolat	Zona Bening (mm)	Gambar
BK1	14.6	
BK2	8	
BK3	8	
BK4	8.8	
BK5	10	

Zona bening tertinggi terdapat pada isolat BK1, kemudian isolat BK5, Isolat BK4 dan terakhir adalah isolat BK2 dan BK3. Menurut Apun dkk (2000). Semakin besar zona bening yang terbentuk di sekitar koloni isolat, maka semakin besar aktivitas amilolitik yang dihasilkan. Kesulitan metode ini apabila bentuk koloni atau zona bening yang dihasilkan tidak benar-benar berbentuk bulat, atau bahkan tidak bulat sama sekali.



Gambar 4.2 Mekanisme Reaksi Antara Pati dan Iodin (Anonymous, 2009<sup>d</sup>)

Ikatan I<sub>2</sub> awal sebesar 0,267 nm dan setelah berada di tengah-tengah polimer amilosa ikatannya bertambah menjadi 0,306 nm (Anonymous, 2009<sup>d</sup>). Pati yang bereaksi dengan iodium akan menghasilkan senyawa kompleks yang berwarna biru/ungu. Iodine akan berada di bagian tengah polimer amilosa yang berbentuk heliks. Intensitas warna biru yang terjadi tergantung pada panjang unit polimer amilosa. Dekstrin dengan iodium akan menghasilkan warna merah anggur.

### 4.3 Karakterisasi Makroskopis dan Mikroskopis Bakteri Amilolitik.

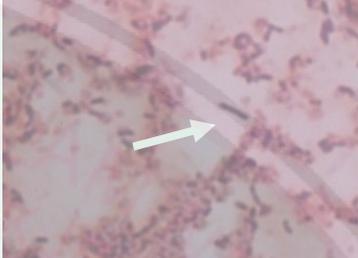
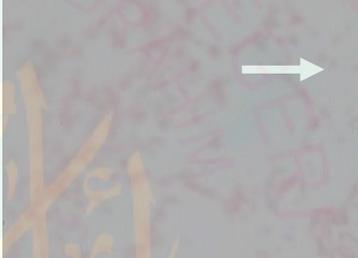
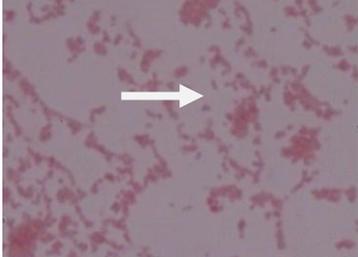
Karakterisasi bakteri amilolitik dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan makroskopis meliputi morfologi koloni, sedangkan pengamatan mikroskopis meliputi pewarnaan gram, uji katalase dan uji endospora.

#### 4.3.1 Pewarnaan Gram

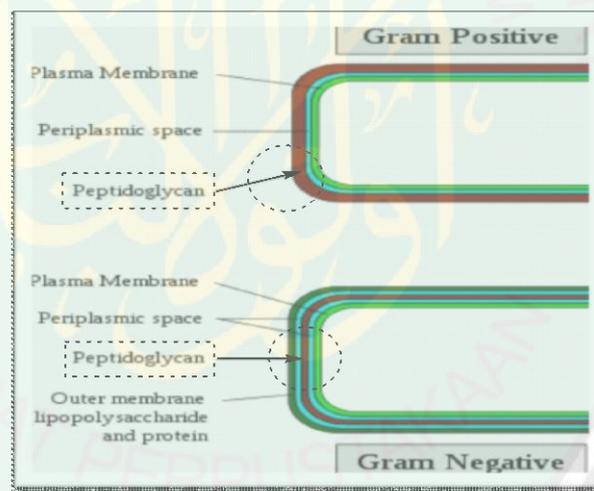
Pengujian pewarnaan gram dilakukan untuk menentukan karakter isolat berdasarkan perbedaan struktur dinding sel bakteri gram positif dan gram

negatif. Lapisan peptidoglikan yang terdapat pada dinding sel bakteri gram positif lebih tebal jika dibandingkan dengan bakteri gram negatif.

Tabel 4.4 Pewarnaan Gram Isolat Bakteri Amilolitik (Perbesaran 1000x)

Isolat	Gambar
BK1	
BK2	
BK3	
BK4	
BK5	

Hasil pengujian pewarnaan Gram menunjukkan gram negatif (warna merah) pada isolat bakteri BK2, BK3, BK4 dan BK5 dan gram positif pada isolat BK1. Sifat gram negatif dengan warna merah pada sel bakteri menurut Strohl dkk (2001) disebabkan oleh dua faktor, yaitu lapisan peptidoglikon yang tipis (satu sampai dua lapis) dan kadar lipid yang tinggi (20%). Prescott dkk (1999), menjelaskan bahwa tebal dinding sel bakteri gram positif sebesar 20-80 nm yang sebagian besar tersusun dari peptidoglikon sedangkan peptidoglikon bakteri gram negatif hanya sebesar 2-7 nm dan memiliki membran luar dengan tebal 7-8 nm yang terdiri dari lipid, protein, dan lipopolisakarida.



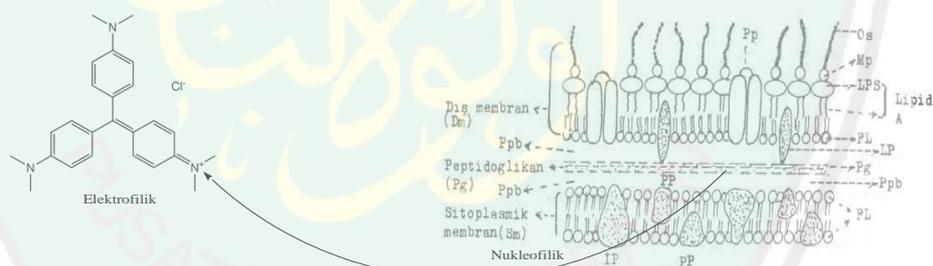
Gambar 4.3 Perbedaan dinding sel bakteri gram positif dan bakteri gram negatif (Nur, 2012).

Prinsip dasar dari pewarnaan adalah adanya ikatan ion antara komponen seluler dari bakteri dengan senyawa aktif dari pewarna yang disebut kromogen. Ikatan ion dapat terjadi karena adanya muatan listrik baik pada komponen seluler maupun pada pewarna (Anonymous, 2008<sup>c</sup>). Kebanyakan bakteri telah bereaksi dengan pewarna-pewarna sederhana karena sitoplasmanya bersifat basofil (suka

akan basa). Zat-zat warna yang digunakan untuk pewarnaan sederhana umumnya bersifat alkalin (komponen kromofornya bersifat positif) (Hadiotomo, 1999). Zat pewarna adalah garam yang terdiri atas ion positif dan ion negatif, salah satu di antaranya berwarna. Pada zat warna yang bersifat basa, warna terdapat pada ion positif (zat pewarna<sup>+</sup> Cl<sup>-</sup>) dan pada pewarna asam, warna akan terdapat pada ion negatif (zat pewarna<sup>-</sup> Na<sup>+</sup>) (Volk dkk, 1988).

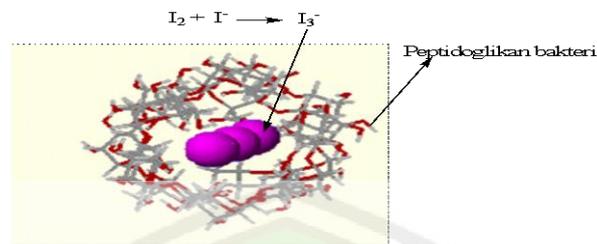
Tabel 4.5 Data Cat Gram Bakteri Amilolitik

No.	Kode Isolat	Jenis Gram	Bentuk Sel
1.	BK1	+	Batang Panjang
2.	BK2	-	Batang Panjang
3.	BK3	-	Batang Pendek
4.	BK4	-	Batang Pendek
5.	BK5	-	Batang Panjang



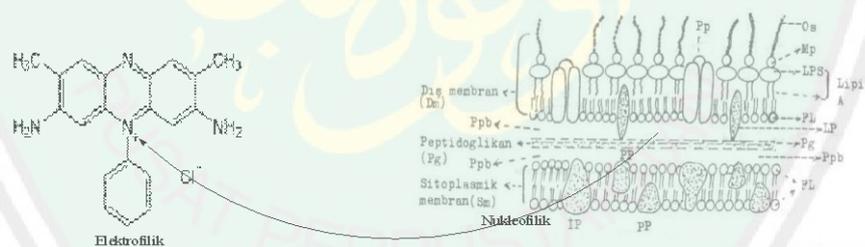
Gambar 4.4 Ikatan ionik antara kristal violet dengan dinding sel bakteri (Talaro, 2005)

Bakteri gram positif maupun gram negatif akan dihasilkan warna yang sama (ungu). Akan tetapi banyaknya Kristal violet yang diserap oleh bakteri gram positif lebih besar, karena tebal dinding sel bakteri gram positif sebesar 20-80 nm yang sebagian besar tersusun dari peptidoglikan (Prescott dkk, 1999).



Gambar 4.5 Interaksi antara kristal iodine dengan dinding sel bakteri (Ophardt, 2003).

Bakteri gram positif maupun gram negatif akan dihasilkan warna yang sama (ungu), akan tetapi pada bakteri gram negatif dengan lapisan peptidoglikogan yang tipis menyebabkan permeabilitas membran sel lebih besar sehingga kristal yodium yang berfungsi sebagai penguat warna menjadi mudah terlepas, adapun kadar lipid yang tinggi akan mudah larut selama pencucian dengan alkohol dan menyebabkan pori-pori membran sel membesar (Strohl dkk, 2001).



Gambar 4.6 Ikatan ionik antara safranin dengan dinding sel (Talaro, 2005).

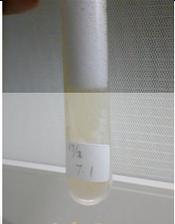
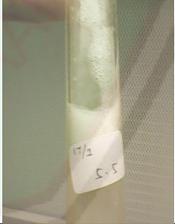
Bakteri gram positif akan dihasilkan warna ungu, dengan tebal dinding sel bakteri gram positif sebesar 20-80 nm sebagian besar tersusun dari peptidoglikan yang berakibat pada banyaknya kristal violet yang diserap oleh bakteri gram positif lebih besar (Preskott dkk, 1999). Kristal iodin yang terjebak pada polisakarida peptidoglikan (dinding sel bakteri) yang semakin menambah pekat warna ungu. Ketika ditambahkan alkohol, maka hanya sedikit kristal violet

dan iodine yang lepas, itu disebabkan karena tebal dinding sel bakteri gram positif sebesar 20-80 nm, sehingga, ketika ditambahkan safranin, dimungkinkan safranin tersebut akan mengambil alih posisi kristal violet yang kemudian membentuk ikatan ion dengan dinding sel bakteri, walaupun demikian warna dari kristal iodine dan kristal violet lebih mendominasi karena tebalnya dinding sel bakteri gram negatif. Adapun pada bakteri gram negatif menghasilkan warna merah, dengan tebal peptidoglikan bakteri gram negatif hanya sebesar 2-7 nm dan memiliki membran luar dengan tebal 7-8 nm yang terdiri dari lipid, protein, dan lipopolisakarida yang berakibat pada banyaknya kristal violet yang diserap oleh bakteri gram negatif lebih kecil (Prescott dkk, 1999). kristal iodine yang terjebak pada polisakarida peptidoglikan (dinding sel bakteri) yang semakin menambah pekat warna ungu. Ketika ditambahkan alkohol, maka banyak kristal violet dan iodine yang lepas, itu disebabkan karena tebal peptidoglikan (dinding sel bakteri) gram negatif hanya sebesar 2-7 nm. Sehingga, ketika ditambahkan safranin, dengan mudah membentuk ikatan ion dengan dinding sel bakteri membentuk warna safranin (merah).

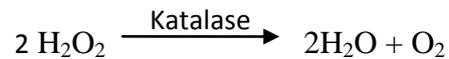
#### 4.3.2 Uji Katalase

Uji katalase dilakukan untuk mengetahui apakah bakteri tersebut memiliki enzim katalase untuk mereduksi efek toksik  $H_2O_2$ . Terbentuknya gelembung gas menandai bahwa bakteri tersebut bersifat aerobik (uji katalase tersebut positif) (Lay, 1994).

Tabel 4.6 Hasil Uji Katalase

Nama Isolat	Hasil	Gambar
BK1	+	
BK2	+	
BK3	+	
BK4	+	
BK5	+	

Hasil uji katalase pada semua isolat bakteri (Gambar 4.7) yang ditemukan menunjukkan hasil positif (adanya gelembung  $O_2$ ). Pembentukan gelembung udara (positif) yang terjadi pada koloni dan sekitarnya, menunjukkan bahwa bakteri yang diuji tersebut bersifat aerobik, sedangkan tidak adanya gelembung udara (negatif) menunjukkan isolat bersifat anaerobik. Dengan enzim katalase,  $H_2O_2$  diurai dengan reaksi sebagai berikut (Ruly, 2008):



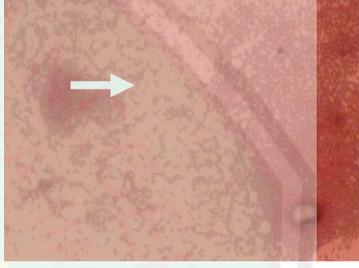
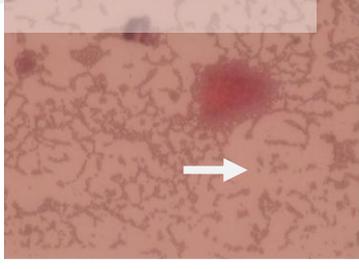
Gambar 4.8 Reaksi degradasi  $\text{H}_2\text{O}_2$  oleh enzim katalase (Pelczar, 2008).

Mikroorganisme biasanya memproduksi anion superoksida ( $\text{O}_2^-$ ) dalam keadaan terdapat oksigen ( $\text{O}_2$ ). Mikroorganisme aerob dapat bertahan hidup dari toksisitas anion superoksida karena memiliki enzim dismutase superoksida yang mengubahnya menjadi hidrogen peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Volk dkk, 1988). Uji katalase yang dilakukan pada semua isolat bakteri untuk mengetahui kemampuan isolat bakteri dalam menghasilkan enzim katalase serta toleransi isolat bakteri terhadap oksigen. Enzim katalase merupakan enzim yang mampu mengkatalisasi hidrogen peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) yang sangat beracun bagi sel menjadi air ( $\text{H}_2\text{O}$ ) dan oksigen ( $\text{O}_2$ ) (Volk dkk, 1988):

#### 4.3.3 Pewarnaan Endospora

Pewarnaan endospora dilakukan untuk mengetahui apakah bakteri mampu menghasilkan endospora. Uji positif jika sel vegetatif berwarna merah dan spora berwarna hijau (Lay, 1994).

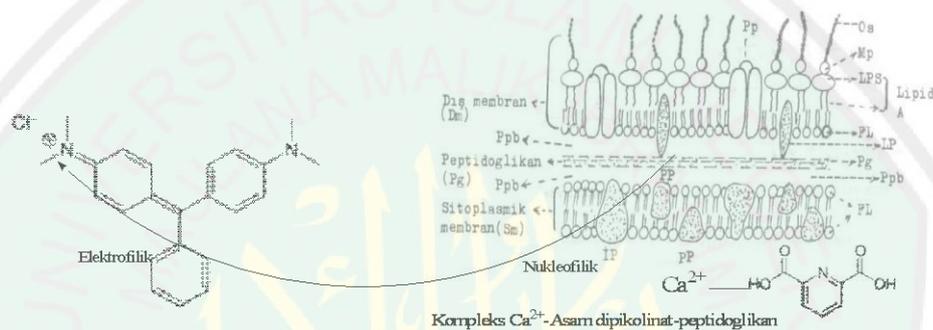
Tabel 4.7 Pewarnaan Endospora Bakteri Amilolitik

Nama Isolat	Jenis Endospora	Gambar
BK1	+	
BK2	-	
BK3	-	
BK4	+	
BK5	-	

Pengujian pewarnaan endospora menunjukkan endospora positif (warna merah pada sel vegetatif dan warna hijau pada endospora). Menurut Lay (1994) uji pewarnaan endospora positif jika sel vegetatif bakteri berwarna merah dan terdapat spora di dalam sel yang berwarna hijau, sedangkan hanya ada sel vegetatif saja yang berwarna merah tidak ada spora hasilnya negatif. Salah satu ciri unik untuk endospora bakteri ialah susunan kimiawinya. Semua endospora bakteri mengandung sejumlah besar *asam dipikolinat*, yaitu substansi yang tidak terdeteksi pada sel-sel vegetatif. Sesungguhnya, asam tersebut merupakan 5-10 % berat kering endospora, dan diduga bahwa lapisan korteks terbuat dari kompleks asam dipikolinat-kalsium-peptidoglikan (Pelczar, 2008). Volk dkk (1988), menyatakan bahwa endospora terbentuk mendekati fase stasioner. Itu sebabnya dalam uji pewarnaan endospora dilakukan pada fase stasioner ( $\pm$  peremajaan 3 hari).

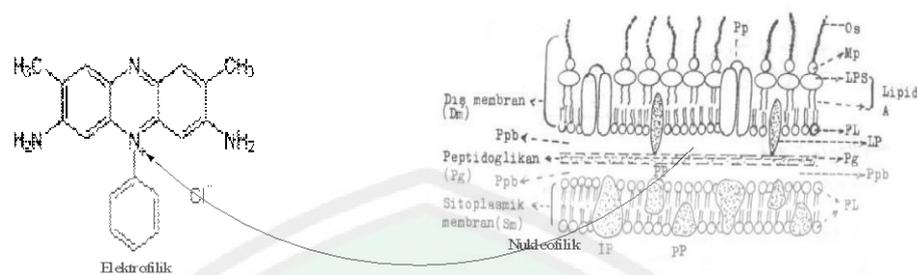
Prinsip dasar dari pewarnaan adalah adanya ikatan ion antara komponen selular dari bakteri dengan senyawa aktif dari pewarna yang disebut kromogen. Ikatan ion dapat terjadi karena adanya muatan listrik baik pada komponen seluler maupun pada pewarna (Anonymous, 2008<sup>c</sup>). Kebanyakan bakteri telah bereaksi dengan pewarna-pewarna sederhana karena sitoplasmanya bersifat basofil (suka akan basa). Zat-zat warna yang digunakan untuk pewarnaan sederhana umumnya bersifat alkalin (komponen kromofornya bersifat positif) (Hadiotomo, 1999). Zat pewarna adalah garam yang terdiri atas ion positif dan ion negatif, salah satu di antaranya berwarna. Pada zat warna yang bersifat basa, warna terdapat pada ion positif (zat pewarna<sup>+</sup> Cl<sup>-</sup>) dan pada pewarna asam, warna akan terdapat pada ion

negatif (zat pewarna<sup>-</sup> Na<sup>+</sup>) (Volk dkk, 1988). Prinsip pewarnaan ini digunakan untuk membedakan spora dari sel vegetatif. Zat warna yang paling sering digunakan untuk mewarnai spora adalah malachite green yang akan tetap diikat oleh spora setelah pencucian dengan air dan sebagai counterstain (larutan pencuci) digunakan safranin (Fardiaz, 1987).



Gambar 4.7 Ikatan ionik antara malachit green dengan kompleks asam dipikolinat-kalsium-peptidoglikan(endospora bakteri) (Talaro, 2005).

Bakteri positif endospora akan dihasilkan warna hijau pada endospora dan merah pada sel vegetatif. Menurut Pelczar (2008), beberapa mikrobiologian telah menghubungkan resistensi ini dengan selubung spora yang impermeabel, yang pada gilirannya berkaitan dengan kompleks asam dipikolinat-kalsium-peptidoglikan. Kemampuan bertahan hidup yang unik inilah yang menjadi bahaya bagi kesehatan manusia terkait penghambatan dan pemusnahan mikroorganisme dalam bidang pangan. Fardiaz (1987), menjelaskan bahwa spora juga lebih tahan terhadap pewarnaan, dan sekali berhasil diwarnai, spora akan sangat sukar untuk melepaskan zat warna, sehingga tidak dapat mengikat zat warna lainnya yang diberikan kemudian (counterstain).



Gambar 4.8 Ikatan ionik antara safranin dengan dinding sel (peptidoglikan) bakteri (Talaro, 2005).

Bakteri negatif endospora akan dihasilkan merah pada sel vegetatif. Itu disebabkan adanya pemanasan pada saat pemberian zat warna, sehingga sel vegetatif tidak mampu mengikat malachit green. Volk dkk (1988), menegaskan bahwa bakteri bisa mati (mengalami lisis) pada suhu 60-70 C. Sehingga, ketika diberikan warna counterstain safranin akan mampu berikatan dengan peptidoglikan bakteri dan memberikan warna merah muda.

Hasil identifikasi makroskopis dan mikroskopis isolat BK1 menunjukkan bahwa bakteri yang telah di isolasi diduga merupakan bakteri amilolitik genus *Bacillus* karena memiliki Gram positif, katalase positif dan endospora positif yang didasarkan pada buku *Bergey's Manual Determination Bacteriology*.

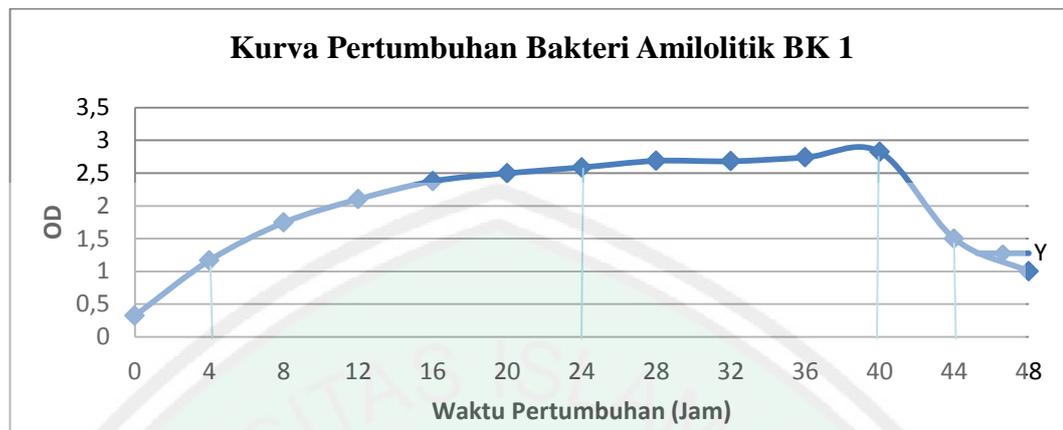
#### 4.4 Kurva Pertumbuhan Bakteri

Pembuatan kurva pertumbuhan bakteri amilolitik menggunakan isolat bakteri yang memiliki zona bening tertinggi yaitu isolat BK1. Kurva pertumbuhan pada penelitian ini dilakukan untuk mengetahui waktu inkubasi yang tepat bagi isolat BK1 dalam memproduksi enzim amilase kasar yang maksimal.

Kurva pertumbuhan memberikan gambaran bahwa dalam siklus kehidupan bakteri itu memiliki 4 fase, yakni fase adaptasi, fase logaritmik, fase stasioner dan fase kematian (Pelczar, 2008). Berdasarkan kurva pertumbuhan dapat ditentukan waktu inkubasi yang tepat oleh bakteri dalam memproduksi enzim amilase secara maksimal. Menurut Tortora dkk (2001), pada fasa lag (adaptasi), jumlah perubahan sel sangat sedikit, sel tidak aktif karena populasi mikroba sedang mengalami aktivitas metabolisme tertentu yang meliputi DNA dan sintesis enzim. Umumnya waktu produksi enzim amilase yang optimal adalah pada saat pertumbuhan bakteri pada fase eksponensial mendekati fase stasioner dengan dimana semakin banyak jumlah bakteri, maka semakin banyak pula enzim yang dihasilkan. Kemudian dikuatkan dengan kurva pertumbuhan yang dibuat dengan membuat grafik hubungan waktu inkubasi dengan nilai OD bakteri dan kadar glukosa dimana bakteri yang bermultiplikasi pada media cair akan menyebabkan media menjadi keruh. Alat yang digunakan untuk pengukuran adalah spektrofotometer atau kolorimeter dengan cara membandingkan densitas optik (*optical density*, OD) antara media tanpa pertumbuhan bakteri dan media dengan pertumbuhan bakteri (Pratiwi, 2009).

Gambar 4.10 menunjukkan kurva pertumbuhan bakteri amilolitik isolat BK1. Fase lag (adaptasi) diduga terjadi setelah jam ke-0 dan sebelum jam ke-4 dimana jumlah perubahan sel sangat sedikit dan belum mengalami kenaikan. Fasa logaritmik diduga terjadi setelah jam ke-4 sampai dengan sebelum jam ke-40 dimana terjadi perubahan sel yang ditandai dengan kenaikan jumlah sel, dimana mikroba membelah dengan cepat dan konstan mengikuti kurva logaritmik. Pada

fase ini kecepatan pertumbuhan sangat dipengaruhi oleh medium tempat tumbuhnya seperti pH dan kandungan nutrient, juga kondisi lingkungan termasuk suhu dan kelembaban udara. Pada fase ini mikroba membutuhkan energi lebih banyak dari pada fase lainnya. Pada fase ini kultur paling sensitif terhadap keadaan lingkungan. Akhir fase log, kecepatan pertumbuhan populasi menurun dikarenakan : 1.) Nutrien di dalam medium sudah berkurang dan 2.) Adanya hasil metabolisme yang mungkin beracun atau dapat menghambat pertumbuhan mikroba. Fasa stasioner diduga terjadi setelah jam ke-40 sampai sebelum jam ke-48 dimana pada fase ini jumlah populasi sel tetap karena jumlah sel yang tumbuh sama dengan jumlah sel yang mati. Ukuran sel pada fase ini menjadi lebih kecil karena sel tetap membelah meskipun zat-zat nutrisi sudah habis. Karena kekurangan zat nutrisi, sel kemungkinan mempunyai komposisi yang berbeda dengan sel yang tumbuh pada fase logaritmik. Pada fase ini sel-sel lebih tahan terhadap keadaan ekstrim seperti panas, dingin, radiasi, dan bahan-bahan kimia. Dan fasa kematian diduga terjadi pada jam ke-48 sampai seterusnya dimana pada fase ini sebagian populasi mikroba mulai mengalami kematian karena beberapa sebab yaitu: 1.) Nutrien di dalam medium sudah habis dan 2.) Energi cadangan di dalam sel habis.



Gambar 4.9 Data Kurva Pertumbuhan Bakteri Isolat BK1

#### 4.5. Produksi Enzim Amilase oleh Isolat BK1 pada Berbagai Jenis Media Pertumbuhan

Media adalah suatu bahan yang terdiri atas campuran nutrisi yang dipakai untuk menumbuhkan mikroba. Media yang diketahui komposisinya secara terinci disebut media sintetik (Indriyanto, 1995). Medium sebagai tempat tumbuh dan berkembang harus menjamin ketersediaan dan kebutuhan mikroba untuk hidup dan tumbuh berkembang. Medium biasa disebut substrat, medium harus mengandung nutrisi dan oksigen yang dibutuhkan mikroba. Mikroba berada dalam medium yang mengandung nutrisi sebagai substrat untuk tumbuh dan berkembang bercampur dengan produk-produk yang dihasilkan termasuk limbah. Medium kebanyakan berasal dari tumbuhan dan sedikit dari produk hewani. Sebagai contoh; biji-bijian (*grain*), susu (*milk*). *Natural raw material* berasal dari hasil pertanian dan hutan. Karbohidrat; gula, pati (tepung), selulosa, hemiselulosa, dan lignin.

Aktivitas enzim banyak dipengaruhi oleh beberapa faktor yang menentukan efektivitas kerja suatu enzim. Apabila faktor pendukung tersebut berada pada kondisi yang optimum, maka kerja enzim akan maksimal. Beberapa faktor yang mempengaruhi kerja enzim antara lain konsentrasi enzim, konsentrasi substrat, suhu, pH dan pengaruh inhibitor (Poedjiadi, dkk, 2005).

Produksi enzim amilase pada berbagai jenis media (bekatul, onggok dan dedak) dengan konsentrasi substrat 2 % (b/v). Inokulum kemudian diambil sebanyak 5 mL dan dipindahkan dalam 50 mL medium media tersebut dan diinkubasi pada *shaker incubator* selama 2 hari dengan kecepatan 130 rpm (Naiola, 2008). Ekstrak kasar enzim diperoleh dengan mensentrifugasi kultur pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit pada suhu 4 °C, supernatan yang diperoleh adalah ekstrak kasar enzim

Tabel 4.8 Data Aktivitas Enzim Amilase yang dihasilkan Isolat BK1 pada Berbagai Jenis Media Produksi

Media Produksi	Rata – rata Aktivitas (U/mL)
Dedak	$6,2950 \times 10^{-3}$
Bekatul	$6,6246 \times 10^{-3}$
Onggok	$4,1136 \times 10^{-3}$

Data Tabel 4.8 di atas diketahui bahwa antara media produksi, unit aktivitas enzimnya menunjukkan bahwa keduanya memiliki pengaruh yang hampir sama dalam memproduksi enzim amilase kasar. Aktivitas enzim amilase kasar paling besar dihasilkan oleh bekatul kemudian dedak dan paling kecil onggok, hal ini menunjukkan bahwa sumber isolat menentukan aktivitas enzim yang dihasilkan, adapun bekatul dan dedak menghasilkan aktivitas enzim yang cukup besar dimungkinkan karena dedak dan bekatul sama-sama berasal dari gabah

namun pada onggok nilai aktivitas enzimnya lebih kecil dikarenakan kandungan amilosanya sangat kecil karena berasal dari ampas singkong (tapioka). Nilai aktivitas amilase pada onggok memiliki nilai jauh lebih kecil karena berasal dari ampas singkong dimana kadar patinya (amilosa) yaitu sebesar 8% dan 65 % berupa lignin dan hemiselulosanya sedangkan kadar serat yang dimiliki bekatul sebesar 8,7-11,4 % untuk selulosa dan hemiselulosa 9,6-12,8 % (Junnatun, 2009).

Risma (2012) melakukan isolasi dan karakterisasi enzim  $\alpha$ -Glukosidase dari beras lapuk, beras baru dan dedak dari tiga varietas yaitu sarinah, IR 64 dan IR 46. Aktivitas tertinggi didapatkan pada IR 46 dengan 90,3 mU/mL. Dewi (2005) juga melaporkan  $\alpha$ -amilase dari *Rhizopus oryzae* mampu menghasilkan gula reduksi sebesar 15,347 mg/mL melalui proses sakarifikasi pada substrat bekatul 20%. Sebayang (2005) melaporkan pada isolasi dan pengujian aktivitas enzim  $\alpha$ -amilase dari *Aspergillus niger* dengan menggunakan media campuran onggok dan dedak didapatkan aktivitas spesifik ekstrak kasar enzim  $\alpha$ -amilase adalah 5.45 unit/mg. Hidayat (2006) melaporkan pada fermentasi asam laktat oleh *Rhizopus oryzae* pada sampel Tapioka Lampung (TL), Singkong Tanpa Kupas (STK), dan Onggok Tapioka (OT) menunjukkan, Tapioka Lampung memiliki kandungan pati paling tinggi yakni sebesar 83,10 %, kemudian Singkong Tanpa Kupas (STK) sebesar 71,6 % dan Onggok Tapioka sebesar 55,7 %. Nilai DE pada hasil hidrolisis asam untuk sampel Tapioka Lampung (TL), Singkong Tanpa Kupas (STK) dan Onggok Tapioka masing-masing sebesar 41,70 %, 33,37 % dan 22,30 %. Dari proses fermentasi, kadar asam laktat yang dihasilkan dari sampel Tapioka Lampung (TL), Singkong Tanpa Kupas (STK) dan Onggok Tapioka

masingmasing sebesar 60,55 g/l, 18,19 g/l dan 14,82 g/l, sedangkan dari standar glukosa dihasilkan asam laktat sebesar 96,94 g/l.

#### 4.6 Analisis Kadar Glukosa dengan Metode DNS

Reaksi dengan DNS yang terjadi merupakan reaksi redoks pada gugus aldehid gula (HCO bilangan oksidasi +3) dan teroksidasi menjadi gugus karboksil (COOH bilangan oksidasi +5) dimana pada gugus aldehid mengalami kenaikan bilangan oksidasi +2 menjadi +5. Sementara itu DNS sebagai oksidator akan tereduksi membentuk 3-amino dan asam 5-nitrosalisilat, dimana pada DNS (bilangan oksidasi  $-\text{NO}_2$  +5) mengalami penurunan bilangan oksidasi sebanyak -3 sehingga pada 3-amino dan asam 5-nitrosalisilat bilangan oksidasi  $\text{NH}_2$  menjadi +2. DNS merupakan senyawa aromatis yang akan bereaksi dengan gula reduksi maupun komponen pereduksi lainnya untuk membentuk asam 3-amino-5-nitrosalisilat, suatu senyawa yang mampu menyerap dengan kuat radiasi gelombang elektromagnetik pada 540 nm. Semakin banyak komponen pereduksi yang terdapat dalam sampel, maka akan semakin banyak pula molekul asam 3-amino-5-nitrosalisilat yang terbentuk dan mengakibatkan serapan semakin tinggi. Reaksi ini berjalan dalam suasana basa. Bila terdapat gula reduksi pada sampel, maka larutan DNS yang awalnya berwarna kuning akan bereaksi dengan gula reduksi sehingga menimbulkan warna jingga kemerahan (Anonymous<sup>b</sup>, 2012).

Aktivitas enzim didefinisikan sebagai kecepatan pengurangan substrat atau kecepatan pembentukan produk pada kondisi optimum. Satu unit aktivitas enzim amilase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dihasilkan satu mikromol gula

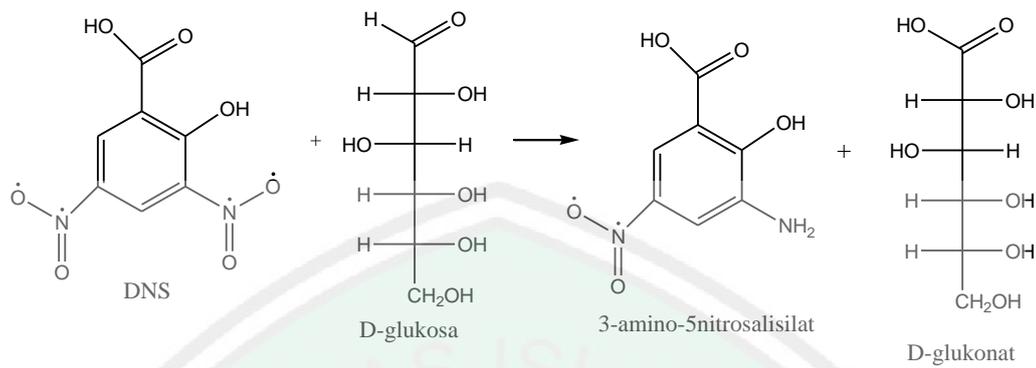
reduksi (glukosa) setiap menit (Lehninger, 1993). Aktivitas enzim ini dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya yaitu konsentrasi substrat, konsentrasi enzim, suhu, pH serta adanya inhibitor. Konsentrasi substrat yang rendah menyebabkan daerah aktif pada enzim tidak berikatan seluruhnya dengan substrat. Begitu pula dengan suhu, enzim mempunyai suhu dan pH optimum. Diatas suhu optimum, aktivitas enzim akan menurun drastis karena terjadinya denaturasi enzim dan pada suhu dibawah suhu optimum, beberapa enzim tidak dapat bekerja.

Aktivitas amilase dapat diukur dengan menggunakan metode asam 3,5 dinitrosalisilat (DNS). Prinsip dari metode ini yaitu didasarkan pada peristiwa tereduksinya DNS menjadi 3-amino-5-nitrosalisilat oleh senyawa gula pereduksi (glukosa) yang akan memberikan warna merah kecoklatan. Menurut Apriyanto dkk. (1989) dalam suasana alkali gula pereduksi akan mereduksi asam 3,5 – dinitrosalisilat membentuk senyawa yang dapat diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540-550 nm.

Pengujian aktivitas amilase pada penelitian ini dilakukan dengan mereaksikan 0.5 mL enzim dengan 0.5 mL larutan soluble starch 1% dan diinkubasi pada suhu 30 ° C selama 30 menit. Selama proses inkubasi, terjadilah reaksi antara enzim dengan substrat yang kemudian menghasilkan gula reduksi berupa glukosa. Reaksi ini merupakan reaksi hidrolisis amilosa menjadi glukosa dengan menggunakan enzim amilase. Menurut Ballschmiter *et al.*, (2006) enzim amilase akan menghidrolisis ikatan  $\alpha$ -1,4-glikosidik dari pati dan maltodekstrin secara acak dari bagian dalam molekul polisakarida menghasilkan maltosa dan beberapa oligosakarida rantai pendek seperti glukosa.

Glukosa yang dihasilkan dengan pereaksi DNS sebanyak 1 mL dan dipanaskan dalam air mendidih selama 5-15 menit untuk menyempurnakan reaksi yang terjadi, untuk menstabilkan warna yang terbentuk, garam rochelle atau KNa-Tartrat 40 % ditambahkan kedalam campuran enzim dan DNS sebanyak 1 mL sesegera mungkin sebelum campuran dingin. Setelah itu ditambahkan aquades sampai volumenya menjadi 10 mL dan dihomogenkan. Diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm untuk menentukan kadar glukosa yang terbentuk. Kadar glukosa yang diperoleh inilah yang menunjukkan aktivitas ekstrak kasar amilase dalam menghasilkan glukosa.

Besar kecilnya aktivitas enzim amilase ini akan mempengaruhi kadar gula pereduksi (glukosa) yang dihasilkan. Komponen pereaksi DNS adalah asam dinitrosalisilat, garam *rochelle* (KNa-Tartrat), fenol, sodium bisulfit, dan natrium hidroksida. Menurut Miller (1959), komponen-komponen tersebut memiliki fungsi, yaitu asam 3,5-dinitrosalisilat untuk mereduksi glukosa dalam keadaan basa yang dibantu oleh natrium hidroksida, garam *rochelle* untuk menghilangkan pengaruh senyawa yang mengganggu sehingga kompleks warna tetap stabil, fenol berfungsi untuk stabilisasi warna yang terbentuk, dan sodium bisulfit untuk menghilangkan pengaruh oksigen terlarut yang dapat mengoksidasi glukosa produk. Reaksi antara reagen DNS dengan glukosa dapat dilihat pada Gambar 4.10. Hasil pengukuran aktivitas ekstrak kasar amilase menunjukkan bahwa ekstrak kasar amilase pada media produksi dedak mempunyai rata-rata aktivitas sebesar  $6.2950 \times 10^{-3}$  U/mL kemudian media produksi bekatul sebesar  $6,6246 \times 10^{-3}$  U/mL dan media produksi onggok sebesar  $4.1136 \times 10^{-3}$  U/mL (Tabel 4.8).



Gambar 4.10 Reaksi glukosa dengan pereaksi asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS)  
(Kismiati dan Ni Nayam, 2010)

#### 4.7 Kedudukan Bekatul dalam Perspektif Islam

Allah SWT menciptakan segala sesuatu didunia ini semata-mata demi kepentingan, kebutuhan dan kesenangan seluruh makhluk hidup, sehingga tercipta sebuah ekosistem yang saling membutuhkan satu dengan yang lainnya Allah SWT berfirman dalam surat ‘Abas ayat 24-32 :

فَلْيَنْظُرِ الْإِنْسَانُ إِلَىٰ طَعَامِهِ ۗ ﴿٢٤﴾ أَنَا صَبَبْنَا الْمَاءَ صَبًّا ﴿٢٥﴾ ثُمَّ شَقَقْنَا الْأَرْضَ شَقًّا ﴿٢٦﴾ فَأَنْبَتْنَا فِيهَا حَبًّا ﴿٢٧﴾ وَعَيْنَبًا وَقَضْبًّا ﴿٢٨﴾ وَزَيْتُونًا وَخَلًّا ﴿٢٩﴾ وَحَدَائِقَ غُلْبًا ﴿٣٠﴾ وَفَيْكَةً وَأَبًّا ﴿٣١﴾ مَتَاعًا لَّكُمْ وَلِأَنْعَمِكُمْ ﴿٣٢﴾

Artinya : “Maka hendaklah manusia itu memperhatikan makanannya. Sesungguhnya kami benar-benar telah mencurahkan air (dari langit). Kemudian kami belah bumi dengan sebaik-baiknya. Lalu kami tumbuhkan biji-bijian di bumi itu. Anggur dan sayur-sayuran. Zaitun dan kurma. Kebun-kebun (yang) lebat. Dan buah-buahan serta rumput-rumputan. Untuk kesenanganmu dan untuk binatang-binatang ternakmu (‘Abasa : 24 – 32)

Maksud dari kalimat *فَلْيَنْظُرِ الْإِنْسَانُ إِلَىٰ طَعَامِهِ* secara khusus memerintahkan manusia untuk memperhatikan makanannya bagaimana ia tumbuh, berbuah dan bagaimana makanan itu sampai padanya setelah melalui banyak tahapan karena

kemudahan dari Allah SWT dan makanan yang dimaksud dari ayat ini adalah semua jenis makanan, mulai dari yang berbiji, sayur-sayuran, buah-buahan (Wahab. 1997).

Hikmah dari penelitian ini menjelaskan bahwa setiap makhluk hidup saling bergantung satu sama lain seperti bakteri amilolitik yang dapat tumbuh subur pada bekatul yang semata-mata demi kebutuhan manusia dalam pemanfaatan enzim amilase dalam produksi glukosa, dimana bekatul ini berasal dari padi yang didalamnya mengandung beras yang dapat dimanfaatkan oleh manusia dan sisanya berupa dedak, bekatul yang dimanfaatkan oleh bakteri.

Perintah **فَلْيَنْظُرِ الْإِنْسَانُ إِلَى طَعَامِهِ** bisa bermakna hendaklah manusia melihat, mengatur, menggali dan lain sebagainya apa-apa yang mereka makan baik berupa sayuran, buah-buahan, dan biji-bijian agar manusia senantiasa bersyukur kepada Allah SWT atas segala kemudahan yang telah diberikan kepadanya, sehingga pada penelitian ini **فَلْيَنْظُرِ** diartikan sebagai melihat dan menggali potensi dari biji-bijian yang berkulit dimana pada penelitian ini berupa bekatul agar kelebihan-kelebihan yang terkandung di dalamnya dapat di gali untuk manfaat yang lebih besar.

## **BAB V**

### **PENUTUP**

#### **5.1 Kesimpulan**

1. Hasil isolasi bakteri amilolitik yang terbaik dari bekatul diperoleh isolat BK1 yang merupakan genus *Bacillus*.
2. Produksi enzim menggunakan media dedak, bekatul dan onggok digunakan isolat BK1 karena memiliki zona bening tertinggi dan didapatkan aktivitas enzim bekatul lebih besar daripada dedak dimana aktivitas yang dihasilkan tidak jauh berbeda antara bekatul dan dedak yaitu sebesar  $6.6264 \times 10^{-3}$  dan  $6.2950 \times 10^{-3}$  dan onggok sebesar  $4.1136 \times 10^{-3}$ , hal ini dimungkinkan karena dedak dan bekatul berasal dari gabah dengan kadar amilosa sebesar 32,8% dan pada onggok kadar amilosanya sebesar 8%.

#### **5.2 Saran**

Berdasarkan hasil penelitian, perlu adanya penelitian lanjutan untuk mengetahui spesies isolat yang didapat, dan perlu adanya pemurnian enzim sehingga didapatkan aktivitas enzim amilase terbaik dengan hasil yang maksimal.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abdurrahman al-Tsa'alabi. 1996. *Al-Jawahir al-Hisan fi Tafsir al-Qur'an*. Dar al-Kutub al-'Ilmiyyah: Beirut, Lebanon, Jilid 1, hlm. 58
- Anonymous. 2011<sup>a</sup>. *Situs Dunia Tumbuhan*. <http://www.plantamor.com>. Diakses Diakses tanggal 3 Oktober 2013.
- Anonymous. 2012<sup>b</sup>. <http://bisakimia.com>. Diakses tanggal 10 Oktober 2013.
- Anonymous. 2008<sup>c</sup>. *Staining Bacteria*. [www.umsl.edu/~microbes](http://www.umsl.edu/~microbes). Diakses pada tanggal 13 April 2014.
- Anonymous. 2009<sup>d</sup>. *Amyloidin*. <http://www.iodum.com>. Diakses tanggal 16 Juni 2014
- Aiyer, P.V.D., 2004, *Effect of C:N Ratio on Alpha Amylase Production by Bacillus licheniformis SPT 27*, African J. of Biotechnology, Vol 3 (10) : 519-522.
- Al-Imam Abul Fida Isma'il Ibnu Katsir Ad-Dimasyqi. 2004. *Tafsir Quranil 'Azhim Juz 27*. Sinar Baru Algensindo. Bandung.
- Anindyawati, T., Sukara, E., Sumiasri, N., dan Melliawati, R. 2009. *Produksi dan Tekno Ekonomi Amilase Untuk Menunjang Industri Dalam Negeri* : DIKTI 2009. <http://www.biotek.lipi.go.id> Di akses pada tanggal 30 Mei 2013.
- Apriyantono, A., Fardiaz, D., Puspitasari, N.L, Sedarnawati, dan Budiyanto, S. 1983. *Petunjuk Laboratorium Analisis Pangan*. Bogor: IPB Press
- Apun, K., Jong, B. C. dan Salleh, M. A. 2000. Screening and Isolation of a Cellulolytic and Amylolytic Bacillus From Sagu Pith Waste. *General Application Microbial* 46: 263-267.
- Ardiansyah. 2013. *Mengenal Bekatul Lebih Jauh*. <http://itp.bakrie.ac.id> diakses tanggal 4 juni 2013. 1997. *Proses Ekstrusi Untuk Pengolahan Hasil Samping Penggilingan Padi (Menir dan Bekatul)*. Prosiding Seminar Tek. Pangan. IPB tidak diterbitkan.
- Ardiansyah. 2010. *Bekatul Sumber Prebiotik (Laboratory of Nutrition, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University-Sendai, Jepang dan*

- Departemen Gizi Masyarakat, FEMA-IPB). [www.bekatul.net](http://www.bekatul.net) . Diakses 15 Juli 2013.
- Asnani, A., Lestari, P. *Aktivitas Amilase, Lipase dan Protease dari Cacing Peryonix excavatus*. Molekul, Vol 4 No. 2 : 115-121.
- Astawan, M. 2009. *Bekatul, Gizinya Kaya Betul*. <http://bola.kompas.com>. Diakses tanggal 30 Mei 2013.
- Ballschmiter, M., Futterer, O., dan Liebl, W. 2006, *Identification and Characterization of a Novel Intracellular Alkaline  $\alpha$ -Amylase from The Hyperthermophilic Bacterium Thermotoga maritima MSB8*, Appl. and Env. Microbiol, Vol 72 (3) : 2206-2211.
- Bernfeld P. 1995. Amylases  $\alpha$ - and  $\beta$ -. Didalam : Colowick SP, Kaplan NO (Eds). *Methods In Enzymology*. New York : Academic Pr. Pp : 149-150.
- Brock., Michael TM., Jhon MM., and Jack P. 1986. *Biology of Microorganism*. Science Hill Inc. New Jersey.
- Budiyanto, M.A.K. 2002. *Mikrobiologi Terapan*. UMM Press, Malang.
- Carvalho RV., Correat and da silva J. 2008. *Properties of an Amylase From Thermophilic Bacillus Sp*. Brazil. J. Microbiol. 39 : 102-107.
- Cappuccino JG dan Sherman N. 1983. *Microbiology A Laboratory Manual*. New York: State University of New York.
- Chalil, D. 2003. *Agribisnis Ubi Kayu di Propinsi Sumatera Utara*. Jurusan Sosial Ekonomi Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Sumatera Utara. Medan.
- Crueger W and Anneliese C. 1984. *Biotechnology : A Text Book of Industrial Microbiology*. Editor of the English Edition by Thomas D. Brock. Science Tech Inc. Madison. New York.
- Crueger, W. and Crueger, A. 1982. *Biotechnology: A Textbook of Industri Microbiology*. Brock TD, editor. Sunderland: Minauer Associates.
- Darwis, A.A dan E. Sukarna. 1990. *Pengantar Praktikum Isolasi, Karakterisasi dan Purifikasi Enzim*. IPB. Bogor 119.

- Dewi, C., Purwoko, T., dan Pangastuti, A. 2005. *Produksi Gula Reduksi oleh Rhizopus Oryzae dari Substrat Bekatul*. Bioteknologi 2. Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta. Vol 1 : 21-26.
- Dirnawan H.A., Suwanto dan Purwadaria T. 2000. *Eksplorasi Bakteri Termofilik Penghasil Enzim Hidrolitik-Ekstraseluler dan Sumber Air Panas Gunung Pancar*. Hayati 7 : 52-55.
- Dwidjoseputro. 2005. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*, Malang: Djambatan.
- Dybkaer, R. 2001. Unit "Katal" for Catalytic Activity. *J Pure Appl Chem* 73: 927-931.
- Fardiaz, S. 1992. *Mikrobiologi Pangan I*. Jakarta: Gramedia.
- Fessenden, R.J dan J.S Fessenden. 1984. *Kimia Organik*. 2<sup>nd</sup> ed. Erlangga. Jakarta.
- Fogarty WM. 1983. *Microbial Enzymes and Biotechnology*. Applied Science. London.
- Fossi, B.T., Tavea, F., dan Ndjouenkeu, R. 1995. *Production and Partial Characterization of a Thermostable Amylase from Ascomycetes Yeast Strain Isolated from Starchy Soils*. *African J. of Biotechnology* Vol. 4 (1):14-18.
- Ginting, J. 2009. *Isolasi Bakteri dan Uji Aktivitas Enzim Amilase Kasar Termofilik dari Air Panas Semangat Gunung Kabupaten Karo, Sumatera Utara*. USU. Tesis. Tidak terbit
- Hadioetomo, R. S. 1999. *Mikrobiologi Dasar Dalam Praktik*. Jakarta : PT Gramedia.
- Handayani D., Mubarik NR., dan Listiyawati S. 2002. *Isolasi dan Karakterisasi Amilase Ekstra Seluler dari Kapang Asal Limbah Cair Tapioka*.
- Harsono, Yudi. 2001. Pemurnian enzim  $\alpha$ -amilase dengan menggunakan filtrasi gel. *Skripsi*. Bogor: FMIPA Institut Pertanian Bogor
- Hidayat, M. A. 2006. *Fermentasi Asam Laktat oleh Rhizopus oryzae Pada Substrat Singkong Hasil Hidrolisis Asam*. Skripsi, IPB tidak terbit.
- Holtzapple M.T. 1994. *Cellulose*. In: *Encyclopedia of Food Science., Food Technology and Nutrition*, 2: 2731-2738. Academic Press. London

- Indriyanto I. 1995. *Pengaruh Suhu dan Waktu Inkubasi Terhadap Produksi Enzim  $\alpha$ -amilase oleh Bacillus subtilis dalam Media Bekatul*. Skripsi tidak terbit. Universitas Diponegoro Semarang.
- Jenni R. 2003. *Program Enzim Selulase-Hemiselulase pada Proses Drinking Kertas Koran Bekas*. Jurnal Matematika dan Sain. 8 : 67-71.
- Jepro. 2011. *Hidrolisis Enzimatis Tepung Tapioka Menjadi Maltodekstrin dengan Sistem Pemanasan Microwave*. Skripsi tidak terbit. Universitas Diponegoro Semarang.
- Junnatun. 2009. *Pengaruh Penambahan Nitrogen dan Waktu Fermentasi Terhadap Proses Pembuatan Etanol dari Onggok Singkong (Manihot esculenta crantz)*. Skripsi tidak terbit. Universitas Islam Negeri Sunan Kalijaga Yogyakarta.
- Kresnamurti, T.K. 2001. *Substitusi Bekatul pada Medium Onggok Sebagai Sumber Nitrogen Untuk Produksi Enzim Amilase oleh Aspergillus niger*. Skripsi tidak terbit. Universitas Diponegoro Semarang.
- Kombong, H . 2004. *Evaluasi Daya Hidrolitik Enzim Glukoamilase dari Filtrat Kultur Aspergillus niger*. Jurnal Ilmu Dasar. 5: 16–20.
- Lay, B. W. 1994. *Analisis mikroba di laboratorium*. Jakarta: PT.gradindo persada.
- Lehninger, A. L. 1993. *Biochemistry*. New York: Worth Publisher Inc
- Long-Liu Lin; Charng-Cherng Chyau; and Wen-Hwei, Hsu. *Biotechnol. Appl. Biochem*, 1998, 28, 61-68.
- Maranatha, B. 2007. *Aktivitas Enzim Selulase Isolat Asal Indonesia pada Berbagai Substrat Limbah Pertanian*. Skripsi tidak terbit. Bogor: Institute Pertanian Bogor.
- Melliawati R., Rohmatussolihat dan Octavina F. 2006. *Seleksi Mikroorganisme Potensial Untuk Fermentasi Sagu*. Biodiversitas 7 nomor 2 : 101 – 104.
- Miller GL, 1959. *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar*. Anal. Chem., 31: 426–428.

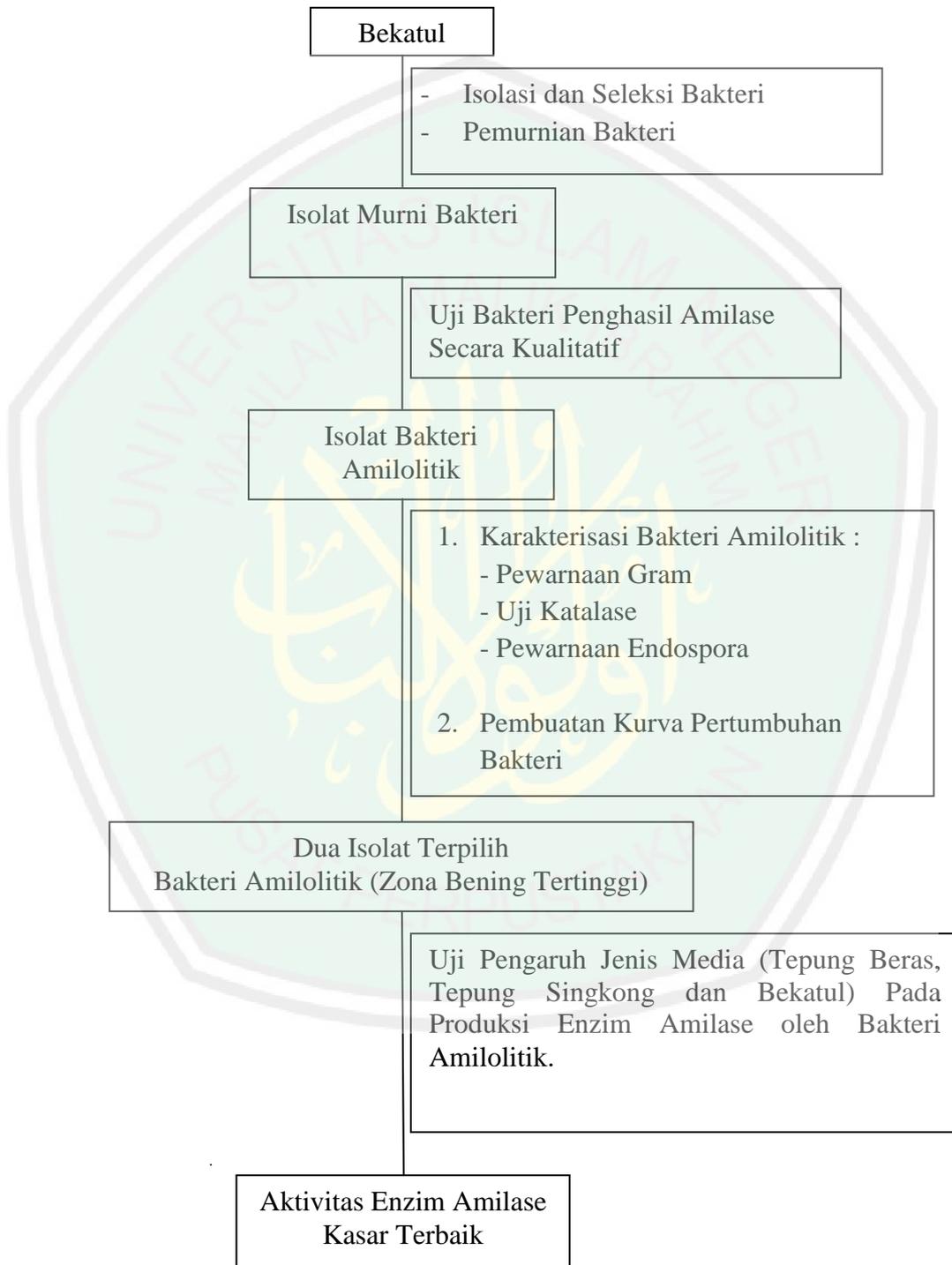
- Muawanah, Anna. 2006. *Produksi Enzim Xilanase Termotabil dari Thermomyces lanuginosus IFO 150 pada Substrat Bagasse Tebu*. Skripsi. Bogor: Program Studi Ilmu Pangan Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Muchtadi S., Nurleni., dan Made. 1992. *Enzim dalam Industri Pangan*. Institut Pertanian Bogor. Bandung.
- Muhammad Ali al-Shabuni. 1999. *Shafwah al-Tafasir: Tafsir li al-Qur'an al-Karim*. Dar al-Kutub al-Islamiyyah: Jakarta.
- Naiola, E. 2008. *Isolasi dan Seleksi Mikroba Amilolitik Dari Makanan Fermentasi Ragi Tapai Gambut Di Kalimantan Selatan*. Berk. Penel. Hayati 13 : 109 – 114.
- Nur, A. M. A. 2012. Bakteri Gram Positif dan Negatif. . [Error! Hyperlink reference not valid.](#) . Diakses tanggal 13 April 2014.
- Nurchahyo H. 2011. *Diktat Bioteknologi*. UNY. Tidak terbit.
- Ophardt. 2003. *Cellulose*. New York USA: John Willey&Sons, Inc.
- Pelczar, M. J. and Chan, E. C. S. 2008. *Elements of Microbiology*. New York: Mc Graw Hill Book Company.
- Poedjiadi A. 2006. *Dasar-dasar Biokimia*. UI Press.
- Poernomo AT., dan Joko DA. 2003. *Uji Aktivitas Crude Enzim Proteolitic Bacillus subtilis FNCC 0059 Hasil Fermentasi Curah*. Majalah Farmasi Erlangga. 3 : 103-107.
- Pratiwi, Sylvia T. 2009. *Mikrobiologi Farmasi*. Erlangga. Jakarta.
- Prescott, S. C. dan C. G. Dunns. 1999. *Industrial Microbiology*. Wesport. Conecticut: The AVI Publishing Co. Inc
- Putra R.M., Gozan M., dan Setyahadi S. 2013. *Produksi Enzim  $\alpha$ -amilase Secara Kontinyu menggunakan Metode Cell Recycling*. UI. Skripsi.
- Putri WDR., Haryadi., Marseno DW dan Cahyanto MN. 2012. *Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Amilolitik Selama Fermentasi Growol, Makanan Tradisional Indonesia*. Jurnal Teknologi Pertanian 13 : 52-60.

- Quthb, S. 2002. *Tafsir Fi Zhilalil Qur'an, Di Bawah Naungan Al-Qur'an (Surah Al-An'aam – Surah Al-A'Raaf 137)* Jilid 4. Jakarta: Gema Insani Press.
- Raharjo, S., Ardiansyah dan Chahyadi, A. 2008. *Isolasi dan Karakterisasi  $\alpha$ -amilase Isolat Bakteri Amilolitik Asidofilik dari Taman Nasional Rawa Aopa Watumaohai*. Indonesia Chimica Acta Vol 1 (1) : 15-23.
- Reddy, N.S., Nimmagadda, A., dan Rao, K.R.S.S. 2003, *An Overview of The Microbial  $\alpha$ -Amylase Family*, African J. of Biotechnology. Vol 2 (12) : 645-648.
- Richana M., Yusuf MG., Lestari P., dan Damardjati SD. 1999. *Prilaku Kultivasi Isolat Bakteri Termofilik Penghasil  $\alpha$ -amilase*. Jurnal Mikrobiol Indonesia. 4 : 35-39.
- Risma, D. 2012. *Isolasi dan Karakterisasi Enzim  $\alpha$ -Glukosidase dari Beras Lapuk (Oryza sativa)*. Skripsi tidak terbit. UI Depok.
- Rosmimik., Richana N., Lestari P dan Said J. 2011. *Studi Penambahan Ion Kalsium Terhadap Aktivitas dan Stabilitas  $\alpha$ -amilase Bacillus Stearothermophilus T II-12*. Mikrobiol Indonesia. 6 : 12-14.
- Ruly. 2008. Uji katalase. <http://www.dunia-mikro.blogspot.com>. Diakses tanggal 7 Agustus 2013.
- Salisbury, F.B., dan C.W. Ross, 1995, *Fisiologi Tumbuhan Jilid 2*, ITB Press, Bandung.
- Santos EO, and Martins ML. 2003. *Effect Product of the Medium Composition on Formation of Amylase by Bacillus sp.* Brazilian Arch Biol Technol. 46 : 129 – 134.
- Sayyid Sabiq. 1992. *Al-'Aqa'id al-Islamiyyah*. Dar al-Fikr: Beirut, Lebanon.
- Sebayang, F. 2005. *Isolasi dan Pengujian Aktivitas Enzim  $\alpha$ -amilase dari Aspergillus niger dengan Menggunakan Media Campuran Onggok dan Dedak*. Jurnal Komunikasi Penelitian Volume 17 (5).
- Setiasih, Siswati., dkk. 2006. *Karakterisasi Enzim  $\alpha$ -Amilase Ekstrasel dari Isolat Bakteri Termofil SW2*. Jurnal Kimia Indonesia Vol. 1 (1), h. 22-27.

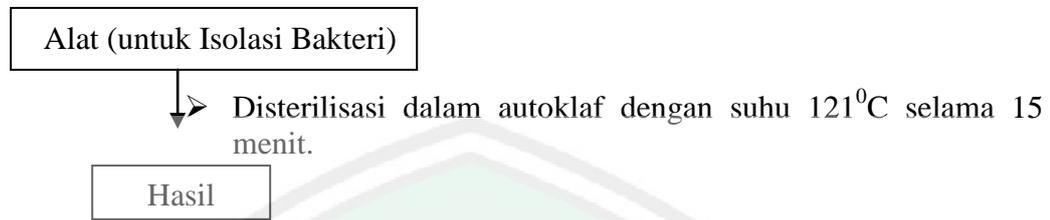
- Shahib MN. 1992. *Pemahaman Seluk Beluk Biokimia dan Penerapan Enzim*. Citra Aditya Bakti.
- Shaw, J.F., Lin, F.P., Chen, S.C., dan Chen, H.C. 1995, *Purification and Properties of an extracellular  $\alpha$ - amylase from Thermus sp.*, Bot. Bull. Acad. Sin, Vol. 36: 195–200.
- Smith JE. 1995. *Bioteknologi*. Edisi 2. Terjemahan Andry Hartono. EGC. Jakarta.
- Somogyi, M. 1952. *Determination of Reducing Sugars* .J. Biol. Chem., 200, 245.
- Strohl, William. A, Rouse, H and Fisher, B.D. 2001. *Lippincott's Illustrated Reviews: Microbiology*. USA: Lippincott william & wilkins.
- Sudiana, I. M., Kanti, A., Rahmansyah, M., Widawati, S., Suliasih, Rahayu R. W., dan Imanuddin, H. 2002. *Populasi dan karakterisasi bakteri selulolitik yang diisolasi berbagai ketinggian lokasi di taman nasional gunung Halimun. Laporan teknik proyek inventarisasi dan karakterisasi sumberdaya hayati*. Indonesia: Puslit biologi-LIPI.
- Sundari, B. R. 1995. Pengaruh penambahan bekatul dengan berbagai konsentrasi dalam media kultur terhadap pertumbuhan populasi (chlorella sp). *Undergraduate thesis*, FMIPA Undip.
- Supriyati, D. Zaenudin, I. P Kompang, Soekamto dan D. Abdurachman. 2005. *Onggok untuk bahan baku pakan*. Majalah Poultry Indonesia. November 2002. 271: 60-61.
- Supriyati. 2003. *Onggok Terfermentasi dan Pemanfaatannya dalam Ransum Ayam Ras Pedaging*. JITV 8(3): 146-150.
- Talaro, K. P. 2005. *Microbiology*. New York: McGraw-Hill.
- Tigue M.A.Mc, Kelly C.T, Doyle E.M, and Fogarty W.M. 1995. *The alkaline amylase of the alkalophilic Bacillus sp. IMD 370. Enzyme Microbial Technol* 17: 570-573.
- Tjokroadikoesoemo, S. P. 1993. *HFS dan Industri Ubi Kayu Lainnya*. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.

- Tortora, G., Fince, B. R. and Case, C. L. 2001. *Introduction Microbiologi* edisi 7. San Fransisco Spanyol: Addison Weasly angman.
- Tresnawati T., dkk. 2004. *Isolasi Bakteri Amilolitik Toleran pH 9 Dari Tanah Di Taman Wisata Alam Situ Gunung Sukabumi*. PKMI tidak terbit. IPB Bogor.
- Volk, W. A dan Wheeler, M. F. 1988. *Mikrobiologi Dasar*. Terjemahan Markham. Jakarta: Erlangga.
- Wahbah Az Zuhaili. 1997. *Tafsir Al Munir Fil Aqidah Was Syari'ah Wal Manhaj*. Damaskus. Dar Al Fikr.
- Waluyo, L. 2005. *Mikrobiologi Umum*. Malang: UMM Press.
- Whittaker JR. 1994. *Principles of Enzymology for the Food Sciences*. New York: Marcel Dekker Inc.
- Widowati, S. 2001. Pemanfaatan Hasil Samping Penggilingan Padi dalam Menunjang Sistem Agroindustri di Pedesaan. *Jurnal Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan*. Bogor: Buletin AgroBio. Vol 4(1): 33-38.
- Winarno FG. 1983. *Enzim Pangan*. Gramedia. Jakarta.
- Yuliar. 2008. *Skrining Bioantagonistik Bakteri untuk Agen Biokontrol Rhizoctonia dan Kemampuannya dalam Menghasilkan Surfaktin*. Biodiversitas Vol. 9 : 83-86.

**Lampiran 1. Metode Kerja**

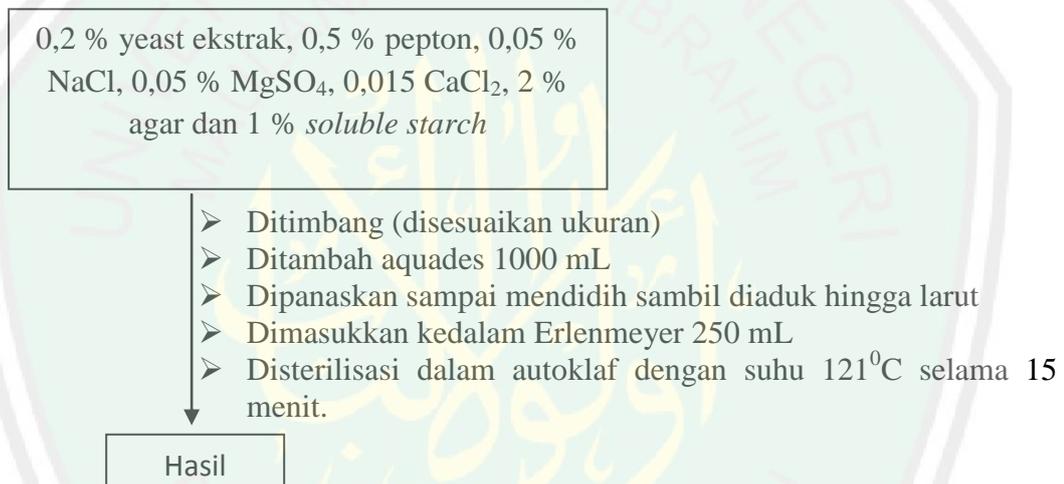


### 3.5.1 Tahap Preparasi Alat dan Bahan

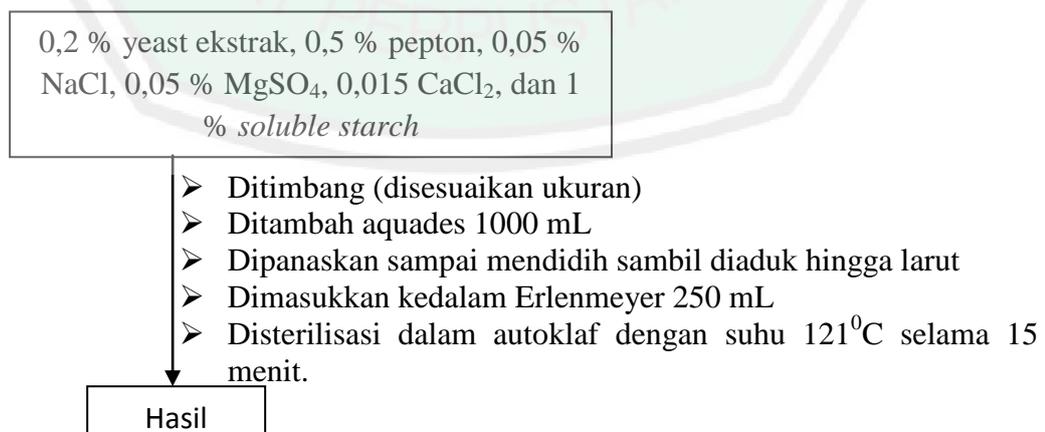


### 3.5.2. Pembuatan Media

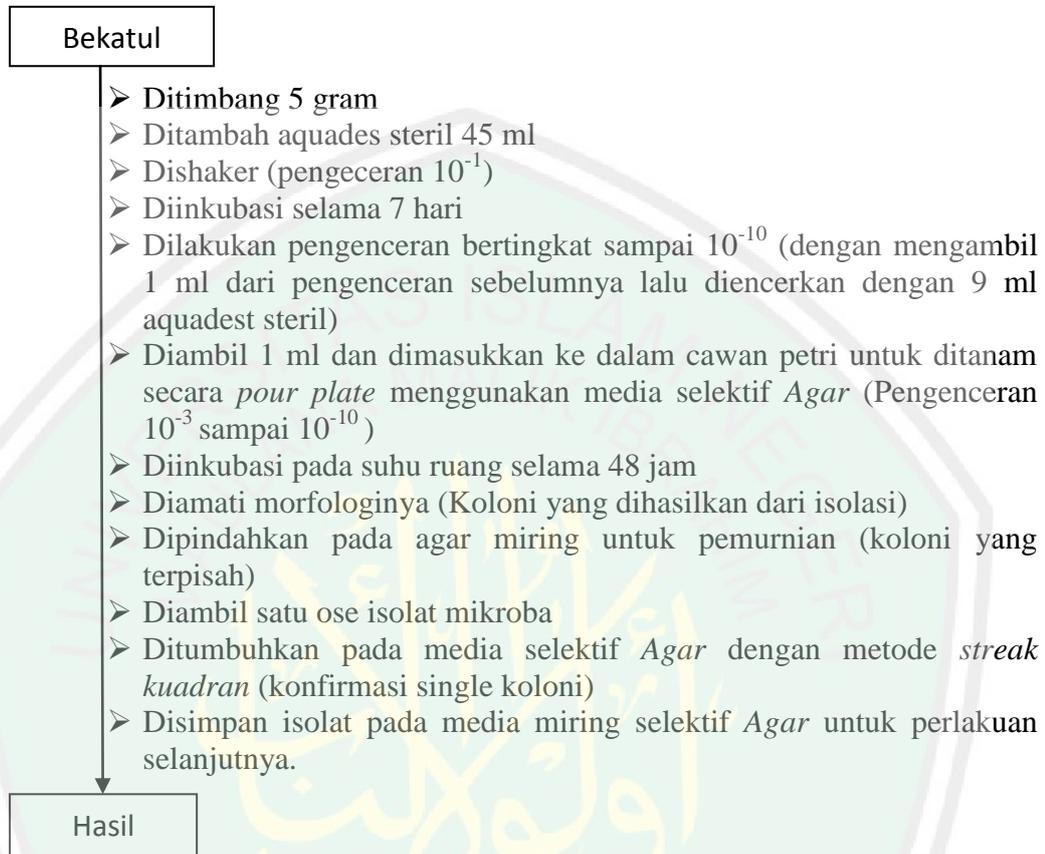
#### 3.5.2.1 Media Selektif Agar



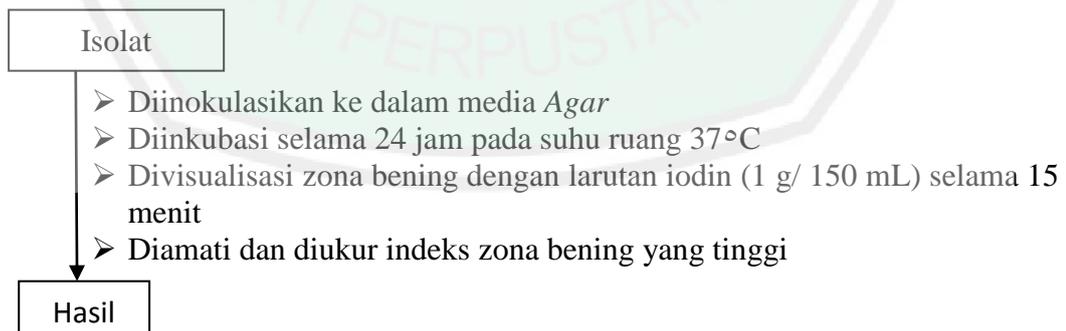
#### 3.5.2.2 Media Selektif Tanpa Agar



### 3.5.3 Isolasi Bakteri



### 3.5.4 Uji Zona Bening



### 3.5.5 Identifikasi Bakteri (Mikroskopis dan Makroskopis)

#### 3.5.5.1 Pewarnaan Gram (Hadioetomo, 1999).

Isolat (24 jam)

- Diambil sedikit dengan jarum ose secara aseptis
- Disuspensikan dengan dengan aquades yang ada di atas gelas objek.
- Difiksasi preparat diatas api bunsen sampai kering.
- Ditetesi dengan larutan kristal violet, didiamkan selama 60 detik, dicuci dengan air mengalir, dikeringkan.
- Ditetesi dengan larutan iodin, didiamkan selama 60 detik, dicuci dengan air mengalir, dikeringkan.
- Ditetesi dengan larutan alkohol 96 %, didiamkan selama 30 detik, dicuci dengan air mengalir, dikeringkan.
- Ditetesi dengan larutan safranin, didiamkan selama 30 detik, dicuci dengan air mengalir, dikeringkan.
- Ditetesi dengan minyak imersi, diamati dengan mikroskop (uji gram positif jika berwarna ungu dan negatif jika berwarna merah)

Hasil

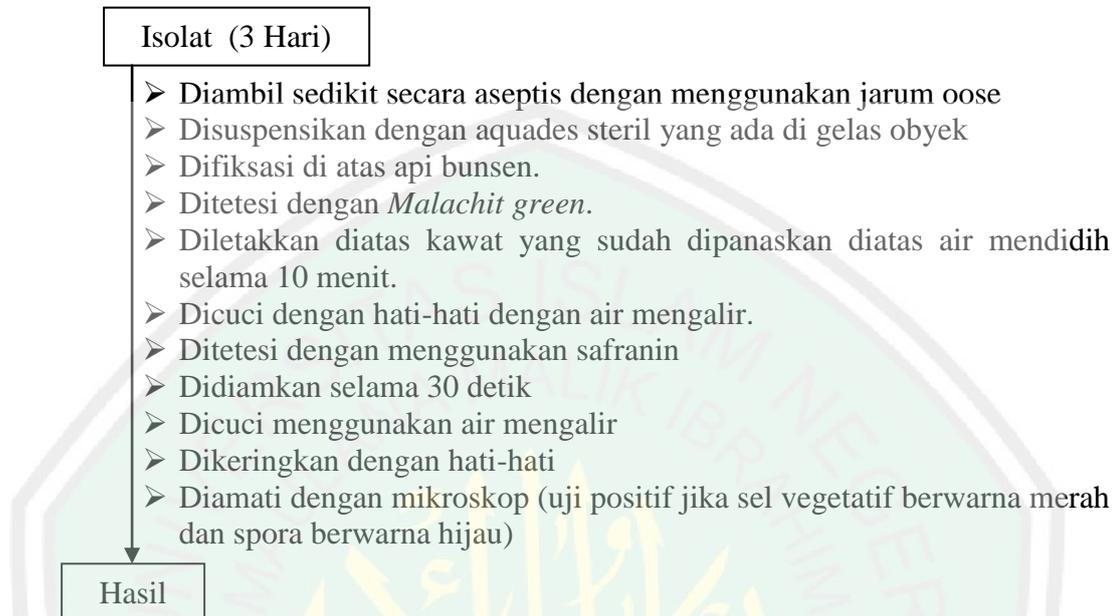
#### 3.5.4.2 Uji Katalase (Lay, 1994).

Isolat (24 jam)

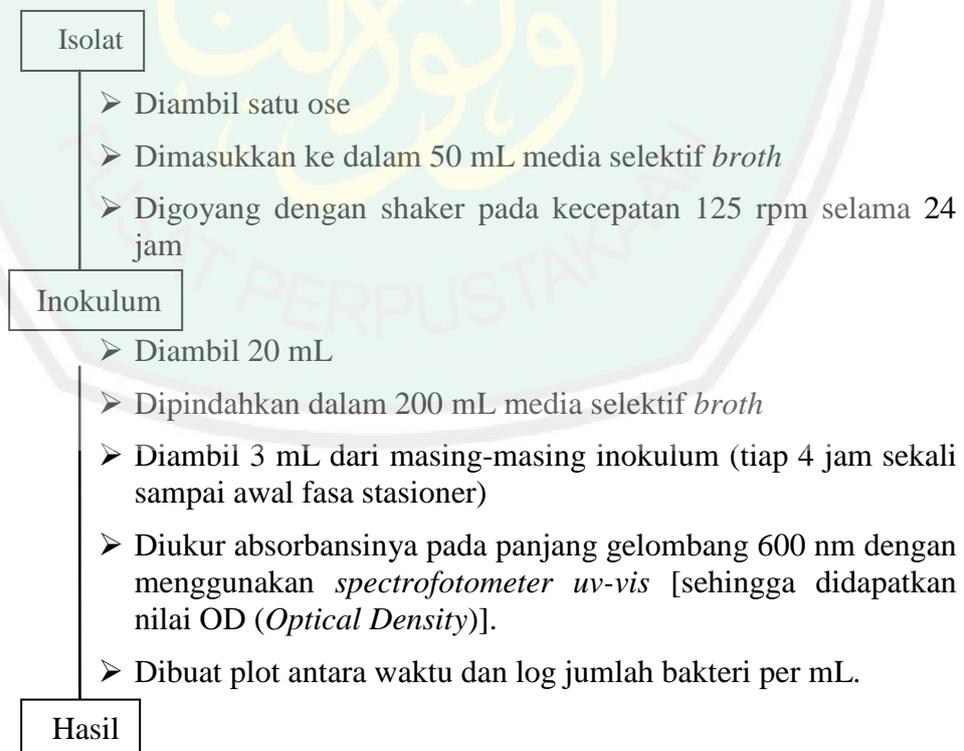
- Diambil sedikit secara aseptis dengan menggunakan jarum ose
- Disuspensikan dengan aquades steril yang ada di gelas obyek (yang sebelumnya disemprot gelas obyek dengan etanol 70% sampai tidak terbentuk lapisan minyak)
- Ditetesi dengan larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3 %
- Diamati pembentukan gelembung udara (positif) yang terjadi pada koloni dan sekitarnya. Terbentuknya gelembung gas menandai bahwa bakteri tersebut bersifat aerobik (uji katalase tersebut positif)

Hasil

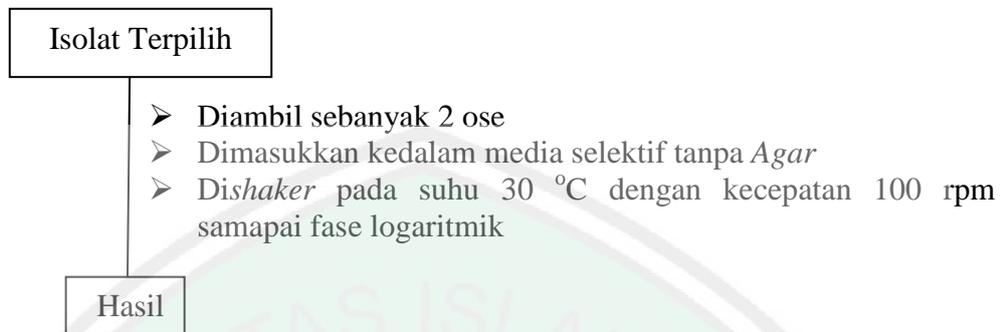
### 3.5.4.3 Pewarnaan Endospora (Lay, 1994).



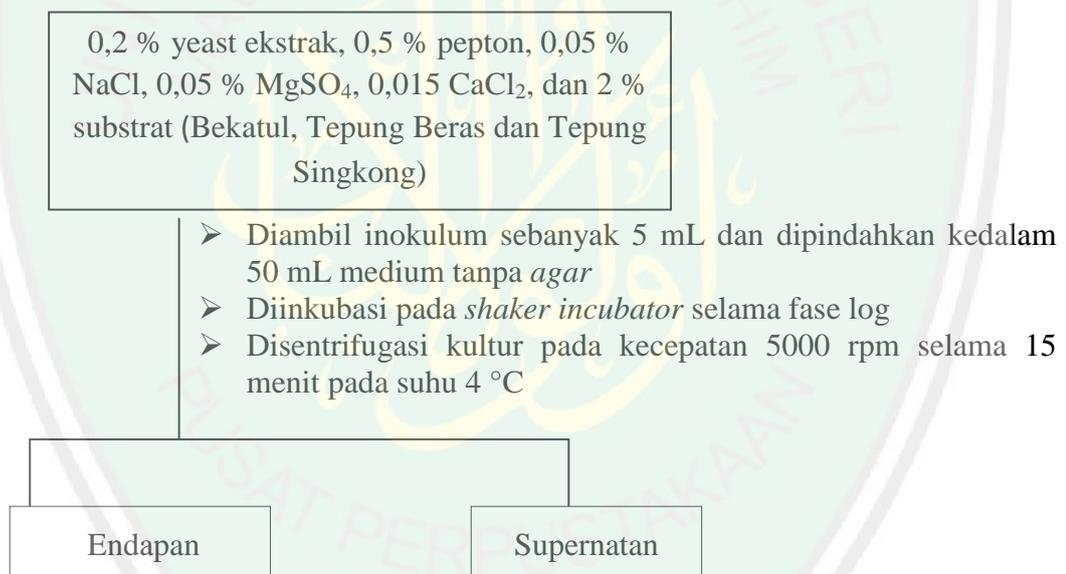
### 3.5.6 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri



### 3.5.7 Pembuatan Inokulum

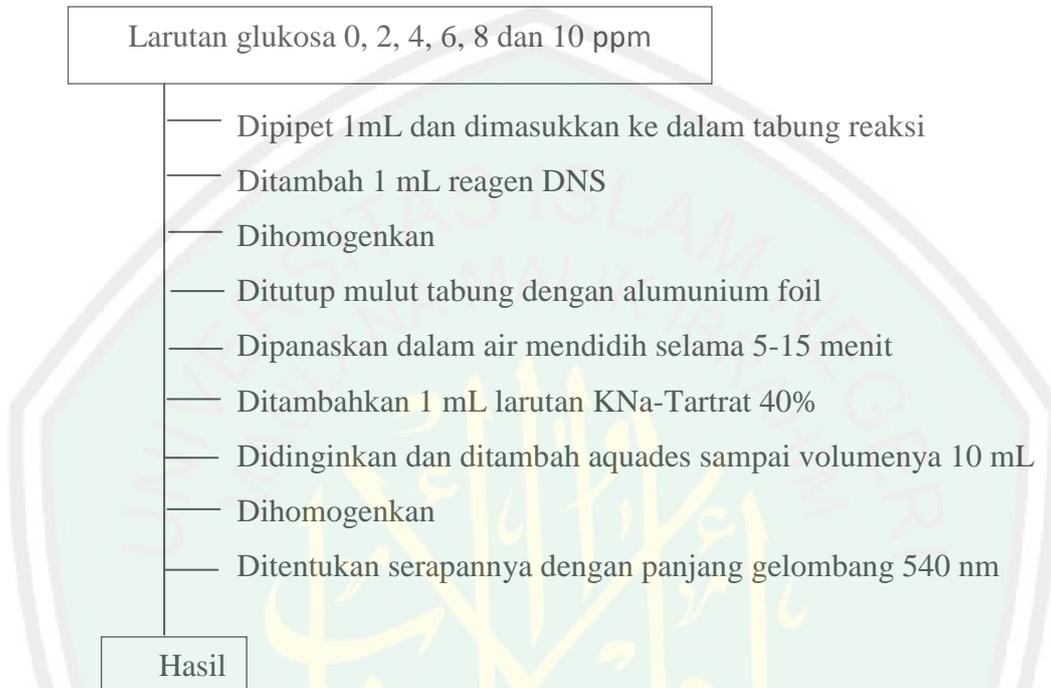


### 3.5.8 Produksi Enzim Amilase Kasar pada Berbagai Jenis Media

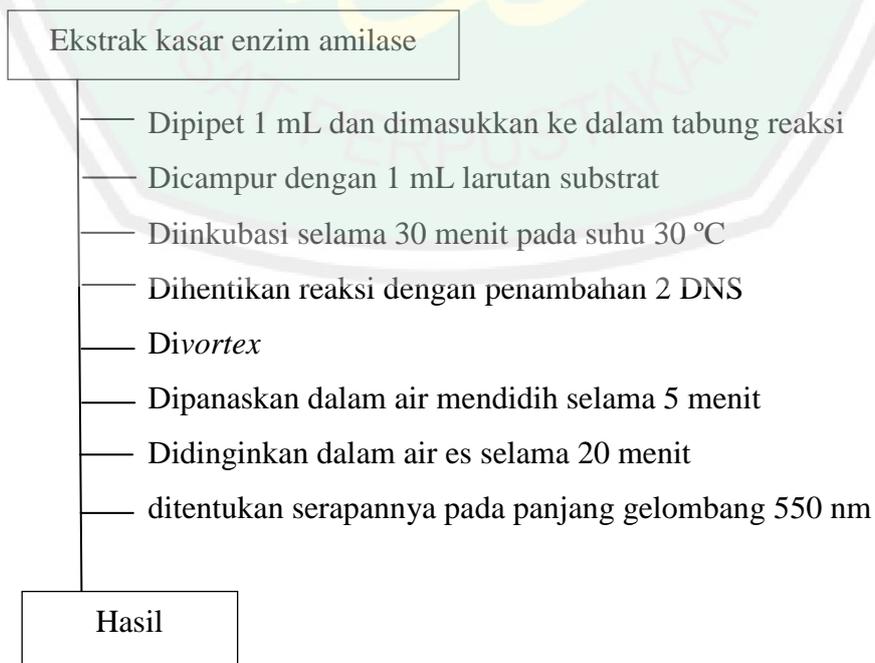


### 3.5.9 Analisis Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Amilase dengan Metode DNS (Miller, 1959).

#### 3.5.9.1 Pembuatan Kurva Standar Glukosa



#### 3.5.10 Analisa Glukosa



## Lampiran 2. Pembuatan Reagen

### 1. Pembuatan buffer fosfat dengan pH 7

Dalam pembuatan buffer fosfat dengan pH 7, maka dibutuhkan reagen sebagai berikut:

- a. Natrium fosfat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 0,2 M

Konsentrasi natrium fosfat yang tersedia = 2,163 M

Konsentrasi natrium fosfat yang dibutuhkan = 0,2 M

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

$$2,163 \text{ M} \times V_1 = 0,2 \text{ M} \times 250 \text{ ml}$$

$$V_1 = \frac{0,2 \text{ M} \times 250 \text{ ml}}{2,163 \text{ M}}$$

$$= 2,88 \text{ ml}$$

Jadi untuk membuat natrium fosfat 0,2 M, dibutuhkan 2,88 ml natrium fosfat 2,163 M dalam 250 ml aquades.

- b. Dinatrium fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 0,2 M

Untuk membuat Dinatrium fosfat dengan konsentrasi 0,2 M adalah dengan cara sebagai berikut:

Menimbang 4,1 gr  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  dalam 250 ml aquades

- c. Maka untuk membuat buffer fosfat dengan pH 7 adalah dengan cara:

Natrium fosfat 0,2 M = 39 ml

Dinatrium fosfat 0,2 M = 61 ml

Kedua larutan tersebut ditempatkan pada labu ukur 500 ml, kemudian ditambahkan aquades hingga tanda tera.

### 2. Pembuatan Media selektif *Agar* dalam 1000 mL Aquades

Pembuatan media agar selektif Amilolitik terdiri dari 2 gram yeast ekstrak, 5 gram pepton, 0,5 gram NaCl, 0,5 gram  $\text{MgSO}_4$ , 0,15  $\text{CaCl}_2$ , 20 gram agar dan 10 gram *soluble starch*, Kemudian ditambahkan dengan aquadest sebanyak 1000 mL, dipanaskan sampai mendidih sambil diaduk hingga larut, kemudian media

tersebut dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 mL, kemudian disterilisasi dalam autoklaf dengan suhu 121 °C selama 15 menit.

### 3. Pembuatan Reagen DNS (Miller, 1959)

Ditimbang asam 3-5 dinitrosalisilat sebanyak 1 gram, 0,2 gram fenol, 0,05 gram sodium sulfit, dan 1 gram natrium hidroksida. Kemudian semua bahan dilarutkan dengan akuades dalam labu takar 100 mL dan ditera. Sebanyak 1 mL garam Rochelle 40 % ditambahkan segera setelah terbentuknya kompleks warna antara DNS dan gula pereduksi hasil hidrolisis .

### 4. Pengenceran Isolasi

$$\frac{5 \text{ gr bekatul}}{45 \text{ mL Aquades Steril}} = 0,1 \text{ gr/mL}$$

➤  $10^{-1}$  gr/mL (diinkubasi selama 7 Hari)

$$\frac{10^{-1} \text{ gr/mL}}{9 \text{ mL Aquades Steril}} = 10^{-2} \text{ gr/mL}^{-2}$$

➤  $10^{-2}$  gr/mL<sup>-2</sup>

➤  $10^{-3}$  gr/mL<sup>-3</sup>

➤  $10^{-4}$  gr/mL<sup>-4</sup>

➤  $10^{-5}$  gr/mL<sup>-5</sup>

➤  $10^{-6}$  gr/mL<sup>-6</sup>

➤  $10^{-7}$  gr/mL<sup>-7</sup>

➤  $10^{-8}$  gr/mL<sup>-8</sup>

➤  $10^{-9}$  gr/mL<sup>-9</sup>

➤  $10^{-10}$  gr/mL<sup>-10</sup>

### 5. Pembuatan alkohol 70 %

Konsentrasi alkohol yang tersedia = 96 %

Konsentrasi alkohol yang diinginkan = 70 %

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$96\% \times V1 = 70\% \times 250 \text{ ml}$$

$$V1 = \frac{70\% \times 250 \text{ ml}}{96\%}$$

$$V_1 = 182,29 \text{ ml}$$

Untuk membuat alkohol 70 %, maka dibutuhkan 182,29 ml alkohol 96 % dalam 250 ml aquades.

#### 6. Pembuatan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3 %

$$\frac{3 \text{ mL H}_2\text{O}_2}{100 \text{ mL Aquades}}$$

$$\frac{3 \text{ mg H}_2\text{O}_2}{100 \text{ mL Aquades}}$$

#### 7. Pembuatan Larutan Iodin

Cara pembuatan larutan iodin adalah :

4 gr KI dan 4 gr I<sub>2</sub> dan dilarutkan dalam 600 mL

#### 7. Pembuatan Larutan Standart Glukosa

Cara membuat larutan stok glukosa standart 100 ppm adalah:

$$100 \text{ ppm} = \frac{1 \text{ mg}}{1000 \text{ mL}} = \frac{10 \text{ mg}}{100 \text{ mL}}$$

untuk membuat larutan standart 100 ppm diperlukan 10 mg glukosa anhidrat, dilarutkan dengan aquades dan ditandabatkan dalam labu takar 100 mL.

Kemudian larutan glukosa dengan konsentrasi 0; 2; 4; 6; 8 dan 10 ppm sebanyak 100 mL dibuat sesuai dengan menggunakan rumus pengenceran sebagaimana berikut :

a. Konsentrasi 2 ppm

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

$$V_1 \times 100 \text{ ppm} = 100 \times 2 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 2 \text{ mL}$$

b. Konsentrasi 4 ppm

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

$$V_1 \times 100 \text{ ppm} = 100 \times 4 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 4 \text{ mL}$$

c. Konsentrasi 6 ppm

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

$$V_1 \times 100 \text{ ppm} = 100 \times 6 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 6 \text{ mL}$$

d. Konsentrasi 8 ppm

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

$$V_1 \times 100 \text{ ppm} = 100 \times 8 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 8 \text{ mL}$$

e. Konsentrasi 10 ppm

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

$$V_1 \times 100 \text{ ppm} = 100 \times 10 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 10 \text{ mL}$$

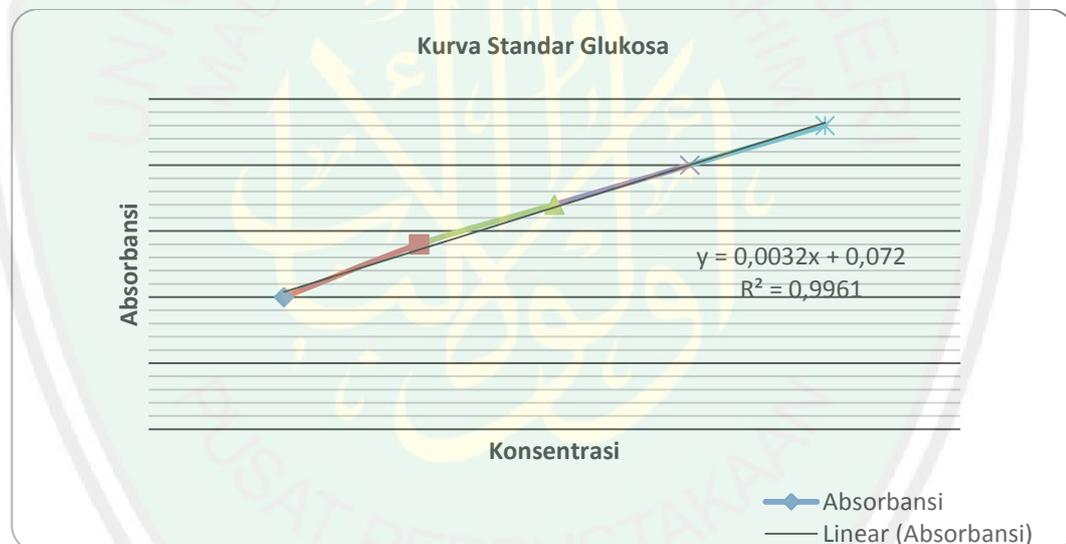
### Lampiran 3. Menentukan Kurva Standar Larutan Glukosa

#### L.4.1 Kurva Standar Larutan Glukosa

Tabel L.4.1 Data Absorbansi Larutan Glukosa Pada  $\lambda$  540 nm

Konsentrasi Glukosa (ppm)	Absorbansi
10	0.1
20	0.14
30	0.17
40	0.2
50	0.23

Gambar L.4.1 Grafik Kurva Standar Glukosa



## Lampiran 4. Pengukuran Absorbansi dan Aktivitas Ekstrak Kasar Amilase

### L.5.1 Nilai Absorbansi Ekstrak Kasar Amilase

Tabel L.5.1 Nilai Absorbansi Ekstrak Kasar Amilase

Jenis Ekstrak	Nilai Absorbansi		
	Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III
Ekstrak Dedak	0.122	0.124	0.123
Ekstrak Bekatul	0.102	0.110	0.104
Ekstrak Onggok	0.130	0.121	0.126

### L.5.2 Menentukan Aktivitas Ekstrak Kasar Amilase

Pengukuran aktivitas ekstrak kasar amilase dapat dilakukan dengan menggunakan persamaan kurva standar glukosa sebagai berikut:

Persamaan kurva standar glukosa

Diketahui:  $y = ax + b$

$$y = 0.003x + 0.072$$

$$x = (y - 0.072) / 0.003$$

misal absorbansi ekstrak kasar dedak 0.122

$$y - 0.072 = 0.003x$$

$$\frac{y - 0.072}{0.003} = x$$

$$\frac{0.122 + 0.072}{0.003} = x$$

$$16.66 \text{ ppm} = x$$

Sehingga, konsentrasi glukosa dengan media produksi dedak pada ulangan 1 sebesar 16.66 ppm.

Tabel L.5.1 Nilai Aktivitas Ekstrak Kasar Amilase

Media Produksi	Ulangan 1		Ulangan 2		Ulangan 3	
	Absorbansi	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	Konsentrasi (ppm)
Dedak	0.122	16.66	0.124	17.33	0.123	17
Bekatul	0.130	19.33	0.121	16.33	0.126	18
Onggok	0.102	10	0.110	12.66	0.104	10.66

Sedangkan untuk menentukan aktivitas ekstrak kasar amilase dapat diketahui dengan menggunakan persamaan:

$$\text{Unit Aktivitas} = \frac{C}{BM_{\text{produk}} \times t} \times \frac{H}{E}$$

Dimana: C = Konsentrasi gula reduksi (ppm)

BM = Berat molekul glukosa

t = Waktu inkubasi (menit)

H = Volume enzim-substrat (mL)

E = Volume enzim (mL)

Misal : konsentrasi gula reduksi sebesar 219.5 maka aktivitas ekstrak kasar amilase adalah

$$\begin{aligned} \text{Unit aktivitas} &= \frac{16.66 \text{ ppm}}{180 \frac{\mu\text{-g}}{\mu\text{mol}} \times 30 \text{ menit}} \times \frac{1 \text{ mL}}{0.5 \text{ mL}} \\ &= 0,0061704 \mu\text{mol/ mL menit} \approx 61,704 \times 10^{-4} \mu\text{mol/mL menit} \end{aligned}$$

Satu unit aktivitas amilase dinyatakan dengan banyaknya mikro mol glukosa yang dihasilkan oleh 1 mL ekstrak kasar selulase per menit pada kondisi tertentu, sehingga aktivitas yang diperoleh adalah  $61,704 \times 10^{-4}$  Unit/mL. Data konsentrasi gula reduksi dan aktivitas ekstrak kasar ditunjukkan pada Tabel L.5.2

Tabel L.5.2 Nilai Konsentrasi Gula Reduksi Dan Aktivitas Ekstrak Kasar

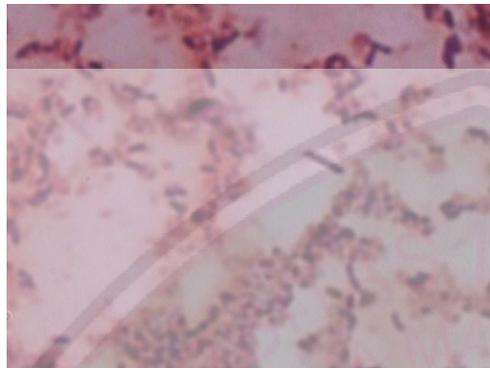
Media Produksi	Ulangan 1		Ulangan 2		Ulangan 3		Rata-rata
	Konsentrasi (ppm)	Aktivitas (U/mL)	Konsentrasi (ppm)	Aktivitas (U/mL)	Konsentrasi (ppm)	Aktivitas (U/mL)	
Dedak	16.66 ppm	$61,704 \times 10^{-4}$	17.33 ppm	$64,186 \times 10^{-4}$	17 ppm	$62,962 \times 10^{-4}$	$62,950 \times 10^{-4}$
Bekatul	19.33 ppm	$71,592 \times 10^{-4}$	16.33 ppm	$60,482 \times 10^{-4}$	18 ppm	$66,666 \times 10^{-4}$	$66,246 \times 10^{-4}$
Onggok	10 ppm	$37,038 \times 10^{-4}$	12.66 ppm	$46,888 \times 10^{-4}$	10.66 ppm	$39,482 \times 10^{-4}$	$41,136 \times 10^{-4}$

Tabel L.5.3 Diameter Zona Bening

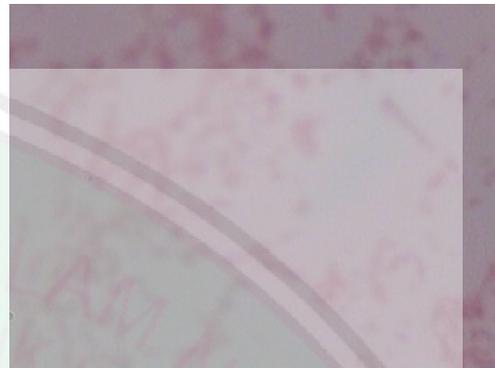
Kode Isolat	Zona Bening Total (cm)	Diameter Koloni (cm)	Zona Bening
BK 1	2.2	1.5	1.46
BK 2	0.8	1	0.8
BK 3	0.4	0.5	0.8
BK 4	0.4	0.45	0.88
BK 5	0.5	0.5	1



## DOKUMENTASI



Cat Gram BK 1



Cat Gram BK 2



Cat Gram BK 3



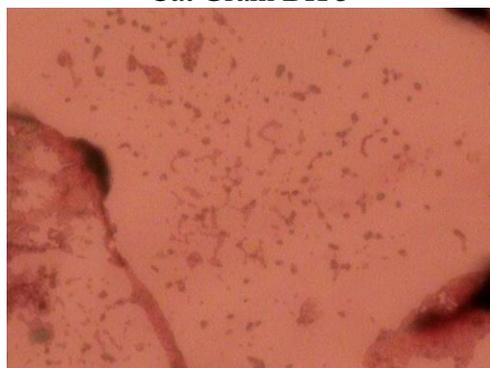
Cat Gram BK 4



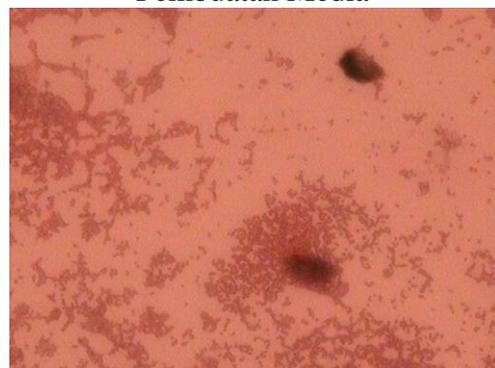
Cat Gram BK 5



Pembuatan Media



Pewarnaan Endospora BK 1



Pewarnaan Endospora BK 2



Pewarnaan Endospora BK 3



Pewarnaan Endospora BK 4



Pewarnaan Endospora BK 5



Bentuk Koloni BK 1



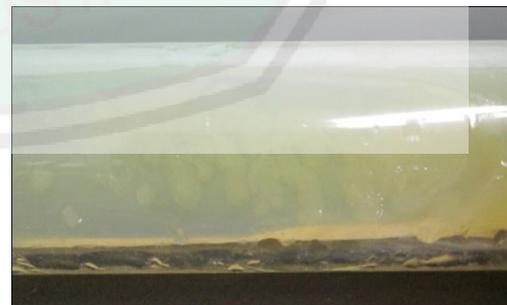
Bentuk Koloni BK 2



Bentuk Koloni BK 3



Bentuk Koloni BK 4



Bentuk Koloni BK 5



Sentrifugasi Ekstrak Kasar Enzim  
Amilase



Pembuatan Reagen DNS



Pemanasan pada Pengukuran Aktivitas  
Enzim



Pengukuran Aktivitas Enzim dengan  
Spektrofotometer



Uji Katalase Isolat BK 1



Uji Katalase Isolat BK 2



Uji Katalase Isolat BK 3



Uji Katalase Isolat BK 4



Uji Katalase Isolat BK 5

