



UNIVERSITAS INDONESIA

**OPTIMASI PRODUKSI ENZIM SELULASE DARI  
*BACILLUS* sp. BPPT CC RK2 DENGAN VARIASI pH DAN SUHU  
MENGUNAKAN *RESPONSE SURFACE METHODOLOGY***

**SKRIPSI**

**CHANDRA PASKA BAKTI  
0806460420**

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



UNIVERSITAS INDONESIA

**OPTIMASI PRODUKSI ENZIM SELULASE DARI  
*BACILLUS* sp. BPPT CC RK2 DENGAN VARIASI pH DAN SUHU  
MENGUNAKAN *RESPONSE SURFACE METHODOLOGY***

**SKRIPSI**


**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Teknik  
program studi Teknologi Bioproses, Departemen Teknik Kimia**

**CHANDRA PASKA BAKTI  
0806460420**

**FAKULTAS TEKNIK  
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI BIOPROSES  
DEPOK  
JANUARI 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 : Chandra Paska Bakti  
NPM : 0806460420  
Tanda Tangan :   
Tanggal : 4 Januari 2012

## HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh

Nama : Chandra Paska Bakti  
NPM : 0806460420  
Program Studi : Teknologi Bioproses  
Judul Skripsi : Optimasi Produksi Enzim Selulase dari *Bacillus* sp.  
BPPT CC RK2 dengan Variasi pH dan Suhu  
Menggunakan *Response Surface Methodology*

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 : Dr. Ing. Ir. Misri Gozan, M.Tech. (  )  
Pembimbing : Dr. Siswa Setyahadi, M.Sc. (  )  
Penguji : Prof. Dr. Ir. Anondho Wijanarko, M.Eng. (  )  
Penguji : Prof. Ir. Sutrasno Kartohardjono, M.Sc., Ph.D. (  )  
Penguji : Dr. Heri Hermansyah, S.T., M.Eng. (  )

Ditetapkan di : Depok  
Tanggal : 24 Januari 2012

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Tuhan Yesus Kristus, yang oleh karena pertolongan dan kasih karunia-Nya saya dapat menyelesaikan penulisan skripsi ini. Makalah skripsi yang berjudul “*Optimasi Produksi Enzim Selulase dari Bacillus sp. BPPT CC RK2 dengan Variasi pH dan Suhu Menggunakan Response Surface Methodology*” dibuat untuk memenuhi tugas mata kuliah Skripsi, salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Teknik pada Departemen Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Indonesia.

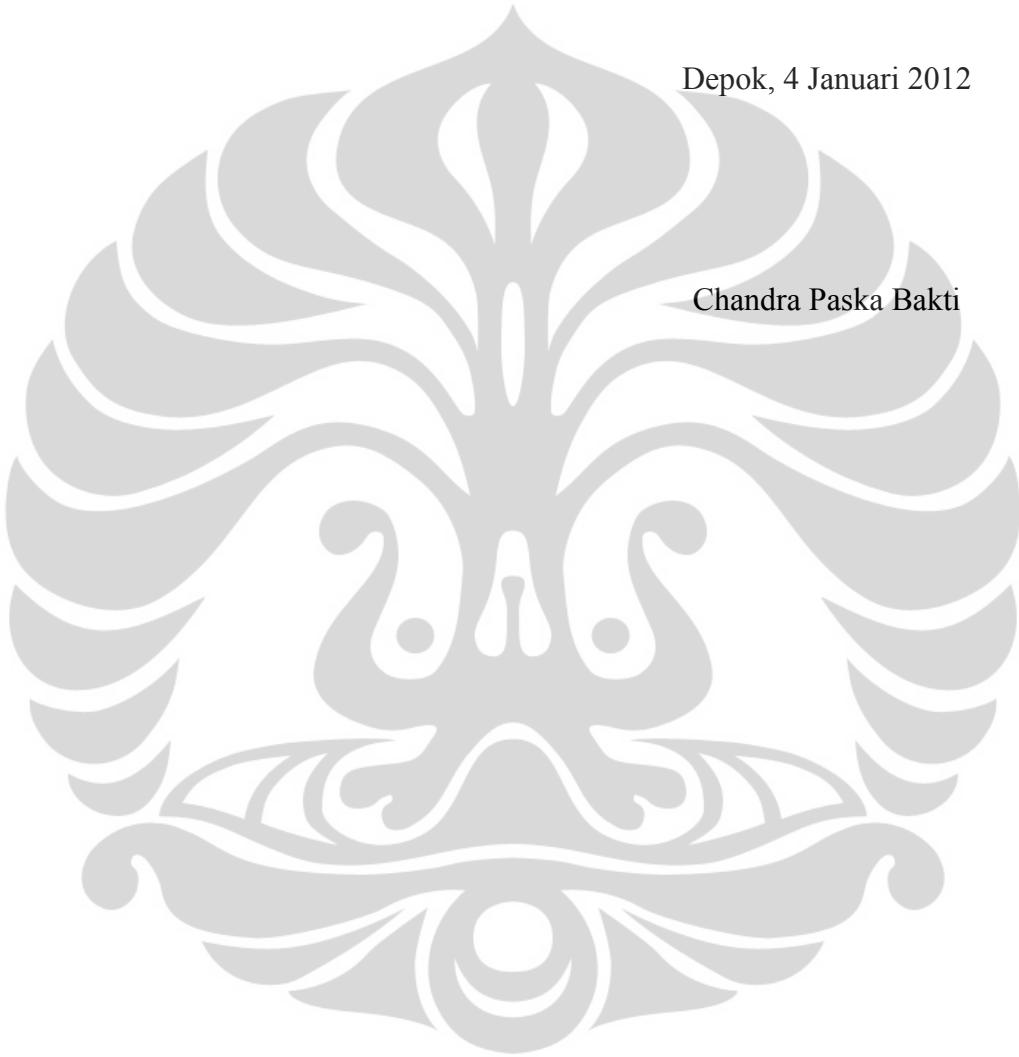
Pada penulisan ini, saya juga ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

- (1) Dr. Ing. Ir. Misri Gozan, M.Eng. selaku dosen pembimbing yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk menuntun saya dalam penyusunan skripsi ini.
- (2) Dr. Siswa Setyahadi, M.Sc. selaku pembimbing ahli beserta asistennya, Ruby, Kukuh dan Ajun, yang telah menyediakan waktu untuk mengajarkan banyak hal yang tidak saya mengerti dalam topik skripsi ini.
- (3) Ir. Rita Arbianti M.Si. selaku dosen pembimbing akademik yang telah menyediakan waktu untuk membimbing, mengarahkan, dan memberikan petunjuk-petunjuk kepada saya selama saya kuliah di kampus ini.
- (4) Para dosen Departemen Teknik Kimia FTUI yang telah memberikan ilmu, pengalaman dan wawasannya.
- (5) Orangtua dan keluarga saya dan yang selalu memberi dukungan dan semangat berupa keceriaan setiap harinya selama mengerjakan skripsi.
- (6) Rekan satu bimbingan: Agung Marssada (teman paralel penelitian), Nadia Chrisayu Natasha, Florensia Indan Stepani, Dini Asyifa, dan Aditya Rinus P. Putra yang sudah membantu dalam berbagi informasi dan pengetahuan serta pengalaman yang berkaitan dengan penulisan ini, dan
- (7) Sahabat-sahabat dan teman-teman semua yang telah memberikan dukungan sehingga saya bersemangat dan bisa menyelesaikan tugas akhir ini.

Saya menyadari bahwa dalam makalah skripsi ini masih terdapat banyak kekurangan. Oleh karena itu, saya mengharapkan kritik dan saran yang membangun sehingga dapat menyempurnakan skripsi ini dan melaksanakan perbaikan di masa yang akan datang. Semoga tulisan ini dapat bermanfaat bagi para pembaca dan bagi dunia pendidikan dan ilmu pengetahuan.

Depok, 4 Januari 2012

Chandra Paska Bakti



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

---

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

Nama : Chandra Paska Bakti  
NPM : 0806460420  
Program Studi : Teknologi Bioproses  
Departemen : Teknik Kimia  
Fakultas : Teknik  
Jenis karya : Skripsi

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

**OPTIMASI PRODUKSI ENZIM SELULASE DARI *BACILLUS* sp. BPPT CC RK2 DENGAN VARIASI pH DAN SUHU MENGGUNAKAN *RESPONSE SURFACE METHODOLOGY***

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, 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  
Pada tanggal : 4 Januari 2012

Yang menyatakan



( Chandra Paska Bakti )

## ABSTRAK

Nama : Chandra Paska Bakti  
Program Studi : Teknologi Bioproses  
Judul : Optimasi Produksi Enzim Selulase dari *Bacillus* sp. BPPT CC  
RK2 dengan Variasi pH dan Suhu Menggunakan *Response  
Surface Methodology*

Bioetanol generasi kedua merupakan salah satu solusi energi alternatif yang tidak memiliki efek samping dalam pemanfaatan bahan bakunya. Saat ini meskipun Indonesia memiliki bahan baku pembuatan etanol yang melimpah, proses produksi etanol generasi kedua masih terhambat oleh ketidakterediaan enzim dalam proses penguraian lignoselulosa menjadi sakarida yang dapat diolah melalui fermentasi menjadi etanol. Selulase merupakan salah satu enzim yang dapat digunakan untuk proses tersebut. Enzim tersebut diketahui dapat dihasilkan oleh bakteri *Bacillus* sp. dalam *submerged fermentation*. Dalam penelitian ini dilakukan evaluasi produksi selulase oleh *Bacillus* sp. BPPT CC RK2 pada substrat alami (dedak padi dan air kelapa) dengan cara mencari nilai kondisi produksi optimum selulase pada skala laboratorium 50 ml. Optimasi dilakukan menggunakan *response surface methodology*. Kondisi yang dioptimasi adalah pH dan suhu. Nilai kondisi optimasi model RSM adalah 6.23 untuk pH dan 40.04°C untuk suhu. Sedangkan kondisi optimasi saat percobaan RSM adalah pH 7.0 dan 37°C. Pengaruh dan interaksi variabel yang diuji terhadap aktivitas selulase dilaporkan pada penelitian ini.

Kata kunci:

Selulase, *Bacillus* sp. BPPT CC RK2, substrat alami, pH dan suhu optimum, metode permukaan respons



## ABSTRACT

Name : Chandra Paska Bakti  
Study Program : Teknologi Bioproses  
Title : Optimization of Cellulase Production from *Bacillus* sp. BPPT CC RK2 with Variance of pH and Temperature using Response Surface Methodology

Second-generation bioethanol is one of the alternative energy solutions that do not have any side effects in the utilization of raw materials. Currently though Indonesia has a raw material for making ethanol in abundance, the second-generation ethanol production process is still hampered by the unavailability of an enzyme in the process of decomposition of lignocellulose into saccharides that can be processed through fermentation into ethanol. Cellulase enzymes is one that can be used for the process. This enzyme is known to be produced by the bacterium *Bacillus* sp. in submerged fermentation. In this study, the cellulase production by *Bacillus* sp. CC BPPT RK2 on natural substrates (rice bran and coconut water) by searching the optimum conditions for cellulase production on a laboratory scale 50 ml, was evaluated. Optimization carried out using response surface methodology. Optimized conditions are pH and temperature. RSM optimization model state values for pH is 6.23 and 40.04°C for temperature. While the current experimental conditions RSM optimization were pH 7.0 and 37°C. The influence and interaction variables were tested against the cellulase activity reported in this study.

Keyword:

Cellulase, *Bacillus* sp. BPPT CC RK2, natural substrate, optimum pH and temperature, response surface methodology

## DAFTAR ISI

|   |      |
|---|------|
| HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....                      | ii   |
| HALAMAN PENGESAHAN.....                                   | iii  |
| KATA PENGANTAR .....                                      | iv   |
| HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI.....             | vi   |
| ABSTRAK .....   | vii  |
| ABSTRACT.....   | viii |
| DAFTAR ISI.....   | ix   |
| DAFTAR GAMBAR .....                                       | xi   |
| DAFTAR TABEL.....   | xii  |
| BAB I. PENDAHULUAN .....                                  | 1    |
| 1.1. Latar Belakang .....                                 | 1    |
| 1.2. Rumusan Masalah .....                                | 3    |
| 1.3. Tujuan.....  | 3    |
| 1.4. Batasan Masalah.....                                 | 3    |
| BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....                             | 4    |
| 2.1. Selulosa .....                                       | 4    |
| 2.2. Enzim Selulase .....                                 | 7    |
| 2.3. Bakteri <i>Bacillus</i> sp.....                      | 9    |
| 2.4. Pengaruh Suhu dan pH dalam Pertumbuhan Bakteri ..... | 12   |
| 2.4.1. Pengaruh Suhu .....                                | 12   |
| 2.4.2. Pengaruh pH.....                                   | 13   |
| 2.5. Desain Optimasi dengan RSM .....                     | 14   |
| 2.6. <i>State-of-the-art</i> Penelitian .....             | 21   |
| BAB III. METODE PENELITIAN.....                           | 23   |
| 3.1. Diagram Alir Penelitian.....                         | 23   |
| 3.2. Tempat dan Waktu Penelitian .....                    | 25   |
| 3.3. Desain Penelitian .....                              | 25   |
| 3.3.1. Uji Pendahuluan.....                               | 25   |
| 3.3.2. Metode Permukaan Respons .....                     | 26   |

|                |   |    |
|----------------|---|----|
| 3.4.           | Alat dan Bahan .....                              | 28 |
| 3.4.1.         | Alat.....   | 28 |
| 3.4.2.         | Bahan.....  | 29 |
| 3.6.           | Prosedur Penelitian.....                          | 30 |
| 3.6.1.         | Pembuatan Media dan Produksi Enzim .....          | 30 |
| 3.6.2.         | Optimasi Medium, pH, dan suhu .....               | 30 |
| 3.6.3.         | Pengujian Aktivitas Enzim dan Kadar Protein ..... | 31 |
| BAB IV.        | HASIL DAN PEMBAHASAN .....                        | 35 |
| 4.1.           | Uji Pendahuluan pH .....                          | 35 |
| 4.2.           | Uji Pendahuluan Suhu .....                        | 38 |
| 4.3.           | Optimasi pH dan Suhu Menggunakan RSM .....        | 41 |
| 4.3.1.         | Uji Statistika Calon Model.....                   | 43 |
| 4.3.2.         | Permukaan Respons Optimum Yang Dihasilkan.....    | 44 |
| 4.3.3.         | Interaksi Respons Antar Variabel .....            | 47 |
| BAB V.         | KESIMPULAN DAN SARAN.....                         | 54 |
| 5.1.           | Kesimpulan.....                                   | 54 |
| 5.2.           | Saran.....  | 54 |
| DAFTAR PUSTAKA | .....   | 55 |
| LAMPIRAN       | .....   | 60 |

## DAFTAR GAMBAR

|   |    |
|---|----|
| Gambar 1. Struktur tunggal selulosa.....                                      | 4  |
| Gambar 2. Struktur hierarki selulosa .....                                    | 5  |
| Gambar 3. Diagram alir sederhana pembuatan bioetanol dari biomassa .....      | 6  |
| Gambar 4. Mekanisme penguraian selulosa.....                                  | 8  |
| Gambar 5. Visualisasi SEM <i>Bacillus</i> sp. ....                            | 11 |
| Gambar 6. Pengaruh temperatur pada laju pertumbuhan mikroba. ....             | 12 |
| Gambar 7. Tingkat keakuratan pengepasan model .....                           | 15 |
| Gambar 8. Penentuan poin desain fraksional pada desain komposit terpusat..... | 16 |
| Gambar 9. Contoh permukaan respons RSM.....                                   | 20 |
| Gambar 10. Diagram alir garis besar penelitian.....                           | 23 |
| Gambar 11. Contoh langkah optimasi <i>one-variable-at-a-time</i> .....        | 24 |
| Gambar 12. Tahapan setiap proses produksi.....                                | 25 |
| Gambar 13. Pengaruh pH terhadap aktivitas selulase.....                       | 36 |
| Gambar 14. Pengaruh pH pada kandungan protein .....                           | 38 |
| Gambar 15. Pengaruh suhu terhadap aktivitas selulase .....                    | 39 |
| Gambar 16. Pengaruh suhu pada kandungan protein.....                          | 40 |
| Gambar 17. Perbandingan nilai prediksi vs. nilai aktual .....                 | 45 |
| Gambar 18. Plot kontur aktivitas selulase terhadap variasi pH dan suhu .....  | 46 |
| Gambar 19. Grafik permukaan respons aktivitas selulase .....                  | 46 |
| Gambar 20. Interaksi pH & C dimana N: 20%, suhu 37°C .....                    | 50 |
| Gambar 21. Interaksi pH & N pada C: 50%, suhu 37°C.....                       | 51 |
| Gambar 22. Interaksi suhu & C dimana N: 20%, pH 7.....                        | 52 |
| Gambar 23. Interaksi suhu & N dimana C: 50%, pH 7.....                        | 53 |

## DAFTAR TABEL

|  |    |
|--|----|
| Tabel 1. Kandungan selulosa dalam berbagai limbah lignoselulosa.....                   | 7  |
| Tabel 2. Beberapa penelitian produksi selulase yang telah dilakukan.....               | 10 |
| Tabel 3. Perbandingan jumlah percobaan desain $3^k$ dengan CCD.....                    | 17 |
| Tabel 4. Desain eksperimen CCD (dibuat di <i>software</i> Minitab).....                | 18 |
| Tabel 5. <i>State-of-the-art</i> optimasi produksi selulase dengan substrat alami..... | 21 |
| Tabel 6. Desain eksperimen uji pendahuluan pH.....                                     | 25 |
| Tabel 7. Desain penelitian uji pendahuluan pH.....                                     | 26 |
| Tabel 8. Penentuan poin desain eksperimen CCD.....                                     | 26 |
| Tabel 9. Matriks eksperimen RSM.....   | 27 |
| Tabel 10. Alat yang dipakai dalam penelitian.....                                      | 28 |
| Tabel 11. Bahan yang dipakai dalam percobaan.....                                      | 29 |
| Tabel 12. Variasi konsentrasi glukosa dalam membuat kurva standar glukosa....          | 32 |
| Tabel 13. Variasi konsentrasi BSA dalam membuat kurva standar protein.....             | 34 |
| Tabel 14. ANOVA model RSM aktivitas selulase.....                                      | 47 |
| Tabel 15. Estimasi koefisien dari tiap faktor.....                                     | 48 |

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **1.1.Latar Belakang**

Bioetanol generasi kedua merupakan salah satu solusi energi alternatif yang tidak banyak menimbulkan efek samping. Efek samping yang dimaksud adalah pemakaian sumber bahan baku bioetanol generasi kedua tersebut tidak berkonflik dengan kebutuhan bahan pangan, seperti yang terjadi pada bioetanol generasi pertama. Bahan baku bioetanol generasi kedua merupakan limbah organik yang mengandung kayu (lignoselulosa) yang jumlahnya sangat melimpah di alam. Dengan pembuatan bioetanol generasi kedua, limbah-limbah organik tersebut dimanfaatkan menjadi sesuatu yang bernilai ekonomis.

Meski bahan baku bioetanol generasi kedua mudah didapatkan, limbah organik tersebut tidak dapat langsung digunakan sebagai substrat dalam fermentasi bioetanol, sebab limbah tersebut (lignoselulosa) perlu dikonversi dahulu menjadi monosakarida (glukosa). Barulah kemudian glukosa yang dihasilkan dapat difermentasikan menjadi bioetanol.

Berbagai metode untuk menghancurkan lignoselulosa telah dilakukan, baik secara fisik maupun kimia. Salah satu metode yang cukup efektif adalah dengan melalui reaksi hidrolisis. Metode yang paling menjanjikan untuk menghidrolisis selulosa adalah menggunakan enzim, contohnya selulase (Galbe & Zacchi 2007). Permasalahan yang ada saat ini adalah jika ingin membuat bioetanol generasi dua, Indonesia masih sulit menyediakan enzim selulase tersebut untuk melakukan proses degradasi lignoselulosa. Jika menggunakan selulase dari luar negeri, harganya tentu sangat mahal. Dan ini akan membuat biaya produksi etanol tidak lagi efisien. Untuk itu, salah satu usaha yang perlu dilakukan adalah memproduksi enzim selulase di dalam negeri.

Memproduksi enzim selulase dalam skala industri sangatlah mahal (Solomon et al. 1997 dikutip Kotchoni et al. 2006) Biaya produksi selulase ini dapat mencapai 50% dari total biaya hidrolisis selulosa dengan selulase. Hal ini terkait dengan rendahnya aktivitas spesifik selulase, yang mengharuskan

pemakaian selulase dalam jumlah yang besar untuk mencukupi jumlah selulosa yang dapat terhidrolisis (Hao et al. 2006). Oleh karena itu perlu dilakukan penekanan biaya produksi yang salah satunya adalah dengan mengoptimasi hasil produksi supaya rasio antara biaya yang dikeluarkan dan keuntungan yang didapat bisa lebih besar. Salah satu cara untuk mengoptimasi hasil produksi adalah dengan mengoptimasi parameter-parameter kondisi operasi produksi sehingga didapat produksi enzim selulase yang maksimum.

Bakteri *Bacillus* sp. diketahui merupakan salah satu mikroorganisme yang dapat menghasilkan enzim selulase. Meskipun produksi selulase oleh bakteri ini tidak sebanyak produksi selulase oleh jamur (con. *Trichoderma reesei*), produksi selulase menggunakan bakteri mendatangkan beberapa keuntungan, antara lain (i) memiliki laju pertumbuhan yang lebih tinggi dari jamur, (ii) kurang terinhibisi oleh material yang telah terhidrolisis, dan (iii) lebih mudah direkayasa genetika (Ariffin et al. 2006; Sukumaran et al. 2005; Schülein 2000).

Substrat yang dipakai selama ini dalam penelitian produksi enzim menggunakan *Bacillus* sp. adalah substrat zat murni yang dipurifikasi dalam laboratorium. Sementara penelitian yang memakai substrat alami berupa bahan alam yang mengandung berbagai komposisi belum dilakukan. Melihat potensi tersebut, dalam studi ini akan dilakukan evaluasi untuk mencari parameter produksi (pH dan suhu) yang menghasilkan selulase dalam jumlah yang paling maksimal dengan menggunakan bakteri *Bacillus* sp. BPPT CC RK2 pada substrat dedak dan air kelapa. Bakteri *Bacillus* sp. BPPT CC RK2 merupakan bakteri koleksi milik BPPT, sedangkan substrat dedak beras dan air kelapa dipilih sebagai pengganti sumber C dan N karena ketersediaannya melimpah di alam sebagai produk sampingan sehingga harganya pun murah.

Proses optimasi dilakukan dengan menggunakan metode analisis statistik yaitu *Response Surface Methodology* (RSM). Cara konvensional untuk melakukan optimisasi parameter produksi enzim, sangatlah mahal dan membutuhkan waktu yang lama (Vohra et al. 2004 & Bogar et al. 2003 dikutip Dahiya et al. 2009). Oleh karena itu dengan adanya metode RSM menggunakan *software* (Design-Expert), diharapkan proses optimisasi dapat jauh lebih cepat dan akurat.

## 1.2.Rumusan Masalah

Bagaimana kondisi dan parameter produksi (pH dan suhu) ketika jumlah enzim selulase yang dihasilkan mencapai optimum?

## 1.3.Tujuan

Menemukan nilai optimum pH dan suhu yang mengakibatkan produksi enzim selulase optimum.

## 1.4.Batasan Masalah

Substrat yang digunakan pada saat optimasi menggunakan metode permukaan respons adalah dedak sebagai sumber karbon dan air kelapa sebagai sumber nitrogen. Sedangkan pada saat uji pendahuluan pH, substrat yang dipakai adalah media standar Luria Bertani + 1% karboksimetil selulosa (CMC).

*Bacillus* sp. BPPT CC RK2 yang digunakan merupakan hasil isolasi oleh BPPT yang berasal dari ekstrak rayap koran. Karakter spesifiknya belum diuji.

Produksi enzim ini dilakukan pada skala laboratorium dimana volume *broth* sebesar 50 ml.

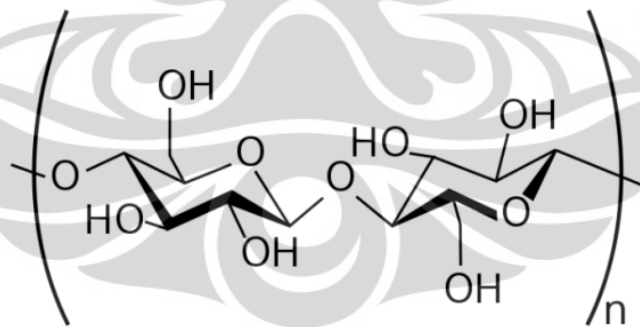


## BAB II

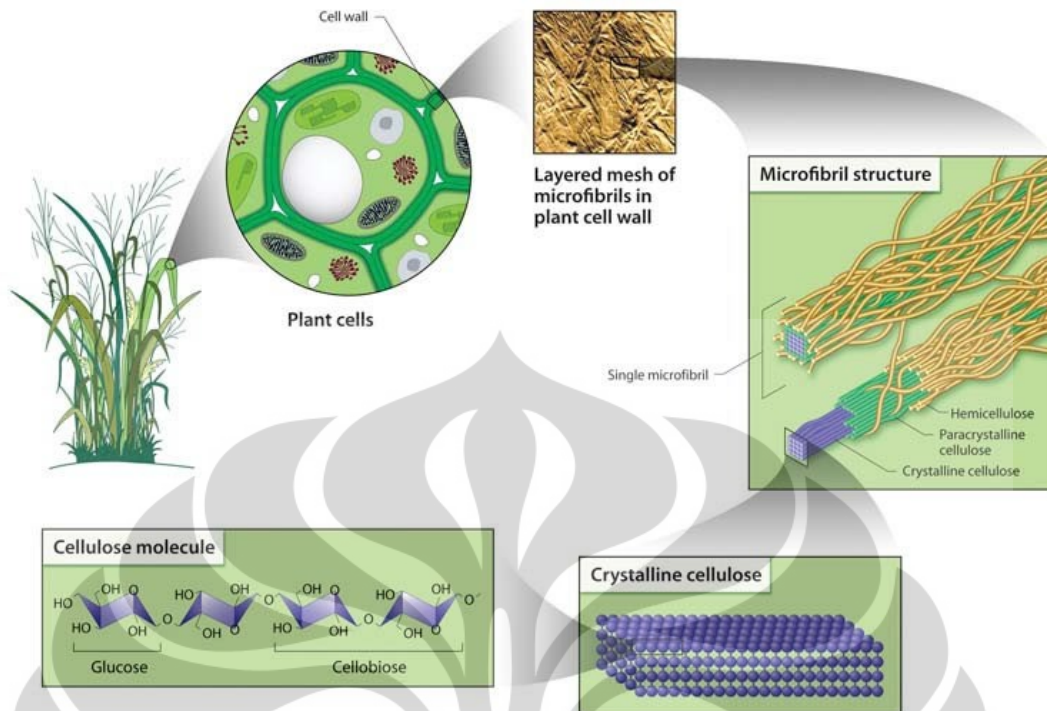
### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1.Selulosa

Selulosa ((C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>)<sub>n</sub>) merupakan homopolimer linear berberat molekul besar yang terdiri dari unit selubiosa berulang-ulang (dua cincin glukosa anhidrat bergabung melalui ikatan β-1,4 glikosidik). Bentuk tunggal selulosa ditunjukkan pada Gambar 1. Polimer rantai panjang selulosa terikat bersama oleh ikatan hidrogen dan ikatan van der Waals, yang mana menyebabkan selulosa terpaket dalam mikrofibril (Apperley et al. 1998 dikutip Mussatto & Teixeira 2010). Karena membentuk ikatan hidrogen, rantai tersebut tersusun paralel dan membentuk struktur kristalin. Mikrofibril selulosa memiliki bagian kristalin yang besar (2/3 dari total selulosa) dan bagian yang kecil yang tak berbentuk (*amorphous*). Semakin kristalin selulosa, akan makin susah selulosa tersebut untuk terlarut dan terdegradasi (Mussatto & Teixeira 2010). Hierarki struktur selulosa dari dinding sel hingga menjadi bentuk kristalin dan molekul ditunjukkan dalam Gambar 2.



Gambar 1. Struktur tunggal selulosa (Wikispaces 2008)

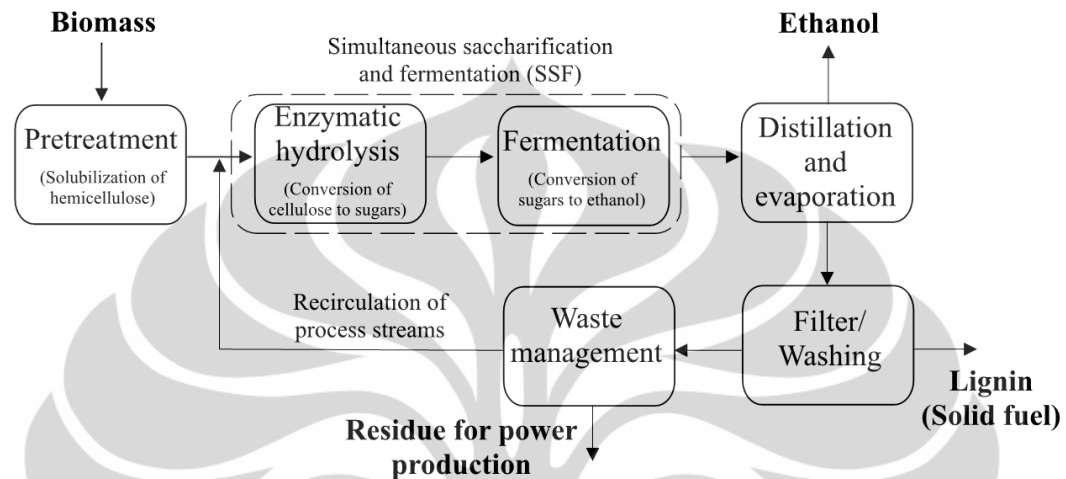


**Gambar 2.** Struktur hierarki selulosa (Office of Biological and Environmental Research of the U.S. Department of Energy Office of Science. 2005)

Selulosa merupakan jenis polisakarida yang paling melimpah dan merupakan konstituen utama pada setiap struktur tanaman serta diproduksi juga oleh sebagian binatang dan sebagian kecil dari bakteri. Tidak hanya pada material organik yang masih hidup, limbah atau sampah organik pun (terutama yang berasal dari tanaman) mengandung banyak sekali selulosa. Selain dijadikan sebagai bahan kertas dan produk-produk industri lain yang membutuhkan serat, selulosa dapat dikonversikan menjadi bahan baku pembuatan bioetanol, yaitu monosakarida (glukosa). Pengkonversian tersebut memerlukan asam pekat dan suhu operasi yang tinggi terkait dengan sifatnya yang sangat polar yang sulit untuk didegradasi secara kimia. Namun, karena proses ini membutuhkan energi besar dan tidak ramah lingkungan, maka pengkonversian selulosa menjadi glukosa biasanya dilakukan oleh enzim selulase. Ketersediaan yang melimpah di alam dan kemampuannya diubah menjadi monosakarida inilah yang menjadikan selulosa sebagai bahan baku dasar bioetanol generasi kedua yang paling potensial.

Pembuatan bioetanol generasi dua memerlukan dua tahap fermentasi seperti yang ditunjukkan dalam Gambar 3. Yang pertama adalah fermentasi untuk menghidrolisis lignoselulosa (termasuk selulosa di dalamnya) menjadi

monosakarida dan yang kedua adalah fermentasi monosakarida tersebut menjadi bioetanol. Di fermentasi yang pertama inilah enzim selulase beserta enzim-enzim hidrolisis lainnya berperan penting. Yield dari fermentasi pertama ini akan mempengaruhi yield total dari keseluruhan proses pembuatan bioetanol.



**Gambar 3.** Diagram alir sederhana pembuatan bioetanol dari biomassa (Galbe & Zacchi 2007)

Meskipun tampaknya dalam proses tersebut enzim selulase lah yang paling berperan dikarenakan banyaknya selulosa dalam fermentasi tersebut yang harus dihidrolisis, polimer gula lain juga harus dihidrolisis jika ingin mencapai yield terbaik. Studi menunjukkan bahwa pemakaian bersama enzim-enzim hidrolisis (selulosa + xylanase) menghasilkan yield gula yang lebih banyak dibandingkan bila hanya memakai satu jenis enzim (Galbe & Zacchi 2007). Mengingat pentingnya proses fermentasi tahap pertama ini, berbagai penelitian telah dilakukan untuk mengoptimasi fermentasi tersebut. Ada yang mengoptimasi variasi substrat yang menghasilkan yield terbanyak, ada yang mengoptimasi parameter fermentasi hidrolisis tersebut, dan ada juga yang mengoptimasi produksi enzim yang akan digunakan dalam fermentasi tersebut agar proses hidrolisis dapat lebih efisien dengan adanya pereaksi (enzim) yang banyak.

Penelitian untuk menguji kandungan selulosa dalam limbah organik lignoselulosa telah dilakukan (Nigam et al. 2009 dikutip Mussatto & Teixeira 2010). Kandungan selulosa dalam berbagai limbah lignoselulosa tampak pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Kandungan selulosa dalam berbagai limbah lignoselulosa

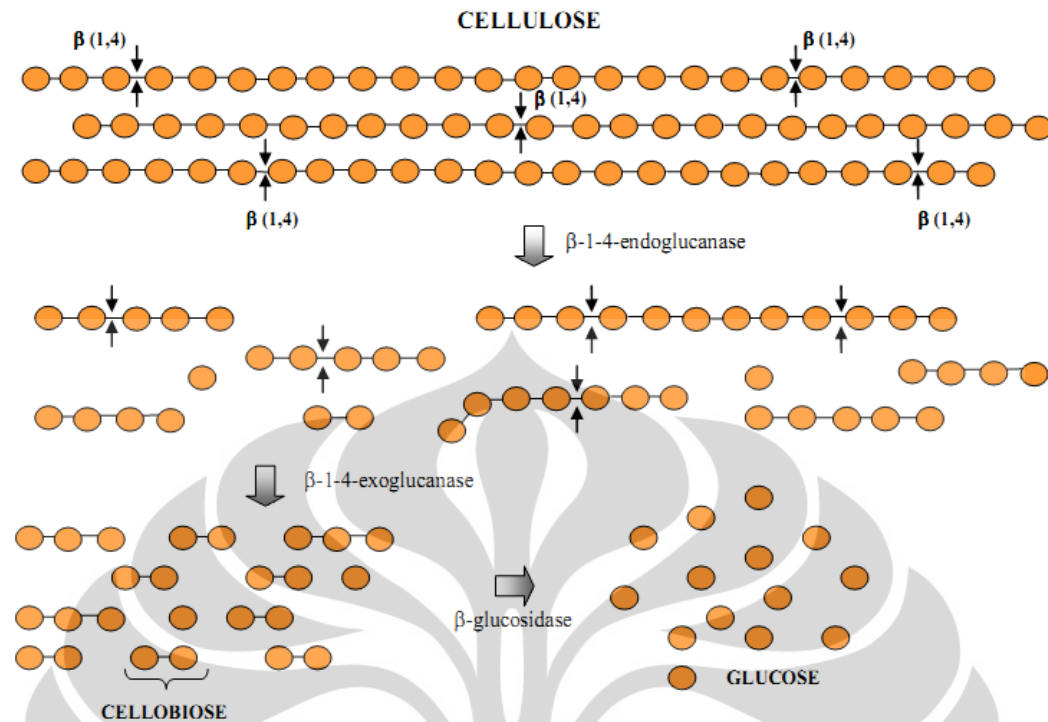
(Nigam et al. 2009 dikutip Mussatto &amp; Teixeira 2010)

| Lignocellulose waste | Cellulose (wt %) | Hemicellulose (wt %) | Lignin (wt %) |
|----------------------|------------------|----------------------|---------------|
| Barley straw         | 33.8             | 21.9                 | 13.8          |
| Corn cobs            | 33.7             | 31.9                 | 6.1           |
| Corn stalks          | 35.0             | 16.8                 | 7.0           |
| Cotton stalks        | 58.5             | 14.4                 | 21.5          |
| Oat straw            | 39.4             | 27.1                 | 17.5          |
| Rice straw           | 36.2             | 19.0                 | 9.9           |
| Rye straw            | 37.6             | 30.5                 | 19.0          |
| Soya stalks          | 34.5             | 24.8                 | 19.8          |
| Sugarcane bagasse    | 40.0             | 27.0                 | 10.0          |
| Sunflower stalks     | 42.1             | 29.7                 | 13.4          |
| Wheat straw          | 32.9             | 24.0                 | 8.9           |

### 2.1.1. Enzim Selulase

Selulase merupakan kelas enzim yang diproduksi terutama oleh jamur, bakteri dan protozoa yang mengkatalis proses selulolisis (hidrolisis selulosa). Enzim ini merupakan tipe enzim hidrolisis. Selulase juga dihasilkan oleh beberapa organisme tipe lain seperti termit (mikroba parasit) yang hidup bersimbiosis di dalam perut organisme lainnya. Beberapa jenis selulase telah diketahui memiliki struktur dan mekanisme yang berbeda.

Untuk dapat mendegradasi selulosa menjadi glukosa, terdapat tiga enzim yang bekerja dalam proses degradasi tersebut, yaitu endoglucanase atau carboxymethyl cellulase (CMCase) (endo  $\beta$ -1,4-glucanase, EC 3.2.1.4), exoglucanase atau cellobiohydrolase (exo  $\beta$ -1,4-glucanase, EC 3.2.1.91), dan endo  $\beta$ -glucosidase ( $\beta$ -D-glucosidase glucohydrolase, EC 3.2.1.21) (Nguyen & Quyen 2010). Endo- $\beta$ -1,4-glucanase menghidrolisis secara acak ikatan internal  $\beta$ -1,4-D-glycosidic dalam selulosa dan menghasilkan oligos dan polimer yang panjangnya tereduksi, sementara itu exo- $\beta$ -1,4-glucanase memotong residu selubiosil dari rantai selulosa yang ujungnya tidak tereduksi. Kemudian, selobiosa terhidrolisis oleh  $\beta$ -glucosidase untuk menghasilkan dua unit glukosa (Coughlan et al. 1985 dikutip Nguyen & Quyen 2010). Mekanisme tersebut terjadi untuk enzim selulase dengan sistem non-kompleks. Proses ini tergambar jelas pada Gambar 4.



**Gambar 4.** Mekanisme penguraian selulosa sampai menjadi glukosa oleh berbagai enzim selulase

(sumber: Mussatto & Teixeira 2010)

Selulase yang adalah enzim tipe hidrolisis merupakan biokatalis yang adalah protein berberat molekul besar. Salah satu sifat unik enzim sebagai biokatalis adalah selektifitas yang sangat tinggi. Reaksi yang dikatalisa oleh enzim sangat spesifik produk dan spesifik substrat, bahkan juga spesifik stereokimia apabila substratnya tersedia dalam dua bentuk isomer (Galbe & Zacchi 2007).

Selulase telah menaruh banyak perhatian dalam tahun-tahun terakhir terkait dengan potensi bioteknologi yang dimilikinya. Selulase memiliki aplikasi luas dalam industri makanan, kertas, deterjen, pengolahan limbah, bahan bakar dan industri kimia lainnya. Melihat potensi yang sangat besar tersebut, produksi selulase oleh mikroorganisme selulolitik banyak dikembangkan.

Selulase merupakan enzim yang dihasilkan mikroorganisme di luar tubuhnya (eksoenzim). Produksi enzim dalam mikroorganisme dapat dikontrol untuk meningkatkan produktivitas enzim oleh mikroorganisme tersebut. Selulase yang dihasilkan bergantung pada hubungan kompleks yang melibatkan berbagai variasi faktor, antara lain ukuran inokulum, pH, rasio C:N, suhu, kehadiran

*inducer*, aditif medium, aerasi, waktu pertumbuhan dan sebagainya (Immanuel et al. 2006 dikutip Ray et al. 2007). Oleh karena itu perhatian diarahkan untuk fokus kepada studi aktivitas selulolitik dan produksi enzim selulase oleh beberapa mikroorganisme dalam berbagai kondisi lingkungan. Untuk menciptakan proses fermentasi yang sukses, adalah penting untuk membuat lingkungan dan kondisi nutrisi yang sesuai dan cocok bagi mikroorganisme yang terlibat. Investigasi yang perlu dilakukan juga adalah menciptakan kondisi optimum untuk meng-*scale up* produksi enzim dalam proses fermentasi individual (Ray et al. 2007). Beberapa penelitian tentang produksi selulase telah dilaporkan baik oleh bakteri maupun oleh jamur, seperti yang terdapat pada Tabel 2 di halaman berikut.

## 2.2. Bakteri *Bacillus* sp.

*Bacillus* sp. merupakan bakteri Gram positif berbentuk batang, memiliki endospora, bersifat motil dan tergolong ke dalam bakteri aerob atau fakultatif anaerob. Bentuk 3D *Bacillus* sp. ditunjukkan dalam Gambar 5. Genus *Bacillus* sp. merupakan bakteri yang sangat baik digunakan sebagai kandidat agen biokontrol karena dapat menghasilkan beberapa metabolit aktif seperti antibiotik, proteinase dan bakteriosin. Pada umumnya antimikrob yang dihasilkan *Bacillus* sp. berupa polipeptida seperti bakteriosin dan antibiotik. Klasifikasi bakteri *Bacillus* sp. adalah sebagai berikut ini (Cohn 1872 dikutip Wikipedia.org)

|         |                       |
|---------|-----------------------|
| Kingdom | : Bacteria            |
| Kelas   | : Bacilli             |
| Ordo    | : Bacillales          |
| Famili  | : Bacillaceae         |
| Genus   | : <i>Bacillus</i>     |
| Species | : <i>Bacillus</i> sp. |

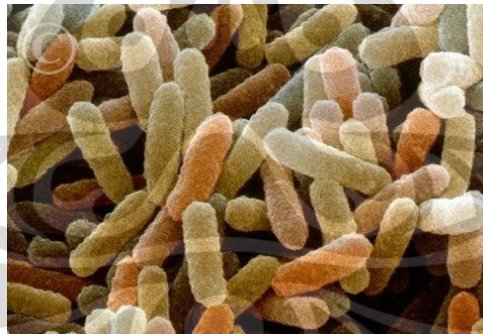
*Bacillus* sp. berbentuk batang, 0,3 – 2,2  $\mu$  x 127 – 7,0  $\mu$ m. *Bacillus* sp. merupakan perwakilan dari bakteri genus Gram-positif yang terdapat di alam (tanah, air, dan debu di udara).

**Tabel 2.** Beberapa penelitian produksi selulase yang telah dilakukan (Sukumaran et al. 2005)

| No. | Mikroorganisme                      | Substrat                 | Metode        | Skala Produksi         | Aktivitas Enzim  |
|-----|-------------------------------------|--------------------------|---------------|------------------------|--|
| 1   | <i>Aspergillus niger</i> A 20       | Cellulose                | SmF           | Shake flask            | Cellobiase 27.5 U/ml                                       |
| 2   | <i>Aspergillus niger</i> NRRL3      | Wheat Bran/Corn cob      | SSF           | Flask                  | Cellobiase 215 IU/g, cellulose                             |
| 3   | <i>Bacillus pumilus</i>             | CM cellulose/glycerol    | SmF           | SF                     | CMCase 1.9 U/ml, Cellobiase 1.2 U/ml                       |
| 4   | <i>Bacillus</i> sp. KSM N252        | Carboxymethyl cellulose  | SmF           | Shake flask            | CMCase 0.17 U/mg protein                                   |
| 5   | <i>Bacillus subtilis</i>            | Banana waste             | SSF           | Shake flask            | FPase 2.8 IU/gds, CMCase 9.6 IU/gds, Cellobiase 4.5 IU/gds |
| 6   | <i>Bacillus subtilis</i>            | Soybean industry residue | SSF           | Cylindrical bioreactor | FPase 1.08 U/mg protein                                    |
| 7   | <i>Chaetomium thermophilum</i> CT2  | Cellulose (sigma cell)   | SmF           | Shake flask            | CMCase 2.7 IU/ml   |
| 8   | <i>Melnocarpus albomyces</i>        | Solka-Floc               | SmF           | 700-l fermentor        | Cellulase 1160 ECU/ml, Endoglucanase 3290 ECU/ml,          |
| 9   | <i>Mucor circinelloidens</i>        | Lactose                  | SmF           | Shake flask            | EGL 0.25 U/ml  |
| 10  | <i>Neurospora crassa</i>            | Wheat straw              | SmF           | Shake flask            | FPase 1.33 U/ml, CMCase 19.7 U/ml, BGL 0.58 U/ml           |
| 11  | <i>Penicillium citrinum</i>         | Wheat bran               | SSF           | Shake flask            | FPase 1.72 IU/ml, Endoglucanase 1.89 IU/ml                 |
| 12  | <i>Penicillium occitanis</i>        | Paper pulp               | SmF-fed-batch | 20-l fermentor         | FPase 23 IU/ml, CMCase 21 IU/ml                            |
| 13  | <i>Phaenerocheate chrysosporium</i> | Cellulose (Avicell)      | SmF           | 100-l fermentor        | Cellulase 29 mg/g cellulose                                |
| 14  | <i>Rhodothermus marinus</i>         | CM cellulose             | SmF           | 150-l fermentor        | Endoglucanase 97.7 U/ml                                    |
| 15  | <i>Streptomyces drozdowiczii</i>    | Wheat bran               | SmF           | Shake flask            | CMCase 595 U/l   |
| 16  | <i>Streptomyces</i> sp. T3-1        | Carboxymethyl cellulose  | SmF           | 50-l fermentor         | CMCase 148 IU/ml, Avicellase 45 IU/ml, BGL 137 IU/ml       |
| 17  | <i>Trichoderma reesei</i>           | Steam treated willow     | SmF           | 22-l fermentor         | FPase 108 U/g cellulose                                    |

Beberapa spesies merupakan flora normal di saluran interestin manusia. Ketika ditumbuhkan di media *blood agar*, *Bacillus* sp. bertumbuh dan berkembang banyak, menyebar, menciptakan koloni yang berwarna abu-abu dengan pinggiran yang tidak rata. Bakteri ini bersifat aerobik oleh karena itu dalam proses fermentasi, aerasi merupakan salah satu hal yang perlu diperhatikan. Karakteristik yang unik dari bakteri ini adalah kemampuan untuk membentuk endospora ketika kondisi lingkungan yang tertekan. Spora ini dapat bertahan 60 tahun atau lebih pada kondisi lingkungan yang ekstrem.

Bakteri ini diketahui mampu menghasilkan enzim selulase bila ditempatkan dalam lingkungan yang terdapat selulosa. Adanya enzim selulosa pada lingkungan hidup *Bacillus* sp. memacu bakteri ini untuk mensekresikan selulase tersebut. Bakteri ini dapat bertindak demikian karena menginginkan produk hasil hidrolisis selulosa oleh selulase (glukosa) yang merupakan makanan (sumber C) bagi bakteri ini. Selain selulase, *Bacillus* sp. juga dapat menghasilkan enzim lain yang berperan dalam mendegradasi bahan baku bioetanol generasi dua, seperti xylanase (Lan Pham et al. 1998).



Gambar 5. Visualisasi SEM *Bacillus* sp. (Andrew Syred 2010)

*Bacillus* sp. diketahui dapat menghasilkan selulosa dengan maksimum pada kondisi operasi pH 4-8 dan suhu 30-40<sup>0</sup>C (Otajevwo & Aluyi 2010). Dalam penelitian tersebut, substrat yang dipakai adalah selulosa murni (CMC). Bila ingin menggunakan bahan lain alami yang berasal dari alam sebagai substrat seperti dedak beras, perlu dilakukan investigasi lebih lanjut untuk mengamati kondisi optimum produksi selulosa oleh *Bacillus* sp..

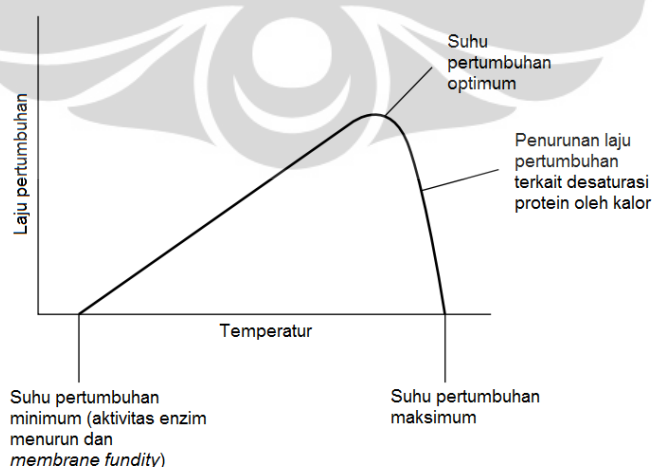


### 2.3. Pengaruh Suhu dan pH dalam Pertumbuhan Bakteri

Pertumbuhan bakteri dipengaruhi oleh berbagai faktor, diantaranya substrat yang diberikan, suhu, pH, oksigen, karbon dioksida, tekanan osmotik dan intensitas cahaya (Hogg 2005). Berikut ini adalah uraian beberapa faktor yang ditinjau dalam penelitian ini.

#### 2.3.1. Pengaruh Suhu

Sebagai grup, mikroorganisme dapat tumbuh di rentang temperatur yang sangat luas, dari suhu beku sampai diatas titik didih. Untuk semua organisme, suhu pertumbuhan minimum dan maksimum menentukan rentang di mana pertumbuhan itu mungkin; secara umum adalah pada suhu 25°C-30°C. Pertumbuhan berjalan lambat di suhu rendah karena enzim bekerja kurang efisien dan juga karena lipid cenderung mengeras dan dengan demikian kehilangan fluiditas membran. Laju pertumbuhan meningkat seiring dengan peningkatan temperatur hingga temperatur optimum dicapai, dan kemudian laju pertumbuhan turun kembali. Suhu optimum dan suhu batas untuk organisme adalah refleksi dari rentang temperatur dari sistem enzim, yang mana perubahannya ditentukan oleh struktur 3-dimensi protein mereka. Suhu optimum secara umum lebih dekat kepada suhu pertumbuhan maksimum, daripada suhu pertumbuhan minimum. Sekali nilai optimum dilewati, kehilangan aktivitas yang disebabkan oleh denaturasi enzim menyebabkan laju pertumbuhan menurun secara drastis (Gambar 6)(Hogg 2005).



**Gambar 6.** Pengaruh temperatur pada laju pertumbuhan mikroba. Kurva asimetris, dengan temperatur optimum lebih dekat ke maksimum daripada ke minimum.

Mayoritas mikroorganisme mencapai pertumbuhan optimal pada temperatur medium sekitar 20°C-45°C; ini disebut *mesophiles*. Berbeda dengan *thermophiles*, yang mana tidak hanya teradaptasi untuk bertahan, tapi juga tumbuh subur di suhu yang lebih tinggi. Umumnya, kategori ini mampu tumbuh dalam rentang suhu 40°C-80°C, dengan optimum berada di sekitar suhu 50°C-65°C. *Extreme thermophiles* memiliki nilai optimum yang melebihi ini, dan dapat mentoleransi suhu di atas 100°C. *Psychrophiles* menempati rentang lain dari temperatur ekstrim; mereka dapat tumbuh pada suhu 0°C, dengan pertumbuhan optimal pada 15°C atau dibawahnya. Sebagai organisme yang tidak mampu tumbuh di suhu di atas 25°C, *Psychotrophs*, di sisi lain, juga mampu tumbuh di suhu 0°C, dengan optimum temperatur lebih tinggi yaitu di 20°C-30°C.

### 2.3.2. Pengaruh pH

Mikroorganisme dipengaruhi sangat kuat oleh pH lingkungan di mana mikroorganisme hidup. Seperti halnya temperatur, kita dapat mendefinisikan nilai pertumbuhan minimum, optimum, dan maksimum, dari berbagai tipe. Rentang pH (antara nilai minimum dan maksimum) adalah lebih besar di kelas fungi daripada di kelas bakteri. Kebanyakan mikroorganisme tumbuh baik di kondisi netral (pH 7). Beberapa bakteri lebih menyukai kondisi alkali, dan beberapa lagi menyukai kondisi asam. Di sisi lain, secara umum fungi lebih menyukai kondisi asam. Alasan untuk penurunan laju pertumbuhan juga terkait dengan perubahan struktur 3-dimensi protein yang terdapat dalam mikroorganisme tersebut.

Nilai pH media pertumbuhan diatur untuk mendapatkan nilai yang diinginkan dengan menambahkan asam atau basa pada saat preparasinya. Aktivitas metabolisme mikroorganisme sering berarti bahwa mereka mengubah pH lingkungan mereka ketika mereka tumbuh (Hogg 2005), sehingga adalah penting dalam media pertumbuhan laboratorium bahwa pH yang diinginkan tidak hanya diatur tetapi juga dijaga.

#### 2.4. Desain Optimasi dengan RSM

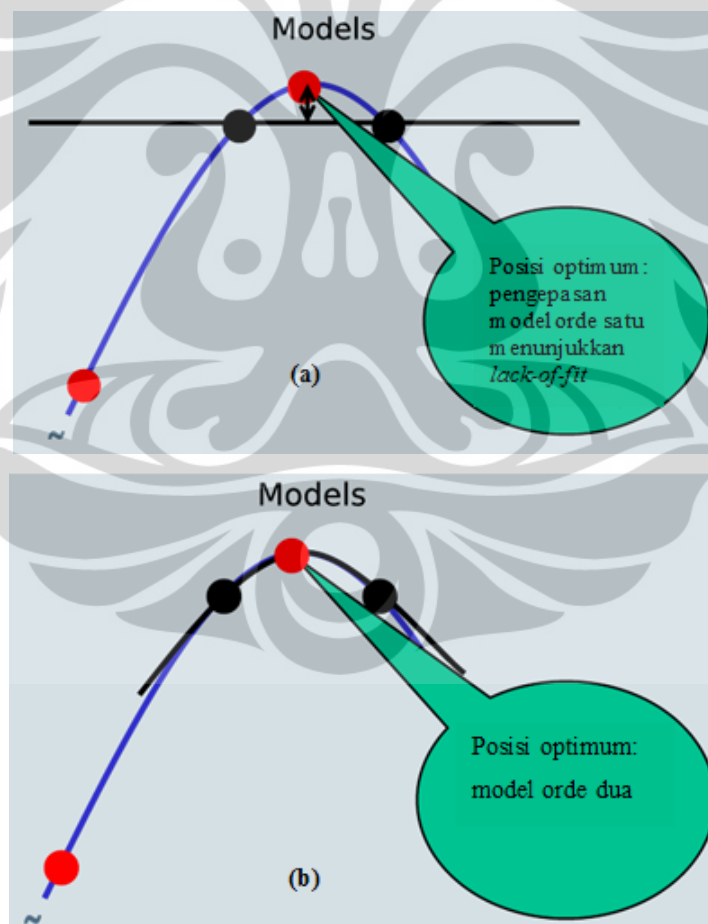
Desain eksperimen adalah suatu prosedur (langkah-langkah lengkap) yang perlu diambil sebelum eksperimen dilakukan supaya data yang semestinya diperlukan dapat diperoleh, sehingga analisis dan kesimpulan secara obyektif dapat dilakukan (Suhartono 2008). Dengan dilakukannya desain eksperimen, kita dapat memperoleh keterangan tentang bagaimana respon yang akan diberikan oleh suatu obyek pada berbagai keadaan tertentu (perlakuan) yang ingin diperhatikan, serta memperoleh atau mengumpulkan informasi sebanyak-banyaknya yang diperlukan (berguna) untuk memecahkan persoalan yang akan dibahas. Terdapat tiga hal penting dalam eksperimen, yaitu (1) respon yang diberikan oleh obyek, (2) keadaan tertentu yang sengaja diciptakan untuk menimbulkan respon, dan (3) keadaan lingkungan serta keragaman alami obyek yang dapat mengacaukan pemahaman tentang respon yang terjadi. Dikarenakan poin ketiga ini, maka dalam melakukan sebuah eksperimen, faktor-faktor lain yang tidak diuji diharuskan memiliki keadaan atau nilai yang sama.

*Optimasi* adalah suatu pendekatan normatif untuk mengidentifikasi penyelesaian terbaik dalam pengambilan keputusan suatu permasalahan. Unsur penting dalam permasalahan optimasi adalah fungsi tujuan yang dipengaruhi oleh sejumlah variabel. Variabel-variabel ini dapat saling bebas dan juga dapat saling bergantung. Dalam suatu proses, yang paling penting dioptimumkan adalah produktivitas suatu proses. Hal ini dapat dicapai dengan mengidentifikasi dan mengendalikan berbagai faktor yang menentukan aktivitas proses tersebut. Secara umum, proses optimasi merupakan langkah minimalisasi biaya atau penggunaan bahan baku dan memaksimalkan hasil atau efisiensi proses produksi (Box & Draper 1987).

Dalam penelitian ini, hal penting yang dilakukan adalah mencari nilai-nilai dari parameter produksi selulase dimana proses produksi menghasilkan yield yang terbesar yang mampu dicapai dalam percobaan ini. Jumlah yield yang dihasilkan diasumsikan merupakan akibat dari penerapan nilai-nilai parameter produksi. Dengan demikian, yield selulase merupakan variabel terikat yang adalah fungsi dari variabel bebas yaitu parameter-parameter produksi selulase. Adapun parameter yang diamati dalam percobaan ini antara lain: suhu, pH dan komposisi

substrat. Untuk komposisi substrat sendiri terdiri dari konsentrasi karbon dan konsentrasi nitrogen.

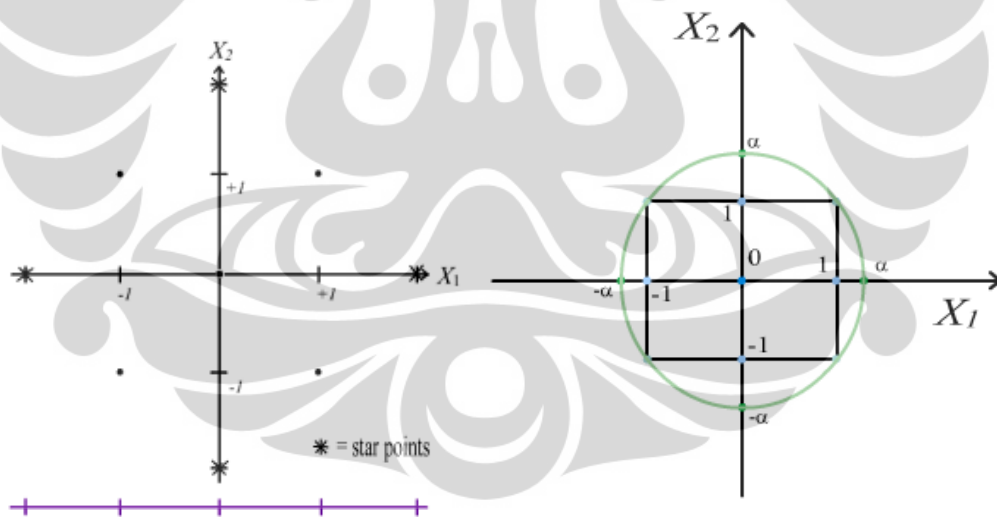
Ada berbagai bentuk desain eksperimen yang dilakukan dalam percobaan pada umumnya, antara lain: (1) desain komparatif, (2) desain *screening*, (3) desain permukaan respons, (4) desain campuran faktor, dan (5) desain regresi. Dikarenakan dalam percobaan ini kita mencari keterkaitan antara variabel bebas dan variabel terikat yang merupakan fungsi atau respon dari variabel bebas tersebut, maka desain eksperimen yang lebih tepat dipakai adalah desain permukaan respon. Dalam desain eksperimen tersebut sebenarnya juga terkandung desain regresi. Sebab untuk menemukan respon yang akurat diperlukan sebuah metode regresi yang tepat untuk mencari model hubungan antara variabel bebas dan variabel terikat.



**Gambar 7.** Tingkat keakuratan pengepasan model dengan (a) regresi orde satu, dan (b) regresi orde dua

Regresi yang dilakukan untuk mendapatkan model optimasi dapat berupa orde satu maupun orde dua. Namun pada umumnya pada desain eksperimen permukaan respon, regresi yang dipakai adalah regresi kuadratik (orde dua) dikarenakan regresi orde satu dapat menimbulkan *lack of fit* yang lebih besar seperti ditunjukkan oleh Gambar 7. Penggunaan regresi orde dua juga lebih memberikan keuntungan dalam proses optimisasi sebab nilai stationer maksimum dapat diketahui dengan lebih tepat.

Untuk dapat mendesain sebuah model orde dua, kita memerlukan variasi tingkatan nilai (level) yang cukup untuk setiap variabel atau faktor. Karena *2-level-design* hanya memiliki dua level setiap faktor, kita hanya dapat mendeteksi pengaruh linear. Untuk mendeteksi pengaruh respons di mana dapat terdapat suatu respons optimum, desain eksperimen yang dibuat minimal harus memiliki tiga level setiap faktor. Akan tetapi jika menggunakan *3-level-design*, jumlah percobaan yang dilakukan akan menjadi sangat banyak. Untuk itu diperlukan efisiensi desain eksperimen yang dilakukan. Efisiensi tersebut dapat dilakukan dengan menggunakan desain fraksional.



**Gambar 8.** Penentuan poin desain fraksional pada desain komposit terpusat

Apa yang diplot pada Gambar 8 adalah desain  $2^2$ , yang merupakan keempat sudut dari  $2^2$ . Kita memiliki titik pusat. Dan kemudian untuk mencapai apa yang akan kita sebut sebagai desain komposit terpusat (Central Composite Design) kita akan menambahkan apa yang disebut *star point* (poin aksial). Ini adalah poin yang berada di luar kisaran -1 dan 1 dalam setiap dimensi. Jika kita

berpikir dalam kerangka proyeksi, kita sekarang memiliki 5 level dari masing-masing 2 faktor yang diperoleh. Alih-alih memiliki 25 poin yang mana merupakan kebutuhan dari desain  $5 \times 5$ , kita hanya memiliki 9 poin. Ini adalah desain yang lebih efisien tetapi masih dalam proyeksi, kita memiliki lima level di setiap arah. Apa yang kita inginkan adalah poin yang cukup untuk memperkirakan permukaan respon tetapi pada saat yang sama menjaga desain yang sederhana dan dengan pengamatan yang sesedikit mungkin. Perbandingan jumlah percobaan yang harus dilakukan antara  $3^k$  design dengan CCD terdapat pada Tabel 3.

**Tabel 3.** Perbandingan jumlah percobaan desain  $3^k$  dengan CCD

|                           |   | Jumlah faktor |       |       |       |
|---------------------------|---|---------------|-------|-------|-------|
|                           |   | k = 2         | k = 3 | k = 4 | k = 5 |
| Central Composite Designs | Factorial points $2^k$                      | 4             | 8     | 16    | 32    |
|                           | Star points $2 \times k$                    | 4             | 6     | 8     | 10    |
|                           | Center points $n_c$ (bervariasi)            | 5             | 5     | 6     | 6     |
|                           | Total                                       | 13            | 19    | 30    | 48    |
| $3^k$ Designs             |   | 9             | 27    | 81    | 243   |
| Pemilihan $\alpha$        | Spherical design ( $\alpha = \sqrt{k}$ )    | 1.4           | 1.73  | 2     | 2.24  |
|                           | Rotatable design ( $\alpha = (n_F)^{1/4}$ ) | 1.4           | 1.68  | 2     | 2.38  |

Desain *spherical* dapat *rotatable* dalam arti bahwa semua titik berjarak sama dari titik pusat. *Rotatable* mengacu pada variansi dari fungsi respon. *Rotatable design* terjadi ketika ada variansi sama untuk semua titik berjarak tetap dari pusat, 0. Ini adalah sifat yang baik. Jika kita memilih pusat ruang desain dan menjalankan percobaan, semua titik yang memiliki jarak sama dari pusat ke segala arah, memiliki variansi prediksi yang sama.

Mengapa kita perlu lima atau enam titik pusat dalam desain? Alasannya juga terkait dengan variansi dari nilai prediksi. Ketika melakukan pengepasan permukaan respon kita ingin memperkirakan fungsi respon di wilayah desain di mana kita mencoba untuk menemukan nilai optimal. Di sini kita menginginkan prediksi yang dapat diandalkan. Dengan memilih 5-6 titik pusat, variansi di tengah adalah kira-kira sama dengan variansi di tepi. Sedangkan, jika kita hanya memiliki satu atau dua titik pusat, maka kita akan memiliki kurang presisi di tengah daripada yang didapatkan tepi. Ketika melampaui jarak dari 1 di *coded unit*, kita mendapatkan lebih banyak variansi dan kurang presisi. Apa yang kita

coba lakukan adalah untuk menyeimbangkan presisi di tepi desain relatif ke tengah desain.

**Tabel 4.** Desain eksperimen CCD (dibuat di *software* Minitab)

| Std Order | Type Poin | Blocks | A  | B  | C  | D  |
|-----------|-----------|--------|----|----|----|----|
| 1         | 1         | 1      | -1 | -1 | -1 | -1 |
| 2         | 1         | 1      | 1  | -1 | -1 | -1 |
| 3         | 1         | 1      | -1 | 1  | -1 | -1 |
| 4         | 1         | 1      | 1  | 1  | -1 | -1 |
| 5         | 1         | 1      | -1 | -1 | 1  | -1 |
| 6         | 1         | 1      | 1  | -1 | 1  | -1 |
| 7         | 1         | 1      | -1 | 1  | 1  | -1 |
| 8         | 1         | 1      | 1  | 1  | 1  | -1 |
| 9         | 1         | 1      | -1 | -1 | -1 | 1  |
| 10        | 1         | 1      | 1  | -1 | -1 | 1  |
| 11        | 1         | 1      | -1 | 1  | -1 | 1  |
| 12        | 1         | 1      | 1  | 1  | -1 | 1  |
| 13        | 1         | 1      | -1 | -1 | 1  | 1  |
| 14        | 1         | 1      | 1  | -1 | 1  | 1  |
| 15        | 1         | 1      | -1 | 1  | 1  | 1  |
| 16        | 1         | 1      | 1  | 1  | 1  | 1  |
| 17        | 0         | 1      | 0  | 0  | 0  | 0  |
| 18        | 0         | 1      | 0  | 0  | 0  | 0  |
| 19        | 0         | 1      | 0  | 0  | 0  | 0  |
| 20        | 0         | 1      | 0  | 0  | 0  | 0  |
| 21        | -1        | 2      | -2 | 0  | 0  | 0  |
| 22        | -1        | 2      | 2  | 0  | 0  | 0  |
| 23        | -1        | 2      | 0  | -2 | 0  | 0  |
| 24        | -1        | 2      | 0  | 2  | 0  | 0  |
| 25        | -1        | 2      | 0  | 0  | -2 | 0  |
| 26        | -1        | 2      | 0  | 0  | 2  | 0  |
| 27        | -1        | 2      | 0  | 0  | 0  | -2 |
| 28        | -1        | 2      | 0  | 0  | 0  | 2  |
| 29        | 0         | 2      | 0  | 0  | 0  | 0  |
| 30        | 0         | 2      | 0  | 0  | 0  | 0  |

Pada tabel di atas, tipe poin 1 merupakan tipe poin faktorial, 0 merupakan tipe poin tengah dan -1 merupakan tipe poin aksial (*star point*). Sedangkan, *block* 1 merupakan *block* faktorial, dan *block* 2 merupakan *block* aksial. *Block* faktorial memiliki 4 titik tengah, sedangkan *block* aksial memiliki 2 titik tengah.

Dalam melakukan optimasi dengan RSM, tahapan yang perlu dilakukan antara lain

(1) *Screening*: dalam tahap ini, berbagai faktor yang diduga berpengaruh, diuji untuk diseleksi faktor mana saja yang benar-benar memberikan dampak besar terhadap sistem, sementara faktor lain yang hanya memberikan dampak kecil dapat diabaikan.

(2) *Improvisasi*: dalam tahap ini dilakukan perubahan nilai faktor-faktor secara berulang-ulang sehingga mendapatkan sekumpulan variasi data yang dapat diolah secara statistik untuk kemudian dicari nilai optimumnya. Proses ini dapat dilakukan dengan metode Box atau Central Composite Design.

(3) *Penentuan titik optimum*: Merupakan proses pencarian titik optimum menggunakan metode regresi orde dua.

Dalam percobaan ini, tahapan pertama tidak dilakukan sebab faktor-faktor yang memberikan dampak besar terhadap sistem telah diketahui dengan mengacu pada berbagai hasil penelitian yang telah dilakukan. Untuk tahapan kedua, metode yang dipakai adalah Central Composite Design. Metode ini dipilih karena memiliki kualitas prediksi yang lebih besar dari metode Box-Behnken dengan selisih *running* yang sedikit (Box:CCD = 27:30) untuk jumlah faktor sebanyak empat buah (Croarkin & Tobias. 2003). Kedua metode ini memiliki keunggulan yaitu dapat mempersingkat waktu optimisasi sebab bila tidak menggunakan metode ini, variansi kombinasi nilai yang diperlukan menjadi sangat banyak dan ini membutuhkan proses *running* yang lebih lama dan biaya yang lebih mahal, seperti yang telah dibahas sebelumnya.

Dalam tahapan yang ketiga, pencarian titik optimum dilakukan dengan mencari model dari system dengan cara melakukan regresi orde dua. Proses perhitungan regresi dan analisis dilakukan menggunakan *software* Design-Expert (Stat-Ease 2007). Dengan bantuan *software*, proses regresi dan analisis dapat lebih cepat dan memiliki galat yang lebih sedikit bila dibandingkan perhitungan secara manual. Hubungan antara variabel bebas  $x$  dan variabel terikat diberikan menurut persamaan

$$\hat{y} = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \hat{\beta}_i x_i + \sum_{i=1}^k \hat{\beta}_{ii} x_i^2 + \sum_i \sum_j \hat{\beta}_{ij} x_i x_j, i < j \quad (1)$$



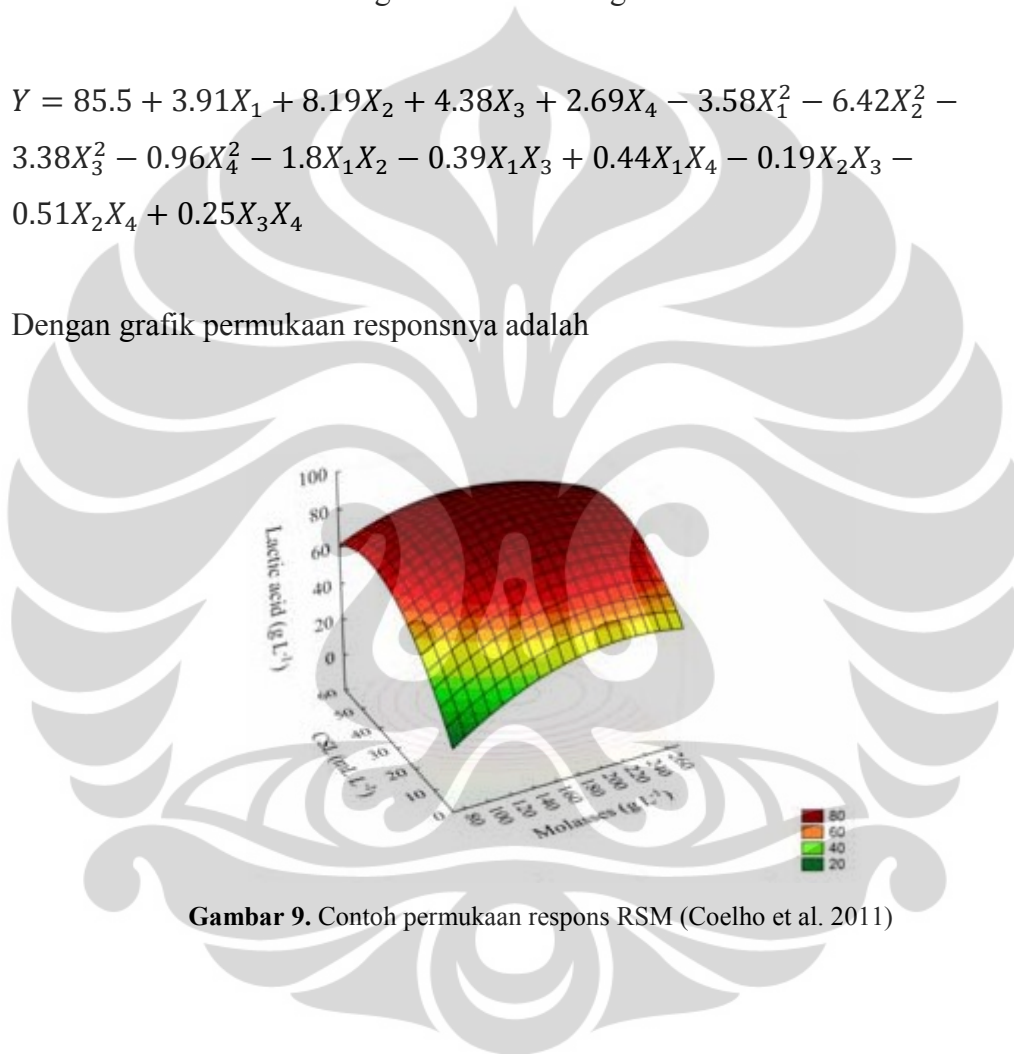
Untuk percobaan ini (4 faktor), persamaan tersebut disederhanakan menjadi

$$y = f(X_1, X_2, X_3, X_4) + \varepsilon \quad (2)$$

dimana  $\varepsilon$  menerangkan galat yang terdapat pada respon  $y$ .  $X_1$  adalah konsentrasi sumber karbon,  $X_2$  adalah konsentrasi sumber nitrogen,  $X_3$  adalah pH, dan  $X_4$  adalah suhu. Contoh hasil regresi orde dua dengan 4 faktor adalah

$$Y = 85.5 + 3.91X_1 + 8.19X_2 + 4.38X_3 + 2.69X_4 - 3.58X_1^2 - 6.42X_2^2 - 3.38X_3^2 - 0.96X_4^2 - 1.8X_1X_2 - 0.39X_1X_3 + 0.44X_1X_4 - 0.19X_2X_3 - 0.51X_2X_4 + 0.25X_3X_4 \quad (3)$$

Dengan grafik permukaan responsnya adalah



**Gambar 9.** Contoh permukaan respons RSM (Coelho et al. 2011)

## 2.5.State-of-the-art Penelitian

Seperti yang telah disebutkan dalam Tabel 2, penelitian tentang produksi selulase sudah banyak dilakukan, begitu juga dengan penelitian tentang optimasi selulase. Optimasi produksi selulase menggunakan substrat alami lebih banyak dilakukan menggunakan fungi daripada bakteri. Seperti yang dilaporkan oleh Singhania et al. (2010) bahwa dalam memproduksi selulase, perusahaan komersial penghasil enzim menggunakan fungi sebagai organisme penghasil, sedangkan bakteri belum banyak digunakan.

Metode optimasi RSM yang dapat memberikan hasil lebih baik dalam hal mengetahui interaksi antar variabel yang dioptimasi nampaknya belum banyak digunakan untuk mengoptimasi produksi selulase oleh bakteri. Ada peneliti asing yang telah melakukan, Deka et al. (2011), namun substrat yang dipakai adalah substrat murni, yakni CMC. Dikarenakan tidak terdapat hubungan yang jelas antara aktivitas selulase pada *soluble* substrat dan pada *insoluble* substrat, maka sebaiknya hasil optimasi menggunakan *soluble* substrat tidak digunakan untuk mengoptimasi produksi selulase yang menggunakan substrat alami seperti yang mengandung dinding sel tumbuhan (Percival Zhang et al. 2006). Berikut ini adalah *State-of-the-art* optimasi produksi selulase menggunakan substrat alami.

**Tabel 5.** *State-of-the-art* optimasi produksi selulase menggunakan substrat alami

|           |         | Metode Optimasi   |  |
|-----------|---------|---|--|
|           |         | RSM   | non-RSM  |
| Organisme | Bakteri | <i>Penelitian yang kami lakukan</i>   | (Krishna 1999)<br>(Iffah 2010)<br>(B.-H. Lee et al. 2010)<br>(Mawadza et al. 2000)   |
|           | Fungi   | (Hao et al. 2006)<br>(Han et al. 2009)<br>(S. Rashid et al. 2009)<br>(Deswal et al. 2011) | (Kumalasari 2003)<br>(P. B. Acharya et al. 2008)<br>(Kocher et al. 2008)<br>(Liang et al. 2010)<br>(C. K. Lee et al. 2011)<br>(Deswal et al. 2011) |

Pada Tabel 5, penelitian yang dicantumkan dibatasi hanya pada metode optimasi yang menggunakan substrat alami, seperti sekam padi, bagas, dsb. Sebenarnya, untuk optimasi produksi selulase dari bakteri yang menggunakan RSM telah dilakukan, namun tidak menggunakan substrat alami. Penelitian tersebut dilakukan oleh Deka et al. (2011). Mereka mengoptimasi produksi selulase dari *Bacillus subtilis* AS3 menggunakan CMC sebagai substrat. Aktivitas selulase hasil produksi optimum yang didapat adalah 0.49 U/ml.

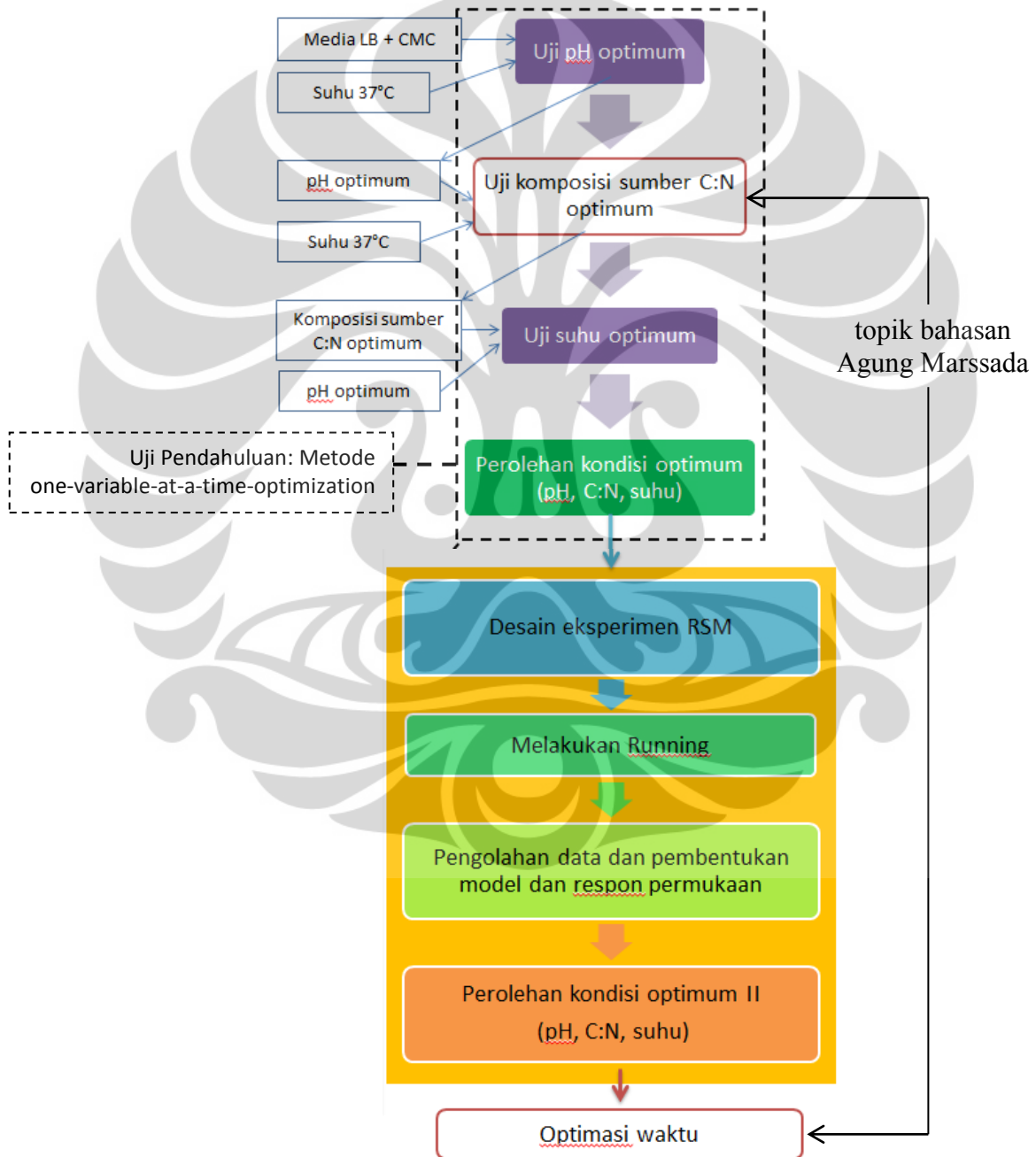
RSM juga telah digunakan dalam mengoptimasi produksi enzim lain yang berasal dari bakteri. Gangadharan et al. (2008) menggunakan RSM untuk melakukan optimasi produksi alpha-amylase oleh *Bacillus amyloliquefaciens*. Bocchini et al. (2002) dan Heck et al. (2005) juga menggunakan RSM untuk melakukan optimasi produksi xylanase yang berasal dari *Bacillus circulans* dan *Bacillus coagulans*.

Di kolom keempat pada Tabel 5, metode optimasi non-RSM yang dilakukan contohnya adalah menggunakan metode kombinasi-2-variabel (B.-H. Lee et al. 2010). Diantara nama-nama yang terdapat di tabel tersebut, peneliti dari Indonesia yang mengoptimasi produksi selulase pada substrat alami adalah Iffah dan Kumalasari. Penelitian yang kami lakukan ini merupakan bagian yang baru, karena mengoptimasi produksi selulase oleh bakteri menggunakan metode optimasi RSM.

## BAB III METODE PENELITIAN

### 3.1. Diagram Alir Penelitian

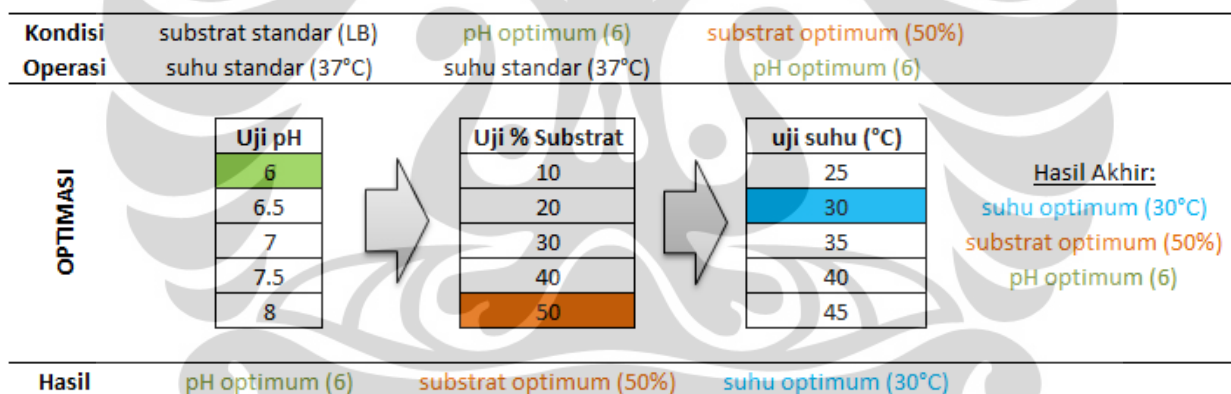
Secara garis besar, urutan penelitian yang akan dilakukan adalah sebagai berikut:



Gambar 10. Diagram alir garis besar penelitian

Penelitian ini dilakukan secara paralel bersama teman saya, Agung Marssada. Yang menjadi topik bahasan Agung adalah pengaruh substrat terhadap produksi optimum selulase beserta optimasi waktu produksi. Topik bahasan saya sendiri adalah pengaruh suhu dan pH terhadap produksi optimum selulase.

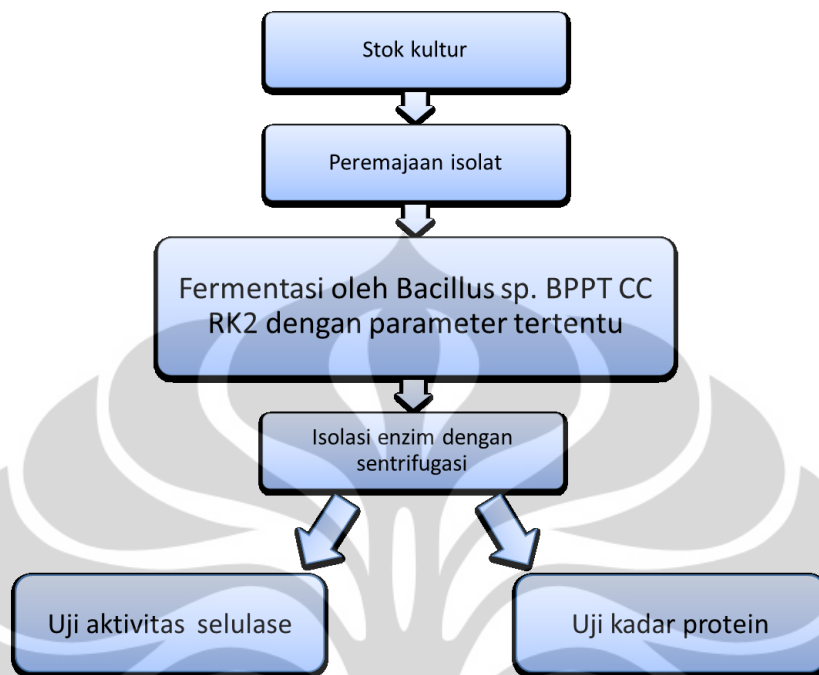
Di penelitian ini dilakukan uji pendahuluan sebelum masuk ke optimasi menggunakan metode permukaan respons. Uji pendahuluan ini adalah untuk meninjau secara kasar bagaimana pengaruh berbagai kondisi parameter produksi selulase. Metode yang digunakan adalah metode optimasi *one-variable-at-a-time*. Dalam metode tersebut tiap variabel yang dicari nilai optimumnya sementara variabel-variabel lainnya diatur pada nilai yang tetap. Karena dalam sekali jalan, hanya satu variabel yang divariasikan, maka interaksi antara variabel yang satu dan yang lain tidak dapat diketahui dengan jelas. Tiap variabel diasumsikan independen satu sama lain. Gambaran langkah optimasi *one-variable-at-a-time* terdapat pada Gambar 11.



Gambar 11. Contoh langkah optimasi *one-variable-at-a-time*

Hasil optimasi dengan metode ini dapat berguna sebagai pertimbangan dalam menentukan nilai batas-atas dan batas-bawah variabel yang akan dioptimasi menggunakan metode permukaan respons. Nilai kondisi optimum yang dihasilkan di uji pendahuluan ini sebaiknya tercakup dalam rentang nilai masing-masing variabel yang akan diuji dalam RSM. Batas-atas dan batas-bawah nilai variabel yang diuji di RSM juga sebaiknya tidak memiliki selisih yang terlalu jauh, supaya posisi optimum lebih jelas terlihat.

Adapun diagram alir tahapan yang dilakukan dalam setiap proses produksi adalah



Gambar 12. Tahapan setiap proses produksi

### 3.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Bioindustri, LAPTIAB - BPPT, Serpong, Tangerang, Banten dengan waktu penelitian dari bulan Agustus 2011 hingga Desember 2011.

### 3.3. Desain Penelitian

#### 3.3.1. Uji Pendahuluan

Tabel 6. Desain eksperimen uji pendahuluan pH

| pH  | Aktivitas<br>(U/ml) | Kandungan Protein<br>(mg/ml) |
|-----|---------------------|------------------------------|
| 6   |                     |                              |
| 6.5 |                     |                              |
| 7   |                     |                              |
| 7.5 |                     |                              |
| 8   |                     |                              |

**Tabel 7.** Desain penelitian uji pendahuluan pH

| Suhu<br>(°C) | Aktivitas<br>(U/ml) | Kandungan Protein<br>(mg/ml) |
|--------------|---------------------|------------------------------|
| 25           |                     |                              |
| 30           |                     |                              |
| 35           |                     |                              |
| 40           |                     |                              |
| 45           |                     |                              |
| 50           |                     |                              |

### 3.3.2. Metode Permukaan Respons

Desain eksperimen yang kami gunakan adalah matriks rancangan *Central Composite Design*.

**Tabel 8.** Penentuan poin desain eksperimen CCD

|      | Satuan | - alpha | -1 | 0  | +1 | + alpha |
|------|--------|---------|----|----|----|---------|
| C    | %      | 30      | 35 | 40 | 45 | 50      |
| N    | %      | 10      | 15 | 20 | 25 | 30      |
| pH   |        | 5       | 6  | 7  | 8  | 9       |
| suhu | °C     | 27      | 32 | 37 | 42 | 47      |

Dari poin-poin desain CCD, kita hanya perlu menentukan nilai batas bawah (-1) dan nilai batas atas (+1), sisanya ditentukan dengan rumus secara otomatis. Nilai tengah (0) merupakan rata-rata dari nilai (-1) dan (+1) untuk masing-masing faktor. Dikarenakan jumlah faktor dalam variabel ini adalah 4 buah, maka nilai  $\alpha = \sqrt{k} = \sqrt{4} = 2$ . Alpha aktual desain dihitung dengan persamaan

$$- \text{alpha} = (0) - \alpha [(0) - (-1)] \quad (4)$$

$$+ \text{alpha} = (0) + \alpha [(0) - (-1)] \quad (5)$$

Setelah nilai parameter-parameter tersebut ditentukan, matriks eksperimen digenerasikan oleh *software* Design-Expert, seperti yang ada di Tabel 9.

**Tabel 9.** Matriks eksperimen RSM

| Nomor Uji | % Dedak | % Air Kelapa | pH | Suhu (°C) | Aktivitas (U/ml) |
|-----------|---------|--------------|----|-----------|------------------|
| 1         | 45      | 15           | 6  | 42        |                  |
| 2         | 35      | 25           | 6  | 32        |                  |
| 3         | 40      | 20           | 7  | 37        |                  |
| 4         | 40      | 20           | 7  | 37        |                  |
| 5         | 35      | 15           | 6  | 32        |                  |
| 6         | 40      | 10           | 7  | 37        |                  |
| 7         | 45      | 25           | 6  | 32        |                  |
| 8         | 35      | 25           | 6  | 42        |                  |
| 9         | 35      | 15           | 6  | 42        |                  |
| 10        | 45      | 25           | 6  | 42        |                  |
| 11        | 40      | 20           | 5  | 37        |                  |
| 12        | 40      | 20           | 7  | 37        |                  |
| 13        | 40      | 20           | 7  | 37        |                  |
| 14        | 45      | 15           | 6  | 32        |                  |
| 15        | 40      | 20           | 7  | 47        |                  |
| 16        | 45      | 25           | 8  | 32        |                  |
| 17        | 40      | 20           | 7  | 27        |                  |
| 18        | 40      | 20           | 7  | 37        |                  |
| 19        | 40      | 20           | 7  | 37        |                  |
| 20        | 30      | 20           | 7  | 37        |                  |
| 21        | 45      | 15           | 8  | 32        |                  |
| 22        | 35      | 15           | 8  | 32        |                  |
| 23        | 45      | 15           | 8  | 42        |                  |
| 24        | 50      | 20           | 7  | 37        |                  |
| 25        | 35      | 25           | 8  | 32        |                  |
| 26        | 35      | 25           | 8  | 42        |                  |
| 27        | 40      | 20           | 9  | 37        |                  |
| 28        | 40      | 30           | 7  | 37        |                  |
| 29        | 35      | 15           | 8  | 42        |                  |
| 30        | 45      | 25           | 8  | 42        |                  |

Ketiga-puluh percobaan tersebut dilakukan di laboratorium untuk mencari nilai aktivitas selulase dari tiap-tiap kombinasi faktor yang diberikan. Dari hasil yang didapat, segera diketahui aktivitas selulase yang paling optimum secara percobaan. Akan tetapi, hasil yang didapat perlu diolah di *software* untuk mendapatkan model matematis, grafik permukaan respons beserta kondisi optimum yang dihasilkan melalui grafik permukaan respons tersebut.



### 3.4. Alat dan Bahan

#### 3.4.1. Alat

Keseluruhan peralatan yang dipakai dalam penelitian ini adalah milik Laboratorium Bioindustri BPPT. Alat-alat tersebut tercantum dalam Tabel 10.

**Tabel 10.** Alat yang dipakai dalam penelitian

| No | Peralatan  | Merek      |
|----|--|------------|
| 1  | shaking incubator                                  | Kuhner     |
| 2  | static incubator                                   | Memmert    |
| 3  | mikroskop  | Nikon      |
| 4  | autoklaf   | Hitachi    |
| 5  | timbangan analitik                                 | Radwag     |
| 6  | sentrifuge   | Hitachi    |
| 7  | hotplate stirrer                                   | Heindolph  |
| 8  | laminar air flow                                   | Babcock BF |
| 9  | thermomixer  | Eppendorf  |
| 10 | microtube  | Eppendorf  |
| 11 | pipet mikro  | Thermo     |
| 12 | tabung sentrifusi                                  | Nunc       |
| 13 | spektrofotometer UV-vis                            | Hitachi    |
| 14 | high speed refrigerated centrifuge dan rotor R10A2 | HIMAC      |
| 15 | alat gelas   | Pyrex      |
| 16 | pH meter   | Ino Lab    |

### 3.4.2. Bahan

Bahan-bahan yang dipakai dalam percobaan ini ada yang merupakan bahan murni asal manufaktur bahan kimia dan ada juga yang tidak sehingga sumbernya harus dinyatakan dengan jelas.

**Tabel 11.** Bahan yang dipakai dalam percobaan

| No | Bahan   | Asal/Merek          |
|----|---|---------------------|
| 1  | <i>Bacillus</i> sp. BPPT CC RK2                 | BPPT                |
| 2  | ekstrak yeast                                   | Scharlau            |
| 3  | bacto pepton                                    | Pronadisa           |
| 4  | CMC   | Pronadisa           |
| 5  | dedak beras                                     | Toko pakan Pamulang |
| 6  | air kelapa tua                                  | Pasar Serpong       |
| 7  | HCl   | Merck               |
| 8  | Bovine Serum Albumine                           | Sigma-Aldrich       |
| 9  | MgSO <sub>4</sub>                               | Merck               |
| 10 | MnSO <sub>4</sub>                               | Merck               |
| 11 | CaSO <sub>4</sub>                               | Merck               |
| 12 | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                | Merck               |
| 13 | NaOH  | Merck               |
| 14 | NaCl  | Merck               |
| 15 | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                | Merck               |
| 16 | NaCO <sub>3</sub>                               | Merck               |
| 17 | CuSO <sub>4</sub>                               | Merck               |
| 18 | NaKC <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub> | Merck               |
| 19 | filtrated H <sub>2</sub> O                      | Milipore            |
| 20 | Folin-Ciocalteu                                 | Merck               |

### **3.6. Prosedur Penelitian**

#### **3.6.1. Pembuatan Media dan Produksi Enzim**

##### ***3.6.1.1. Pembuatan Media Produksi Standar***

Media pemeliharaan yang digunakan adalah Luria Bertani (LB) cair dengan komposisi per liter yaitu, 10g pepton, 5g ekstrak yeast, dan 5g NaCl. LB ditambahkan dengan 1% Selulosa. Media dilarutkan dengan akuades. Kemudian media disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1,2 atm selama 15 menit.

##### ***3.6.1.2. Pembuatan Stok Kultur***

Isolat *Bacillus* sp. BPPT CC RK2 diinokulasikan sebanyak 1-2 ose ke dalam media LB agar miring dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Isolat ini digunakan sebagai stok kultur penelitian.

##### ***3.6.1.3. Produksi Enzim***

Media starter dibuat dengan menginokulasikan sebanyak 1-2 ose isolat *Bacillus* sp. ke dalam media LB steril (10% media produksi), kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 6 jam. Agitasi yang dilakukan selama fermentasi adalah 150 rpm. Produksi enzim dilakukan dengan menginokulasikan media starter ke dalam media produksi, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Agitasi yang dilakukan selama fermentasi adalah 150 rpm.

##### ***3.6.1.4. Panen Enzim***

Setelah 24 jam, enzim diambil dengan sentrifugasi pada agitasi 6000 rpm menggunakan High Speed Refrigerated Centrifuge Himac CR21G dan rotor R10A2 selama 15 menit pada suhu 4°C. Kemudian diambil supernatannya sebagai fraksi enzim kasar. Enzim kasar tersebut kemudian dianalisis kadar protein dan aktivitas enzimnya.

#### **3.6.2. Optimasi Medium, pH, dan suhu**

##### ***3.6.2.1. Penentuan pH Optimum***

Metode yang digunakan sama seperti metode pembuatan media produksi standar, hanya saja dilakukan modifikasi. Modifikasi yang dilakukan adalah

dengan mengatur pH produksi menjadi pH 6.0; 6.5; 7.0; 7.5; 8.0. Kemudian media disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1,2 atm selama 15 menit. Selanjutnya ke tahap produksi enzim.

### **3.6.2.2. Penentuan Suhu Optimum**

Prosedur yang digunakan sama seperti metode pembuatan media produksi standar, hanya saja substrat yang dipakai adalah substrat terpilih hasil uji pendahuluan substrat yang menjadi topik Agung Marssada beserta konsentrasinya. Juga pH yang dipakai adalah pH optimum yang didapat dari uji pendahuluan pH. Media yang telah dibuat kemudian disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1,2 atm selama 15 menit. Suhu yang divariasikan antara lain 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C.

### **3.6.2.3. Optimasi Dengan Metode Permukaan respons (RSM)**

Data dari hasil seluruh pengujian rancangan komposit terpusat (respon). digunakan untuk menyusun persamaan matematika menggunakan *software* Design-Expert 7.1.5. Persamaan yang akan didapat digunakan untuk menghitung kondisi optimum fermentasi. Hasil perhitungan tersebut diuji dengan regresi dan ANOVA. Langkah selanjutnya adalah menemukan daerah nilai optimum dari persamaan yang didapat.

## **3.6.3. Pengujian Aktivitas Enzim dan Kadar Protein**

### **3.6.3.1. Uji Aktivitas Selulase**

Pengujian aktivitas selulase yang dilakukan pada percobaan ini adalah melakukan pengujian terhadap endo  $\beta$ -1,4-glucanase (EC 3.2.1.4) atau yang biasa disebut sebagai CMCCase. Uji CMCCase dipilih karena untuk substrat lignoselulosa, selulase yang paling dominan dihasilkan adalah endo  $\beta$ -1,4-glucanase (B.-H. Lee et al. 2010). Meski pada pengujian ini selulase yang dianalisis hanya CMCCase dikarenakan enzim tersebut adalah yang paling dominan, bukan berarti selulase lain tidak dihasilkan. Percival Zhang et al. (2006) melaporkan bahwa untuk

*insoluble* selulosa kristalin seperti yang dimiliki oleh dedak, jenis selulosa lain seperti exoglucanase dan betaglucosidase juga dihasilkan.

### Pengujian CMCase

Aktivitas CMCase diukur dengan menggunakan metode yang dilakukan oleh Yin et al. (2010), yaitu dengan mereaksikan sampel dalam larutan 1 mL CMC 1%, buffer fosfat 0.05 M (pH 7.0) di mana volume sampel enzim 100  $\mu$ l, dan volume pelarut 900  $\mu$ l. Reaksi berlangsung selama 30 menit dan diinkubasi pada suhu 50°C. Gula turunan yang dihasilkan dari reaksi tersebut ditentukan dengan metode DNS Miller (1959). Satu unit (U) didefinisikan sebagai jumlah enzim yang melepas 1  $\mu$ mol gula tereduksi dari CMC per menit pada suhu 50°C. Konsentrasi gula tereduksi ekuivalen dengan produk samping dari reaksi yang terjadi yaitu 3-amino,5-nitrosalicylic acid. Zat tersebut dapat diamati dengan spektroskopi karena memiliki absorbansi yang tinggi pada panjang gelombang 540 nm. Aktivitas selulase dihitung menurut persamaan

$$\text{Aktivitas (U/ml)} = \frac{\text{mg glukosa} \times 1000}{\text{Mr glukosa} \times 30 \text{ menit} \times 0.1 \text{ ml}} \quad (6)$$

### Pembuatan Kurva Standar Glukosa

Pembuatan kurva standar glukosa dilakukan dengan membuat variasi konsentrasi standar glukosa sebagai berikut

**Tabel 12.** Variasi konsentrasi glukosa dalam membuat kurva standar glukosa

| C glukosa (mg/ml) | Absorbansi |
|-------------------|------------|
| 0                 |            |
| 0.04              |            |
| 0.08              |            |
| 0.12              |            |
| 0.16              |            |
| 0.2               |            |
| 0.24              |            |
| 0.28              |            |
| 0.32              |            |
| 0.36              |            |
| 0.4               |            |

Glukosa tersebut dilarutkan dalam larutan buffer fosfat 0.05 M, pH 7.0. Kandungan glukosa dalam larutan tersebut diuji dengan metode DNS yang dilakukan pada pengujian CMCase seperti yang telah dijelaskan sebelumnya. Kurva standar glukosa adalah grafik hubungan konsentrasi glukosa dengan nilai absorbansi pada panjang gelombang 540 nm.

### **3.6.3.2. Penentuan Kadar Protein**

Kadar protein enzim ditentukan dengan metode reagen fenol Lowry (Lowry et al. 1951). Langkah pertama adalah reaksi protein dengan tembaga dalam kondisi basa. Kemudian diikuti oleh langkah kedua yaitu reduksi senyawa fosfomolibdat-fosfotungstat oleh tembaga yang berikatan dengan protein. Metode ini spesifik untuk jenis protein yang mengandung asam amino tirosin dan triptofan.

Kondisi basa dapat dihasilkan dari buffer fosfat atau phosphate buffer saline (PBS). Dalam satu liter larutan PBS terdiri dari 8g NaCl; 0,2g KCl; 1,44g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  dan 0,24g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Larutan PBS disesuaikan menjadi pH 7,4 dengan penambahan NaOH atau HCl. Selain itu, dibuat pula reagen Lowry yang terdiri dari tiga macam larutan (A, B dan C). Untuk satu liter larutan A terdiri dari 20g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dan 0,4g NaOH, satu liter larutan B terdiri dari 10g  $\text{CuSO}_4$ , dan satu liter larutan C terdiri dari 2g  $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ .

Pembuatan reagen Lowry dilakukan dengan mencampurkan ketiga larutan tersebut dengan perbandingan volume larutan A : B : C adalah 98 : 1 : 1. Larutan standar protein dibuat dari Bovine Serum Albumin (BSA) dengan variasi konsentrasi 100-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , interval 100.dd $\text{H}_2\text{O}$  digunakan sebagai blangko. Mula-mula sebanyak 20 $\mu\text{L}$  masing-masing larutan BSA direaksikan dengan 180 $\mu\text{L}$  larutan PBS untuk membuat kondisi basa kemudian diikuti dengan penambahan 2 mL reagen Lowry fresh. Setelah diaduk dengan vortex, analit diinkubasi selama 10 menit lalu direaksikan dengan reagen Follin Ciocalteu sebanyak 200 $\mu\text{L}$  dan diinkubasi kembali selama 30 menit. Hasilnya, larutan yang mengandung protein akan berubah warna dari bening menjadi biru.

Analisis kuantitatif dilakukan dengan menggunakan instrumen spektrofotometer visible dengan panjang gelombang 750 nm.

### Pembuatan Kurva Standar BSA

Pembuatan kurva standar protein dilakukan dengan membuat variasi konsentrasi standar BSA seperti pada Tabel 13.

**Tabel 13.** Variasi konsentrasi BSA dalam membuat kurva standar protein

| Protein (mg/ml) | Absorbansi |
|-----------------|------------|
| 0               |            |
| 1               |            |
| 2               |            |
| 3               |            |
| 4               |            |
| 5               |            |
| 6               |            |
| 7               |            |
| 8               |            |
| 9               |            |
| 10              |            |

BSA dilarutkan dalam mili-Q-water (ddH<sub>2</sub>O). Kandungan protein pada larutan yang dibuat diuji dengan metode Lowry seperti yang dilakukan pada pengujian kandungan protein pada penelitian ini. Konsentrasi analit berfungsi sebagai sumbu X pada grafik dan absorbansi sebagai sumbu Y, sehingga akan diperoleh suatu garis linear dengan gradien tertentu.

Kurva standar BSA adalah grafik hubungan konsentrasi protein standar (BSA) dengan nilai absorbansi pada panjang gelombang 750 nm. Bovine Serum Albumin (BSA) mengandung 1mg/mL protein dalam buffer asetat 0.1M pH 6.0.

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Tujuan umum dari penelitian ini adalah mendapatkan nilai optimum pH dan suhu yang mengakibatkan produksi enzim selulase mencapai optimum. Tujuan tersebut dapat dicapai dengan melakukan serangkaian percobaan seperti yang telah diuraikan di metode penelitian. Hasil yang didapat dari percobaan-percobaan itu antara lain aktivitas selulase dan kandungan protein pada uji pendahuluan pH dan suhu, serta permukaan respons dari aktivitas selulase pada optimasi menggunakan RSM.

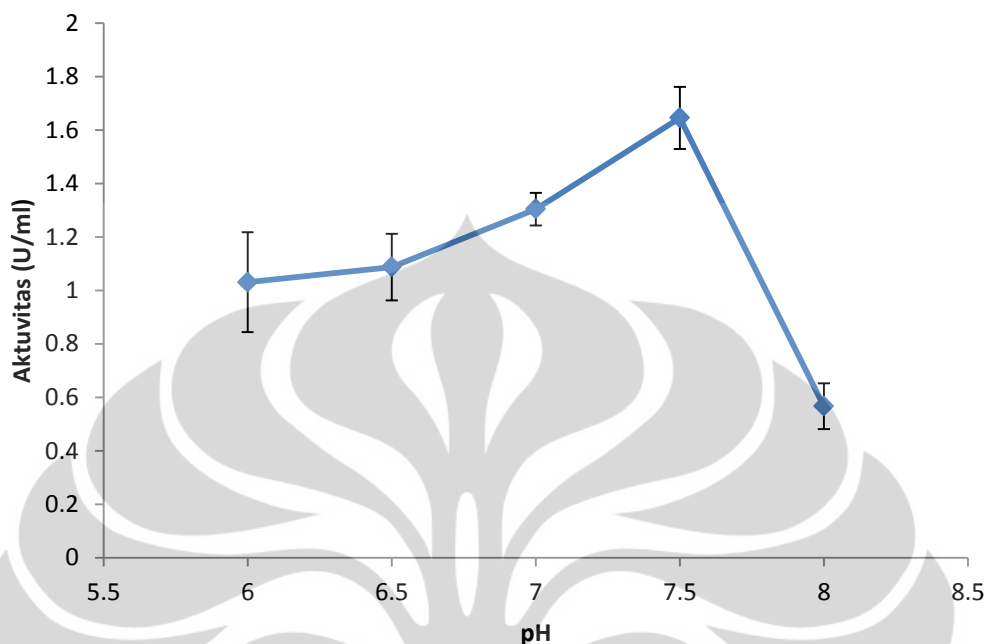
Pada uji pendahuluan, kami mencari kisaran nilai optimum dari tiap-tiap variabel yaitu pH dan suhu. Karena metode yang digunakan adalah *one-variable-at-a-time*, hubungan antar variabel tidak dapat dijelaskan (Geiger 1997) dan oleh karena itu, tiap-tiap variabel diasumsikan independen satu sama lain. Nilai optimum yang didapat kemudian dipakai untuk menjadi pertimbangan dalam menentukan batas bawah dan batas atas input variabel di metode RSM.

#### 4.1. Uji Pendahuluan pH

*Bacillus* sp. dapat hidup di berbagai kondisi pH. Meski demikian pH operasi produksi memiliki dampak, tidak hanya terhadap bagaimana bakteri tersebut bermetabolisme, tetapi juga terhadap bagaimana bakteri tersebut bereaksi terhadap substrat-substrat yang ada. Seperti yang dikatakan oleh Otajevwo & Aluyi (2010), *Bacillus* sp. memproduksi selulase di rentang pH 4-8. Karena itu kami melakukan variasi pH operasi untuk masing-masing fermentasi yang dilakukan, yaitu dari pH yang cukup asam (pH 6) hingga pH yang cukup tinggi (pH 8). pH yang diatur adalah pH kondisi awal proses. Kami tidak melakukan pengendalian pH secara kontinu selama proses berlangsung. Dari data yang didapat, *Bacillus* sp. memproduksi selulase dengan aktivitas tertinggi pada pH yang sedikit diatas pH normal, yaitu pH 7.5. Pada pH rendah, selulase yang diproduksi memiliki aktivitas yang rendah pula. Aktivitas selulase yang diproduksi terus meningkat seiring dengan pH operasi yang meningkat hingga



akhirnya turun drastis ketika pH operasi = 8. Hal ini nampak jelas pada Gambar 13.



**Gambar 13.** Pengaruh pH terhadap aktivitas selulase

Setiap percobaan dilakukan replikasi analisis sebanyak tiga kali. Dan karena setiap pengulangan yang dilakukan tidak selalu memberikan hasil yang sama, maka standar deviasi dicantumkan dalam grafik.

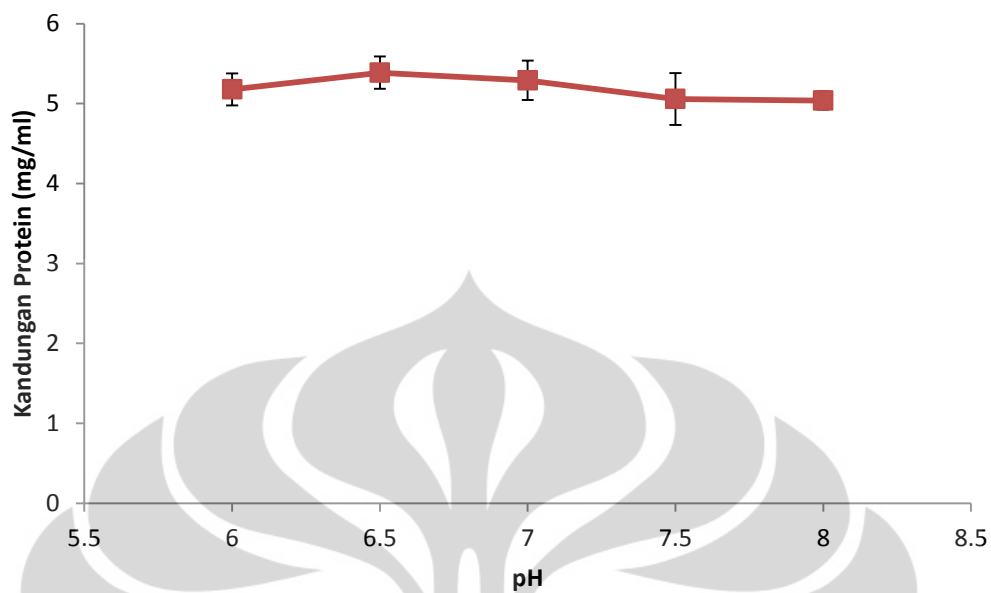
Perlu diketahui bahwa substrat yang digunakan dalam pengujian ini adalah media standar Luria Bertani + CMC. Uji pendahuluan pH dilakukan sebelum uji pendahuluan substrat, terkait dengan penelitian yang dilakukan secara paralel bersama Agung Marssada, sehingga kami memilih media standar Luria Bertani (LB) sebagai media yang dipakai untuk media pertumbuhan bakteri. Media LB merupakan media yang terdiri dari 1% pepton, 0.5% NaCl dan 0.5% ekstrak ragi dalam aquades. LB biasa digunakan di laboratorium sebagai media pertumbuhan bakteri karena media ini merupakan media yang kaya akan nutrisi (MacWilliams & Liao 2006).

Selulase merupakan *inducible enzymes* (B.-H. Lee et al. 2010) yang artinya supaya selulase dapat dihasilkan oleh bakteri, substrat dari selulase (selulosa) harus diberikan pada bakteri supaya bakteri tersebut terangsang dan

terpacu untuk menghasilkan selulase. Media LB tidak mengandung selulosa, oleh karena itu supaya *Bacillus* sp. dapat menghasilkan selulase, selulosa berupa karboksimetil selulosa (CMC) perlu ditambahkan pada media tersebut.

Kondisi pH optimum dari uji pendahuluan pH pada media LB + CMC dengan kondisi fermentasi suhu 37°C dan agitasi 150 RPM selama 24 jam adalah **pH 7.5**. Hal yang serupa juga dilakukan oleh Paul & Varma (1993) menggunakan strain *Bacillus* sp. yang juga berasal dari rayap dengan kondisi fermentasi suhu 37°C dan CMC sebagai substrat, dengan hasil yang tidak beda jauh dari penelitian kami yaitu pH optimum berada di pH 7.2. Nilai pH optimum yang didapat ini (pH 7.5) selanjutnya dipakai sebagai kondisi fermentasi pada uji pendahuluan berikutnya (uji pendahuluan substrat).

Di percobaan ini kami juga menguji kandungan protein pada setiap proses fermentasi yang dilakukan. Tujuan menguji kandungan protein ini adalah untuk mengetahui protein ekstraselular yang dihasilkan oleh bakteri (termasuk enzim-enzim lain yang dihasilkan). Di dalam pengujian pH, kondisi operasi lain disamaratakan, dalam hal ini jumlah dan konsentrasi substratnya. Dengan demikian, jumlah protein pada awal kondisi seharusnya sama. Meskipun pada saat mengatur pH initial ditambahkan sejumlah zat ke dalam media kultur, namun zat tersebut bukanlah zat yang mengandung protein, zat tersebut hanyalah asam dan basa biasa (HCl dan NaOH). Oleh karena itu, berbagai variasi nilai-nilai kandungan protein yang ditampilkan pada Gambar 14 dan pada gambar-gambar berikutnya adalah murni disebabkan oleh peristiwa yang terjadi selama proses fermentasi berlangsung. Peristiwa yang juga mungkin terjadi selama proses fermentasi berlangsung selain dihasilkannya protein ekstraselular oleh bakteri adalah terdenaturasinya protein yang sudah terkandung sebelumnya di dalam substrat. Hal ini tentunya juga turut mempengaruhi perubahan kandungan protein dari *broth* fermentasi keseluruhan.

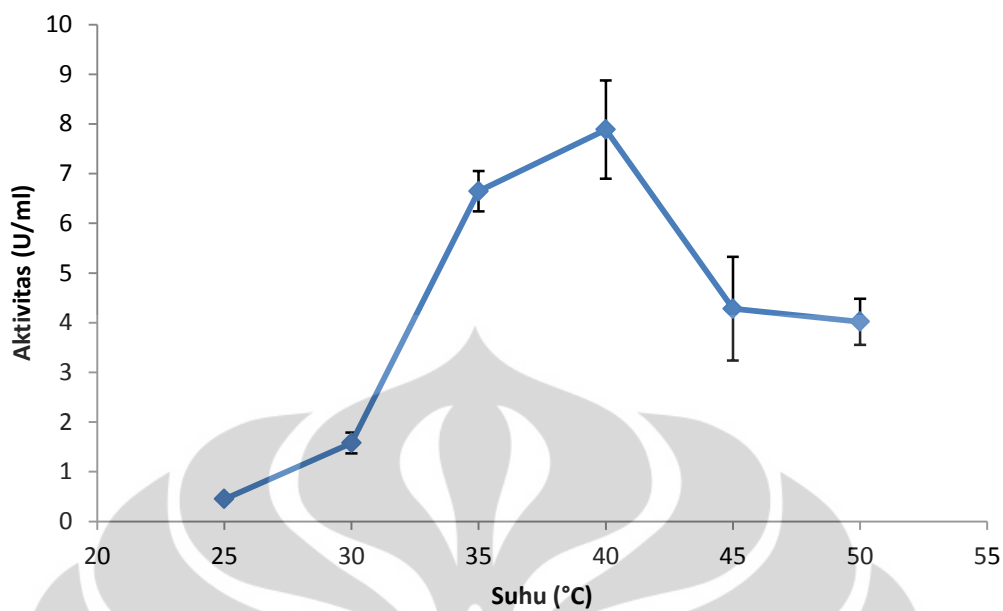


**Gambar 14.** Pengaruh pH pada kandungan protein

Dalam grafik tersebut tampak bahwa kandungan protein adalah rendah pada pH yang paling asam, kemudian naik ketika pH berubah menjadi sedikit basa, dan kemudian turun terus menerus seiring dengan meningkatnya pH. Dari variasi-variasi pH tersebut kandungan protein lebih sedikit pada kondisi basa (pH = 8) daripada ketika kondisi asam (pH = 6) meskipun kedua kondisi basa dan asam tersebut memiliki selisih yang sama dengan pH normal.

#### 4.2. Uji Pendahuluan Suhu

Seperti halnya pH, suhu juga memiliki dampak terhadap metabolisme bakteri. Suhu yang umum dipakai dalam fermentasi bakteri pada umumnya adalah 37°C. Di sini kami melakukan pengujian variasi suhu operasi terhadap aktivitas selulase yang diproduksi, yaitu dari 25°C hingga 50°C. Kami melakukan *trial* dengan rentang suhu tersebut dengan mengacu pada suhu tempat asal bakteri *Bacillus* sp. BPPT CC RK2, yaitu di tempat hidup rayap koran dengan suhu kamar (~30°C). Suhu operasi untuk masing-masing fermentasi dijaga supaya tetap dan stabil oleh sistem kendali yang terdapat pada shaker fermentasi.



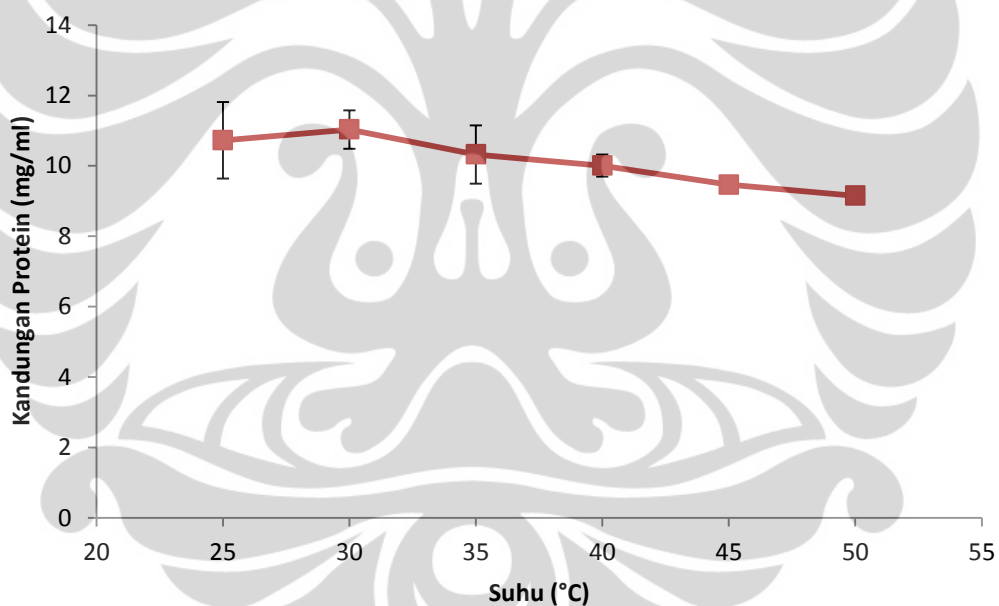
**Gambar 15.** Pengaruh suhu terhadap aktivitas selulase

Dari data yang didapat (Gambar 15), suhu operasi yang menghasilkan produksi selulase dengan aktivitas tinggi, tidak jauh dari suhu 37°C, yaitu berada di suhu 35°C dan 40°C. Suhu yang menghasilkan produksi selulase dengan aktivitas tertinggi sendiri adalah pada 40°C. Di suhu rendah (25°C), aktivitas selulase yang dihasilkan cenderung rendah, begitu juga pada suhu tinggi (~50°C), namun aktivitas tetap lebih rendah pada suhu rendah. Kami menduga bahwa ini terkait dengan metabolisme bakteri *Bacillus* sp. yang tidak begitu baik bila pada suhu rendah maupun tinggi, meskipun pada suhu tinggi enzim-enzim yang berperan dapat beraktivitas lebih baik, namun bila sudah melebihi kemampuannya justru akan merusak enzim yang berperan tersebut dan kemudian akan menurunkan laju metabolismenya. Di suhu rendah pun, meski enzim pada metabolisme *Bacillus* sp. tidak rusak atau terdenaturasi, enzim tersebut tetap memiliki aktivitas yang rendah karena kalor yang diterima sebagai energi aktivasi dalam bertransisi hanya sedikit.

Perlu diketahui juga bahwa pada pengujian ini, substrat yang dipakai adalah dedak beras sebagai sumber karbon (40% w/v) dan air kelapa (20% v/v)

yang mana telah diketahui dari pengujian substrat alternatif terbaik yang dilakukan setelah uji pendahuluan pH, memberikan aktivitas yang optimal.

Nilai suhu optimum (40°C) pada optimasi produksi selulase menggunakan bakteri *Bacillus* sp. pada substrat alami juga dilaporkan oleh Immanuel et al. (2006) hanya saja pH kondisi penelitian yang dilakukannya (pH 7) berbeda sedikit dengan penelitian ini. Ketika kami melakukan optimasi waktu produksi (topik bahasan Agung Marssada, data terlampir) dan memperhatikan jumlah sel pada media fermentasi setiap tiga jam, hasil yang didapat menunjukkan bahwa produksi selulase mencapai optimum ketika bakteri *Bacillus* sp. BPPT CC RK2 berada pada fase eksponensial di mana pada fase tersebut bakteri bertumbuh pesat. Suhu yang dipakai dalam percobaan itu adalah 37°C. Sedangkan P J Piggot (2009) melaporkan bahwa *Bacillus* sp. dapat tumbuh optimum di suhu 40°C.



**Gambar 16.** Pengaruh suhu pada kandungan protein

Seperti halnya pada uji pendahuluan pH, kandungan protein juga diuji dalam percobaan ini. Dari Gambar 15, tampak bahwa kandungan protein mengalami peningkatan sejenak pada suhu 30°C, yang kemudian menurun terus sampai batas maksimum suhu yang diberikan pada percobaan ini, yaitu pada suhu 50°C. Ada kemungkinan protein-protein dalam *broth* mengalami denaturasi lebih

banyak pada suhu tinggi sehingga menyebabkan penurunan kandungan protein yang lebih besar pada suhu tinggi.

### 4.3. Optimasi pH dan Suhu Menggunakan RSM

Setelah melakukan uji pendahuluan, kami melakukan optimasi dengan menggunakan metode permukaan respons. Keunggulan optimasi menggunakan permukaan respons dibandingkan dengan metode optimasi *one-variable-at-a-time* adalah dengan RSM, dapat diketahui bagaimana variabel-variabel yang dioptimasi memiliki pengaruh satu sama lain.

Optimasi suhu dan pH menggunakan RSM kali ini digabung dengan optimasi substrat, yaitu sumber karbon dan sumber nitrogennya. Untuk pembahasannya sendiri, saya mengambil nilai optimum karbon dan nitrogen sebagai nilai yang tetap, kemudian melihat bagaimana interaksi antara suhu dan pH terhadap aktivitas selulase yang diproduksi.

Terdapat dua desain eksperimen RSM yang umum digunakan, yaitu Central Composite Design (CCD) dan Box Behnken Design. Keduanya sama-sama dapat digunakan untuk mengkalibrasi model kuadratik. Letak perbedaannya adalah pada Box-Behnken Design, tidak terdapat center point pada desainnya. Keberadaan center point ini memperbolehkan estimasi efek dari orde-dua. Jadi dengan adanya center point ini dapat diketahui dengan lebih jelas kesesuaian model yang didapat (Mathworks 2011). Meski demikian, karena Box-Behnken Design tidak memiliki center point, maka untuk jumlah faktor  $\leq 4$ , jumlah percobaan yang harus dilakukan menjadi lebih sedikit. Oleh karena Central Composite Design memiliki keunggulan dalam melihat kesesuaian model yang didapat, maka kami memilih menggunakan desain eksperimen ini. CCD juga digunakan dalam penelitian optimasi seperti yang dilakukan oleh Jabasingh & Nachiyar (2010); S. Rashid et al. (2009); Deka et al. (2011); dan Hao et al. (2006).

Dalam mendesain eksperimen optimasi RSM perlu dilakukan pemilihan batas atas dan batas bawah variabel yang akan dioptimasi. Disinilah pentingnya hipotesis atau dugaan nilai optimum dari variabel yang akan diuji. Sebaiknya dugaan nilai optimum variabel yang diuji berada dalam rentang batas atas dan batas bawah bawah input variabel pada RSM. Untuk itulah, data hasil optimasi pada metode *one-variable-at-a-time* yang telah dilakukan sebelumnya dapat

dijadikan dasar yang cukup untuk menentukan batas atas dan batas bawah input variabel RSM. Nilai optimum di metode *one-variable-at-a-time* haruslah masuk dalam rentang batas atas dan batas bawah input variabel RSM. Untuk pemilihan batas-bawah dan batas-atas pH kami cenderung memilih pH 6 sebagai batas-bawah dan pH 8 sebagai batas-atas RSM. Rentang pH yang diuji dalam RSM tidak lebih sempit daripada rentang pH pada uji pendahuluan sebab kami menyadari bahwa nilai optimum pH yang dihasilkan pada optimasi RSM dapat cukup berbeda dengan ketika melakukan uji pendahuluan. Hal ini terkait perbedaan substrat selulosa murni dan substrat alami yang dipakai. Meski demikian, data dari uji pendahuluan pH yang menunjukkan bahwa dalam rentang tersebut terdapat nilai optimum, cukup memberikan informasi yang cukup. Untuk penentuan rentang suhu, kami mengambil rentang yang lebih sempit dari suhu yang diuji di uji pendahuluan. Adapun batas-bawah untuk suhu adalah 32°C dan batas-atas nya adalah 42°C dengan nilai optimum yang diberikan pada uji pendahuluan adalah 40°C. Pengambilan rentang yang lebih sempit ini bertujuan untuk mengurangi deviasi yang terjadi dan untuk melihat proses dengan lebih detil di dugaan kondisi optimum (40°C).

Bila desain eksperimen sudah didapat, dilakukan percobaan sesuai desain eksperimen tersebut dan data yang didapat kemudian diolah di *software* yang digunakan, yakni Design-Expert. Data-data tersebut diolah dengan tujuan untuk mendapatkan persamaan matematis yang menjelaskan tentang efek variabel-variabel terhadap respons yang diinginkan, dalam hal ini aktivitas selulase. Persamaan matematis tersebut bila sesuai dan memenuhi syarat secara statistik dapat dijadikan sebuah model dari peristiwa yang terjadi dalam percobaan ini. Model tersebut kemudian dapat dipakai untuk memprediksi respons dari kondisi yang diinginkan.

Untuk dapat membuat sebuah model matematis dari data desain eksperimen yang dilakukan, kita perlu menguji kesesuaian dan kebenaran model yang diusulkan, melalui statistika. Ada tiga pengujian dalam menentukan suatu model, supaya model yang dipilih adalah benar-benar sesuai dengan kondisi yang ada sebenarnya. Tiga pengujian tersebut antara lain: uji Sum of Squares, uji Lack of fit, dan uji statistika dasar (R-Squared).

### 4.3.1. Uji Statistika Calon Model

#### 4.3.1.1. Uji Sum of Squares

| Source             | Sum of  |    | Mean   | F      | p-value  |
|--------------------|---------|----|--------|--------|----------|
|                    | Squares | df | Square | Value  | Prob > F |
| Mean vs Total      | 858.77  | 1  | 858.77 |        |          |
| Linear vs Mean     | 70.31   | 4  | 17.58  | 3.87   | 0.014    |
| 2FI vs Linear      | 28.19   | 6  | 4.7    | 1.04   | 0.4282   |
| Quadratic vs 2FI   | 83.32   | 4  | 20.83  | 146.95 | < 0.0001 |
| Cubic vs Quadratic | 1.46    | 8  | 0.18   | 1.92   | 0.2021   |
| Residual           | 0.67    | 7  | 0.095  |        |          |
| Total              | 1042.72 | 30 | 34.76  |        |          |

**Suggested**

Dalam uji Sum of Squares, suatu model dinyatakan cocok apabila probabilitas nilai- $p > F$  adalah lebih kecil daripada 0.05. Nilai tersebut memiliki arti yakni ketidaktepatan model yang diberikan adalah kurang dari 5%. Bila melihat dari tabel nilai p-value Prob > F yang kurang dari 0.05 adalah model “Linear vs Mean” dan “Quadratic vs 2FI” dengan nilai terendah dimiliki oleh model “Quadratic vs 2FI” oleh karena itulah model ini disarankan oleh *software* Design-Expert dalam uji Sum of Squares.

#### 4.3.1.2. Uji Lack of Fit

|            | Sum of  |    | Mean   | F      | p-value  |
|------------|---------|----|--------|--------|----------|
| Source     | Squares | df | Square | Value  | Prob > F |
| Linear     | 113.42  | 20 | 5.67   | 133.84 | < 0.0001 |
| 2FI        | 85.23   | 14 | 6.09   | 143.68 | < 0.0001 |
| Quadratic  | 1.91    | 10 | 0.19   | 4.52   | 0.0549   |
| Cubic      | 0.45    | 2  | 0.23   | 5.35   | 0.0573   |
| Pure Error | 0.21    | 5  | 0.042  |        |          |

**Suggested**

Pengujian lack of fit dilakukan untuk melihat apakah terdapat ketidakcocokan antara model dengan orde dua. Model yang baik adalah model yang tidak memiliki lack of fit. Uji hipotesis berikut dilakukan terhadap masing-masing model.

Ho : Tidak ada lack of fit pada model, nilai “p-value prob > F”  $\geq 5\%$

Hi : Ada lack of fit pada model, nilai “p-value prob > F”  $< 5\%$



Berdasarkan hipotesis tersebut, model yang baik adalah model yang tidak menerima  $H_0$ . Bila melihat pada tabel, ada dua model yang tidak menerima  $H_0$ , yaitu model kuadratik dan model kubik. Meski nilai “p-value prob > F” model kubik sedikit lebih besar, nilai “sum of Squares”-nya jauh lebih kecil dari model kuadratik. Nilai sum of squares cukup memberikan peranan penting. Oleh karena itu model kuadratik disarankan oleh *software* Design-Expert.

#### 4.3.1.3. Uji R-Squared

|           | Std. |           | Adjusted  | Predicted |        |                  |
|-----------|------|-----------|-----------|-----------|--------|------------------|
| Source    | Dev. | R-Squared | R-Squared | R-Squared | PRESS  |                  |
| Linear    | 2.13 | 0.3822    | 0.2834    | 0.0863    | 168.07 |                  |
| 2FI       | 2.12 | 0.5355    | 0.291     | 0.2553    | 136.99 |                  |
| Quadratic | 0.38 | 0.9884    | 0.9777    | 0.9384    | 11.33  | <b>Suggested</b> |
| Cubic     | 0.31 | 0.9964    | 0.985     | 0.6436    | 65.56  |                  |

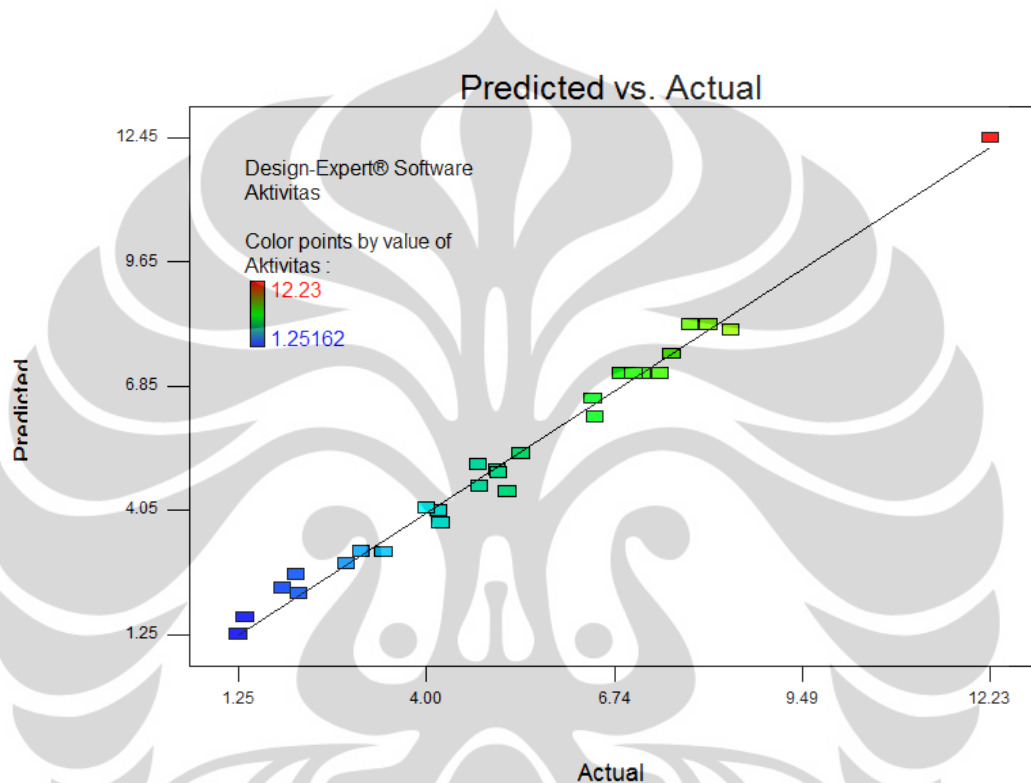
Pada pengujian R-squared, tiap-tiap model dilihat nilai Adjusted-R-Squared nya dan juga Predicted-R-Squared nya. Model yang baik adalah model yang memiliki nilai R-squared mendekati 1. Bila dilihat pada tabel, model kuadratik memenuhi syarat tersebut, baik untuk Adjusted-R-Squared nya dan juga Predicted-R-Squared nya. Sehingga, meski nilai Adjusted-R-Squared model kubik lebih tinggi dari nilai Adjusted-R-Squared model kuadratik, model kubik tidak dapat dipilih karena nilai Predicted-R-Squared tidak memenuhi syarat. Oleh karena itu model kuadratik disarankan oleh *software* Design-Expert.

#### 4.3.2. Permukaan Respons Optimum Yang Dihasilkan

Dari hasil pengujian-pengujian yang telah dilakukan, kami memilih model kuadratik sebagai model permukaan respons aktivitas terhadap pH, suhu dan substrat (sumber karbon dan nitrogen). Adapun model yang dihasilkan adalah berbentuk persamaan matematis yang bila disusun: Aktivitas dengan  $Y$ , C dengan  $X_1$ , N dengan  $X_2$ , pH dengan  $X_3$  dan suhu dengan  $X_4$ , adalah

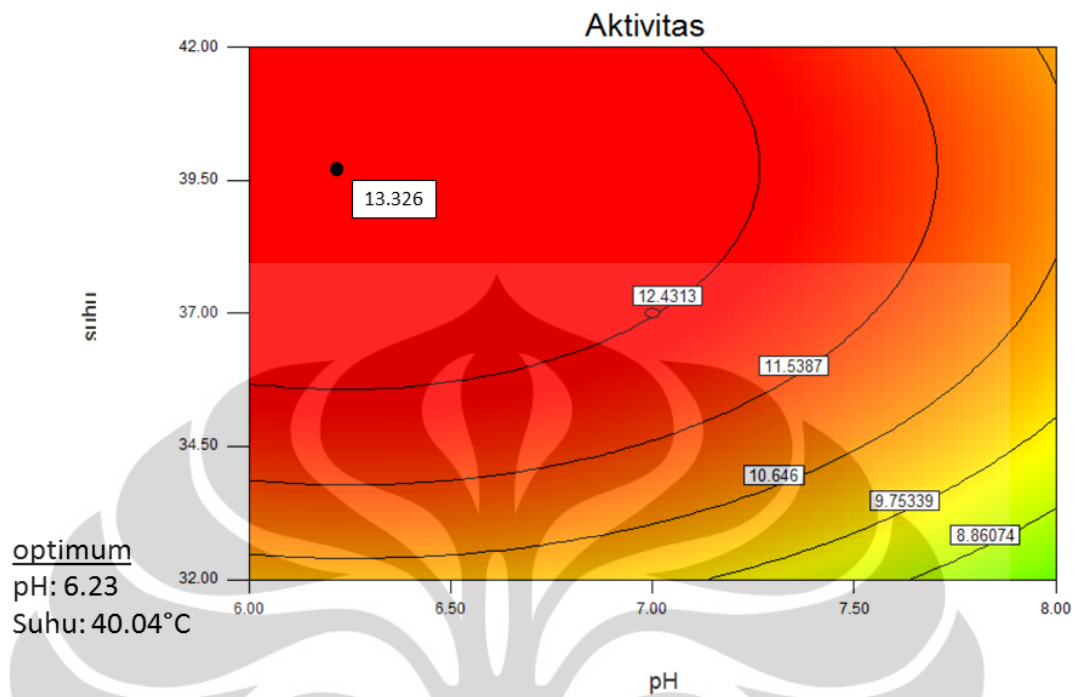
$$\begin{aligned}
 Y_i = & - 18,50583 - 2,0795 X_1 - 1,52359 X_2 + 11,17026 X_3 + 2,11982 X_4 + \\
 & 1,1294 \cdot 10^{-2} X_1 X_2 - 0,066964 X_1 X_3 + 1,9320 \cdot 10^{-2} X_1 X_4 + 0,12316 X_2 X_3 - \\
 & 3,9063 \cdot 10^{-2} X_2 X_4 - 0,012093 X_3 X_4 + 2,3766 \cdot 10^{-2} X_1^2 - 3,3751 \cdot 10^{-2} X_2^2 - 0,79024 \\
 & X_3^2 - 0,047505 X_4^2
 \end{aligned} \tag{7}$$

Model yang dihasilkan dapat dikatakan cukup akurat untuk menggambarkan kondisi yang sebenarnya dari proses yang terjadi. Ini tidak hanya dibuktikan oleh hasil tiga pengujian statistik yang dilakukan sebelumnya, tetapi juga oleh kecilnya penyimpangan yang terjadi antara nilai aktual percobaan dengan nilai prediksi yang dihasilkan oleh model, seperti yang tampak pada Gambar 17.

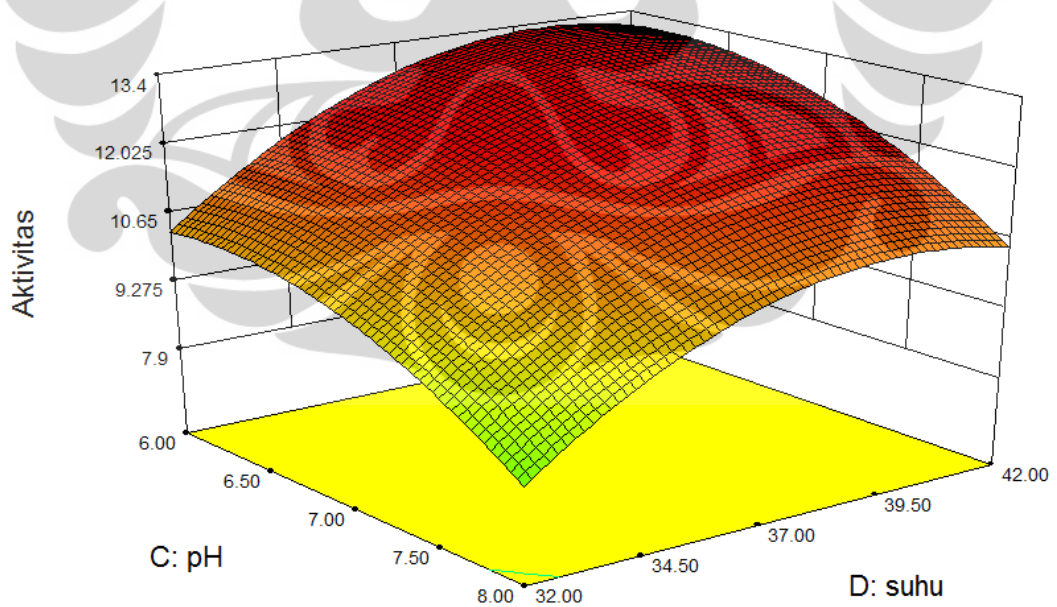


**Gambar 17.** Perbandingan nilai prediksi vs. nilai aktual

Model yang didapat tersebut kemudian ditampilkan dalam grafik kontur permukaan dan juga dalam permukaan tiga dimensi seperti yang ada di Gambar 18 dan Gambar 19. Gambar tersebut merupakan permukaan respons aktivitas selulase yang diproduksi sebagai pengaruh dari variasi pH dan suhu. Nilai variabel sumber karbon dan sumber nitrogen diatur ke nilai optimum pada *running* #24 desain eksperimen RSM yang mana merupakan *running* desain eksperimen yang memberikan aktivitas tertinggi yaitu pada  $C = 50\%$  (w/v) dan  $N = 20\%$  (v/v). Pada percobaan tersebut nilai pH dan suhu optimum percobaan RSM adalah **7.0** dan **37°C**. Hasil keseluruhan *running* desain eksperimen dapat dilihat di bagian lampiran.



**Gambar 18.** Plot kontur aktivitas selulase terhadap variasi pH dan suhu (C: 50%, N: 20%)



**Gambar 19.** Grafik permukaan respons aktivitas selulase terhadap variasi pH dan suhu

Dari grafik tampak bahwa respon aktivitas tertinggi dari model yang diberikan berada pada nilai **pH 6.23** dan **suhu 40.04°C**. Dari grafik respons 3D, tampak bahwa pH cenderung menurun pada pH tinggi. Nilai pH optimum juga berada di kondisi asam. Hal ini membuktikan yang dikatakan Percival Zhang et al. (2006) bahwa memang nilai optimum uji pendahuluan pH yang menggunakan substrat murni (CMC) tidak dapat disejajarkan dengan nilai optimum RSM yang menggunakan substrat alami (dedak) sebagai sumber karbonnya (pH uji pendahuluan : pH RSM = 7.5 : 6.23).

### 4.3.3. Interaksi Respons Antar Variabel

Untuk mengetahui interaksi respons antar variabel yang terkandung dalam persamaan yang didapat, kita perlu merujuk pada hasil *analysis of variance* (ANOVA) model. Model persamaan yang didapat di percobaan ini memiliki 14 *term* dengan masing-masing *term* memiliki 1 derajat bebas. *Term* tersebut terdiri dari 4 efek linear, 6 efek interaksi dan 4 efek kuadratik.

**Tabel 14.** ANOVA model RSM aktivitas selulase

| Source      | Sum of Squares | df | Mean Square | F Value | p-value Prob > F |                        |
|-------------|----------------|----|-------------|---------|------------------|------------------------|
| Model       | 181.82         | 14 | 12.99       | 91.62   | < 0.0001         | <b>significant</b>     |
| A-C         | 51.77          | 1  | 51.77       | 365.22  | < 0.0001         |                        |
| B-N         | 7.85           | 1  | 7.85        | 55.39   | < 0.0001         |                        |
| C-pH        | 7.42           | 1  | 7.42        | 52.31   | < 0.0001         |                        |
| D-suhu      | 3.27           | 1  | 3.27        | 23.1    | 0.0002           |                        |
| AB          | 1.28           | 1  | 1.28        | 9       | 0.009            |                        |
| AC          | 1.79           | 1  | 1.79        | 12.65   | 0.0029           |                        |
| AD          | 3.73           | 1  | 3.73        | 26.33   | 0.0001           |                        |
| BC          | 6.07           | 1  | 6.07        | 42.81   | < 0.0001         |                        |
| BD          | 15.26          | 1  | 15.26       | 107.65  | < 0.0001         |                        |
| CD          | 0.058          | 1  | 0.058       | 0.41    | 0.5303           |                        |
| A^2         | 9.68           | 1  | 9.68        | 68.31   | < 0.0001         |                        |
| B^2         | 19.53          | 1  | 19.53       | 137.76  | < 0.0001         |                        |
| C^2         | 17.13          | 1  | 17.13       | 120.84  | < 0.0001         |                        |
| D^2         | 38.69          | 1  | 38.69       | 272.92  | < 0.0001         |                        |
| Residual    | 2.13           | 15 | 0.14        |         |                  |                        |
| Lack of Fit | 1.91           | 10 | 0.19        | 4.52    | 0.0549           | <b>not significant</b> |
| Pure Error  | 0.21           | 5  | 0.042       |         |                  |                        |
| Cor Total   | 183.95         | 29 |             |         |                  |                        |

Dalam Tabel 14, A menyatakan konsentrasi sumber karbon, B menyatakan konsentrasi sumber nitrogen, C menyatakan pH dan D menyatakan suhu. *Term* yang terdiri dari satu huruf (variabel tunggal) menyatakan efek linear sedangkan *term* dua huruf (dua variabel), menyatakan efek interaksi.

Untuk bisa dinyatakan memiliki pengaruh yang signifikan, setiap *term* harus memiliki nilai “probabilitas p-value > F” yang lebih dari 0.05. Jika melihat pada tabel ANOVA, semua *term* memiliki nilai yang signifikan kecuali *term* CD. Hal ini berarti bahwa semua efek linear dari masing-masing variabel dan efek interaksi antar variabel beserta efek kuadratnya memiliki pengaruh yang signifikan terhadap respons yang dihasilkan, kecuali pada efek interaksi antara pH dan suhu. Dengan demikian interaksi antara variabel pH dan suhu tidak memiliki pengaruh signifikan terhadap aktivitas selulase yang dihasilkan. Meski demikian interaksi antara pH dan konsentrasi dedak, pH dan konsentrasi nitrogen, suhu dan konsentrasi dedak, serta suhu dan konsentrasi nitrogen, tetap memiliki pengaruh yang signifikan terhadap respons aktivitas selulase yang dihasilkan. Dan untuk mengetahui seperti apa pengaruh yang diberikan dari masing-masing *term* tersebut, kita perlu melihat estimasi koefisien dari masing-masing *term*.

**Tabel 15.** Estimasi koefisien dari tiap faktor

| Factor         | Coefficient Estimate | df | Standard Error |
|----------------|----------------------|----|----------------|
| Intercept      | 7.13                 | 1  | 0.15           |
| A-C            | 1.47                 | 1  | 0.077          |
| B-N            | -0.57                | 1  | 0.077          |
| C-pH           | -0.56                | 1  | 0.077          |
| D-suhu         | 0.37                 | 1  | 0.077          |
| AB             | 0.28                 | 1  | 0.094          |
| AC             | -0.33                | 1  | 0.094          |
| AD             | 0.48                 | 1  | 0.094          |
| BC             | 0.62                 | 1  | 0.094          |
| BD             | 0.98                 | 1  | 0.094          |
| CD             | -0.06                | 1  | 0.094          |
| A <sup>2</sup> | 0.59                 | 1  | 0.072          |
| B <sup>2</sup> | -0.84                | 1  | 0.072          |
| C <sup>2</sup> | -0.79                | 1  | 0.072          |
| D <sup>2</sup> | -1.19                | 1  | 0.072          |

Estimasi koefisien yang terdapat dalam tabel tersebut merupakan koefisien dari tiap faktor yang terdapat dalam persamaan model *coded* sebagai berikut

$$\text{Aktivitas} = 7.13 + 1.47A - 0.57B - 0.56C + 0.37D + 0.28AB - 0.33AC + 0.48AD + 0.62BC + 0.98BD - 0.06CD + 0.59A^2 - 0.84B^2 - 0.79C^2 - 1.19D^2 \quad (8)$$

Model *coded* merupakan model dengan input batas-atas, batas-atas beserta nilai alpha-nya terkodekan menjadi -1 untuk batas bawah bawah, +1 untuk batas atas, -2 untuk alpha minus, dan +2 untuk alpha plus. Dikarenakan tiap-tiap batas nilai variabel memiliki nilai yang standar, maka model yang dihasilkan dapat diinterpretasi dengan jelas. Dari Tabel 15 terbukti bahwa efek interaksi antara pH dan suhu memiliki pengaruh yang tidak signifikan karena nilai koefisien estimasinya sangatlah kecil jika dibandingkan dengan estimasi koefisien faktor-faktor lain. Dari faktor-faktor yang ada, yang memberikan pengaruh positif terhadap respons aktivitas selulase yang dihasilkan antara lain

- + Efek linear konsentrasi dedak
- + Efek linear suhu
- + Efek kuadrat konsentrasi substrat

Sedangkan, faktor yang memberikan pengaruh negatif terhadap respons aktivitas selulase antara lain

- Efek linear konsentrasi air kelapa
- Efek linear pH
- Efek kuadrat konsentrasi air kelapa
- Efek kuadrat pH
- Efek kuadrat suhu

Untuk interaksi antar 2 faktor, kita tidak dapat langsung menjustifikasi bahwa tanda positif di estimasi koefisien selalu memberikan efek positif pada respons aktivitas selulase. Ada kalanya ketika 2 faktor sama-sama memiliki nilai yang besar, aktivitas selulase justru menurun. Yang bisa dikatakan di sini adalah tanda positif di koefisien estimasi pada faktor interaksi menunjukkan bahwa interaksi yang terjadi antara kedua faktor tersebut adalah interaksi sinergis. Begitu

sebaliknya, tanda negatif di koefisien estimasi pada faktor interaksi menunjukkan bahwa interaksi yang terjadi antara kedua faktor tersebut adalah interaksi antagonis. Interaksi 2 faktor yang merupakan interaksi sinergis antara lain

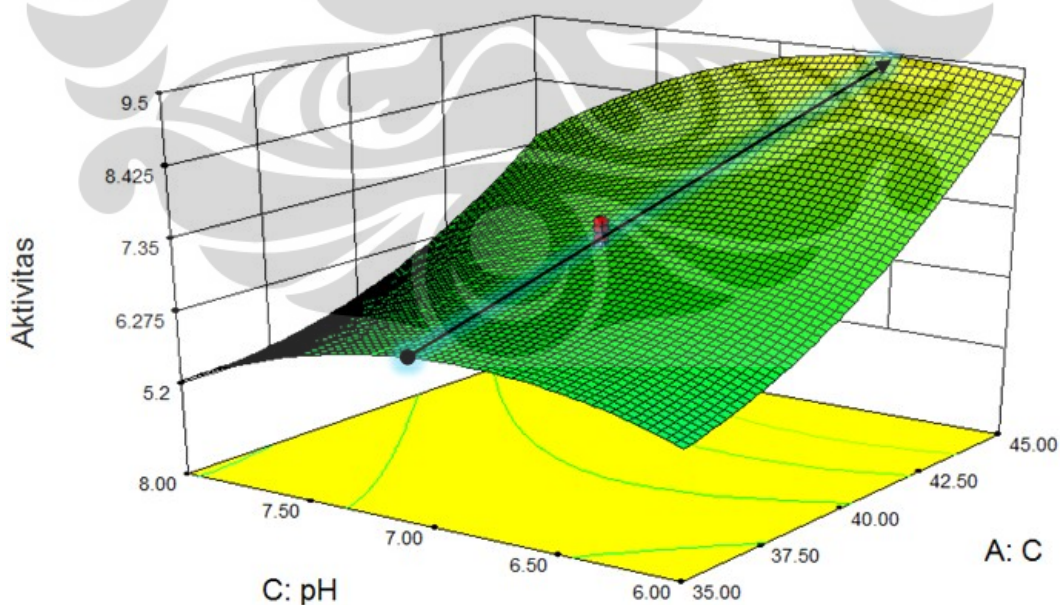
- + Interaksi antara konsentrasi dedak dan air kelapa
- + Interaksi antara konsentrasi dedak dan suhu
- + Interaksi antara konsentrasi air kelapa dan pH
- + Interaksi antara konsentrasi air kelapa dan suhu

Sedangkan, interaksi 2 faktor yang merupakan interaksi antagonis antara lain

- Interaksi antara konsentrasi dedak dan pH
- Interaksi antara pH dan suhu

Pengaruh negatif efek linear pH tergambar jelas pada grafik 3D respons permukaan (Gambar 19) di mana aktivitas cenderung menurun seiring dengan kenaikan pH. Pengaruh positif efek linear suhu juga tergambar jelas pada grafik 3D permukaan respons (Gambar 19) di mana aktivitas cenderung meningkat seiring dengan kenaikan suhu.

#### 4.3.3.1. Interaksi antara pH dan Konsentrasi Sumber Karbon

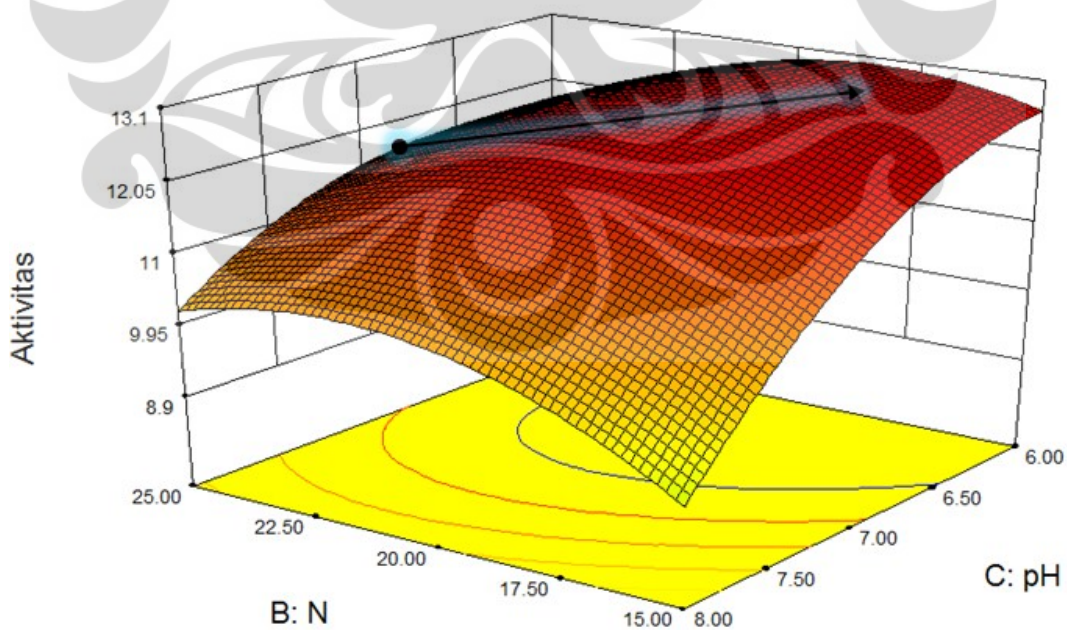


**Gambar 20.** Interaksi pH & C dimana N: 20%, suhu 37°C

Dari Gambar 20 tampak bahwa untuk konsentrasi dedak yang rendah (35%), aktivitas optimum dihasilkan ketika pH berada pada kondisi normal (sekitar pH 7). Dan ketika konsentrasi dedak semakin tinggi, nilai pH yang menghasilkan aktivitas optimum bergerak ke arah pH asam, yaitu antara pH 6.5 – pH 6.0.

Meskipun pH yang cukup rendah dapat mengganggu metabolisme bakteri, juga dapat membuat protein terdenaturasi, namun tampaknya pH yang rendah memberikan dampak positif terhadap produksi selulase ketika konsentrasi sumber karbon yang semakin tinggi. Lynd et al. (2002) melaporkan bahwa pH yang rendah diperlukan untuk membantu proses degradasi lignin yang melindungi selulosa dalam substrat alami seperti dedak beras. Jika demikian, maka pada kondisi asam, makin besar konsentrasi substrat alami, makin banyak pula selulosa yang dapat diakses oleh bakteri, maka makin besar juga enzim yang dapat dihasilkan. Dengan demikian, aktivitas optimum didapat ketika pH semakin menurun dan konsentrasi dedak semakin meningkat. Interaksinya adalah interaksi antagonis.

#### 4.3.3.2. Interaksi antara pH dan Konsentrasi Sumber Nitrogen

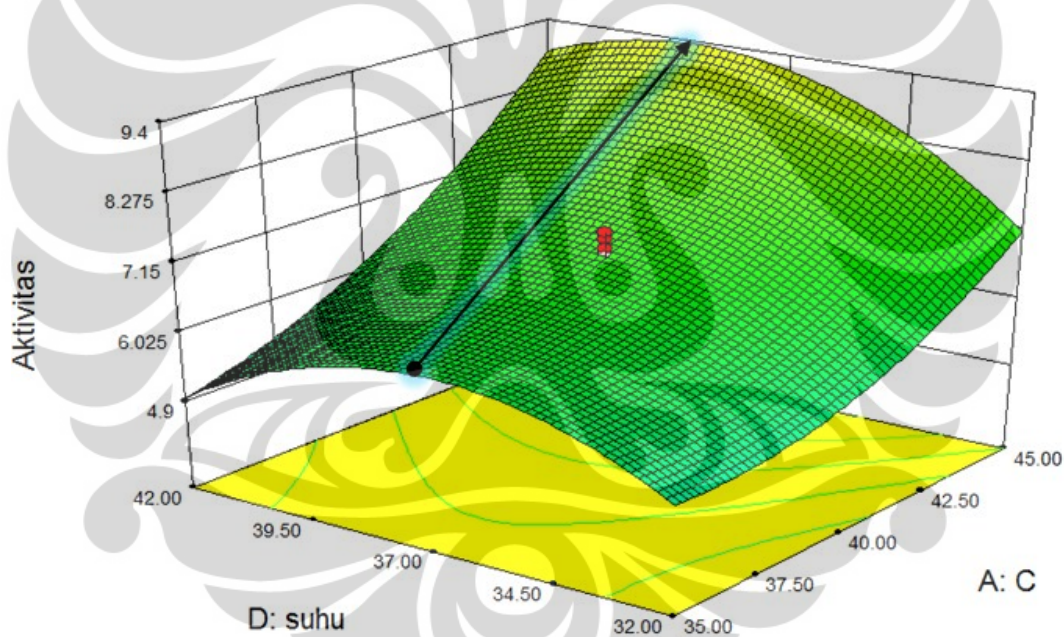


**Gambar 21.** Interaksi pH & N pada C: 50%, suhu 37°C



Dari Gambar 21, interaksi yang terjadi antara pH dan konsentrasi sumber nitrogen adalah pada pH tinggi aktivitas cenderung optimum pada konsentrasi air kelapa yang tinggi, namun ketika pH rendah, aktivitas justru meningkat di nilai konsentrasi air kelapa yang cenderung rendah. Interpretasi lain yang dapat digambarkan adalah ketika konsentrasi air kelapa tinggi (25%) pH yang dibutuhkan agar aktivitas optimum adalah berada di kisaran pH normal, dan ketika konsentrasi air kelapa diturunkan, pH yang dibutuhkan untuk mencapai aktivitas optimum adalah berada di pH asam. Dengan demikian, aktivitas optimum didapat ketika pH semakin menurun dan konsentrasi nitrogen semakin menurun pula. Interaksinya adalah interaksi sinergis.

#### 4.3.3.3. Interaksi antara Suhu dan Konsentrasi Sumber Karbon

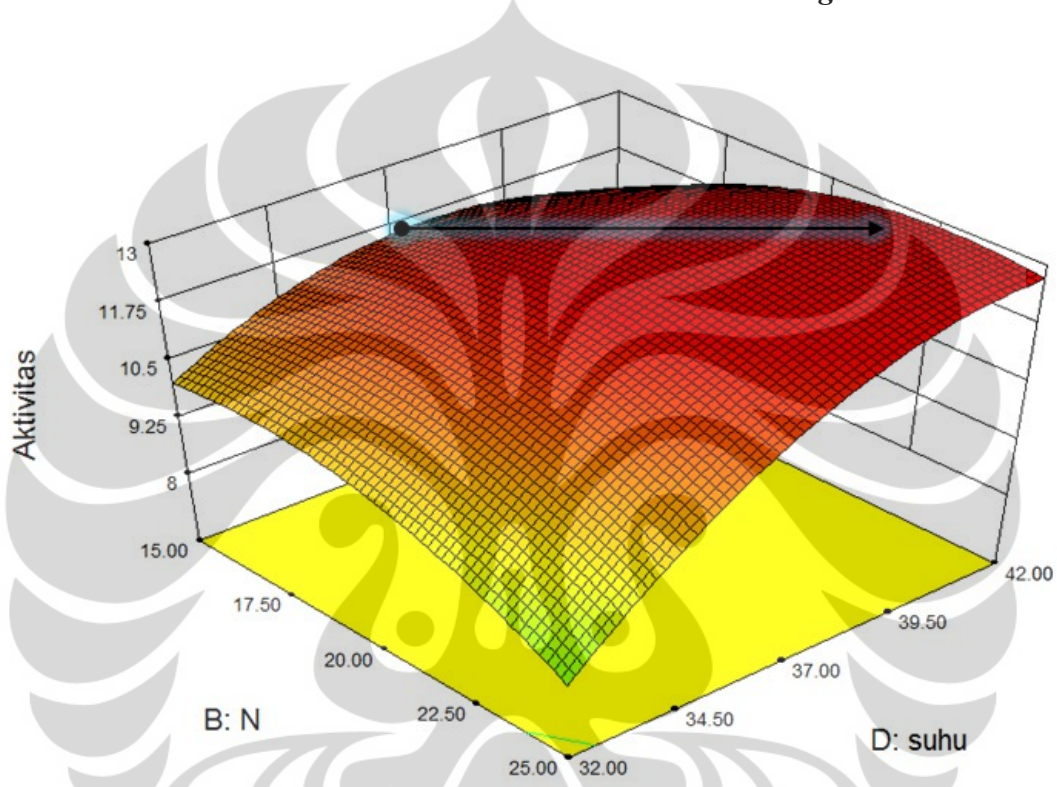


Gambar 22. Interaksi suhu & C dimana N: 20%, pH 7

Dari Gambar 22 tampak bahwa aktivitas meningkat ketika konsentrasi dedak meningkat. Pada peningkatan tersebut, nilai suhu optimum bergeser dari suhu 37°C ke nilai yang lebih tinggi, yakni pada kisaran suhu 39.5°C. Pada saat konsentrasi dedak tinggi di mana *inducer* enzim selulase banyak tersedia, bakteri memiliki kecenderungan untuk menjadi lebih aktif. Hal ini perlu didukung dengan kalor yang cukup untuk memenuhi energi aktivasi enzim-enzim yang berperan

dalam metabolisme bakteri supaya keadaan transisi enzim tersebut ( $[E]+[S] \rightarrow [E][S] \rightarrow [E]+[P]$ ) dapat lebih cepat dilalui sehingga reaksinya pun dapat lebih cepat. Dengan demikian, aktivitas optimum didapat ketika suhu semakin meningkat dan konsentrasi dedak semakin meningkat. Interaksinya adalah interaksi sinergis.

#### 4.3.3.4. Interaksi antara Suhu dan Konsentrasi Sumber Nitrogen



**Gambar 23.** Interaksi suhu & N dimana C: 50%, pH 7

Dari Gambar 23, tampak bahwa aktivitas bergerak menuju optimum ketika suhu bergeser dari kisaran nilai 37°C ke kisaran nilai 39.5°C untuk nilai konsentrasi air kelapa yang semakin meningkat. Seperti halnya interaksi antara suhu dengan konsentrasi dedak, adanya asupan makanan yang banyak (dalam hal ini jumlah asupan nitrogen) membuat bakteri cenderung ingin lebih aktif. Dan hal ini perlu diimbangi oleh tersedianya kalor yang cukup bagi aktivitas bakteri yang meningkat tadi. Interaksi yang terjadi antara suhu dan konsentrasi air kelapa adalah interaksi sinergis.

## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1. Kesimpulan

Metode optimasi menggunakan RSM menghasilkan suatu optimasi kondisi yang nampak jelas memperlihatkan hubungan-hubungan antar variabel yang terlibat. Hubungan-hubungan tersebut dilaporkan dalam penelitian ini. Model aktual yang dihasilkan melalui RSM adalah

$$Y_i = - 18,50583 - 2,0795 X_1 - 1,52359 X_2 + 11,17026 X_3 + 2,11982 X_4 + 1,1294 \cdot 10^{-2} X_1 X_2 - 0,066964 X_1 X_3 + 1,9320 \cdot 10^{-2} X_1 X_4 + 0,12316 X_2 X_3 - 3,9063 \cdot 10^{-2} X_2 X_4 - 0,012093 X_3 X_4 + 2,3766 \cdot 10^{-2} X_1^2 - 3,3751 \cdot 10^{-2} X_2^2 - 0,79024 X_3^2 - 0,047505 X_4^2$$

Dengan  $Y_i$ : aktivitas selulase,  $X_1$ : konsentrasi dedak,  $X_2$ : konsentrasi air kelapa,  $X_3$ : pH, dan  $X_4$ : suhu

Adapun kondisi optimum pH dan suhu hasil interpretasi model RSM adalah **pH 6.23** dan **suhu 40.04°C** sementara untuk kondisi optimum pH dan suhu pada saat melakukan percobaan RSM adalah **pH 7.0** dan **suhu 37°C**.

#### 5.2. Saran

Perlu diteliti lebih lanjut tentang penyebab efek interaksi pH dan suhu yang menyebabkan faktor tersebut tidak memiliki pengaruh signifikan terhadap respons aktivitas selulase yang dihasilkan. Selain itu perlu juga dilakukan percobaan verifikasi terhadap model yang dihasilkan di percobaan ini meskipun model ini sudah cukup baik ( $R\text{-squared} > 90\%$ ).

## DAFTAR PUSTAKA

- Acharya, P.B., Acharya, D.K. & Modi, H.A., 2008. Optimization for cellulase production by *Aspergillus niger* using saw dust as substrate. *Journal of Biotechnology*, 7(22), pp.4147-4152.
- Andrew Syred, 2010. Coloured SEM of *Bacillus* sp. bacteria. Available at: [http://www.visualphotos.com/image/1x6040123/coloured\\_sem\\_of\\_bacillus\\_sp\\_bacteria](http://www.visualphotos.com/image/1x6040123/coloured_sem_of_bacillus_sp_bacteria).
- Ariffin, H. et al., 2006. Production and Characterisation of Cellulase by *Bacillus Pumilus* Eb3. *International Journal of Engineering*, 3(1), pp.47-53.
- Bocchini, D.A. et al., 2002. Optimization of xylanase production by *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation using response surface methodology. *Process Biochemistry*, 38(5), pp.727-731.
- Box, G.E.P. & Draper, N.R., 1987. *Empirical Model-Building and Response Surfaces*, Wiley. Available at: <http://psycnet.apa.org/psycinfo/1987-97236-000>.
- Coelho, L.F. et al., 2011. Lactic acid production by new *Lactobacillus plantarum* LMISM6 grown in molasses: optimization of medium composition. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 28(1), pp.27-36.
- Croarkin, C. & Tobias., P., 2003. Comparisons of response surface designs. In *Engineering Statistic Handbook*.
- Dahiya, S., Singh, N. & Rana, J.S., 2009. Optimization of growth parameters of phytase producing fungus using RSM. *Industrial Research*, 68(November), pp.955-959.
- Deka, D. et al., 2011. Enhancement of Cellulase Activity from a New Strain of *Bacillus subtilis* by Medium Optimization and Analysis with Various Cellulosic Substrates. *Enzyme research*, 2011. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3102325&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Deswal, D., Khasa, Y.P. & Kuhad, R.C., 2011. Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Fomitopsis* sp. RCK2010 under solid state fermentation. *Bioresource technology*, 102(10), pp.6065-72.
- Galbe, M. & Zacchi, G., 2007. Pretreatment of Lignocellulosic Materials for Efficient Bioethanol Production. *Adv Biochem Engin/Biotechnol*, 108, pp.41-65.

- Gangadharan, D. et al., 2008. Response surface methodology for the optimization of alpha amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Bioresource Technology*, 99(11), pp.4597-4602. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17761415>.
- Geiger, E., 1997. Statistical Methods For Fermentation Optimization. In *Fermentation & Biochemical Engineering Handbook*. William Andrew Publishing, p. 161.
- Han, L. et al., 2009. Optimizing cellulase production of *Penicillium waksmanii* F10-2 with response surface methodology. *Journal of Biotechnology*, 8(16), pp.3879-3886.
- Hao, X.-cai, Yu, X.-bin & Yan, Z.-li, 2006. Optimization of the Medium for the Production of Cellulase by the Mutant *Trichoderma reesei* WX-112 Using Response Surface Methodology. *Food Technology Biotechnology*, 44(1), pp.89-94.
- Heck, J.X. et al., 2005. Optimization of cellulase-free xylanase activity produced by *Bacillus coagulans* BL69 in solid-state cultivation. *Process Biochemistry*, 40(1), pp.107-112. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032959203004709>.
- Hogg, S., 2005. *Essential Microbiology* S. Hogg, ed., John Wiley & Sons, Inc. Available at: [http://books.google.com/books?id=6oJFAQAIAAJ&source=gbs\\_ViewAPI](http://books.google.com/books?id=6oJFAQAIAAJ&source=gbs_ViewAPI).
- Iffah, H., 2010. *Optimasi produksi enzim sistem selulase dari Bacillus coagulans*. Universitas Negeri Malang.
- Immanuel, G. et al., 2006. Effect of different growth parameters on endoglucanase enzyme activity by bacteria isolated from coir retting effluents of estuarine environment. *International Journal Environmental Science Technology*, 2(1), pp.25-34.
- Jabasingh, S.A. & Nachiyar, C.V., 2010. A new combinational statistical approach for cellulase optimization in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Science and Technology*, 3(8), pp.871-878.
- Kocher, G., Kalra, K. & Banta, G., 2008. Optimization of cellulase production by submerged fermentation of rice straw by *Trichoderma harzianum* Rut-C 8230. *The Internet Journal of Microbiology*, 5(2). Available at: <http://www.ispub.com/journal/the-internet-journal-of-microbiology/volume-5-number-2/optimization-of-cellulase-production-by-submerged-fermentation-of-rice-straw-by-trichoderma-harzianum-rut-c-8230.html>.
- Kotchoni, S.O. et al., 2006. Purification and Biochemical Characterization of Carboxymethyl Cellulase (CMCase) from a Catabolite Repression

- Insensitive Mutant of *Bacillus pumilus*. *International Journal of Agriculture & Biology*, 08(2), pp.286-292.
- Krishna, C., 1999. Production of bacterial cellulases by solid state bioprocessing of banana wastes. *Bioresource Technology*, 69, pp.231-239.
- Kumalasari, A.T., 2003. *Optimasi Produksi Selulase Penicillium naigioense (s11) Pada Berbagai Perlakuan Substrat Polard*. Institut Pertanian Bogor.
- Lee, B.-H. et al., 2010. Industrial scale of optimization for the production of carboxymethylcellulase from rice bran by a marine bacterium, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* A-53. *Enzyme and Microbial Technology*, 46(1), pp.38-42.
- Lee, C.K., Darah, I. & Ibrahim, C.O., 2011. Production and Optimization of Cellulase Enzyme Using *Aspergillus niger* USM AI 1 and Comparison with *Trichoderma reesei* via Solid State Fermentation System. *Biotechnology research international*, 2011, p.658493.
- Liang, Y. et al., 2010. Optimization of growth medium and enzyme assay conditions for crude cellulases produced by a novel thermophilic and cellulolytic bacterium, *Anoxybacillus* sp. 527. *Applied biochemistry and biotechnology*, 160(6), pp.1841-52.
- Lowry, O.H., Randall, R.J. & Lewis, A., 1951. Protein Measurement with The Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*.
- Lynd, L.R. et al., 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and molecular biology reviews*, 66(3), pp.506–577.
- MacWilliams, M.P. & Liao, M.-K., 2006. Luria Broth (LB) and Luria Agar (LA) Media and Their Uses Protocol. Available at: <http://www.microbelibrary.org/component/resource/laboratory-test/3031-luria-broth-lb-and-luria-agar-la-media-and-their-uses-protocol>.
- Mathworks, 2011. Response Surface Designs - MATLAB & Simulink Example. Available at: <http://www.mathworks.com/help/toolbox/stats/f56635.html> [Accessed January 3, 2012].
- Mawadza, C. et al., 2000. Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains. *Journal of biotechnology*, 83(3), pp.177-87. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11051415>.
- Miller, G.L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), pp.426-428.

- Mussatto, S.I. & Teixeira, J.A., 2010. Lignocellulose as raw material in fermentation processes. *Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, pp.897-907.
- Nguyen, V.T. & Quyen, D.T., 2010. Optimizing culture conditions for the production of endo- $\alpha$ -1,4-glucanase by *Aspergillus awamori* strain Vietnam Type Culture Collection (VTCC) -F099. *Journal of Biotechnology*, 9(38), pp.6337-6344.
- Office of Biological and Environmental Research of the U.S. Department of Energy Office of Science., 2005. Cellulose Structure and Hydrolysis Challenges. p.204. Available at: <https://public.ornl.gov/site/gallery/detail.cfm?id=181>.
- Otajewwo, F.. & Aluyi, H.S., 2010. Cultural Conditions Necessary For Optimal Cellulase Yield By Cellulolytic Bacterial Organisms As They Relate To Residual Sugars Released In Broth Medium. *Nigerian Journal of Microbiology*, 24(1), pp.2168-2182.
- P J Piggot, 2009. *Bacillus Subtilis*. In M. Schaechter, ed. *Encyclopedia of Microbiology*.
- Paul, J. & Varma, A.K., 1993. Characterization of cellulose and hemicellulose degrading *Bacillus* sp. from termite infested soil. *Current Science*, 64(4), pp.262-266.
- Percival Zhang, Y.-H., Himmel, M.E. & Mielenz, J.R., 2006. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnology advances*, 24(5), pp.452-81.
- Lan Pham, P. et al., 1998. Production of xylanases by *Bacillus polymyxa* using lignocellulosic wastes. *Industrial Crops and Products*, 7(2-3), pp.195-203. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669097000484>.
- Rashid, S. et al., 2009. Optimization of the Nutrient Suppliers for Cellulase Production with the Basal Medium Palm Oil Mill Effluent. *Media*, pp.809-815.
- Ray, A.K. et al., 2007. Optimization Of Fermentation Conditions For Cellulase Production By *Bacillus Subtilis* Cy5 And *Bacillus Circulans* Tp3 Isolated From Fish Gut. *Acta Ichthyologica Et Piscatoria*, 37, pp.47-53.
- Schülein, M., 2000. Protein engineering of cellulases. *Biochimica et biophysica acta*, 1543(2), pp.239-252. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11150609>.

Singhania, R.R. et al., 2010. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, 46(7), pp.541-549.

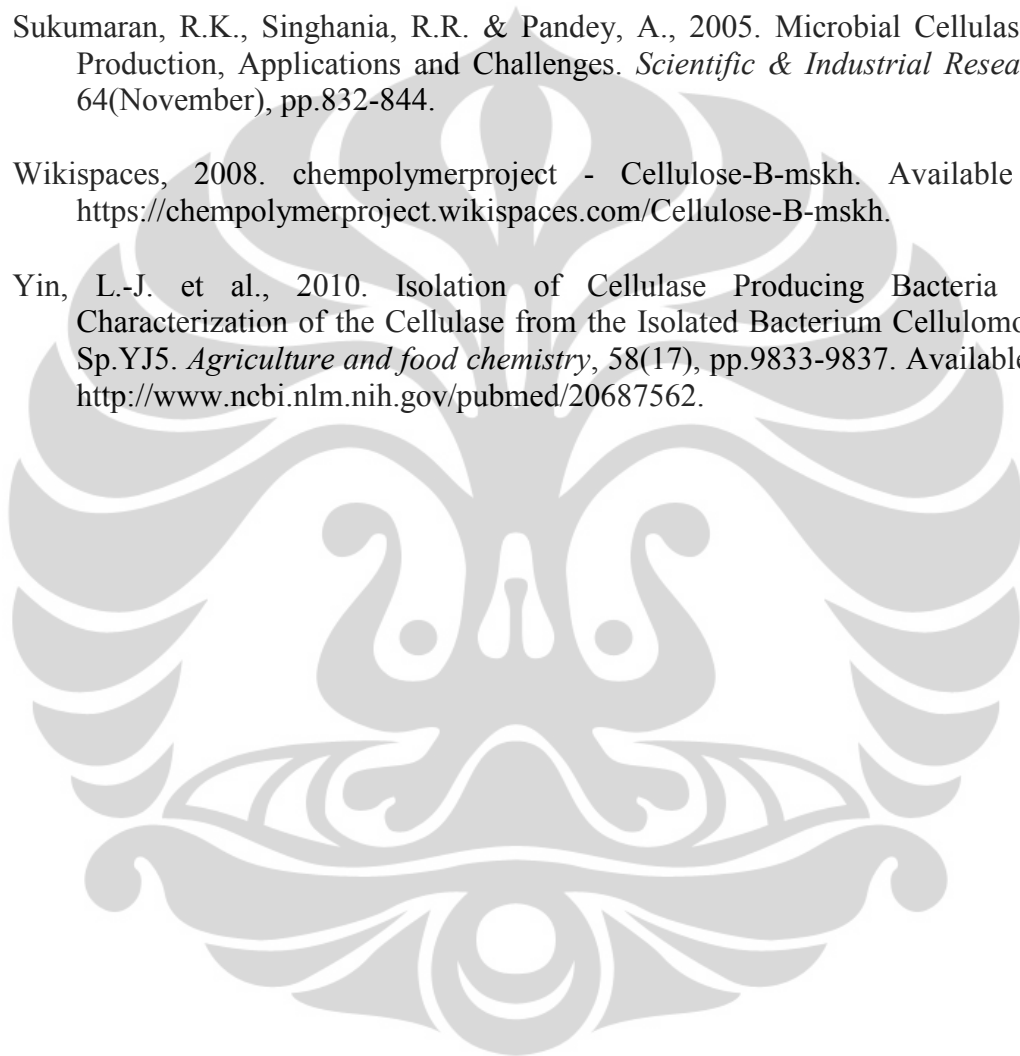
Stat-Ease, 2007. Design-Expert. Available at: <http://www.statease.com/>.

Suhartono, 2008. DoE Module 1: Introduction. *Institut Sepuluh November*. Available at: <http://oc.its.ac.id/detilmateri.php?idp=234>.

Sukumaran, R.K., Singhania, R.R. & Pandey, A., 2005. Microbial Cellulases - Production, Applications and Challenges. *Scientific & Industrial Research*, 64(November), pp.832-844.

Wikispaces, 2008. chempolymerproject - Cellulose-B-mskh. Available at: <https://chempolymerproject.wikispaces.com/Cellulose-B-mskh>.

Yin, L.-J. et al., 2010. Isolation of Cellulase Producing Bacteria and Characterization of the Cellulase from the Isolated Bacterium *Cellulomonas* Sp.YJ5. *Agriculture and food chemistry*, 58(17), pp.9833-9837. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20687562>.





## LAMPIRAN

### A. Hasil Uji Pendahuluan pH

| <b>pH</b>  | <b>Aktivitas<br/>(U/ml)</b> | <b>Kandungan Protein<br/>(mg/ml)</b> |
|------------|-----------------------------|--------------------------------------|
| <b>6</b>   | 1.031                       | 5.178                                |
| <b>6.5</b> | 1.088                       | 5.386                                |
| <b>7</b>   | 1.304                       | 5.291                                |
| <b>7.5</b> | 1.645                       | 5.058                                |
| <b>8</b>   | 0.567                       | 5.039                                |

### B. Hasil Uji Pendahuluan Suhu

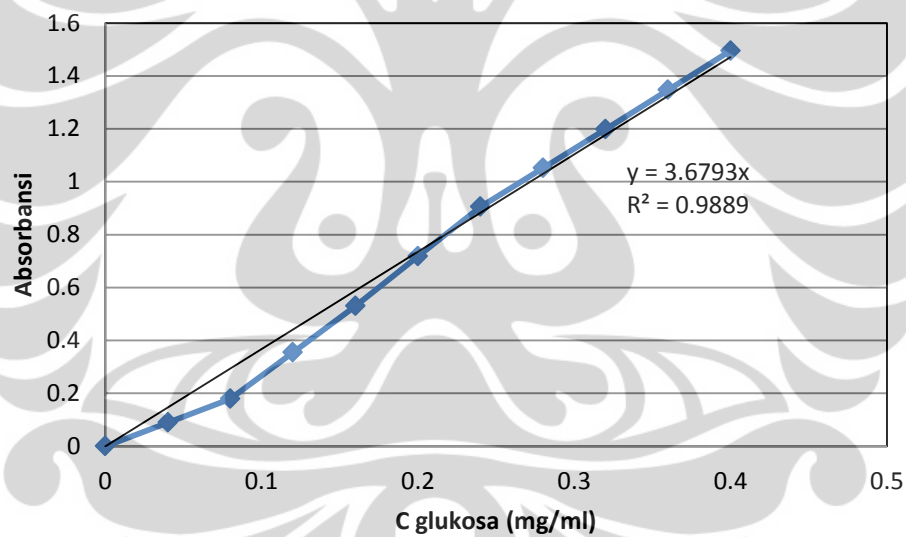
| <b>Suhu<br/>(°C)</b> | <b>Aktivitas<br/>(U/ml)</b> | <b>Kandungan Protein<br/>(mg/ml)</b> |
|----------------------|-----------------------------|--------------------------------------|
| <b>25</b>            | 0.451                       | 10.725                               |
| <b>30</b>            | 1.577                       | 11.034                               |
| <b>35</b>            | 6.646                       | 10.324                               |
| <b>40</b>            | 7.885                       | 10.008                               |
| <b>45</b>            | 4.281                       | 9.466                                |
| <b>50</b>            | 4.018                       | 9.151                                |

## C. Hasil Percobaan RSM

| Nomor Uji | % Dedak | % Air Kelapa | pH | Suhu (oC) | Aktivitas (U/ml) |
|-----------|---------|--------------|----|-----------|------------------|
| 1         | 45      | 15           | 6  | 42        | 8.450            |
| 2         | 35      | 25           | 6  | 32        | 1.252            |
| 3         | 40      | 20           | 7  | 37        | 7.410            |
| 4         | 40      | 20           | 7  | 37        | 6.839            |
| 5         | 35      | 15           | 6  | 32        | 6.460            |
| 6         | 40      | 10           | 7  | 37        | 5.057            |
| 7         | 45      | 25           | 6  | 32        | 5.180            |
| 8         | 35      | 25           | 6  | 42        | 3.380            |
| 9         | 35      | 15           | 6  | 42        | 4.005            |
| 10        | 45      | 25           | 6  | 42        | 8.120            |
| 11        | 40      | 20           | 5  | 37        | 4.756            |
| 12        | 40      | 20           | 7  | 37        | 7.059            |
| 13        | 40      | 20           | 7  | 37        | 7.024            |
| 14        | 45      | 15           | 6  | 32        | 7.850            |
| 15        | 40      | 20           | 7  | 47        | 3.054            |
| 16        | 45      | 25           | 8  | 32        | 4.180            |
| 17        | 40      | 20           | 7  | 27        | 1.352            |
| 18        | 40      | 20           | 7  | 37        | 7.153            |
| 19        | 40      | 20           | 7  | 37        | 7.309            |
| 20        | 30      | 20           | 7  | 37        | 6.430            |
| 21        | 45      | 15           | 8  | 32        | 5.382            |
| 22        | 35      | 15           | 8  | 32        | 4.780            |
| 23        | 45      | 15           | 8  | 42        | 5.032            |
| 24        | 50      | 20           | 7  | 37        | 12.230           |
| 25        | 35      | 25           | 8  | 32        | 2.140            |
| 26        | 35      | 25           | 8  | 42        | 4.210            |
| 27        | 40      | 20           | 9  | 37        | 2.829            |
| 28        | 40      | 30           | 7  | 37        | 2.100            |
| 29        | 35      | 15           | 8  | 42        | 1.902            |
| 30        | 45      | 25           | 8  | 42        | 7.585            |

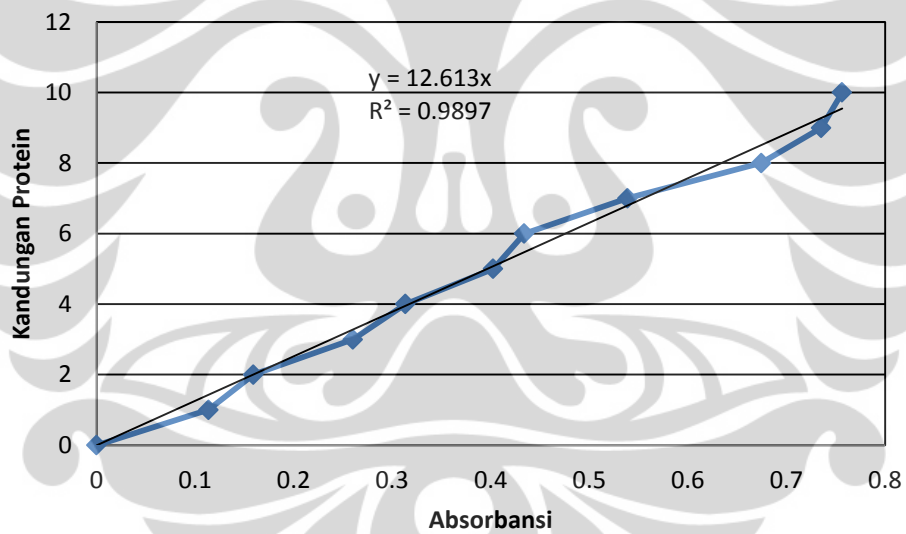
## D. Kurva Standar Glukosa

| C glukosa | Abs   |
|-----------|-------|
| 0         | 0     |
| 0.04      | 0.090 |
| 0.08      | 0.179 |
| 0.12      | 0.355 |
| 0.16      | 0.53  |
| 0.2       | 0.718 |
| 0.24      | 0.905 |
| 0.28      | 1.052 |
| 0.32      | 1.198 |
| 0.36      | 1.347 |
| 0.4       | 1.495 |



## E. Kurva Standar Protein

| Protein (mg/ml) | Abs      |
|-----------------|----------|
| 0               | 0        |
| 1               | 0.1135   |
| 2               | 0.159167 |
| 3               | 0.260167 |
| 4               | 0.3135   |
| 5               | 0.4025   |
| 6               | 0.434    |
| 7               | 0.538833 |
| 8               | 0.6745   |
| 9               | 0.7355   |
| 10              | 0.7565   |



## F. Data Optimasi Waktu Produksi Selulase

| Jam | Aktivitas (U/ml) | Konsentrasi Protein (mg/ml) | Jumlah Sel |
|-----|------------------|-----------------------------|------------|
| 0   | 1.54             | 13.7                        | 2.80E+08   |
| 3   | 6.83             | 13.84                       | 4.40E+08   |
| 6   | 7.06             | 14.7                        | 8.00E+08   |
| 9   | 9.91             | 14.97                       | 1.12E+09   |
| 12  | 13.25            | 15.31                       | 1.24E+09   |
| 15  | 12.58            | 15.47                       | 4.00E+09   |
| 18  | 12.39            | 15.77                       | 8.40E+09   |
| 21  | 11.19            | 16.66                       | 1.20E+10   |
| 24  | 10.06            | 17.05                       | 1.36E+10   |

