



**UNIVERSITAS INDONESIA**

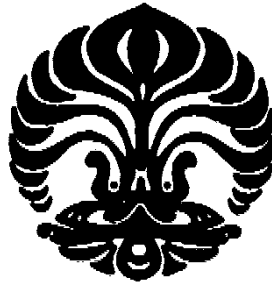
**AKTIVITAS ENZIM SELULASE ISOLAT SGS 2609 BBP4B-KP  
MENGUNAKAN SUBSTRAT LIMBAH PENGOLAHAN RUMPUT  
LAUT YANG DIPRETREATMENT DENGAN ASAM**

**SKRIPSI**

**DESI ANGGARAWATI**

**0806340025**

**FAKULTAS TEKNIK  
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI BIOPROSES  
DEPOK 2012**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**AKTIVITAS ENZIM SELULASE ISOLAT SGS 2609 BBP4B-KP  
MENGUNAKAN SUBSTRAT LIMBAH PENGOLAHAN RUMPUT  
LAUT YANG DIPRETREATMENT DENGAN ASAM**

**SKRIPSI**

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Teknik**

**DESI ANGGARAWATI**

**0806340025**

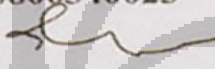
**FAKULTAS TEKNIK  
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI BIOPROSES  
DEPOK 2012**

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Desi Anggarawati

NPM : 0806340025

Tanda Tangan : 

Tanggal : 2 Juli 2012

## HALAMAN PENGESAHAN

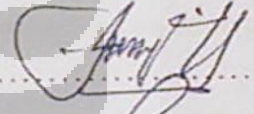
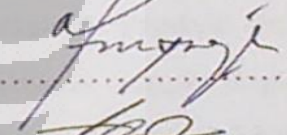
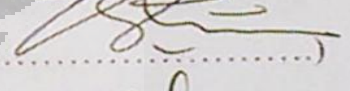
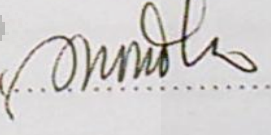
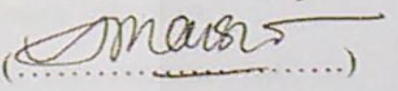
Skripsi ini diajukan oleh

Nama : Desi Anggarawati  
NPM : 0806340025  
Program Studi : Teknologi Bioproses  
Judul Skripsi :

### **Aktivitas Enzim Selulase Isolat SGS 2609 BBP4B-KP Menggunakan Substrat Limbah Pengolahan Rumput Laut Yang Dipretreatment Dengan Asam**

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Teknik pada Program Studi Teknologi Bioproses, Fakultas Teknik, Universitas Indonesia.

#### DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Eng. Muhamad Sahlan, S. Si., M. Eng (.....)  
Pembimbing II : Ir. Pujoyuwono Martosuyono, M. Sc (.....)  
Penguji I : Dr. Tania Surya Utami, ST., MT (.....)  
Penguji II : Prof. Dr. Ir. Anondho Wijanarko, M. Eng (.....)  
Penguji III : Dr. Amarila Malik Apt., M. Si (.....)

Ditetapkan di : Depok, Jawa Barat, Indonesia

Tanggal : 2 Juli 2012

## KATA PENGANTAR

Syukur alhamdulillah saya panjatkan kepada Allah SWT, karena atas berkat dan rahmat-Nya, saya dapat menyelesaikan buku skripsi ini. Penulisan buku skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Teknik Jurusan Teknologi Bioproses pada Fakultas Teknik Universitas Indonesia. Saya menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan skripsi ini, sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih kepada:

- (1) Allah Subhanahu wa Ta'ala yang telah memberikan kelancaran serta kemudahan dalam penyusunan skripsi ini.
- (2) Dr. Eng. Muhamad Sahlan, S. Si., M. Eng., selaku dosen pembimbing I dalam penelitian ini yang memberikan masukan, arahan dan bimbingan dalam menyelesaikan skripsi ini.
- (3) Ir. Pujoyuwono Martosuyono, M. Sc. selaku dosen pembimbing II yang telah menyediakan waktu untuk mengajarkan banyak hal yang belum saya mengerti dalam penelitian ini.
- (4) Kepala Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan yang telah mengizinkan untuk dapat meneliti menggunakan dana APBN tahun anggaran 2012 dan diperbolehkan menggunakan data tersebut untuk keperluan penyusunan skripsi.
- (5) Ibu, Bapak, Adik dan keluarga lainnya yang telah memberikan banyak motivasi, *support* dan doa sehingga saya tetap bersemangat untuk dapat mengerjakan skripsi ini sesempurna mungkin yang dapat saya lakukan.
- (6) Ibu Nuri, Mbak Maya, Mbak Devi, Mas Sepri, Pak Tomi dan semua staff di BBP4B-KP yang telah membantu ketika penelitian;
- (7) Teman-teman baru ketika di laboratorium BBP4B-KP, Endah, Arti, Tina, Cide, Asih, Yamin, Raekal, dan Mbak Isna. Terima kasih atas bantuan, saran, obrolan, support, dan banyak lainnya dari kalian. Semoga tetap masih dapat menjaga silaturahmi ini setelah kita semua wisuda;

- (8) Kawan-kawan satu bimbingan yaitu Raditya Imamul Khalid, Yongki Suharya, Pauline Leon, Darul Hamdi, M. Iqbal, Khotib Sarbini, dan semua sahabat di Departemen Teknik Kimia terutama Ibu Imelda dan Ibu Hanif yang turut membantu dalam pengerjaan skripsi ini;
- (9) Dr. Tania Surya Utami, ST., MT., Prof. Dr. Ir. Anondho Wijanarko, M. Eng, dan Dr. Amarila Malik Apt., M. Si sebagai dosen penguji yang telah memberikan banyak saran sehingga skripsi ini menjadi lebih baik dari sebelumnya.

Akhir kata, saya berharap Allah SWT berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Tidak ada yang sempurna di dunia ini, mohon maaf bila terdapat ketidaksempurnaan dalam skripsi ini. Semoga skripsi ini membawa manfaat bagi orang lain untuk pengembangan ilmu.

Depok, 2 Juli 2012

Penulis

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI  
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

---

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Desi Anggarawati

NPM : 0806340025

Program Studi : Teknologi Bioproses

Departemen : Teknik Kimia

Fakultas : Teknik

Jenis karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty-Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul :

**Aktivitas Enzim Selulase Isolat SGS 2609 BBP4B-KP Menggunakan Substrat  
Limbah Pengolahan Rumput Laut yang Dipretreatment Dengan Asam**

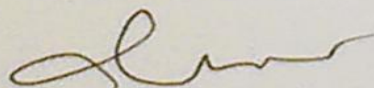
beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok, Jawa Barat, Indonesia

Pada tanggal : 2 Juli 2012

Yang menyatakan



(Desi Anggarawati)

## ABSTRAK

Nama : Desi Anggarawati  
Program studi : Teknologi Bioproses  
Judul : Aktivitas Enzim Selulase Isolat SGS 2609 BBP4B-KP Menggunakan Substrat Limbah Pengolahan Rumput Laut yang *Dipretreatment* Dengan Asam

Sampai saat ini limbah dari industri pengolahan rumput laut hanya digunakan untuk pupuk padahal masih cukup memiliki kandungan selulosa dan berpotensi menjadi bahan baku biofuel. Limbah pengolahan rumput laut dari daerah Pameungpeuk, Garut, ditemukan memiliki kadar selulosa dan lignin sebesar 18,83% dan 15,625% pergramnya. Sebelum limbah siap digunakan untuk substrat dilakukan proses *pretreatment* menggunakan  $H_2SO_4$  terlarut untuk menghilangkan lignin dan meningkatkan aksesibilitas enzim selulase ke selulosa dengan variasi konsentrasi  $H_2SO_4$  terlarut sebesar 0,5%; 1%; 1,5%; dan 2% (v/v). Limbah yang telah *dipretreatment* tersebut dijadikan substrat untuk memproduksi enzim selulase menggunakan isolat bakteri laut SGS 2609 milik BBP4B-KP yang telah diisolasi dari rumput laut *Sargassum Sp.* Fermentasi hidrolisis limbah oleh bakteri isolat SGS 2609 dilakukan selama 7 hari. Kondisi optimum untuk produksi enzim selulase dari bakteri isolat SGS 2609 ini yaitu dengan substrat limbah yang *dipretreatment*  $H_2SO_4$  0,5% pada hari ke-4 dengan aktivitas selulase sebesar 0,0549 U/ml dan aktivitas spesifik sebesar 0.011 U/mg.

**Kata Kunci:** *enzim selulase,  $H_2SO_4$ , isolat SGS 2609, limbah rumput laut, pretreatment, selulosa.*



## ABSTRACT

Name : Desi Anggarawati  
Study Program : Bioprocess Technology  
Title : Activity of cellulase enzyme from isolate SGS 2609 BBP4B-KP using diluted-acid-pretreated seaweed waste as substrate

Waste from seaweed industry currently used as a fertilizer when the waste still contains celluloses and also has potential use as raw material for biofuel. Seaweed waste from industry in Pameungpeuk, Garut, contained celluloses dan lignins in the waste 18,83% and 15,625%, respectively. Before the waste is ready to be used, the pretreatment step using dilute-sulfuric-acid was used for breaking down the lignin and increasing the accessibility of cellulase enzyme to cellulose using variance of concentrations 0,5%; 1%; 1,5%; and 2% (v/v). The pretreated seaweed waste then used as substrate for producing cellulase enzyme from isolate bacteria SGS 2609 BBP4B-KP which has been isolated from seaweed *Sargassum sp.* The fermentation time took approximately 7 days. The optimum condition for producing cellulase enzyme from isolate SGS 2609 was using seaweed waste pretreated with  $H_2SO_4$  0,5% as substrate on the 4<sup>th</sup> day of fermentation, with the cellulase activity 0,0549 U/ml and the specific activity 0,011 U/mg.

**Keyword:** *celulase enzyme, cellulose,  $H_2SO_4$ , isolate SGS 2609, seaweed waste, pretreatment.*

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS</b> ....Error! Bookmark not defined.	
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....Error! Bookmark not defined.	
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	<b>iv</b>
<b>ABSTRAK</b> .....	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>viii</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>ix</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>xi</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>xiii</b>
<b>BAB 1 PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1. 1. Latar Belakang .....	1
1. 2. Perumusan Masalah .....	3
1. 3. Batasan Masalah .....	4
1. 4. Tujuan Penelitian .....	4
1. 5. Sistematika Penulisan .....	4
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>6</b>
2. 1. Rumput Laut .....	6
2. 2. Lignoselulosa .....	7
2. 3. Lignin.....	9
2. 4. Selulosa.....	10
2. 5. <i>Pretreatment</i> Lignoselulosa.....	12
2. 6. Enzim Selulase.....	12
2.6.1. Sumber Enzim Selulase .....	15
2.7. <i>State of The Art</i> .....	15
<b>BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN</b> .....	<b>18</b>
3. 1. Diagram Alir Penelitian .....	18
3. 2. Alat dan Bahan.....	19
3. 3. Prosedur .....	21
3.3.1. Persiapan Sampel Limbah Pengolahan Rumput Laut.....	21
3.3.2. <i>Pretreatment</i> Limbah Rumput laut .....	21
3.3.3. Peremajaan Isolat SGS 2609.....	21

3.3.4.	Produksi Enzim Kasar Selulase Dengan Substrat Limbah Rumput Laut .....	22
3. 4.	Analisis Data Penelitian.....	23
3.4.1.	Uji Aktivitas Enzim Selulase .....	23
3.4.2.	Pengukuran Kadar Protein Total.....	24
3.4.3.	Uji Kandungan Lignin dan Selulosa.....	26
3. 5.	Tempat dan Waktu Penelitian.....	26
<b>BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>		<b>27</b>
4. 1.	Peremajaan Bakteri Isolat SGS 2609 .....	27
4. 2.	<i>Pretreatment</i> Limbah Rumput Laut.....	28
4. 3.	Hidrolisis Limbah Menggunakan Bakteri Isolat SGS 2609 .....	32
4. 4.	Aktivitas Enzim Selulase Isolat SGS 2609 .....	36
<b>BAB 5 PENUTUP.....</b>		<b>43</b>
5. 1.	Kesimpulan .....	43
5. 2.	Saran .....	43
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>		<b>44</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>		<b>49</b>

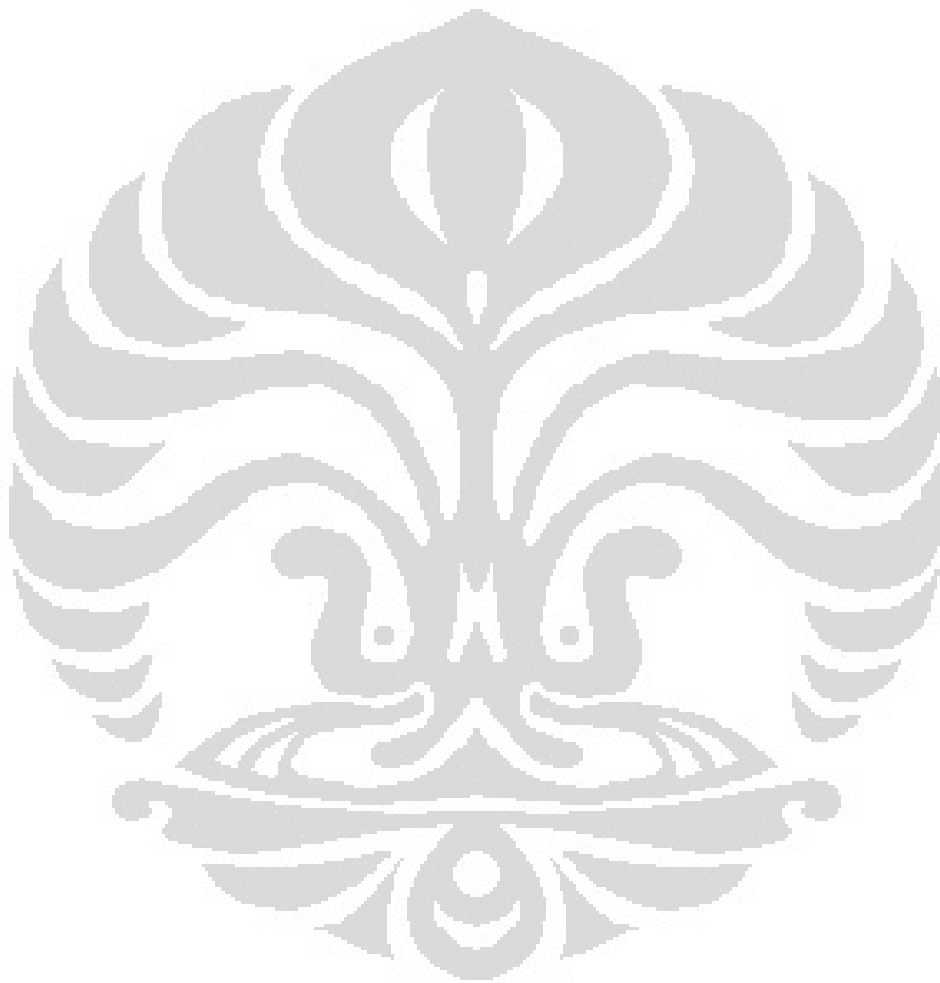
## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1. Gambaran struktur biomassa lignoselulosa yang terdiri dari lignin, hemiselulosa dan selulosa (Boudet <i>et al</i> , 2003) .....	7
Gambar 2. 2. Struktur (a) selulosa, (b) lignoselulosa (Sumber: Harun <i>et al</i> , 2010) 8	
Gambar 2. 3. Komponen pembentuk lignin (Jeffries, 1994).....	9
Gambar 2. 4. Struktur lignin yang umum terdapat pada kayu lunak, dengan contoh struktur ariglycerol- $\beta$ -aryl eter yang dilingkari (Hammel, 1997). .....	10
Gambar 2. 5. Struktur kimia dari selulosa (Sumber: <a href="http://sci.waikato.ac.nz">http://sci.waikato.ac.nz</a> ) .....	11
Gambar 2. 6. Ilustrasi dari efek <i>pretreatment</i> terhadap lignoselulosa (Harmsen, 2010).....	12
Gambar 2. 7. Jenis dan Aksi Enzim Selulase (Sumber: Pikukuh, 2011) .....	14
Gambar 2. 8. Skema tahap-tahap hidrolisis selulosa secara enzimatik (Morana <i>et al</i> , 2011) .....	14
Gambar 3. 1. Diagram Alir Penelitian .....	18
Gambar 4. 1. Koloni bakteri isolat SGS 2609 dengan pengenceran $10^{-5}$ .....	27
Gambar 4. 2. Hasil <i>streak</i> pada media agar .....	27
Gambar 4. 3. Hasil pewarnaan Gram pada isolat SGS 2609 .....	28
Gambar 4. 4. Sampel sebelum dikeringkan .....	29
Gambar 4. 5. Sampel setelah dikeringkan dan digiling .....	29
Gambar 4. 6. Berat akhir limbah setelah ditreatment dengan empat variasi konsentrasi $H_2SO_4$ .....	31
Gambar 4. 7. Grafik kadar selulosa dan lignin limbah; persentase per 1 gram sampel dengan (■) selulosa; dan (●) lignin. ....	31
Gambar 4. 8. Kadar glukosa dalam fitrat .....	32
Gambar 4. 9. Ilustrasi tahapan hidrolisis limbah menggunakan isolat SGS 2609	34
Gambar 4. 10. Media cair spesifik yang berisi variasi substrat dalam labu erlenmeyer .....	34
Gambar 4. 11. Kurva produksi biomassa bakteri isolat SGS 2609 dalam kelima variasi substrat limbah rumput laut .....	35
Gambar 4. 12. Skema tahap-tahap hidrolisis selulosa secara enzimatik (Morana <i>et al</i> , 2011) .....	36

Gambar 4. 13. Grafik aktivitas enzim selulase dengan substrat limbah rumput laut selama 7 hari menggunakan variasi substrat yang berbeda..... 38

Gambar 4. 14. Grafik aktivitas selulase, aktivitas spesifik, dan kadar protein total pada kelima variasi medium limbah spesifik ..... 41

Gambar 4. 15. Grafik aktivitas spesifik pada kelima variasi medium limbah spesifik ..... 42



## DAFTAR TABEL

Tabel 2. 1. Komposisi lignoselulosa dalam beberapa sumber (Harmsen <i>et al</i> , 2010).....	8
Tabel 2. 2. Komposisi Kimia Rumput Laut (Sumber: Kim <i>et al.</i> , 2010).....	11
Tabel 2. 3. <i>State of the art</i> penelitian ini .....	17



# BAB 1

## PENDAHULUAN

### 1. 1. Latar Belakang

Indonesia yang dua per tiga wilayahnya terdiri dari lautan dengan garis pantai lebih dari 1.660 km (Rahmat, 2011) memiliki keanekaragaman hayati laut mulai dari keanekaragaman jenis ikan, moluska, crustacean, rumput laut serta komoditas perairan lainnya. Salah satu komoditi perairan Indonesia yang sangat berpotensi untuk dikembangkan adalah rumput laut karena semakin lama jumlah permintaan terhadap rumput laut semakin tinggi baik di pasar lokal maupun internasional (Rahmat, 2011). Tiap tahun dilaporkan produksi rumput laut semakin meningkat dari tahun 2007 sebesar 135 ribu ton, tahun 2008 sebesar 150 ribu ton (Budiono, 2008), meningkat kembali pada tahun 2009 sebesar 2,574 juta ton, tahun 2010 sebesar 3,083 juta ton dan terus meningkat karena pemerintah terus menambah klaster untuk memacu produksi dengan target sebesar 10 juta ton sampai tahun 2014 (Anonim, 2011).

Setidaknya sampai saat ini kira-kira sudah ada lebih dari 20 buah pabrik pengolahan rumput laut produksi karaginan ini dan masih akan terus bertambah banyak (Anonim, 2009). Limbah yang dihasilkan oleh industri pengolahan rumput laut ini biasanya hanya dimanfaatkan sebagai pupuk (Anonim, 2010) padahal dalam limbah tersebut juga masih mengandung selulosa yang nantinya dapat digunakan sebagai bahan baku biofuel (Triwisari *et al.*, 2009).

Sampai saat ini issue mengenai menipisnya cadangan minyak bumi masih hangat dibicarakan karena cadangan minyak yang terus dieksplorasi tidak ada tindakan untuk menemukan cadangan minyak yang baru untuk meningkatkan *recovery* minyak bumi. Oleh karena itu perlu dicari bahan bakar alternatif untuk dapat mengurangi penggunaan bahan baku fosil dari minyak bumi.

Salah satu energi alternatif yang dapat menggantikan bahan bakar dari minyak bumi yaitu bioetanol (Mussatto, 2010). Etanol dapat diproduksi oleh mikroorganisme secara terus menerus dan bahan bakunya berasal dari sumber daya yang dapat diperbaharui. Gula merupakan bahan baku utama dalam pembuatan bioethanol sehingga sampai saat ini yang paling sering digunakan untuk bahan baku yaitu molase, aren, ubi kayu serta jagung. Dikarenakan akan bersaing dengan kebutuhan pangan sehingga dicari bahan baku lain yang berasal dari bahan non pangan yaitu dari bahan berserat (selulosa atau lignoselulosa) seperti limbah pertanian, kehutanan serta lainnya yang memiliki kandungan selulosa (John, 2011).

Rumput laut mulai disorot menjadi salah satu sumber dalam pembuatan energi alternatif karena kandungannya yang memiliki kandungan lignin sedikit atau sama sekali tidak terdapat lignin dan cara pembiakannya yang tergolong mudah (Jang *et al.*, 2012; Yanagisawa *et al.*, 2011) serta tidak akan bersaing dengan kebutuhan pangan (Kim *et al.*, 2011).

Setiap harinya industri penghasil agar (produk olahan dari rumput laut) menghasilkan limbah sebanyak 65-70% dari bahan baku yang digunakan. Menurut pengakuan dari salah satu industri penghasil agar, dalam sehari dapat menghasilkan kurang lebih 30 ton limbah (Triwisari *et al.*, 2009). Karena jumlahnya yang banyak serta masih memiliki kandungan selulosa yang cukup banyak sehingga limbah pengolahan rumput laut ini memiliki potensi sebagai bahan baku dalam pembuatan bioethanol. Pemanfaatan kembali limbah ini juga membantu dalam menerapkan prinsip “*Zero Waste Industry*” serta meningkatkan nilai tambah dari limbah tersebut.

Dalam limbah pengolahan rumput laut ini masih terdapat pengotor-pengotor lain yang juga merupakan hasil sampingan dari proses produksi karena itu diperlukan *pretreatment* dahulu sebelum ke tahap sakarifikasi yang mengubah selulosa menjadi gula rantai pendek.

Tahap yang paling penting bila menggunakan bahan baku selulosa adalah dalam mengubah selulosa menjadi sakarida (tahap hidrolisis)



(Harun *et al.*, 2010). Di tahap ini biasa dilakukan dengan perlakuan kimia atau biologis menggunakan enzim. Keduanya memiliki kelebihan dan kekurangan. Dari segi keefektifan dalam mendegradasi selulosa menjadi sakarida, penggunaan enzim lebih unggul dibandingkan dengan penggunaan kimiawi tetapi penggunaan dengan enzim membutuhkan biaya yang tidak sedikit (Philippidis, 1994). Biaya hidrolisis enzimatik yang besar ini akan berdampak pada biaya produksi bioethanol secara keseluruhan oleh karena itu diperlukan optimasi dalam penggunaan enzim. Enzim yang biasa digunakan untuk hidrolisis selulosa yaitu enzim selulase yang banyak ditemukan pada jamur, yeast dan bakteri.

Strategi yang biasa dilakukan untuk menurunkan biaya produksi ke tingkat ekonomis yaitu dengan cara 1) meningkatkan produktivitas enzim, 2) menggunakan substrat yang murah, 3) meningkatkan stabilitas produksi yang baik, dan 4) menghasilkan enzim yang memiliki aktivitas yang tinggi pada substrat spesifik (Ashadi dan Kahar, 2011).

Dalam penelitian kali ini produksi enzim selulase didapatkan dari bakteri laut yang sampai saat ini belum terlalu dimanfaatkan tetapi pihak BBP4B-KP telah mengisolasi strain bakteri isolat SGS 2609 yang telah diisolasi dari rumput laut *Sargassum Sp.* Sebagai langkah awal, yaitu dilihat bagaimana aktivitas selulase dengan substrat limbah yang telah ditreatment dengan  $H_2SO_4$ .

## 1. 2. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dipaparkan sebelumnya, maka dapat dirumuskan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Dengan konsentrasi  $H_2SO_4$  berapa dan hari berapa yang menghasilkan aktivitas enzim selulase isolat SGS 2609 paling tinggi yang nantinya akan digunakan untuk tahap produksi selanjutnya?

### 1. 3. Batasan Masalah

Dalam penelitian ini, pembatasan masalah yang akan dibahas adalah sebagai berikut:

1. Limbah pengolahan rumput laut yang digunakan adalah limbah dari industri di daerah Pameungpeuk, Garut untuk jenis limbah rumput laut *Gracillaria sp.*
2. Proses *pretreatment* yang dilakukan yaitu dengan menggunakan perlakuan asam ( $H_2SO_4$ ) dengan empat konsentrasi (v/v).
3. Proses fermentasi hidrolisis menggunakan bakteri laut isolat SGS 2609 milik BBP4B-KP.
4. Waktu fermentasi dilakukan selama tujuh hari.

### 1. 4. Tujuan Penelitian

Tujuan yang ingin dicapai dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan aktivitas selulase paling tinggi dengan waktu yang optimum untuk dilakukan produksi menggunakan limbah pengolahan rumput laut sebagai substrat.

### 1. 5. Sistematika Penulisan

Sistematika penulisan yang digunakan adalah sebagai berikut:

#### Bab I Pendahuluan

Pada bab pendahuluan ini terdiri atas latar belakang, rumusan masalah, tujuan penelitian, batasan masalah, dan sistematika penulisan.

#### Bab II Tinjauan Pustaka

Tinjauan pustaka berisikan ulasan mengenai rumput laut, lignoselulosa, lignin, selulosa, *pretreatment* lignoselulosa serta enzim selulase dan sumber-sumber enzim selulase.

#### Bab III Metode Penelitian

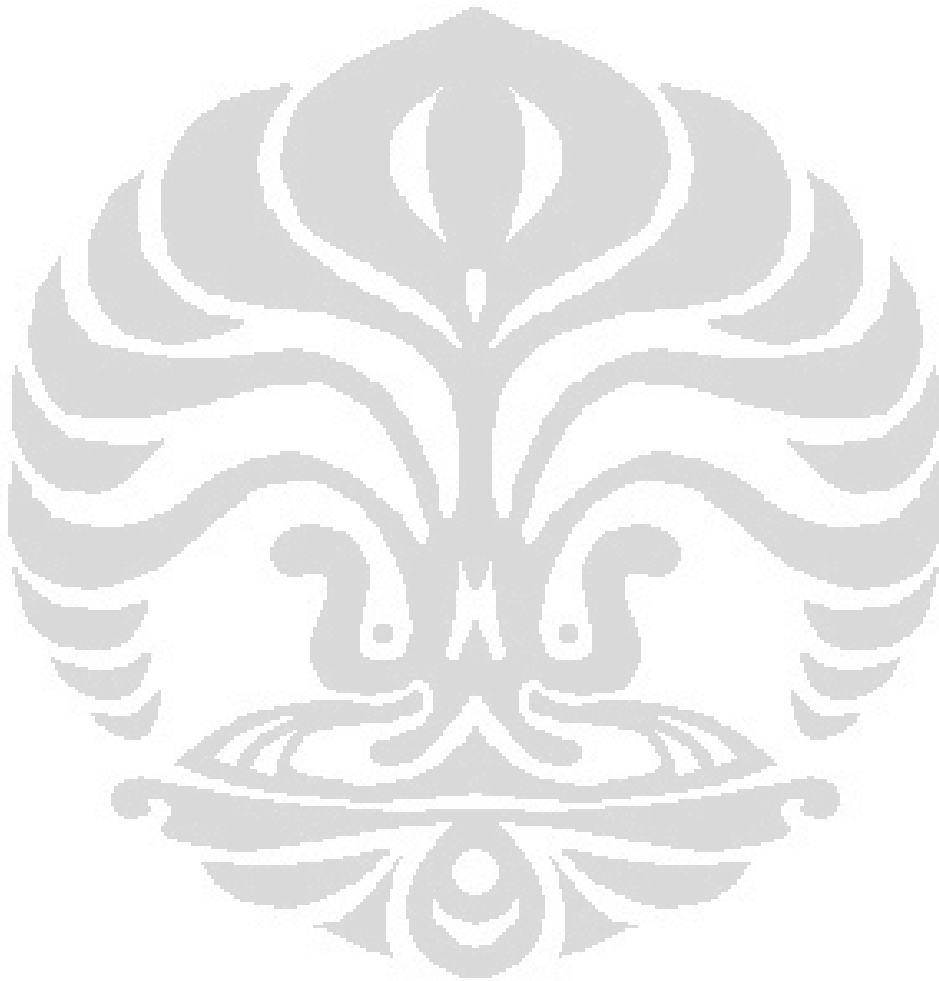
Pada bab ini berisi tentang diagram alir penelitian, alat dan bahan yang digunakan, prosedur penelitian, lokasi penelitian dan jadwal penelitian.

#### Bab IV Hasil dan Pembahasan

Pada bab ini berisi penjelasan hasil eksperimen dan analisis hasil eksperimen

#### Bab V Penutup

Berisi Kesimpulan akhir penelitian dan saran untuk penelitian lanjutan yang dilakukan terkait hasil penelitian sekarang



## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2. 1. Rumpun Laut

Rumput laut merupakan salah satu sumber daya hayati yang dapat diperbaharui dan keberadaannya banyak di wilayah pesisir serta laut. Rumput laut tumbuh di alam dengan melekatkan diri pada karang, lumpur, pasir, batu dan benda keras lainnya. Selain benda mati, rumput lautpun dapat melekat pada tumbuhan lain secara epifitik (Jana-Anggadiredjo, 2006).

Rumput laut merupakan tumbuhan laut jenis alga. Tanaman ini adalah ganggang multiseluler golongan divisi *Thallophyta* yang artinya termasuk tanaman berderajat rendah, tidak mempunyai akar, batang maupun daun sejati (Zatnika, 2009). Jenis rumput laut sangat beragam, mulai dari yang berbentuk bulat, pipih, tabung atau seperti ranting dahan bercabang-cabang. Seperti layaknya tanaman darat pada umumnya, rumput laut juga memiliki klorofil atau pigmen warna yang lain. Rumput laut dibagi dalam empat kelas yaitu ganggang biru (*Cyanophyceae*), ganggang hijau (*Chlorophyceae*), ganggang merah (*Rhodophyceae*) atau ganggang coklat (*Phaeophyceae*) (Istini, 1985). Dalam Ekspedisi Sibiga yang dilakukan dari tahun 1899-1900 telah menghasilkan inventarisasi jenis alga laut di Indonesia yang mencapai 782 jenis yang tumbuh di berbagai wilayah perairan Indonesia, terdiri dari 196 jenis alga hijau dan 452 alga merah (Zatnika, 2009).

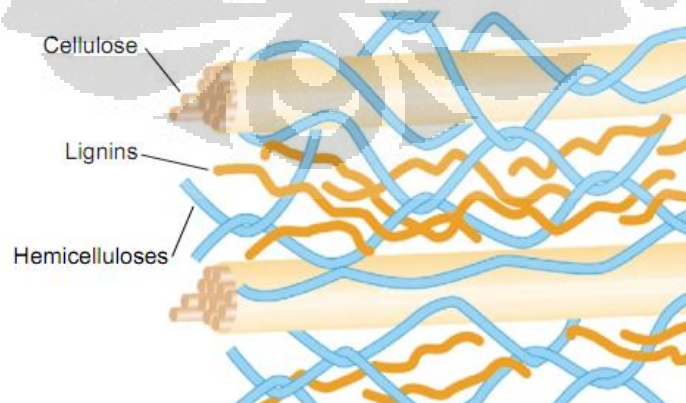
Rumput laut merupakan salah satu komoditi perikanan Indonesia yang cukup potensial sebagai devisa negara. Beberapa jenis rumput laut yang bernilai ekonomis tinggi dan telah dibudidayakan antara lain rumput laut merah (*Rhodophyceae*) dan rumput laut coklat (*Phaeophyceae*). Beberapa jenis rumput laut yang tergolong *Rhodophyceae* adalah *Glacillaria* sp., *Gellidium* sp., *Gellidiela* sp., dan *Gellidiopsis* sp. merupakan penghasil karaginan sedangkan jenis rumput laut yang

tergolong dalam *Phaeophyceae* adalah *Turbinaria* sp., *Sargassum* sp. Yang merupakan penghasil alginat (Suryaningrum, 2011).

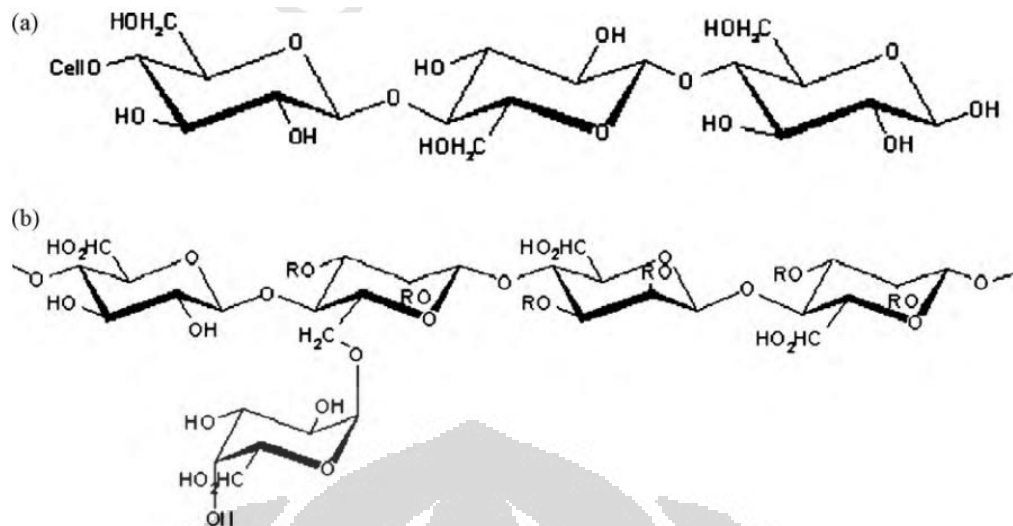
Kandungan utama rumput laut adalah karbohidrat sebagai polisakarida kompleks berupa serat. Disamping itu rumput laut juga mengandung protein, sedikit lemak, abu yang sebagian besar merupakan senyawa garam natrium dan kalium, vitamin-vitamin seperti vitamin A, B1, B2, B6, B12 dan C, betakaroten, mineral seperti kalium, kalsium, fosfor, natrium, zat besi dan iodium (Jana-Anggadiredjo, 2006). Di Indonesia sendiri, pengolahan rumput laut dengan skala industri sudah mulai banyak dilakukan dengan produknya yaitu agar, karaginan serta alginat (Istini, 1985). Letak dari industri pengolahan rumput laut tersebut tersebar di berbagai wilayah di Indonesia (Zatnika, 2009). Dari proses pengolahan di masing-masing industri ini memiliki limbah yang belum digunakan secara optimal. Sampai saat ini kebanyakan limbah tersebut hanya untuk pupuk.

## 2. 2. Lignoselulosa

Lignoselulosa merupakan komponen organik utama dari biomassa yang terdiri dari tiga polimer yaitu lignin, hemiselulosa, dan selulosa dimana yang terbesarnya yaitu selulosa sekitar 35-50%, hemiselulosa 20-35%, dan lignin 10-25%. (Saha, 2004). Ilustrasi dari ketiga komponen tersebut dapat dilihat pada gambar 2.1.



**Gambar 2. 1. Gambaran struktur biomassa lignoselulosa yang terdiri dari lignin, hemiselulosa dan selulosa (Boudet *et al*, 2003)**



Gambar 2. 2. Struktur (a) selulosa, (b) lignoselulosa (Sumber: Harun *et al*, 2010)

Komposisi lignoselulosa tergantung dari mana sumbernya. Terdapat variasi yang signifikan dari komposisi lignin dan hemiselulosa tergantung berasal dari kayu keras, lunak atau rerumputan. Contoh komposisi lignoselulosa pada beberapa sumber dapat dilihat pada tabel 2.1. dibawah.

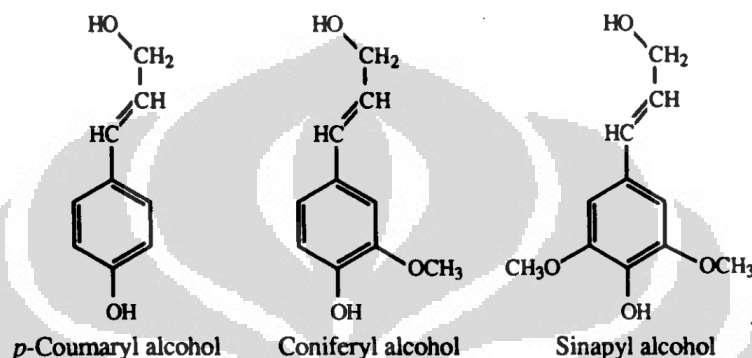
Tabel 2. 1. Komposisi lignoselulosa dalam beberapa sumber (Harmsen *et al*, 2010)

Material lignoselulosa	Selulosa (%)	Hemiselulosa (%)	Lignin (%)
Batang kayu keras	40-55	24-40	18-25
Batang kayu lunak	45-50	25-35	25-35
Rumput	25-40	35-50	10-30
Daun	15-20	80-85	0
Kertas	85-99	0	0-15

Lignoselulosa biasanya atau merupakan komponen yang paling banyak terdapat pada buangan beberapa industri seperti hutan, pertanian, dan limbah rumah tangga. Untuk menghidrolisis enzimatis dari lignoselulosa dengan tanpa *pretreatment* biasanya tidak efektif karena tingginya stabilitas material terhadap serangan enzim atau bakteri (Taherzadeh and Karimi, 2008). Oleh karena itu, sebagian besar proses dalam pemanfaatan bahan lignoselulosa ini selalu melibatkan *pretreatment* terlebih dahulu.

### 2.3. Lignin

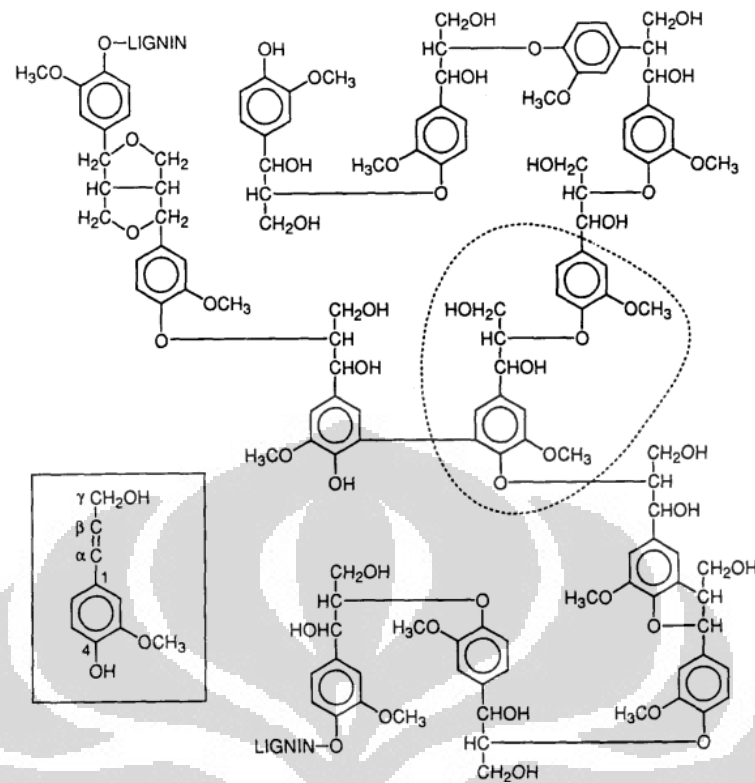
Lignin merupakan molekul yang sangat kompleks terdiri dari unit-unit fenilpropane yang terhubung dalam bentuk tiga dimensional yang sulit untuk didegradasi. Komposisi lignin terdiri dari polimer aromatik yang unitnya dihubungkan oleh ikatan eter dan karbon-karbon. Tiga komponen yang membentuk lignin yaitu *p*-coumaril alkohol, coniferyl alkohol, dan sinapil alkohol.



Gambar 2.3. Komponen pembentuk lignin (Jeffries, 1994)

Lignin adalah yang paling susah didegradasi dari komponen sel tanaman, semakin tinggi proporsi lignin semakin tinggi pula resistan terhadap degradasi kimia dan enzimatik. Pemakaian material lignoselulotik memiliki kelemahan yaitu dengan adanya lignin yang sulit didegradasi sehingga berpengaruh dalam resistensi terhadap degradasi kimia dan biologis (Taherzadeh and Karimi, 2008).

Berikut merupakan ilustrasi dari komposisi kimia yang terdapat dalam lignin.



**Gambar 2. 4. Struktur lignin yang umum terdapat pada kayu lunak, dengan contoh struktur ariglycerol-β-aril eter yang dilingkari (Hammel, 1997).**

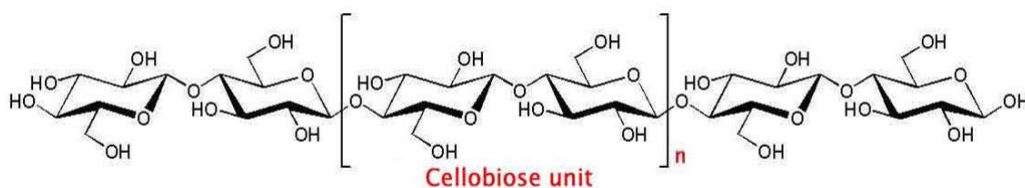
Lignin terlarut akibat proses *pretreatment* merupakan penghambat (inhibitor) untuk selulase, xylanase, dan glukosidase. Beberapa selulase memiliki pengaruh inhibitor yang berbeda terhadap keberadaan lignin, dimana xylanase dan glukosidase memiliki sedikit efek terhadap lignin (Taherzadeh and Karimi, 2008).

#### 2. 4. Selulosa

Selulosa merupakan substansi organik yang paling melimpah di alam dan merupakan komponen utama dari dinding sel tumbuhan (Pikukuh, 2011), memiliki struktur kimia terdiri dari unsur C, O, dan H yang membentuk rumus molekul  $(C_6H_{10}O_5)_n$  (Pikukuh, 2011) serta berat molekul yang tinggi, terdiri dari polimer linier D-glukosa yang diikat oleh ikatan β-1,4-*glucosidic* (Philippidis, 1991). Rantai selulosa diikat bersama oleh ikatan hydrogen antara gugus hidroksil dari molekul yang berdekatan dan gaya Van der Waals membentuk serat yang tidak mudah larut



(Philippidis, 1991). Dasar pembentuk selulosa merupakan dimer dari dua unit glukosa yang dinamai selobiosa (Gambar 2.4).



**Gambar 2. 5. Struktur kimia dari selulosa (Sumber: <http://sci.waikato.ac.nz>)**

Proses degradasi selulosa (hidrolisis selulosa) dapat dilakukan secara kimiawi (menggunakan asam atau basa) atau secara biologis menggunakan mikroorganisme selulolitik yang berasal dari bakteri ataupun jamur. Degradasi sempurna selulosa yang terjadi dengan bantuan mikroorganisme akan melepaskan karbon dioksida (CO<sub>2</sub>) dan air pada kondisi aerobik. Pada kondisi anaerobik, proses hidrolisis akan melepaskan karbon dioksida, metana, dan air. Mikroorganisme tersebut dapat mendegradasi selulosa karena menghasilkan enzim dengan spesifikasi berbeda yang saling bekerja sama. Enzim tersebut akan menghidrolisis ikatan  $\beta$ -1,4-*glycosidic* pada selulosa. Hidrolisis sempurna selulosa akan menghasilkan monomer selulosa yaitu glukosa, dan hidrolisis tak sempurna akan menghasilkan disakarida dari selulosa yang disebut selobiosa (Galbe & Zacchi, 2007).

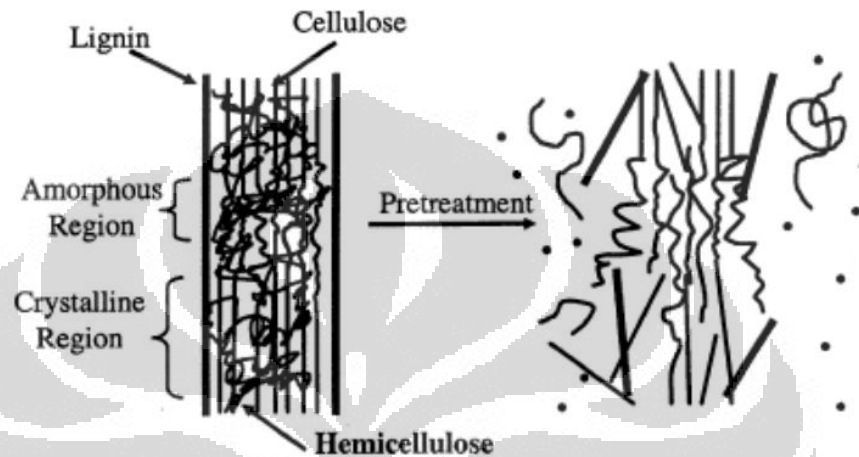
**Tabel 2. 2. Komposisi Kimia Rumput Laut (Sumber: Kim *et al.*, 2010)**

Jenis Alga Merah	Selulosa (%)	Galaktan (%)	Karbohidrat (%)	Protein (%)	Lainnya (Lipid, ash) (%)
<i>Glacilaria</i>	19,7	44,4	74,1	11	14,9
<i>E. cottonii</i>	7,1	43,4	50,5	4,9	44,6

Pada Tabel 2.1. diatas dapat dilihat besarnya kandungan selulosa dalam *Glacilaria* sebesar 19,7% dan kandungan karbohidrat yang cukup tinggi dibandingkan dengan *E. cottonii*. Salah satu keunggulan selulosa yang dimiliki oleh rumput laut yaitu memiliki kandungan lignin sedikit serta cara pembiakannya yang tergolong mudah (Jang *et al.*, 2012; Yanagisawa *et al.*, 2011).

## 2. 5. *Pretreatment* Lignoselulosa

*Pretreatment* merupakan tahapan yang penting dalam konversi biokimia dari biomassa lignoselulosa menjadi contohnya *biofuel*. Tahapan tersebut mengharuskan untuk merubah struktur biomassa selulosa agar akses ke selulosa menjadi lebih tinggi untuk enzim supaya dapat merubah menjadi gula yang dapat difermentasi (Mosier *et al*, 2005).



Gambar 2. 6. Ilustrasi dari efek *pretreatment* terhadap lignoselulosa (Harmsen, 2010)

*Pretreatment* meliputi perubahan biomassa sehingga hidrolisis (enzimatis) selulosa dan hemiselulosa dapat mencapai *yield* lebih banyak dan lebih cepat. Tujuan lainnya yaitu melibatkan penghilangan kadar lignin dan gangguan terhadap kristalinitas struktur selulosa (gambar 2.6). Perbaikan yang dihasilkan dari perlakuan *pretreatment* ini terhadap material lignoselulosa yaitu.

1. Meningkatkan luas permukaan dan porositas
2. Modifikasi struktur lignin
3. Penghilangan lignin
4. Depolimerisasi(sebagian) hemiselulosa
5. Penghilangan hemiselulosa
6. Mengurangi kristalinitas selulosa

## 2. 6. Enzim Selulase

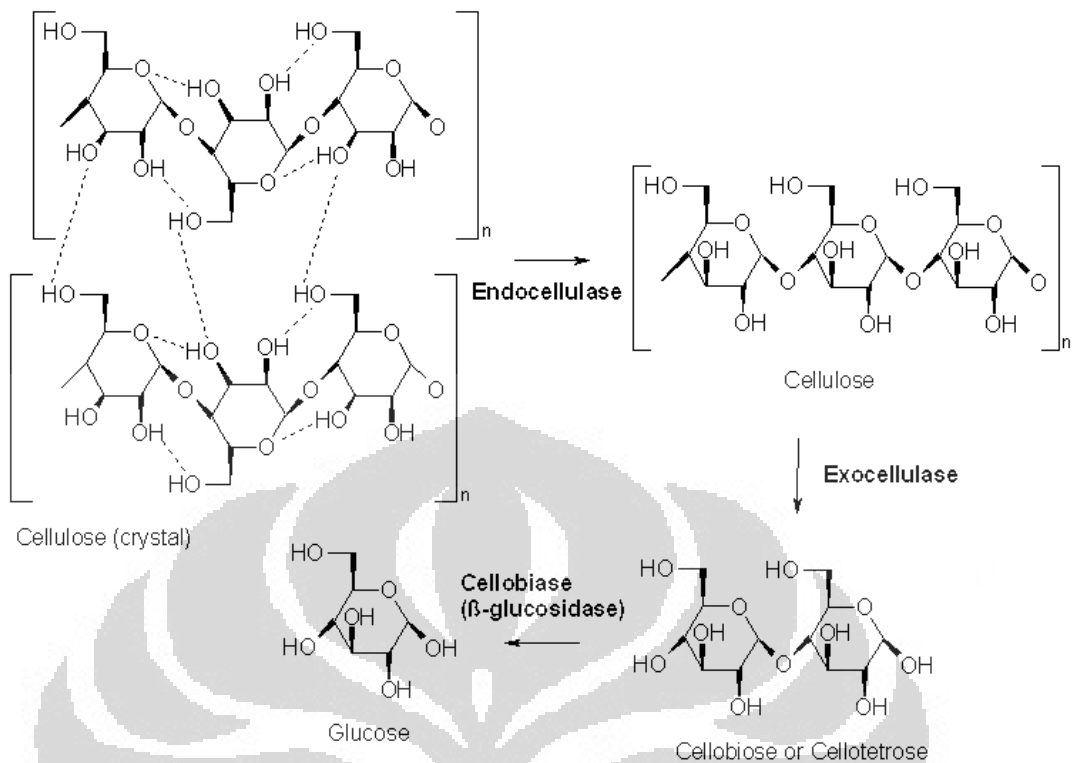
Pada kenyataannya, selulase bukanlah enzim tunggal tapi merupakan sistem enzim yang terdiri dari beberapa komponen enzim yang

bekerja secara bertahap untuk menguraikan selulosa menjadi glukosa dengan komposisi yang beragam tergantung dari sumbernya (Philippidis, 1991; Yunasfi, 2008).

Selulase adalah nama trivial enzim yang mempunyai nama sistemik  $\beta$ -1,4-glukan-4-glukanohidrolase (EC. 3. 2. 1. 4). Nama selulase merupakan nama umum bagi semua enzim yang dapat memutuskan ikatan  $\beta$ -1,4-glukosida dalam selulosa, selodekstrin, selobiosa serta turunan selulosa yang lain (Sekarsari, 2003).

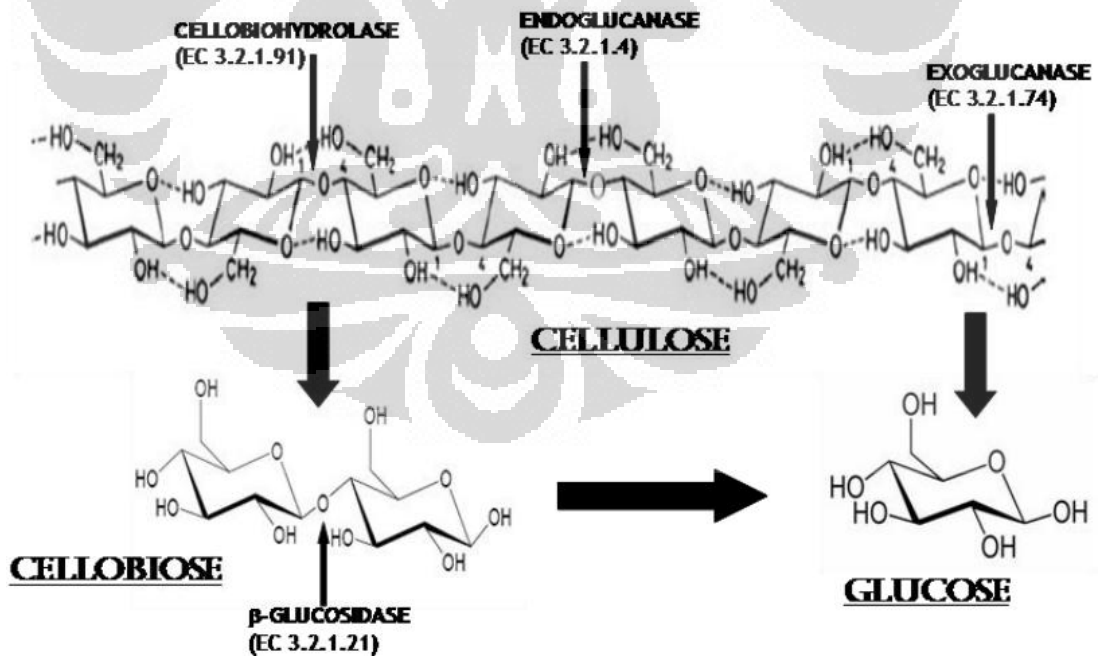
Terdapat empat kelompok enzim utama sebagai komponen penyusun selulase berdasarkan spesifikasi substrat masing-masing enzim (Yunasfi, 2008), yaitu:

1. Endo-  $\beta$ -1,4-glukanase menghidrolisis ikatan  $\beta$ -1,4-glikosida secara acak. Enzim ini tidak menyerang selobiosa tetapi menghidrolisis selodekstrin, selulosa yang telah dilonggarkan oleh asam fosfat dan selulosa yang telah disubstitusi seperti CMC dan HES (Hidroksi Etil Selulosa).
2.  $\beta$ -1,4-D-glukan selobiohidrolase (EC.3.2.1.91), menyerang ujung rantai selulosa non pereduksi dan menghasilkan selobiosa. Enzim ini dapat menyerang selodekstrin tetapi tidak menyerang selulosa yang telah disubstitusi serta tidak dapat menghidrolisis selobiosa.
3.  $\beta$ -1,4-D-glukan glukohidrolase (EC.3.2.1.74), menyerang ujung rantai selulosa non pereduksi dan menghasilkan glukosa. Enzim ini menyerang selulosa yang telah dilonggarkan dengan asam fosfat, selo-oligosakarida dan CMC.
4.  $\beta$ -1,4-D-glukosidase (EC.3.2.1.21), menghidrolisis selobiosa dan selo-oligosakarida rantai pendek serta menghasilkan glukosa. Enzim ini tidak menyerang selulosa atau selodekstrin.



Gambar 2. 7. Jenis dan Aksi Enzim Selulase (Sumber: Pikukuh, 2011)

Konsep mekanisme hidrolisa enzimatis terhadap selulosa diilustrasikan oleh Morana *et al* (2011) pada gambar 2.5 dibawah ini.



Gambar 2. 8. Skema tahap-tahap hidrolisis selulosa secara enzimatis (Morana *et al*, 2011)

### 2.6.1. Sumber Enzim Selulase

Enzim selulase biasanya diproduksi oleh mikroba contohnya fungi, bakteri, dan juga protozoa selain itu juga diproduksi oleh tanaman dan hewan (Morana *et al*, 2011).

Enzim selulase terdapat pada jamur dan bakteri baik yang aerobik dan anaerobic. Jamur mesofilik aerobik *Trichoderma reesei* dan mutannya merupakan jamur yang sering banyak dipelajari sumber selulasenya. Jamur lainnya yang memproduksi selulase yaitu *T. viride*, *T. lignorum*, *T. koningii*, *Penicillium spp.*, *Fusarium spp.*, *Aspergillus spp.*, *Chrysosporium pannorum*, dan *Sclerotium rofsii*. Selulase dari jamur merupakan glikoprotein yang tidak membutuhkan kofaktor dalam aktivitas enzimatisnya (Philippidis, 1991).

Beberapa bakteri juga diidentifikasi dapat memproduksi selulase ekstraseluler seperti *Acidothermus cellulolyticus*, *Micromonospora bispora*, *Bacillus sp.*, *Cytophaga sp.*, *Streptomyces flavogriseu*, *Thermomonospora fusca*, dan *T. curvata*, *Cellulomonas uda*, *Clostridium stercorarium*, *Acetivibrio cellulolyticus*, dan *Ruminococcus albus*. (Philippidis, 1991). Dibeberapa bakteri selulase diproduksi di membran sel (contohnya *Cytophaga sp.*), sedangkan yang lain merupakan hasil ekstraseluler (contohnya *Cellvibrio vulgaris*) atau keduanya (contohnya *Cellvibrio filvus*). Selulase dari bakteri memiliki komposisi yang berbeda daripada selulase dari jamur; bakteri selulolitik memproduksi endoglukanase dan atau selobiofosforilase (yang mengkatalisis konversi selobiosa menjadi glukosa dan glukosa-1-fosfat) atau  $\beta$ -glukosidase atau keduanya (Philippidis, 1991).

### 2.7. State of The Art

Penelitian kali ini bertujuan untuk mengetahui kondisi optimum dari enzim selulase yang dihasilkan oleh bakteri isolat SGS 2609 dengan menggunakan substrat selulosa dari limbah limbah rumput laut yang telah dipretreatment sebelumnya menggunakan perlakuan asam ( $H_2SO_4$ ).

Sampai saat ini penelitian tentang produksi enzim selulase telah banyak dilakukan mulai yang berasal dari jamur, bakteri, maupun dari kelenjar hewan. Dari segi aktivitas yang dihasilkan, selulase dari jamur memiliki keunggulan tetapi memakan waktu lebih lama untuk memproduksinya.

Selulase dari bakteri mulai banyak dilirik oleh peneliti karena bakteri memiliki fase hidup yang lebih cepat dari pada jamur sehingga diharapkan dapat memproduksi enzim selulase dalam waktu yang singkat.

Biasanya substrat yang digunakan yaitu CM-Cellulose yang merupakan selulosa murni tetapi biaya untuk substrat ini mahal dan sangat berpengaruh pada biaya produksinya (Verma *et al.*, 2012; Trivedi *et al.*, 2011; Arifin *et al.*, 2006). Dalam Ashadi dan Kahar (2011) strategi yang biasa dilakukan untuk menurunkan biaya produksi ke tingkat ekonomis yaitu dengan cara 1) meningkatkan produktivitas enzim, 2) menggunakan substrat yang murah, 3) meningkatkan stabilitas produksi yang baik, dan 4) menghasilkan enzim yang memiliki aktivitas yang tinggi pada substrat spesifik.

Banyak hal yang dilakukan untuk menekan biaya produksi agar menjadi ekonomis contohnya penggunaan substrat yang murah contohnya yaitu limbah lignoselulosa yang masih mengandung banyak selulosa, substrat untuk bakteri selulolitik.

Contoh beberapa penelitian yang menggunakan limbah lignoselulosa sebagai substrat untuk produksi enzim selulase terdapat dalam tabel 2.3.

Semua penelitian tersebut yang menggunakan limbah tidak ada yang melakukan *pretreatment* sebelum menggunakannya untuk substrat. Sedangkan dari beberapa literatur lainnya untuk meningkatkan hidrolisis enzimatik dari selulase dalam mendegradasi selulosa perlu dilakukan *pretreatment* pada biomassa yang mengandung lignin (biomassa lignoselulosa) (Harun *et al.*, 2010; Jeya *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2012; Corredor, 2008; Zhang *et al.*, 2007; Saha *et al.*, 2005).

Oleh karena itu, dalam penelitian kali ini dilakukan *pretreatment* dengan menggunakan beberapa variasi asam ( $H_2SO_4$ ) sebelum limbah tersebut siap untuk digunakan sebagai substrat bagi bakteri isolat 2609.

Tabel 2. 3. *State of the art* penelitian ini

		Substrat yang Digunakan						
		CMC	Kulit Mangga	Sekam Padi	Residu Kacang Kedelai	Molase	Residu Pisang	Limbah Rumput Laut
Sumber Enzim	<i>Bacillus ssp.</i>	(Verma <i>et al.</i> , 2012)			(Heck <i>et al.</i> , 2002)			
	<i>Paenibacillus polymyxa</i>		(Kumar <i>et al.</i> , 2012)					
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>			(Lee <i>et al.</i> , 2008)				
	<i>Bacillus subtilis</i>					(Shabeb <i>et al.</i> , 2010)	(Krishna, Chundakkadu, 1999)	
	<i>Bacillus flexus</i>	(Trivedi <i>et al.</i> , 2011)						
	<i>Bacillus pumilus</i>	(Arifin <i>et al.</i> , 2006)						
	Isolat SGS 2609							(penelitian ini)

## BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN

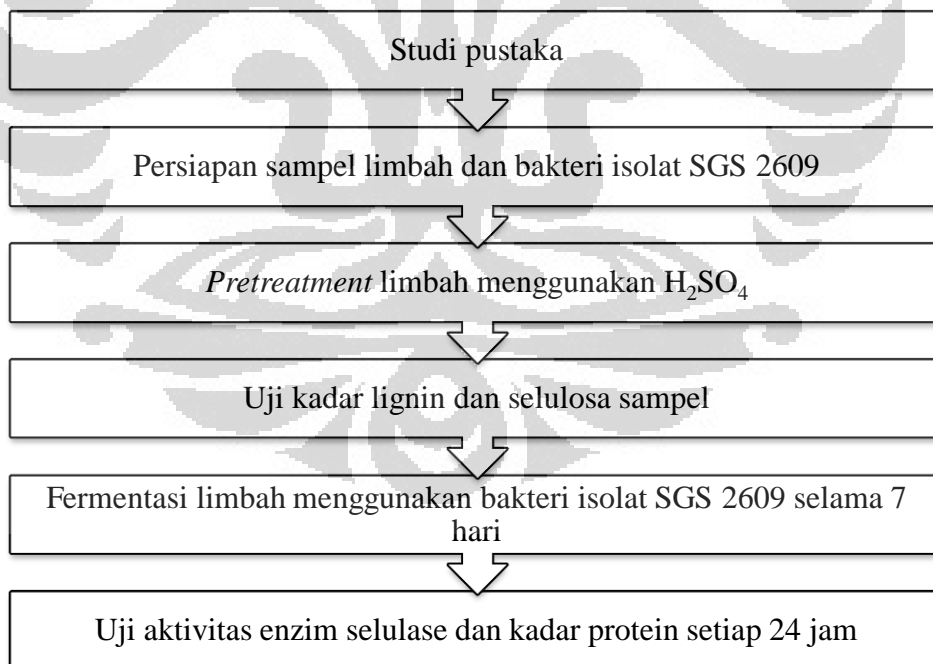
### 3. 1. Diagram Alir Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk membandingkan aktivitas enzim selulase yang diproduksi bakteri isolat SGS 2609 milik BBP4BKP dalam menghidrolisis hasil *pretreatment* limbah rumput laut yang menggunakan empat variasi asam untuk *pretreatment*

Penelitian yang akan dilakukan ini memiliki beberapa tahap yaitu.

1. Studi pustaka
2. Persiapan sampel limbah dan bakteri isolat SGS 2609
3. *Pretreatment* limbah menggunakan  $H_2SO_4$
4. Fermentasi limbah menggunakan bakteri isolat SGS 2609 selama 7 hari.

Diagram alir penelitian ini ditunjukkan pada Gambar 3.1 dibawah ini.



**Gambar 3. 1. Diagram Alir Penelitian**



### 3. 2. Alat dan Bahan

Peralatan dan bahan yang digunakan selama penelitian adalah sebagai berikut:

#### Alat:

1. Labu Erlenmeyer
2. Oven (Memert)
3. Timbangan analitik (Mettler Toledo Model: ML204/02 Type New Classic MF)
4. Timbangan digital (Mettler PE 360 Deltra Range®)
5. *Beaker glass*
6. Gelas ukur
7. Autoklaf (Hirayama Tokyo Japan)
8. Cawan petri
9. *Schott Bottle*
10. Inkubator (GallenKamp)
11. Inkubator statis/goyang (Shel Lab)
12. Kertas saring Whatman No. 42
13. *Magnetic stirrer* (Labinco)
14. *Waterbath*
15. *Micro pipette* dan tip
16. Tabung reaksi
17. Gelas ukur
18. Labu ukur
19. Spektrofotometer *visible* (Spectronic® 20 Genesys™)
20. *Furnace* 6000 (Barnstead Thermolyne)
21. Sentrifuse mikro suhu rendah (Beckman Coulter™ Microfuge® 22 R Centrifuge dan Centurion Scientific K3 Series)
22. *Transfer box* (Labconco Horizontal Clean Bench)
23. Jarum tanam bulat (ose)
24. Alat *refluks* (Barnstead Labline®)
25. *Vortex* (Thermolyne maxi mix plus)
26. Kulkas (Toshiba Glacio dan Samsung Cooltech)

27. Kompor listrik (Maspion)
28. *Hot plate* (Labinco)
29. *Eppendorf* 1,5 ml
30. Kertas pH *universal* (Merck)
31. Corong kaca
32. Pipet volum
33. Kertas timbang
34. Alkohol 70%
35. Parafilm

**Bahan:**

1. Limbah rumput laut
2. Aquades
3.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  98% (Merck)
4. Bakteri isolat SGS 2609
5. *Nutrient Broth* (Oxoid). Komposisi (g/l): 'Lab-Lemco' Powder 1.0; *yeast extract* 2.0; pepton 5.0; NaCl 5.0.
6. *Nutrient Agar* (Oxoid). Komposisi (g/l): 'Lab-Lemco' Powder 1.0; *yeast extract* 2.0; pepton 5.0; NaCl 5.0; agar 15.0.
7. Media cair (w/v): 1% substrat spesifik (CM-Cellulose/limbah); 0,02%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,03%  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; 0,05%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,002%  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,004%  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,2 % ekstrak khamir, dan 0,1% glukosa.
8. *Bovine serum albumin* (BSA) (Merck)
9. Reagen DNS
10. Buffer sitrat fosfat pH 5
11. Reagen Lowry
12. Reagen pewarnaan Gram

### 3.3. Prosedur

Tahapan penelitian dilakukan pada skala laboratorium dengan media bioreaktornya berupa labu erlenmeyer. Yang dilakukan pada penelitian ini yaitu.

#### 3.3.1. Persiapan Sampel Limbah Pengolahan Rumput Laut

Sampel limbah pengolahan rumput laut didapatkan dari industri di daerah Pameungpeuk, Garut untuk jenis limbah rumput laut *Gracillaria sp.* Limbah rumput laut kemudian dicuci lalu dikeringkan setelah itu digiling sampai mendapatkan ukuran sekitar 60-80 Mesh.

#### 3.3.2. Pretreatment Limbah Rumput laut

*Pretreatment* dilakukan dengan menggunakan larutan asam sulfat (seri konsentrasi 0,5; 1; 1,5; 2%). *Pretreatment* dilakukan pada suhu 121°C dalam autoklaf selama 1 jam untuk masing-masing variasi konsentrasi (Ge *et al.*, 2011). Perbandingan sampel dan larutan yang dipakai yaitu 1:5, *pretreatment* dilakukan dalam erlenmeyer 300 mL. Setelah *pretreatment*, sisa asam yang tidak larut dikumpulkan dengan filtrasi dan sesudah itu dicuci sampai pHnya netral dengan air panas lalu dikeringkan dalam oven semalaman dan ditimbang. Percobaan dilakukan dengan pengulangan dua kali.

Limbah juga dianalisis kandungan selulosa dan ligninnya menggunakan metode gravimetri, metode *Chesson* (dalam Datta, 1981).

#### 3.3.3. Peremajaan Isolat SGS 2609

Bakteri yang akan digunakan pada penelitian ini adalah isolat bakteri potensial penghasil selulase hasil isolasi dari limbah pengolahan rumput laut *Sargassum Sp.* yang merupakan isolat koleksi dari BBRP2B-KP.

Peremajaan isolat bakteri terpilih sebagai penghasil enzim selulase dilakukan dengan menumbuhkan isolat bakteri pada media

nutrien agar (NA). Bakteri tersebut diinkubasi di dalam inkubator selama 1 x 24 jam pada suhu 37°C.

Bakteri yang telah dilakukan peremajaan dilakukan pengamatan secara morfologi dengan melakukan pewarnaan Gram yang dilihat dengan menggunakan mikroskop pada perbesaran 1000 x. Pewarnaan Gram dilakukan dengan cara memfiksasi bakteri pada kaca objek gelas dengan menggunakan larutan aquadest yang telah disterilkan di atas api bunsen. Preparat olesan bakteri yang telah difiksasi panas digenangi pewarna ungu kristal violet selama 1 menit, dibilas dengan air, dan ditiriskan. Olesan digenangi iodium Gram selama 1 menit dan dicuci dengan 95% etanol (*decoloration solution*) selama 30 detik sampai pewarna ungu kristal pada preparat tidak terbilas lagi dan dicuci dengan akuades sampai warna olesan menjadi bening. Olesan digenangi kembali dengan larutan safranin selama 1 menit, bilas dengan akuades, ditiriskan sampai kering. Bakteri yang telah diwarnai diamati dengan mikroskop medan terang pada perbesaran 1000 x (Capuccino & Sherman 1983). Hasil pewarnaan Gram isolat PMP 0126y difoto menggunakan mikroskop (Olympus DP12) yang dikerjakan di laboratorium Mikrobiologi, BBP4B-KP.

#### **3.3.4. Produksi Enzim Kasar Selulase Dengan Substrat Limbah Rumput Laut**

Produksi enzim kasar selulase dari isolat bakteri selulolitik terpilih dimulai dengan menyiapkan starter dengan menumbuhkan bakteri ke dalam 10 ml media kaldu nutrient (10% dari media yang lebih besar) kemudian dipindahkan ke dalam 100 ml media limbah (media spesifik). Limbah yang digunakan yaitu yang telah *ditreatment* dengan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, selain itu juga menggunakan limbah yang belum *ditreatment* sebagai kontrol. Percobaan dilakukan dengan pengulangan dua kali dalam dua erlenmeyer yang berbeda.

Kedalam media starter diinokulasikan sekitar 1-2 lup koloni lalu diinkubasi sekitar 12-14 jam setelah itu dituang kedalam media limbah

spesifik. Media pertumbuhan *starter* maupun produksi diinkubasi dan digoyang pada suhu 30°C dengan kecepatan 150 rpm dan setiap harinya diambil sampel sekitar 5 ml untuk diukur banyaknya produksi biomassa yang dihasilkan dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm dan sebagian disentrifuse untuk diambil supernatannya sebagai fraksi enzim ekstrak kasar.

Setrifuse dilakukan pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan hasil sentrifugasi kemudian disimpan pada kulkas dengan suhu 4 °C.

### **3. 4. Analisis Data Penelitian**

#### **3.4.1. Uji Aktivitas Enzim Selulase**

Hasil dan sampling dari prosedur pada subbab 3.3.4. selanjutnya dilakukan pengujian aktivitas enzim dengan menggunakan metode DNS dari Wood (1998) dalam Arifin (2006) yang dimodifikasi. Suspensi sampel disentrifugasi pada suhu 4 °C dan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Supernatannya yang merupakan ekstrak enzim kasar lalu diuji aktivitas enzimnya.

Sebanyak 1,8 ml substrat (1% selulosa CM-Cellulose (Sigma)) ditambah dengan 0,2 ml enzim ekstrak kasar, dikocok kuat dengan vortex, selanjutnya diinkubasi selama 30 menit pada suhu 30°C, aktivitas enzim dihentikan pada air mendidih selama 15 menit. Setelah itu, dari larutan tersebut diambil sebanyak 1 ml dan ditambah dengan 1 ml DNS, dipanaskan di air mendidih selama 15 menit. Absorbansi diukur pada  $\lambda$  575 nm dengan menggunakan spektrofotometer. Perlakuan kontrol dan blanko dilakukan secara bersamaan dengan metode dan tahapan yang sama pada pengujian sampel. Kontrol merupakan enzim yang telah dinaktivasi terlebih dahulu direaksikan dengan substrat, sedangkan blanko tidak menggunakan enzim melainkan menggunakan bufer sitrat fosfat pH 5 yang direaksikan dengan substrat. Aktivitas enzim diukur pada

setiap sampling yang dilakukan sehingga diketahui waktu optimum produksi enzim selulase.

Aktivitas selulase dinyatakan dalam satuan internasional yaitu U/ml. Satu unit merupakan jumlah enzim yang dibutuhkan untuk memecah 1  $\mu$ mol selulosa menjadi gula pereduksi per menit pada kondisi pengujian. Aktivitas enzim dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\text{Aktivitas selulase (U/ml)} = \text{konsentrasi glukosa sampel} \times \frac{1000}{V \times t \times \text{BM}} \quad (3.1)$$

$$\text{Konsentrasi glukosa sampel: } ((A_s - A_b) - (A_k - A_b)) \quad (3.2)$$

Keterangan :  $A_s$  = Absorbansi sampel       $A_b$  = Absorbansi blanko

$A_k$  = Absorbansi kontrol       $V$  = volume enzim (0,2 mL)

$t$  = waktu inkubasi       $\text{BM}$  = Bobot molekul glukosa (180)

Aktivitas enzim selulase dalam memecah selulosa menjadi glukosa dapat ditentukan melalui persamaan yang diperoleh dari kurva standar glukosa.

Kurva standar glukosa dibuat dengan pembuatan larutan glukosa dengan berbagai konsentrasi (0 mg/ml sampai 0,4 mg/ml). Pembuatan larutan glukosa dengan variasi konsentrasi yang berbeda dilarutkan dalam buffer sitrat fosfat pH 5, masing-masing 1 ml dalam tabung reaksi lalu ditambahkan 1 ml reagen DNS. Setiap larutan kemudian dipanaskan dalam *waterbath* dengan suhu 100°C selama 15 menit. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 575 nm.

### 3.4.2. Pengukuran Kadar Protein Total

Pengukuran kadar protein total bertujuan untuk mengukur seberapa banyak kandungan protein yang terdapat dalam enzim ekstrak kasar (supernatan) menggunakan metode Lowry yang telah dimodifikasi.

Bahan yang digunakan pada metode Lowry adalah sebagai berikut:

1. Larutan A yaitu 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Merck) dalam 0,1 N NaOH (Merck);
2. Larutan B yaitu 2% Natrium Kalium Tartrat (Merck) dalam aquades;
3. Larutan C yaitu 1%  $\text{CuSO}_4$ (Merck) dalam aquades; dan
4. 1 N Reagen Folin – Ciocalteu (Merck) (melarutkan Folin-Ciocalteu 2 N dalam aquades dengan perbandingan 1:1).

Tahapan metode Lowry ini yaitu:

1. Pembuatan larutan biuret yang terdiri dari larutan A, B, dan C dengan perbandingan 100:1:1. Larutan biuret ini dibuat ketika akan melakukan pengukuran kadar protein (*fresh* saat ingin digunakan).
2. Sampel enzim ekstrak kasar sebanyak 50  $\mu\text{L}$  ditaruh kedalam tabung reaksi lalu ditambahkan 1 mL larutan biuret, divorteks lalu didiamkan selama 10 menit. Hal ini dilakukan agar protein dapat bereaksi dengan tembaga dalam suasana basa.
3. Setelah 10 menit, ditambahkan larutan Folin sebanyak 0,1 mL, divorteks dan didiamkan selama 30 menit. Pada tahap ini terjadi reduksi senyawa fosfomolibdat-fosfotungstat oleh tembaga yang berikatan dengan protein yang mengakibatkan larutan berubah warna menjadi biru.
4. Pembuatan larutan standar protein dari *Bovine Serum Albumin* (BSA) dengan variasi konsentrasi 0-0,6 mg/mL dengan interval 0,05, buffer sitrat fosfat pH 5 digunakan sebagai blanko. Variasi konsentrasi BSA dilarutkan kedalam buffer sitrat fosfat sampai volumenya 0,5 mL lalu ditambahkan larutan biuret 1 mL, divorteks dan didiamkan 10 menit, lalu ditambahkan larutan Folin 0,1 mL, divorteks dan didiamkan 30 menit.
5. Analisis kuantitatif dilakukan dengan menggunakan instrumen Spektrofotometer *visible* (Spectronic<sup>®</sup> 20 Genesys<sup>™</sup>) pada panjang gelombang 750 nm.

### 3.4.3. Uji Kandungan Lignin dan Selulosa

Kandungan lignin dan selulosa pada limbah diketahui dengan cara gravimetric yaitu dengan metode *Chesson* (dalam Datta, 1981).

Langkah-langkahnya yaitu:

1. Satu gram (a) sampel kering ditambahkan 150 mL aquades dan direfluks pada suhu 100°C selama satu jam. Hasilnya disaring, residu padatnya dicuci dengan air panas (300 mL). Residu padatnya kemudian dikeringkan dengan oven sampai beratnya konstan kemudian ditimbang (b).
2. Residu padatnya ditambahkan 150 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N kemudian direfluks selama 1 jam suhu 100°C. Hasilnya disaring sampai pHnya netral menggunakan air mendidih setelah itu dikeringkan dalam oven sampai beratnya konstan (c).
3. Residu padat lalu ditambahkan 10 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% dan direndam pada suhu kamar selama 4 jam. Ditambahkan 150 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N dan direfluks selama 1 jam pada pendingin balik. Residu disaring dan dicuci dengan air mendidih sampai pHnya netral kemudian dipanaskan dengan oven dengan suhu 105°C dan hasilnya ditimbang (d) selanjutnya residu diabukan lalu ditimbang (e).

Perhitungan kadar selulosa dan lignin sebagai berikut:

$$\text{kadar selulosa} = \frac{c-d}{a} \times 100\% \quad (3.3)$$

$$\text{kadar lignin} = \frac{d-e}{a} \times 100\% \quad (3.4)$$

### 3.5. Tempat dan Waktu Penelitian

Tempat : Laboratorium Bioteknologi, Laboratorium Mikrobiologi, Laboratorium Kimia, dan Laboratorium Pengolahan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan

Waktu : Februari - Mei 2012



## BAB 4

### HASIL DAN PEMBAHASAN

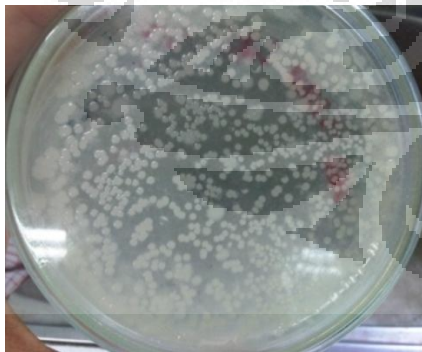
#### 4.1. Peremajaan Bakteri Isolat SGS 2609

Peremajaan ini dilakukan agar bakteri yang akan digunakan nantinya masih aktif (hidup) dan tidak mati karena itu inkubasi dilakukan hanya 24 jam. Peremajaan bakteri dapat dilakukan dalam media padat atau cair disesuaikan dengan kebutuhannya.

Isolat SGS 2609 ini diremajakan dalam media nutrisi agar (Oxoid) dengan komposisi kandungan Lab-Lemco powder 1 gr/L; ekstrak khamir 2 g/L; pepton 5 gr/L; NaCl 5 gr/L serta agar 15 gr/L.

Stok isolat yang ada disimpan dalam media cair nutrisi kaldu, sebelum dapat siap dipakai untuk prosedur selanjutnya dilakukan pengenceran terlebih dahulu dalam aquades steril dengan pengenceran  $10^{-5}$  lalu ditanam ke dalam media nutrisi agar dan didapatkan hasil koloni bakteri yang dapat dilihat pada Gambar 4.1.

Setelah itu, dilakukan *streak* dengan mengambil sedikit koloni dari yang ada pada gambar 4.1 ke media agar lainnya untuk mendapatkan koloni tunggal yang nantinya siap untuk diinokulasikan ke dalam media cair.



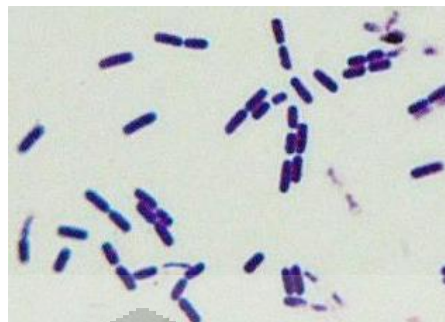
Gambar 4.1. Koloni bakteri isolat SGS 2609 dengan pengenceran  $10^{-5}$



Gambar 4.2. Hasil *streak* pada media agar

Setelah itu dilakukan pewarnaan Gram untuk mengetahui bentuk morfologi bakteri dan jenis Gramnya. Hasil pewarnaan Gram dilihat

dengan menggunakan mikroskop (Olympus DP12) dengan perbesaran 1000 x (Gambar 4.3).



**Gambar 4. 3. Hasil pewarnaan Gram pada isolat SGS 2609**

Sampel bakteri yang digunakan untuk pewarnaan Gram ini yaitu yang umurnya belum sampai atau sama dengan 24 jam dikarenakan pada bakteri tersebut dinding selnya masih belum mengeras sehingga dapat secara optimal menyerap reagen Gram yang diberikan. Pewarnaan Gram ini menentukan komposisi membran sel suatu bakteri. Dapat dilihat dari gambar 4.3 bahwa bakteri isolat SGS 2609 berbentuk batang dan merupakan jenis Gram positif karena berwarna ungu yang menandakan lapisan peptidoglikan yang tebal dan kandungan lemak yang tidak terlalu banyak (Modul Praktikum Mikrobiologi, 2008).

#### **4. 2. Pretreatment Limbah Rumput Laut**

Sampel limbah pengolahan rumput laut didapatkan dari industri di daerah Pameungpeuk, Garut untuk jenis limbah rumput laut *Gracillaria sp.* Sampel masih mengandung banyak air sehingga perlu dilakukan penjemuran terlebih dahulu. Penjemuran dilakukan dibawah terik matahari dan memerlukan waktu 6 hari sampai kering. Berat kering yang didapatkan yaitu sekitar 2 kg.

Sebelum sampel siap digunakan lebih lanjut, sampel dikecilkan ukurannya terlebih dahulu dengan penggilingan sampai didapatkan ukuran sekitar 60-80 mesh. Pengecilan ukuran bertujuan untuk memperbesar luas permukaan sampel agar proses degradasi selulosa oleh enzim dan lignin oleh  $H_2SO_4$  menjadi lebih tinggi.



**Gambar 4. 4. Sampel sebelum dikeringkan**



**Gambar 4. 5. Sampel setelah dikeringkan dan digiling**

Komposisi dari sampel limbah tersebut bukan hanya ada rumput lautnya saja tetapi juga terdapat pengotor lainnya berupa garam-garaman hasil buangan dari proses produksi serta lignoselulosa dari daun-daunan ataupun serpihan kayu hasil buangan. Dengan menggunakan metode *Chesson* (dalam Datta, 1981) didapatkan kadar selulosa dan lignin dalam sampel limbah tersebut yaitu 18,83% selulosa dan 15,625% lignin. Dalam tabel 2.1 (Sumber: Kim *et al*, 2010), dengan jenis alga *Glacilaria*, terdapat penurunan persentasi selulosa dan peningkatan kadar lignin. Karena masih mengandung cukup selulosa, limbah ini berpotensi menjadi substrat bagi bakteri selulolitik isolat SGS 2609.

Pada material lignoselulosa, selulosa, hemiselulosa dan lignin membentuk suatu struktur kristal yang menghambat ketersediaan karbohidrat untuk langkah hidrolisis berikutnya. Untuk membebaskan polisakarida, perlu dilakukan *pretreatment* yang tepat dalam memisahkan setiap komponen tersebut (Harun *et al*, 2010).

Jeya *et al* (2010) mengatakan bahwa biomassa yang mengandung lignin tidak dapat dihidrolisa oleh enzim selulase tanpa prosedur *pretreatment* karena lignin merupakan inhibitor bagi enzim. Pendegradasian kadar lignin dalam biomassa juga dilakukan oleh Zhao *et al* (2012) untuk meningkatkan efektivitas aktivitas hidrolisis enzim selulase.

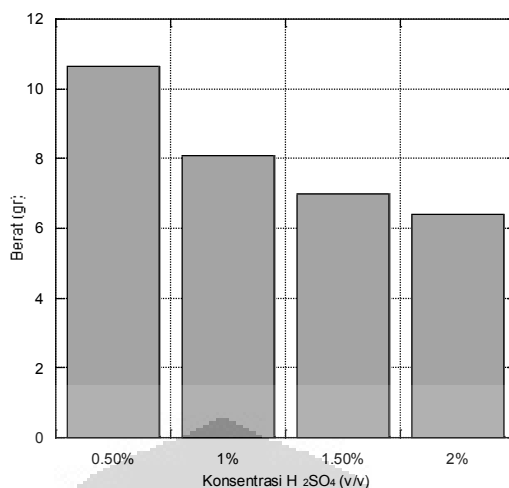
Pretreatment merupakan proses untuk konversi selulosa dan sangat penting sebelum hidrolisis enzimatik dapat terjadi secara efektif. Hal ini diperlukan untuk mengubah struktur selulosa biomassa agar selulosa lebih

mudah diakses oleh enzim yang mengkonversi polimer karbohidrat menjadi gula reduksi. Tujuan dari *pretreatment* ini adalah untuk membuka segel lignin, hemiselulosa, dan melarutkan hemiselulosa serta mengganggu struktur kristal selulosa (Corredor, 2008).

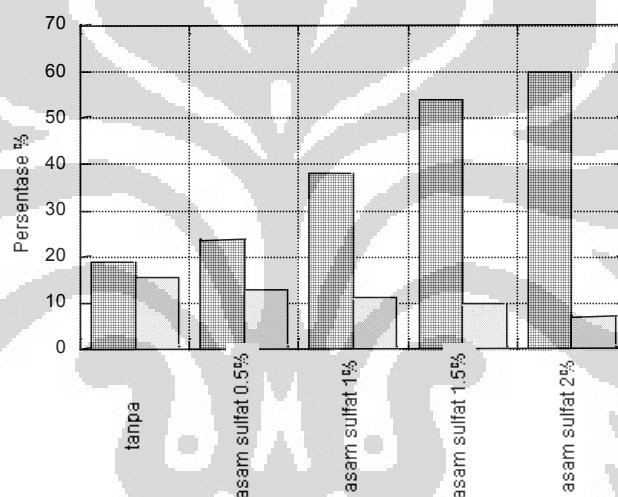
Oleh karena itu sebelum siap untuk menjadi substrat, limbah rumput laut dilakukan *pretreatment* menggunakan  $H_2SO_4$  dengan 4 variasi konsentrasi (v/v). Dalam Zhang *et al* (2007) dan Saha *et al* (2005) menyatakan bahwa *pretreatment* asam menggunakan  $H_2SO_4$  ditemukan efektif dalam membantu hidrolisis enzimatis selulosa.

Dalam penelitian ini, 15 gram sampel limbah dipretreatment menggunakan  $H_2SO_4$  dengan empat variasi konsentrasi (v/v) 0.5%, 1%, 1.5%, dan 2%. *Pretreatment* dilakukan dengan perbandingan pencampuran sampel dalam larutan  $H_2SO_4$  sebesar 1:5 (w/v) dan dilakukan dalam autoklaf suhu  $121^\circ C$  selama 1 jam. Residu dipisahkan dari larutan dengan cara disaring menggunakan kertas saring Whatman No. 42. Residu dicuci sampai pH menjadi netral menggunakan air (aquades) mendidih lalu residu dikeringkan dalam oven selama seharian dan ditimbang berat akhir dari sampel. Residu lalu diuji untuk mengetahui seberapa besar kandungan lignin dan selulosa, filtrat hasil penyaringan juga dicek kadar gula pereduksinya menggunakan metode DNS (Ariffin, 2006).

Dari data yang didapatkan bahwa seiring dengan meningkatnya konsentrasi  $H_2SO_4$  yang diberikan, berat akhir sampel menjadi semakin kecil (Gambar 4.6.). Menggunakan Metode Chesson (dalam Datta, 1981), diketahui kadar selulosa dan lignin pada sampel yang belum ditreatment adalah 18,83% dan 15,625%. Setelah *pretreatment* dilakukan, semakin meningkat konsentrasi  $H_2SO_4$  yang diberikan, kadar lignin semakin rendah dan sebaliknya dengan kadar selulosa yang semakin meningkat (Gambar 4.7.).



**Gambar 4. 6. Berat akhir limbah setelah ditreatment dengan empat variasi konsentrasi H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**



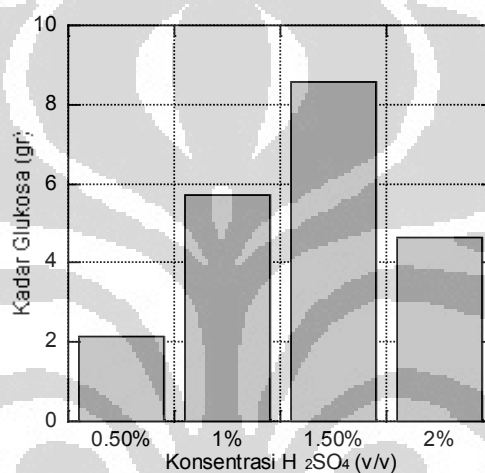
**Gambar 4. 7. Grafik kadar selulosa dan lignin limbah; persentase per 1 gram sampel dengan (■) selulosa; dan (▨) lignin.**

Hasil pengecekan terhadap filtrat juga dilakukan untuk mengetahui apakah terdapat glukosa akibat perlakuan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Didapatkan bahwa semakin tinggi konsentrasi H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> yang diberikan, glukosa yang terlepas dalam filtrat semakin tinggi (Gambar 4.8.) tetapi terjadi penurunan kadar glukosa pada konsentrasi H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2%. Hal ini menandakan bahwa bukan hanya lignin yang terdegradasi melainkan terdapat selulosa dan hemiselulosa yang terdegradasi sehingga ada glukosa yang terlarut pada filtrat (Corredor, 2008).

*Pretreatment* dengan asam khususnya H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> selain digunakan untuk menghilangkan kadar lignin biasanya juga digunakan dalam proses

hidrolisis lignoselulosa menjadi monosakarida untuk pembuatan biofuel (Meinita *et al*, 2011 dan 2012, Harmsen *et al*, 2010). Asam terlarut ini selain mengnacurkan lignin juga dapat menghancurkan hemiselulosa dan sebagian kecil selulosa yang tedapat dalam biomassa tersebut .

Tetapi seiring dengan terdapatnya glukosa dalam filtrat, kadar selulosa juga semakin meningkat sehingga dapat disimpulkan bahwa adanya glukosa yang terkandung dalam filtrat tidak terlalu signifikan dibandingkan dengan terbentuknya selulosa akibat pengerusakan struktur lignin oleh *pretreatment* dengan asam terlarut.



**Gambar 4. 8. Kadar glukosa dalam filtrat**

Selain hancurnya struktur lignin dan akses ke selulosa menjadi lebih besar, terdapat produk sampingan akibat *pretreatment* oleh H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Produk sampingan dari proses ini diantaranya yaitu senyawa fenol (dari degradasi lignin), turunan furan (furfural dan HMF) dari gula yang terdegradasi, dan asam alfalik (asam asetat, asam format, dan asam levulinik) (Corredor, 2008; Harmsen, 2010). Produk sampingan tersebut akan meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi asam yang diberikan.

#### 4. 3. Hidrolisis Limbah Menggunakan Bakteri Isolat SGS 2609

Untuk pertumbuhannya, bakteri memerlukan nutrisi dengan memanfaatkan senyawa yang terdapat disekitarnya. Sumber energi utama untuk bakteri yaitu karbon yang biasanya didapatkan dari sumber organik

(glukosa) dan CO<sub>2</sub> (Todar). Ada banyak cara dalam memenuhi kebutuhan energi pada setiap jenis bakteri, hal tersebut akhirnya membuat kelompok sendiri bagi bakteri berdasarkan cara mendapatkan makanannya contohnya bakteri fotoautotof, fotoheterotrof, kemoautotrof, dan kemoheterotrof (Todar). Tetapi mayoritas bakteri merupakan kemoheterotrof yang mendapatkan sumber energinya dari senyawa organik.

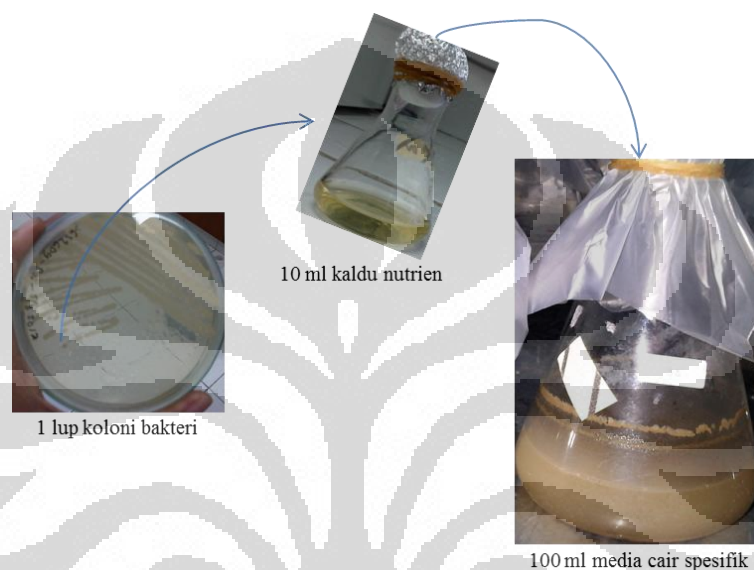
Bakteri biasanya menghasilkan beberapa enzim tertentu yang dapat merubah senyawa organik menjadi sumber energi siap pakai bagi mereka. Tidak terkecuali yaitu bakteri selulolitik (bakteri pemecah selulosa). Bakteri selulolitik biasa hidup pada lingkungan yang terdapat banyak selulosa yang membuat dirinya mengsekresikan enzim selulase untuk dapat memecah selulosa tersebut menjadi glukosa. Enzim sendiri merupakan produk yang dihasilkan oleh bakteri dalam proses adaptasinya terhadap lingkungan untuk tetap bertahan hidup (Todar).

Sumber karbon memainkan peran penting dalam produksi selulase yang dihasilkan oleh bakteri Hal ini karena enzim diproduksi berdasarkan jenis sumber karbon yang digunakan, enzim yang dihasilkan akan mempunyai sifat spesifik berdasarkan substrat yang digunakan. Biaya substrat yang tinggi dapat menjadi faktor pembatas dalam produksi enzim (Ariffin *et al*, 2008). Oleh karena itu pemilihan substrat dengan biaya yang rendah menjadi sangat penting, sehingga dipilihlah limbah pengolahan rumput laut ini sebagai substrat enzim selulase dari bakteri selulolitik isolat SGS 2609.

Penelitian telah dilakukan oleh Ariffin *et al* (2008) yaitu *pretreatment* dapat menghilangkan lignin sehingga membuat enzim selulase dapat mudah berikatan dengan substrat (selulosa). Hal ini yang menjadikan pertimbangan untuk membandingkan proses hidrolisis menggunakan limbah yang sudah dipretreatment dan yang belum.

Tahapan dalam hidrolisis ini yaitu, pertama-tama satu koloni bakteri yang sebelumnya telah dilakukan peremajaan dalam media agar diinokulasikan kedalam media cair nutrien kaldu (komposisi (g/l): 'Lab-Lemco' Powder 1.0; yeast extract 2.0; pepton 5.0; NaCl 5.0) (volumenya

sebanyak 10% dari media cair spesifik) selama 12 jam setelah itu dituang kedalam media cair yang lebih spesifik yang terdiri dari: 1% substrat spesifik (limbah); 0,02%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0,03%  $NH_4NO_3$ ; 0,05%  $K_2HPO_4$ ; 0,1%  $KH_2PO_4$ ; 0,002%  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0,004%  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ; 0,2 % ekstrak khamir, dan 0,1% glukosa. Pada tahap ini dilakukan pengulangan dua kali setiap variasi substrat yang berbeda. Ilustrasi dari langkah tersebut dapat dilihat pada gambar 2.8.



**Gambar 4. 9. Ilustrasi tahapan hidrolisis limbah menggunakan isolat SGS 2609**



**Gambar 4. 10. Media cair spesifik yang berisi variasi substrat dalam labu erlenmeyer**

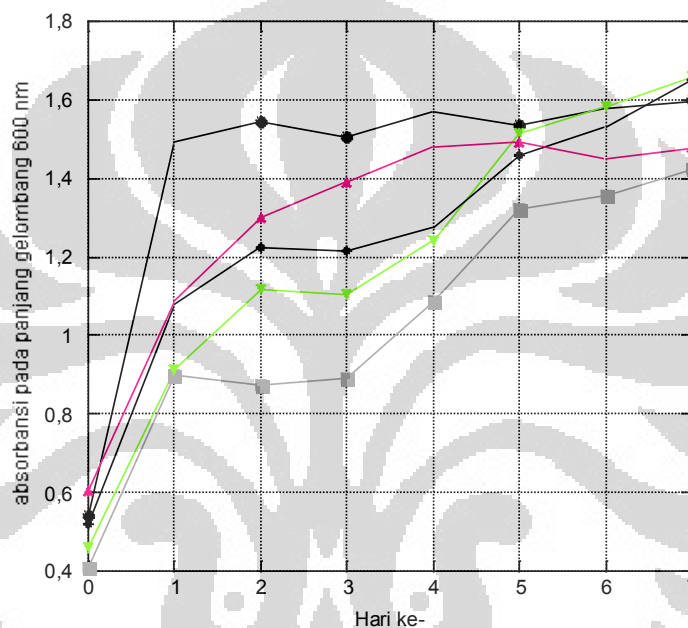
Proses fermentasi hidrolisis dilakukan dalam inkubator goyang dengan kecepatan 150 rpm dan pada suhu  $30^{\circ}C$ . Suspensi bakteri yang telah ditumbuhkan dalam kaldu nutrien selama 12 jam tersebut lalu dituang kedalam media spesifik. Proses fermentasi hidrolisis ini dilakukan selama 7 hari dan setiap hari dilakukan sampling untuk kurva pertumbuhan, aktivitas selulase, dan kadar protein total.

Bakteri ditumbuhkan dalam media nutrien kaldu (volume 10% dari media spesifik) bertujuan untuk memperbanyak jumlah bakteri yang



nantinya akan dituang kedalam media cair spesifik agar bakteri tersebut kemungkinan beradaptasinya lebih tinggi dan tidak mati.

Sampling mulai dilakukan dari hari ke-0, dihari saat suspensi dari nutrien kaldu baru dituang ke medium spesifik. Jumlah produksi biomassa yang dihasilkan setiap 24 jam sekali dicek kadar kekeruhan larutannya menggunakan spektrofotometer pada absorbansi 600 nm, blanko merupakan medium awal sebelum ditambahkan bakteri. Hasil pengecekan yang dilakukan selama 7 hari dapat dilihat pada gambar 4.11. dibawah ini.



**Gambar 4. 11. Kurva produksi biomassa bakteri isolat SGS 2609 dalam kelima variasi substrat limbah rumput laut: (●) tanpa pretreatment; (■) dipretreatment dengan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5%; (▼) dipretreatment dengan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1%; (▲) dipretreatment dengan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,5%; (◆) dipretreatment dengan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2%**

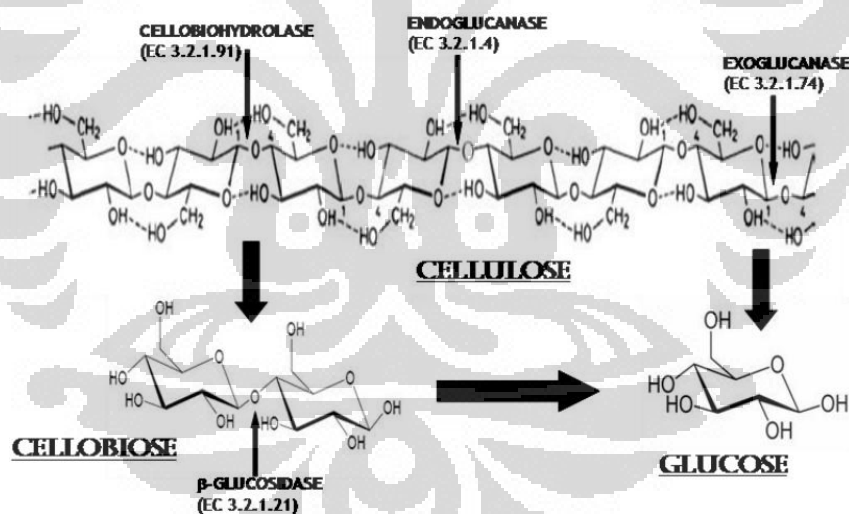
Dari kurva produksi biomassa tersebut dapat dilihat bahwa sampai hari ke-7 mayoritas masih terdapat peningkatan. Dari kelima variasi yang dilakukan, pada medium yang substratnya tidak dilakukan *pretreatment* menunjukkan kurva yang lebih tinggi dan lebih stabil daripada keempat variasi lainnya.

Dan dari kurva tersebut didapatkan bahwa bakteri isolat SGS 2609 dapat beradaptasi dengan baik dan dapat tumbuh dalam media spesifik yang diberikan. Hal ini dikarenakan bakteri mensekresikan enzim yang berguna untuk mendapatkan sumber energi bagi bakteri tersebut yaitu

selulase (karena mayoritas komposisi medium spesifik adalah selulosa). Untuk komposisi selulosa substrat yang ditambahkan dalam media spesifik tersebut dapat dilihat pada tabel 4.1. Selulosa yang terdapat dalam media cair tersebut dipecah oleh enzim selulase yang nantinya menghasilkan glukosa untuk sumber energi bakteri.

#### 4. 4. Aktivitas Enzim Selulase Isolat SGS 2609

Inkubasi yang dilakukan selama tujuh hari tersebut dilakukan untuk mengecek aktivitas enzim selulase dan kadar protein total yang dihasilkan. Aktivitas diukur dari jumlah glukosa yang dihasilkan oleh enzim ekstrak kasar karena enzim selulase bekerja untuk memutus ikatan glikosidik pada selulosa menjadi glukosa (dimana selulosa adalah polimer dengan monomernya yaitu selobiase yang merupakan gabungan dari dua unit glukosa). Mekanisme pemutusan rantai pada selulosa oleh enzim selulase diilustrasikan pada gambar 4.12. dibawah ini.



Gambar 4. 12. Skema tahap-tahap hidrolisis selulosa secara enzimatik (Morana *et al*, 2011)

Setiap hari dilakukan pengambilan sampel sebanyak 3 ml dari masing-masing suspensi media dengan variasi substrat yang berbeda kedalam eppendorf kapasitas 1,7 ml selanjutnya disentrifuse pada 10.000 g selama 10 menit dengan suhu 4°C. Sampel enzim yang telah disentrifuse tersebut merupakan sampel enzim ekstrak kasar yang akan dianalisis kadar protein total dan aktivitas enzim selulasenya. Sentrifuse dilakukan untuk memisahkan bakteri dari supernatannya. Enzim selulase merupakan enzim

ekstraseluler sehingga yang diambil adalah supernatan dari proses sentrifuse tadi. Komponen enzim terbanyak merupakan protein yang rentan terhadap suhu sehingga saat sentrifugasi suhu dipertahankan dalam keadaan rendah yaitu 4°C sekaligus agar menginaktifkan enzim protease yang juga terdapat dalam supernatan agar enzim selulase yang ada tidak rusak.

Setelah suspensi bakteri tersebut disentrifuse dan supernatannya dipisahkan dari endapannya, untuk uji aktivitas perlu adanya ekstrak enzim yang diinaktivasi agar dapat dibandingkan kadar glukosanya dengan glukosa yang dihasilkan selama inkubasi 30 menit. Sekitar 0,5 ml supernatan (dalam eppendorf) dipanaskan dalam *waterbath* selama 15 menit setelah itu didinginkan.

Uji aktivitas selulase menggunakan enzim aktif untuk sampel, enzim inaktif sebagai kontrol, dan buffer sitrat fosfat pH 5 sebagai blanko. Sebanyak 1,8 ml substrat untuk uji (1% CM-Cellulose (Merck) dalam 1,8 ml buffer sitrat fosfat pH 5) dicampur dengan 0,2 ml masing-masing dengan enzim aktif, inaktif, dan buffer. Lalu diinkubasi selama 30 menit untuk mengetahui berapa kadar glukosa yang dihasilkan dalam waktu tersebut.

Untuk mengetahui aktivitas selulase digunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas selulase (U/ml)} = \text{konsentrasi glukosa sampel} \times \frac{1000}{V \times t \times BM} \quad (4.1)$$

Dimana konsentrasi glukosa didapatkan dengan rumus:

$$\text{Absorbansi glukosa sampel: } ((A_s - A_b) - (A_k - A_b)) \quad (4.2)$$

Dari rumus absorbansi glukosa sampel diatas, lalu dimasukkan kedalam persamaan yang didapatkan dari kurva standar glukosa untuk mendapatkan konsentrasi glukosa dalam sampel. Persamaan untuk mendapatkan konsentrasi glukosa sampel yaitu:

$$\text{konsentrasi glukosa} = \frac{\text{absorbansi glukosa sampel} + 0,056}{1,851} \quad (4.3)$$

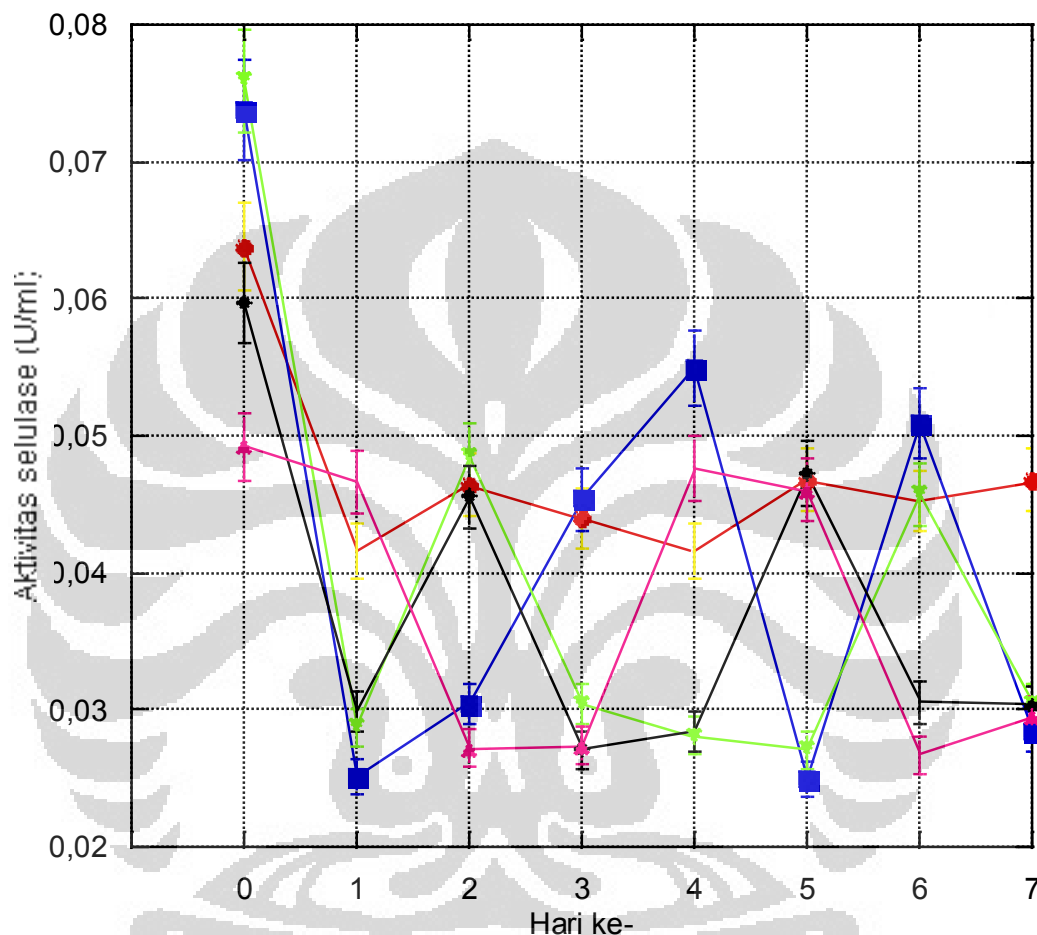
Dengan tingkat linearitas kurva standar yaitu 0,990.

Keterangan :  $A_s$  = Absorbansi sampel       $A_b$  = Absorbansi blanko

$A_k$  = Absorbansi kontrol       $V$  = volume enzim (0,2 mL)

$t$  = waktu inkubasi       $BM$  = Bobot molekul glukosa (180)

Hasil perhitungan aktivitas enzim selulase dengan variasi media substrat yang difermentasi selama 7 hari dapat dilihat pada gambar 4.13 dibawah ini.



Gambar 4. 13. Grafik aktivitas enzim selulase dengan substrat limbah rumput laut selama 7 hari menggunakan variasi substrat: (●) tanpa pretreatment; (■) dipretreatment dengan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5%; (▼) dipretreatment dengan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1%; (▲) dipretreatment dengan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,5%; (◆) dipretreatment dengan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2%

Pada hari ke-0, saat suspensi dari nutrisi kaldu baru dituang ke dalam media spesifik, menghasilkan aktivitas selulase paling tinggi dibandingkan dari hari lainnya. Tetapi pada hari tersebut tidak dapat dijadikan kesimpulan karena tujuan dari penelitian ini adalah untuk memproduksi enzim selulase menggunakan media spesifik.

Dari kelima variasi substrat yang digunakan, aktivitas selulase paling tinggi yaitu pada substrat yang telah dipretreatment dengan 0,5%

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ketika hari ke-4 yaitu sebesar 0,0549 U/ml. Untuk aktivitas selulase dengan substrat limbah tanpa *pretreatment* justru lebih rendah dibandingkan dengan yang dengan perlakuan 0,5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> padahal kurva pertumbuhan bakteri dalam substrat limbah tanpa *pretreatment* paling tinggi dibanding yang lain. Hipotesis sementara yang didapatkan yaitu bakteri isolat SGS 2609 ini juga menghasilkan enzim lain contohnya ligninase karena pada limbah yang belum *dipretreatment* kadar lignin masih tinggi tetapi penulis belum juga mendapatkan literatur yang kasusnya mirip dengan hal ini (Komunikasi pribadi, 2012).

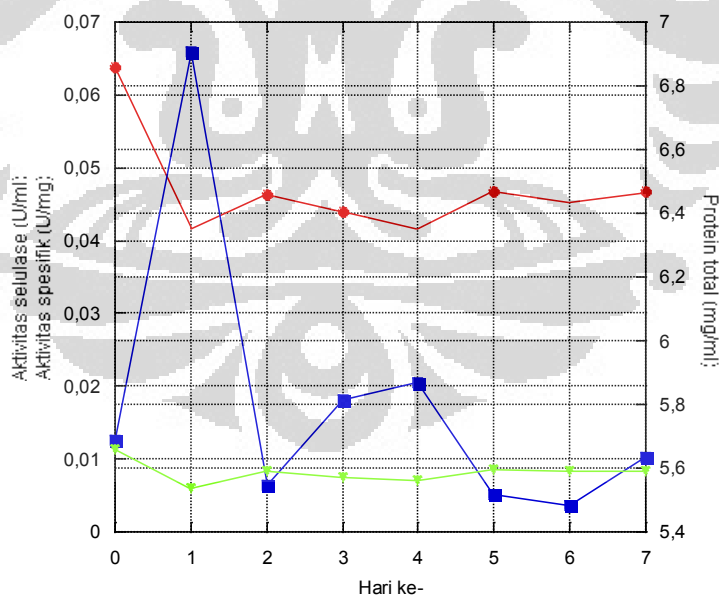
Penelitian terhadap limbah pengolahan rumput laut juga dilakukan oleh Ge *et al* (2011) dan juga menggunakan *pretreatment* H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Dalam penelitiannya, aktivitas selulase paling tinggi juga dihasilkan dengan limbah yang telah *dipretreatment* dengan 0,5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dibandingkan dengan variasi konsentrasi lainnya (variasi konsentrasi yang digunakan yaitu 0; 0,1; 0,2; 0,5; dan 1%).

Dari sub bab 4.3. sebelumnya bahwa proses *pretreatment* menggunakan asam terlarut ini menghasilkan beberapa produk sampingan seperti fenol (dari degradasi lignin), turunan furan (furfural dan HMF) dari gula yang terdegradasi serta asam alfalik (asam asetat, asam format, dan asam levulinik) yang jumlahnya akan meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi asam yang diberikan (Corredor, 2008). Dari beberapa literatur, produk sampingan tersebut merupakan inhibitor bagi enzim sehingga semakin meningkatnya konsentrasi asam yang diberikan semakin tinggi juga tingkat inhibitorynya bagi enzim (Corredor, 2008; Harmsen, 2010; Meinita, 2012). Hal ini yang mengakibatkan rendahnya aktivitas selulase untuk substrat limbah yang *dipretreatment* dengan variasi konsentrasi H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1%; 1,5%; dan 2%. Dimana bila masih terdapat lignin yang tinggi (substrat dengan limbah tanpa *pretreatment*) juga dapat menjadi inhibitor bagi enzim (Taherzadeh and Karimi, 2008), yang membuat aktivitas selulase menjadi lebih rendah.

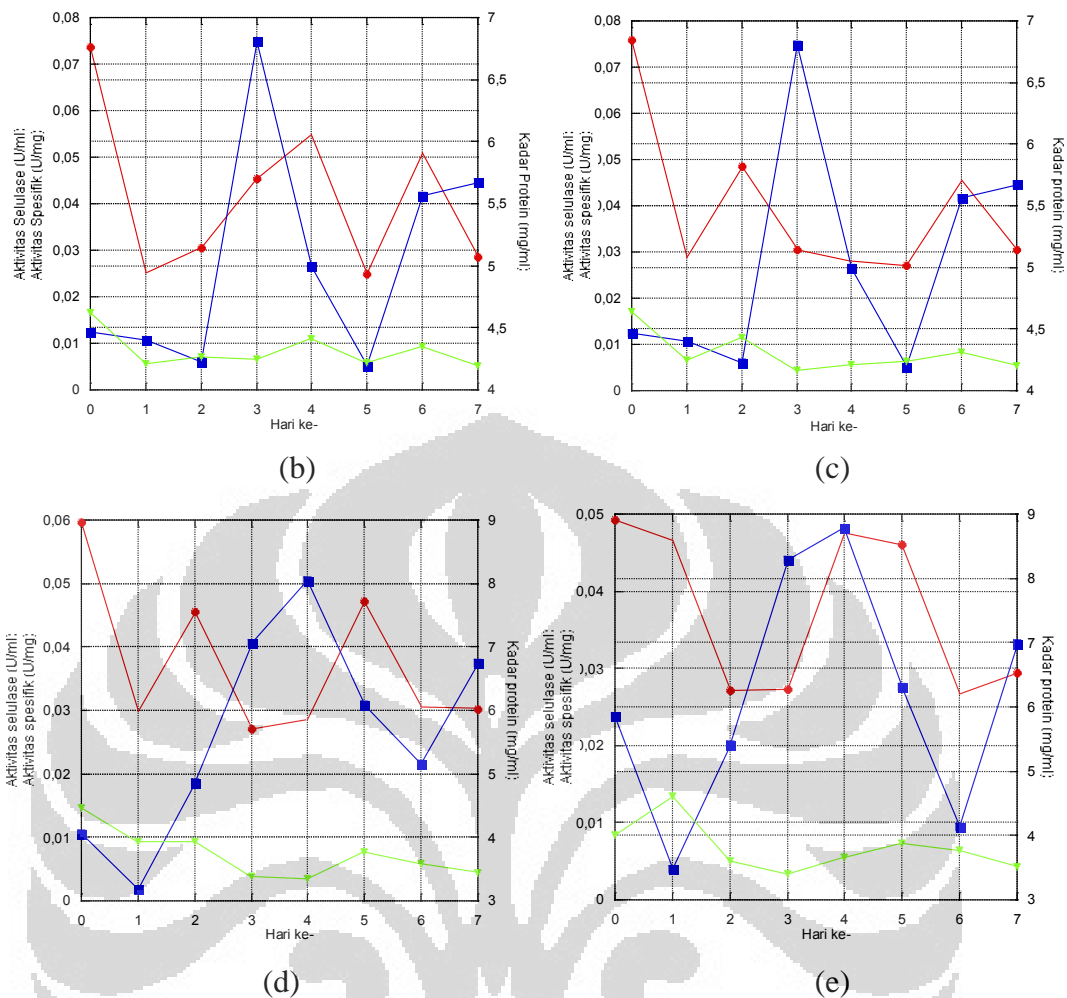
Enzim selulase yang dihasilkan oleh bakteri selulolitik merupakan respon dari bakteri untuk beradaptasi dan dapat tumbuh dalam lingkungan

tersebut. Pada gambar 4.13. didapatkan bahwa untuk setiap variasi substrat terdapat fluktuasi aktivitas enzim selulase. Penjelasan tentang fenomena ini yaitu disaat kadar glukosa dalam media berkurang, bakteri merespon untuk mensintesis enzim selulase agar dapat memecah selulosa dalam lingkungan menjadi glukosa, yang menghasilkan aktivitas enzim selulase pada saat ini menjadi meningkat. Dan pada saat kebutuhan akan glukosa terpenuhi, bakteri merespon untuk tidak mensintesis enzim selulase yang membuat saat itu aktivitas enzim selulase menurun. Fenomena ini seperti *switch off-on*, karena sebetulnya dihasilkannya enzim selulase oleh bakteri untuk dapat bertahan dan tumbuh dalam lingkungan yang terdapat selulosa (komunikasi pribadi, 2012).

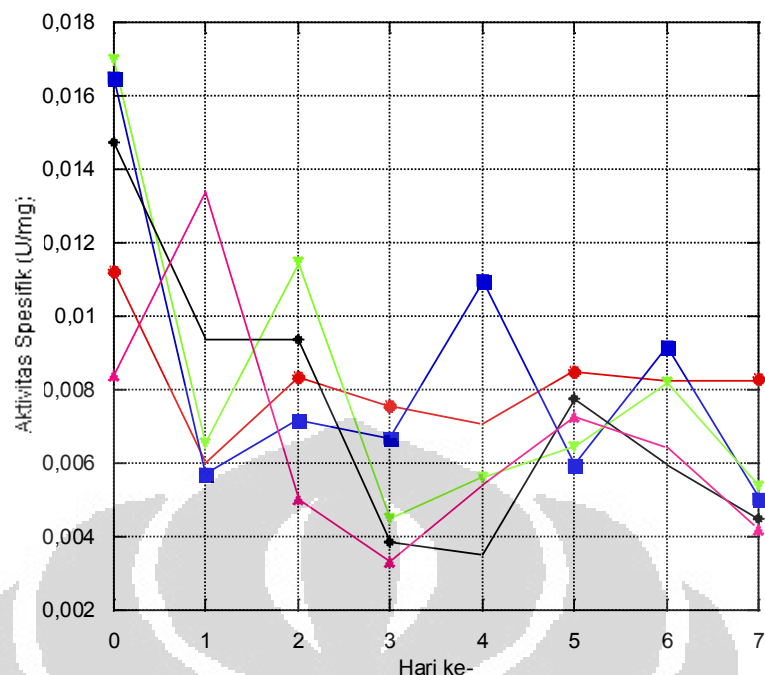
Dalam menentukan kondisi yang terbaik untuk memproduksi enzim selulase selanjutnya tidak hanya dilihat dari seberapa besar aktivitas enzim selulase yang dihasilkan tetapi juga dilihat dari aktivitas spesifik yang merupakan perbandingan dengan seberapa banyak protein total yang dihasilkan. Gambar 4.14 adalah kurva representatif gabungan dari aktivitas selulase, aktivitas spesifik, dan protein total pada kelima variasi substrat.



(a)



**Gambar 4. 14.** Grafik aktivitas selulase, aktivitas spesifik, dan kadar protein total pada kelima variasi medium limbah spesifik dengan (a) substrat limbah tanpa *pretreatment*; (b) substrat limbah *dipretreatment* dengan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5%; (c) substrat limbah *dipretreatment* dengan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1%; (d) substrat limbah *dipretreatment* dengan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,5%; dan (e) substrat limbah *dipretreatment* dengan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2%. Keterangan simbol: (●) aktivitas selulase, (■) kadar protein total; (▼) aktivitas spesifik



**Gambar 4. 15.** Grafik aktivitas spesifik pada kelima variasi medium limbah spesifik: (●) tanpa pretreatment, (■) dipretreatment dengan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5%; (▼) dipretreatment dengan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1%; (◆) dipretreatment dengan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,5%; dan (▲) dipretreatment dengan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2%

Pada grafik dengan substrat yang dipretreatment dengan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5%, aktivitas selulase tertinggi terdapat pada hari ke-4 yaitu sebesar 0,0549 U/ml dan bila dilihat aktivitas spesifiknya, pada hari ke-4 bakteri tersebut memproduksi enzim selulase paling banyak diantara hari lainnya untuk substrat yang sama (ditunjukkan oleh tingginya aktivitas spesifik).

Aktivitas spesifik menentukan seberapa besar kemurnian enzim spesifik yang diinginkan yang dihasilkan oleh bakteri, dalam hal ini adalah enzim selulase.

Sehingga diperoleh kesimpulan bahwa kondisi optimum untuk produksi enzim selulase dari bakteri isolat SGS 2609 ini yaitu dengan substrat limbah yang dipretreatment H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5% pada hari ke-4 dengan aktivitas selulase sebesar 0,0549 U/ml dan aktivitas spesifik sebesar 0.011 U/mg.



## **BAB 5**

### **PENUTUP**

#### **5.1. Kesimpulan**

Beberapa kesimpulan yang didapatkan dari penelitian ini yaitu.

1. Limbah yang *dipretreatment* dengan  $H_2SO_4$  akan menghasilkan aktivitas lebih besar dibandingkan yang tidak *dipretreatment*.
2. Aktivitas selulase tertinggi yaitu pada substrat limbah yang *dipretreatment* dengan  $H_2SO_4$  0,5%.
3. Kondisi optimum untuk produksi enzim selulase dari bakteri isolat SGS 2609 ini yaitu dengan substrat limbah yang *dipretreatment*  $H_2SO_4$  0,5% pada hari ke-4 dengan aktivitas selulase sebesar 0,0549 U/ml dan aktivitas spesifik sebesar 0.011 U/mg.

#### **5.2. Saran**

Beberapa saran yang didapatkan dari penelitian ini yaitu.

1. Perlu dilakukan pengecekan terhadap enzim-enzim lainnya yang dihasilkan oleh bakteri isolat SGS 2609 ini, seperti enzim ligninase dan hemiselulase.
2. Perlu adanya optimasi konsentrasi substrat limbah dalam medium.
3. Karakterisasi terhadap enzim selulase yang dihasilkan perlu dilakukan.
4. Perbandingan aktivitas selulase dengan substrat yang *dipretreatment* menggunakan NaOH, apakah lebih besar atau lebih kecil, juga perlu dilakukan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, “*Plant Structure and Function*”,  
[http://sci.waikato.ac.nz/farm/content/plantstructure.html#cellulose\\_and\\_lignin](http://sci.waikato.ac.nz/farm/content/plantstructure.html#cellulose_and_lignin) (16 Februari 2012).
- Anonim, “*Pupuk Ramah Lingkungan dari Rumput Laut*”,  
<http://benihikan.net/teknologi/pupuk-ramah-lingkungan-dari-rumput-laut/>  
(16 Februari 2012)
- Anonim, 2011, “*Mengembangkan Sumber Energi Alternatif Terbaru*”,  
<http://artikelterbaru.com/teknologi/mengembangkan-sumber-energi-alternatif-terbaru-2011689.html> (15 Februari 2012).
- Anonim, 2009, “*Kualitas Karaginan Memburuk*”,  
[http://www.trobos.com/show\\_article.php?rid=13&aid=1798](http://www.trobos.com/show_article.php?rid=13&aid=1798) (13 Februari 2012).
- Anonim., 2010, “*Rumput Laut Ciptakan 500 Produk Komersial*”,  
<http://buanasumsel.com/rumput-laut-ciptakan-500-produk-komersial/> (13 Februari 2012).
- Anonim, 2011, “*Produksi Rumput Laut Lampau Target*”,  
<http://perikanan.sidoarjo.go.id/berita-121--produksi-rumput-laut-lampau-target.html> (13 Februari 2012).
- Ariffin, H., Hassan, M., Shah, U. K., Abdullah, N., Ghazali, F. M., and Shirai, Y. 2008. Production of bacterial endoglucanase from pretreated oil palm empty fruit bunch by *Bacillus pumilus* EB3. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106, 231-236.
- Ashadi, R. W. dan Kahar, P., 2011, “*Kompleks Enzim Selulase: Kunci Pemanfaatan Limbah Organik Menjadi Biofuel*”,  
[http://io.ppijepang.org/v2/index.php?option=com\\_k2&view=item&id=404:kompleks-enzim-selulase-kunci-pemanfaatan-limbah-organik-menjadi-biofuel](http://io.ppijepang.org/v2/index.php?option=com_k2&view=item&id=404:kompleks-enzim-selulase-kunci-pemanfaatan-limbah-organik-menjadi-biofuel) (12 Februari 2012).
- Balat, M. (2011). Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energi Conversion and Management*, 858-875.

- Boudet, A. M., Kajita, S., Grima-Pettenati, J., and Gofner, D. 2003. Lignin and lignocellulosics: a better control of synthesis for new and improved uses. *Trends in Plant Science*, 8, 576-581.
- Budiono, E., 2008, “Produksi Rumput Laut Naik 10%”, <http://economy.okezone.com/read/2008/08/15/19/137208/produksi-rumput-laut-naik-10> (13 Februari 2012).
- Corredor, D. 2008. Pretreatment and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. New York: ProQuest LLC.
- Data, R. 1981. Acidogenic fermentation of lignocellulose-acid yield and conversion of components. *Biotechnology and Bioengineering* 23(9): 2167-2170.
- Demirbas, F. M., Balat, M. dan Balat, H. 2011. Biowastes-to-Biofuels. *Energy Conversion and Management*, 52, 1815-1828.
- Galbe, M., & Zacchi, G. (2007). Pretreatment of Lignocellulosic Materials for Efficient Bioethanol Production. *Adv Biochem Engin/Biotechnol*, 108, 41-65.
- Ge, L., Wang, P., dan Mou, H. 2011. Study on saccharification techniques of seaweed wastes for the transformation of ethanol. *Renewable Energy*, 36, 84-89.
- Hammel, K. E. 1997. Fungal degradation of lignin. Dalam: Cadisch G, Giller KE, Editor. *Driven by Nature: Plant Litter Quality and Decomposition*. London: CAB International, 33-45.
- Harmsen, P., Huijgen W., Bermudez, L., and Bakker, R. 2010. Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass. Wageningen UR Food & Biobased Research, 1184.
- Harun, R., Jason, W. S. Y., Cherrington, T., dan Danquah, M. K. 2010. Microalgal biomass as a cellulosic fermentation feedstock for bioethanol production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*.
- Istini, S., Zalnika, A., dan Suhaimi. 1985. Manfaat dan Pengolahan Rumput Laut. *Seafarming Workshop Report Bandar Lampung*. WBL/85/WP - 14.
- Jana-Anggadiredjo, 2006. *Rumput Laut*. Jakarta: Penebar Swadaya.

- Jang, J., Cho, Y., Jeong, G., dan Kim, S. (2012). Optimization of saccharification and ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from seaweed, *Saccharina japonica*. *Bioprocess Biosyst Engineering*, 11-18.
- Jeffries, T. 1994. Biodegradation of lignin and hemicelluloses. Dalam: *Biochemistry of microbial degradation*, C. Ratledge (ed.). Netherlands: Kluwer Academic Publisher.
- Jeya, M., Nguyen, N., Moon, H., Kim, S., and Lee, J. 2010. Conversion of woody biomass into fermentable sugars by cellulase from *Agaricus arvensis*. *Bioresource Technology*, 101, 8742-8749.
- John, R. P., Anisha, G. S., Nampoothiri, K. M., dan Pandey, A. 2011. Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. *Bioresource Technology*, 102, 186-193.
- Kim, G. S., Shin, M., Kim, Y., Kim, J. S., Ryu., dan Kim, K. H. 2010. *Patent No. US 2010/0124774 A1*. South Korea.
- Kim, N., Li, H., Jung, K., Chang, H. N., dan Lee, P. C. 2011. Ethanol Production From Marine Algal Hydrolysates Using *Escherichia coli* KO11. *Bioresource Technology*, 102, 7466-7469.
- Meinita, M. D. N., Kang, J., Jeong, G., Koo, H., Park, S., and Hong, Y. 2011. Bioethanol production from the acid hydrolysate of the carrageenophyte *Kappaphycus alvarezii* (cottonii). *J. Appl. Phycol*, DOI 10.1007/s10811-011-9705-0.
- Meinita, M. D. N., Hong, Y., dan Jeong, G. 2012. Comparison of Sulfuric and Hydrochloric Acids as Catalysts in Hydrolysis of *Kappaphycus alvarezii* (Cottonii). *Bioprocess Biosyst. Eng*, 35, 123-128.
- Mussatto, S. I. 2010. Technological trends, global market, and challenges of bioethanol production. *Biotechnology Advances*, 28, 817-830.
- Morana, A. M. 2011. Cellulase from fungi and bacteria and their biotechnological applications. In A. E. Golan, *Cellulase: types and action, mechanism, and uses* (p. 6). New York: Nova Science Publishers, Inc.
- Mosier, N., C. Wyman. 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 96(6): 673-686.

- Najafpour, G., Younesi, H., dan Ismail, K. S. K. (2004). Ethanol Fermentation in an Immobilized Cell Reactor Using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*, 251-260.
- Pandey, A. P. 2004. *Consise Encyclopedia of Bioresource Technology*. New York: The Haworth Press.
- Penyusun. 2008. Petunjuk Praktikum Mikrobiologi Dasar. Purwokerto: Fakultas Biologi Universitas Jenderal Soedirman.
- Philippidis, G. P. 1991. Evaluation of The Current Status of The Cellulase Production Technology. *Biofuel Information Center*.
- Philippidis, G. P. 1994. Cellulase Production Technology; Evaluation of Current Status. In *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production* (pp. 188-217). American Chemical Society.
- Pikukuh, P., 2011, "Selulosa, Komponen yang Paling Banyak Ditemukan di Alam", <http://blog.ub.ac.id/supat/2011/03/14/hello-world/> (16 Februari 2012).
- Rahmat, 2011, "Melirik Potensi Rumput Laut Aceh", <http://harian-aceh.com/2011/11/19/melirik-potensi-rumput-laut-aceh-2> (15 Februari 2012).
- Saha, B. C. 2004. Lignocellulose biodegradation and application in biotechnology. US Government Work. American Chemical Society. 2-14.
- Saha, B.C., Cotta, M.A. 2006. Ethanol production from alkaline peroxide pretreated enzymatically saccharified wheat straw. *Biotechnol. Progr.* 22, 449-453.
- Sekarsari, I. D. 2003. *Seleksi Isolat Bakteri Rumen (Anaerob) Penghasil Karboksi Metil Selulase*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Suryaningrum, T. D., 2011, "Teknologi Penanganan Rumput Laut", <http://rumputlautindonesia.blogspot.com/2011/07/teknologi-penanganan-rumput-laut.html> (15 Februari 2012).
- Taherzadeh, M., and Karimi, K. 2008. Pretreatment of lignocellulose wastes to improve ethanol and biogas production: a review. *International Journal of Molecular Sciences*, 9, 1621-1651.

- Talebnia, F. 2008. *Ethanol Production from Cellulosic Biomass by Encapsulated Saccharomyces cerevisiae*. Goteborg, Sweden: Chalmers University of Technology.
- Todar, Kenneth, “Nutrition and Growth of Bacteria”, <http://textbookofbacteriology.net/nutgro.html> (19 Juni 2012).
- Triwisari, D. A, Ulfana, P. D., dan Diptasari, A. 2009. *Potensi limbah industri rumput laut sebagai bahan baku alternatif pembuatan bioetanol di indonesia; Program Kreativitas Mahasiswa*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Yanagisawa, M., Nakamura, K, Ariga, O., dan Nakasaki, K. 2011. Production of high concentrations of bioethanol from seaweeds that contains easily hydrolyzable polysaccharides. *Process Biochemistry*, 46, 2111-2116.
- Yunasfi. 2008. *Serangan Patogen dan Gangguan Terhadap Proses Fisiologis Pohon*. Universitas Sumatera Utara.
- Zatnika, A. 2009. *Pedoman Teknis Budidaya Rumput Laut*. BPPT.
- Zhang, Y.H.P., Ding, S.Y., Mielenz, J.R., Cui, J.B., Elander, R.T., Laser, M., Himmel, M.E., McMillan, J.R., Lynd, L.R. 2007. Fractionating recalcitrant lignocellulose at modest reaction conditions. *Biotechnol. Bioeng.* 97, 214–223.
- Zhao, L., Cao, G., Wang, A., Ren, H., Dong, D., Liu, Z., Guan, X., Xu, C., and Ren, N. 2012. Fungal pretreatment of cornstalk with *Phanerochaete chrysosporium* for enhancing enzymatic saccharification and hydrogen production. *Bioresource Technology*, 114, 365-369.

## LAMPIRAN

### A. *Pretreatment* Limbah Pengolahan Rumput laut

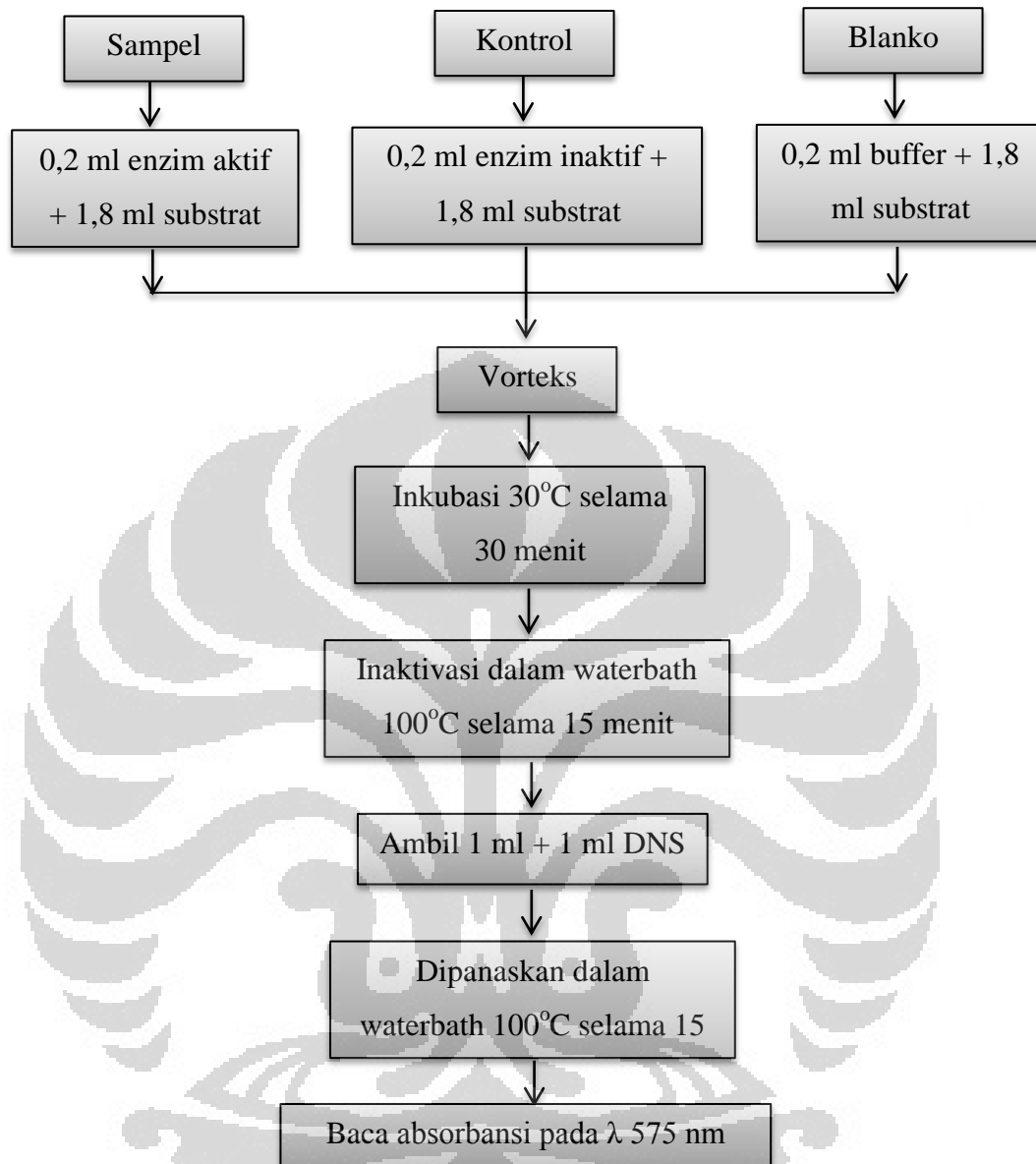
Berat akhir limbah setelah ditreatment dengan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> yaitu.

Konsentrasi H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (v/v)	Berat (gr)		
	Awal	Akhir	Terdegradasi
0,5%	15	10,654	4,346
1%	15	8,084	6,916
1,5%	15	6,977	8,023
2%	15	6,395	8,605

### B. Kadar Selulosa dan Lignin Sampel Limbah

Variasi	Selulosa (%/gr)	Lignin (%/gr)
Tanpa treatment	18,83	15,625
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.5%	23,41	12,87
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1%	38,24	11,435
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1.5%	53,99	10,075
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2%	59,99	7,065

### C. Alur Kerja Uji Aktivitas Selulase



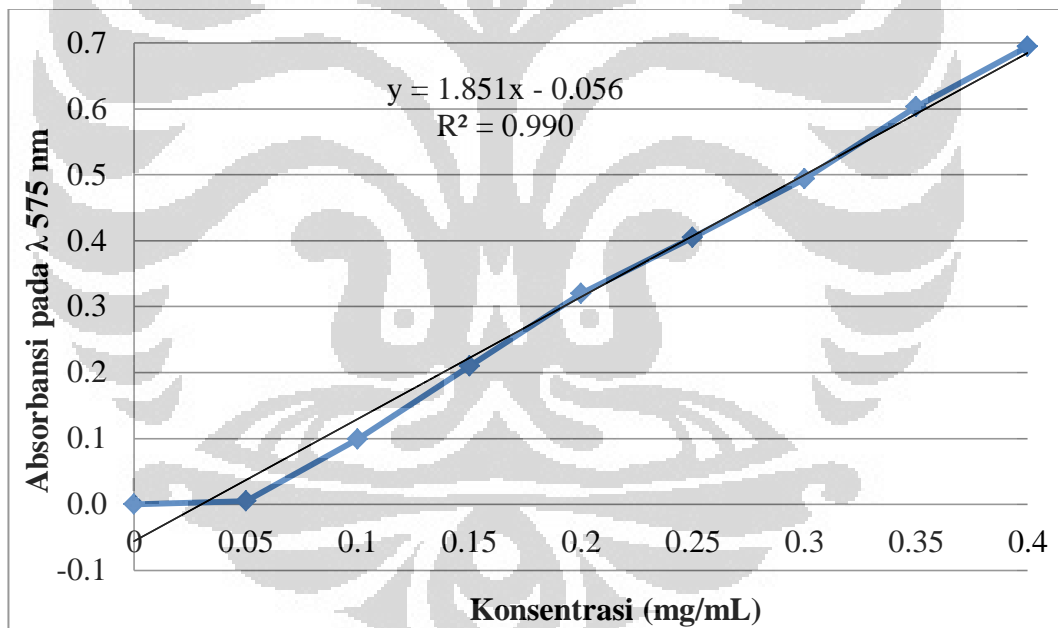
### D. Kurva Standar Glukosa

Larutan standard glukosa merupakan glukosa (Merck) yang dilarutkan dalam aquadest dengan variasi konsentrasi dari 0-0,4 mg/ml. 1 ml larutan glukosa dengan konsentrasi tertentu ditambahkan reagen DNS 1 ml lalu dipanaskan dalam *waterbath* 100°C selama 15 menit lalu dibaca absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 575 nm.



Reagen DNS terdiri dari 18.2% natrium kalium tartarate (Merck), 0.2% fenol (Merck), 0.05% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck), 1% NaOH (Merck), dan 1% 3,5-dinitrosalicylic acid (Sigma) dengan perbandingan berat per volum untuk kelima bahan tersebut.

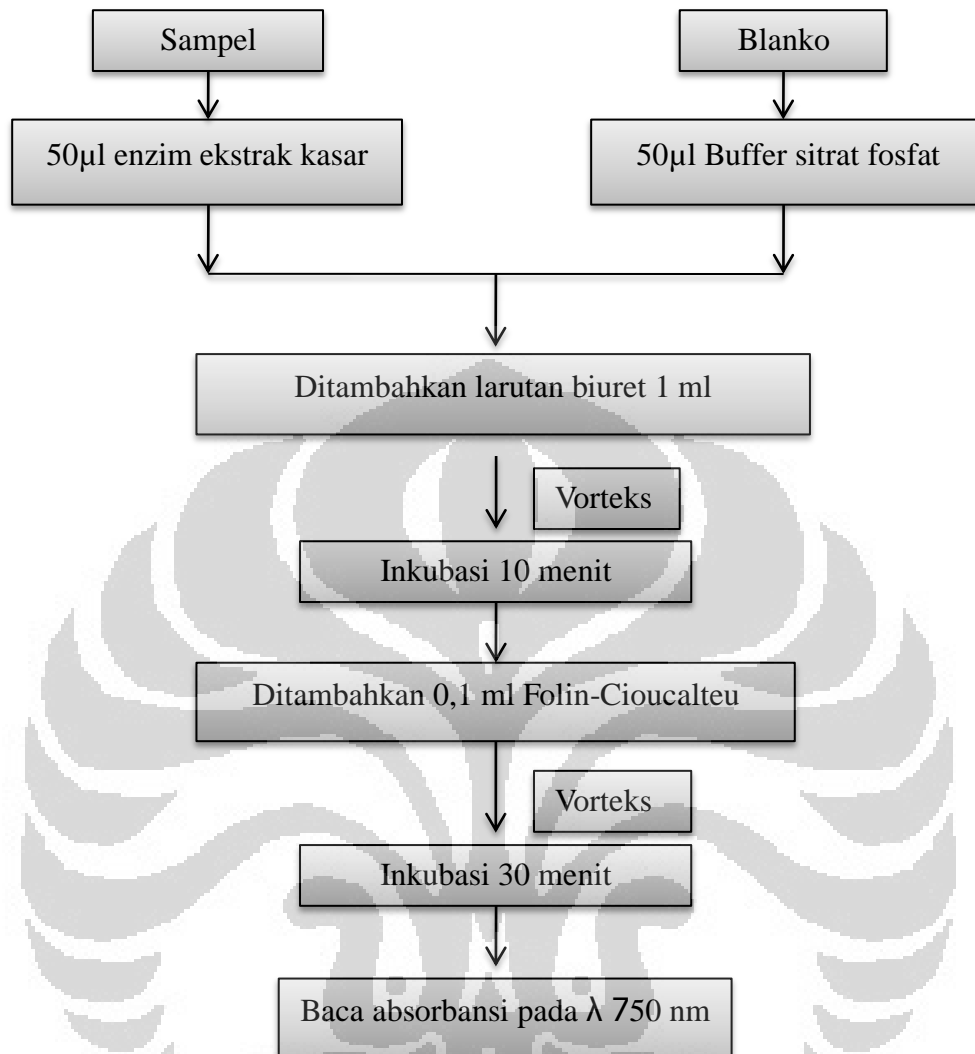
Konsentrasi (mg/mL)	Absorbansi
0	0,000
0,05	0,006
0,1	0,099
0,15	0,210
0,2	0,320
0,25	0,405
0,3	0,494
0,35	0,603
0,4	0,695



Dari data yang didapatkan untuk standard glukosa ini memiliki kemiringan 0,990 dengan persamaan  $y = 1,851x - 0,056$  dengan x merupakan konsentrasi glukosa (mg/ml) dan y absorbansi yang terbaca oleh spektrofotometer pada  $\lambda$  575 nm. Sehingga didapatkan persamaan untuk mengetahui konsentrasi glukosa dalam sampel yaitu.

$$x = \frac{y + 0,056}{1,851}$$

### E. Alur Kerja Kadar Protein Total

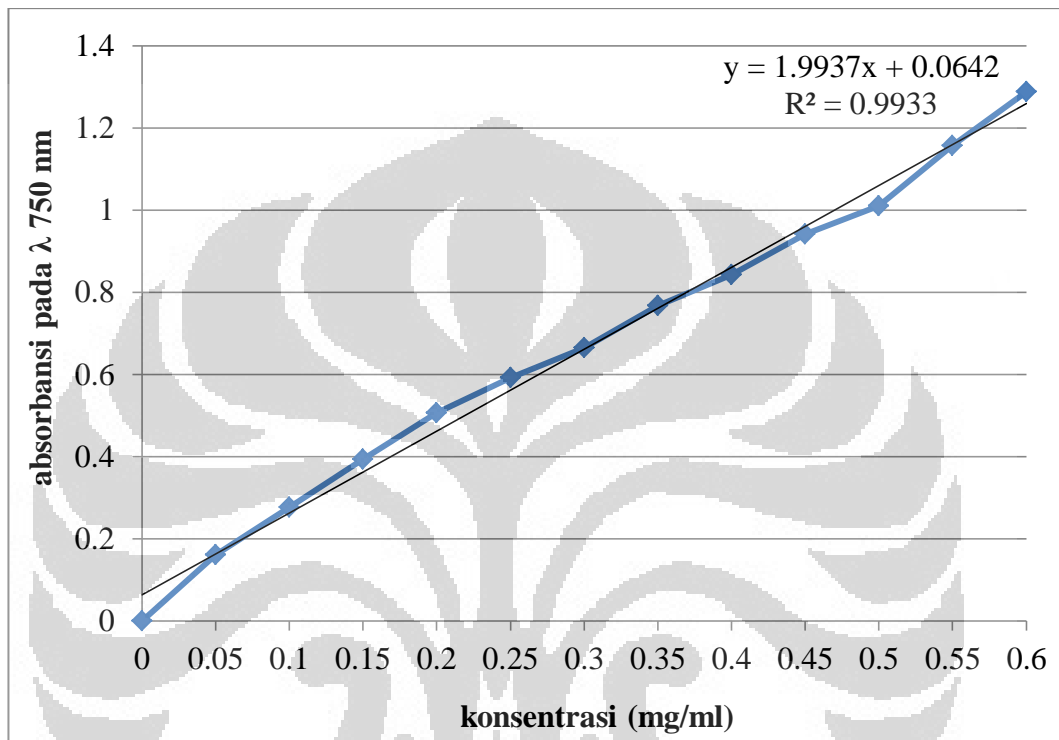


### F. Kurva Standar Protein

Pembuatan larutan standar protein dari *Bovine Serum Albumin* (BSA) dengan variasi konsentrasi 0-0,6 mg/mL dengan interval 0,05, buffer sitrat fosfat pH 5 digunakan sebagai blanko.

Konsentrasi (mg/ml)	Absorbansi
0	0
0,05	0,162
0,1	0,277
0,15	0,394
0,2	0,507
0,25	0,593
0,3	0,665

0,35	0,768
0,4	0,844
0,45	0,942
0,5	1,011
0,55	1,158
0,6	1,289



Dari data yang didapatkan untuk standar protein ini memiliki kemiringan 0,9933 dengan persamaan  $y = 1,9937x + 0,0642$  dengan  $x$  merupakan konsentrasi protein (mg/ml) dan  $y$  absorbansi yang terbaca oleh spektrofotometer pada  $\lambda$  750 nm. Sehingga didapatkan persamaan untuk mengetahui konsentrasi protein terlarut dalam sampel yaitu.

$$x = \frac{y - 0,0642}{1,9937}$$

## G. Data Aktivitas Selulase, Protein Total, dan Aktivitas Spesifik

### 1. Substrat limbah tanpa pretreatment

Hari ke-	Aktivitas selulase (U/ml)	Protein total (mg/ml)	Aktivitas spesifik (U/mg)
0	0,0638	5,688	0.01122
1	0,0416	6,908	0.00602
2	0,0464	5,548	0.00837
3	0,0439	5,813	0.00756
4	0,0416	5,868	0.00709
5	0,0468	5,518	0.00848
6	0,0452	5,486	0.00825
7	0,0468	5,633	0.00830

### 2. Substrat limbah dengan pretreatment H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5%

Hari ke-	Aktivitas selulase (U/ml)	Protein total (mg/ml)	Aktivitas spesifik (U/mg)
0	0.07379	4.4705	0.01651
1	0.02509	4.4005	0.00570
2	0.03046	4.233	0.00720
3	0.04536	6.8055	0.00667
4	0.05488	4.998	0.01098
5	0.02496	4.1905	0.00596
6	0.05100	5.568	0.00916
7	0.02846	5.6755	0.00502

### 3. Substrat limbah dengan pretreatment H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1%

Hari ke-	Aktivitas selulase (U/ml)	Protein total (mg/ml)	Aktivitas spesifik (U/mg)
0	0.07590	4.4705	0.01698
1	0.02871	4.4005	0.00652
2	0.04854	4.233	0.01147
3	0.03046	6.8055	0.00448
4	0.02809	4.998	0.00562
5	0.02709	4.1905	0.00646
6	0.04572	5.568	0.00821
7	0.03046	5.6755	0.00537

**4. Substrat limbah dengan pretreatment H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.5%**

<b>Hari ke-</b>	<b>Aktivitas selulase (U/ml)</b>	<b>Protein total (mg/ml)</b>	<b>Aktivitas spesifik (U/mg)</b>
0	0.05969	4.053	0.01473
1	0.02984	3.188	0.00936
2	0.04560	4.868	0.00937
3	0.02709	7.0555	0.00384
4	0.02846	8.053	0.00353
5	0.04724	6.0955	0.00775
6	0.03059	5.153	0.00594
7	0.03021	6.743	0.00448

**5. Substrat limbah dengan pretreatment H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2%**

<b>Hari ke-</b>	<b>Aktivitas selulase (U/ml)</b>	<b>Protein total (mg/ml)</b>	<b>Aktivitas spesifik (U/mg)</b>
0	0.04924	5.8605	0.00840
1	0.04666	3.4755	0.01342
2	0.02721	5.408	0.00503
3	0.02734	8.2855	0.00330
4	0.04760	8.773	0.00543
5	0.04607	6.3205	0.00729
6	0.02671	4.143	0.00645
7	0.02946	6.9955	0.00421