



UNIVERSITAS INDONESIA

**OPTIMASI PRODUKSI SELULASE DARI *BACILLUS* sp. BPPT
CC RK 2 MENGGUNAKAN METODE RESPON PERMUKAAN
DENGAN VARIASI RASIO C/N DAN WAKTU FERMENTASI**

SKRIPSI

**AGUNG MARSSADA BIORATA
0806339976**

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



UNIVERSITAS INDONESIA

**OPTIMASI PRODUKSI SELULASE DARI *BACILLUS* sp. BPPT
CC RK 2 MENGGUNAKAN METODE RESPON PERMUKAAN
DENGAN VARIASI RASIO C/N DAN WAKTU FERMENTASI**

SKRIPSI

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

**AGUNG MARSSADA BIORATA
0806339976**

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

Universitas Indonesia

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

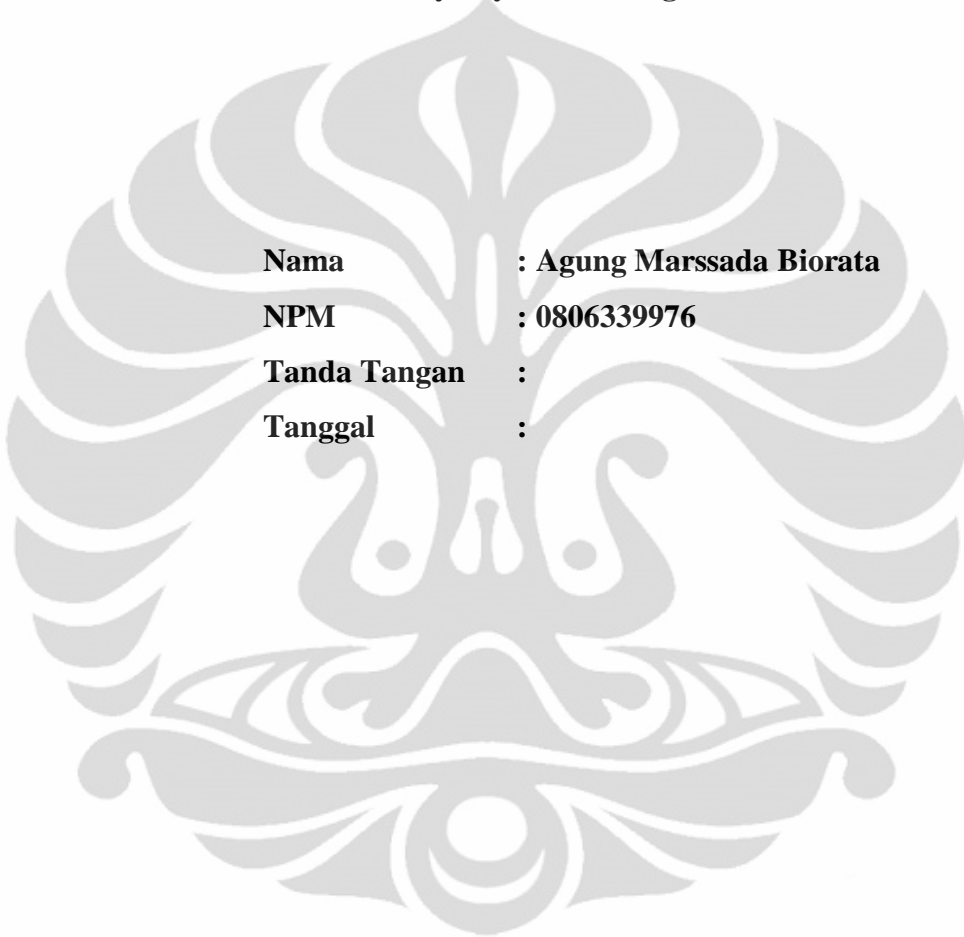
**Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar**

Nama : Agung Marssada Biorata

NPM : 0806339976

Tanda Tangan :

Tanggal :



HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh

Nama : Agung Marssada Biorata
NPM : 0806339976
Program Studi : Teknologi Bioproses
Judul Skripsi : Optimasi produksi selulase dari *Bacillus* sp. BPPT CC
RK2 menggunakan metode respon permukaan dengan
variasi rasio C/N dan waktu fermentasi

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. Dr. Ir. Setijo Bismo, DEA. ()
Penguji : Dr Heri Hermansyah, ST., M.Eng. ()

Ditetapkan di : Depok

Tanggal :

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 Selulase dari Bacillus sp. BPPT CC RK2 Menggunakan metode respon permukaan dengan Variasi Rasio C/N dan Waktu Fermentasi*” dibuat untuk memenuhi tugas mata kuliah Skripsi, salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Teknik pada Departemen Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Indonesia.

Penulis menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan skripsi ini, sangatlah sulit bagi penulis untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, penulis 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, 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 dan wawasannya.
- (5) Orangtua dan adik-adik saya dan yang selalu memberi dukungan dan semangat berupa keceriaan setiap harinya selama mengerjakan skripsi.
- (6) Rekan satu bimbingan: Chandra Paska (teman paralel penelitian), Nadia Chrisayu Natasha, Florensia Inden Stephani, 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

Agung Marssada Biorata

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

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

Nama : Agung Marssada Biorata
NPM : 0806339976
Program Studi : Teknologi Bioproses
Departemen : Teknik Kimia
Fakultas : Teknik
Jenis karya : Skripsi

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

OPTIMASI PRODUKSI SELULASE DARI *BACILLUS* sp. BPPT CC RK 2 MENGGUNAKAN METODE RESPON PERMUKAAN DENGAN VARIASI RASIO C/N DAN WAKTU FERMENTASI

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

(Agung Marssada Biorata)

ABSTRAK

Nama : Agung Marssada Biorata
Program Studi : Teknologi Bioproses
Judul : Optimasi Produksi Selulase dari *Bacillus* sp. BPPT CC RK2
Menggunakan Metode Respon Permukaan dengan Variasi Rasio
C/N dan Waktu Fermentasi

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan kondisi operasi optimum dalam memproduksi Selulase dengan *response surface methodology* menggunakan *Bacillus* sp. BPPT CC RK 2. Optimasi ini memakai substrat alam yang banyak terdapat di Indonesia dan murah sebagai sumber karbon dan sumber nitrogen yang digunakan sebagai media produksi enzim untuk mengganti *Carboxymethyl cellulose* (sumber karbon) dan *Yeast Extract* (sumber nitrogen) yang masih mahal. Proses penelitian ini dilakukan 4 tahap, yaitu: (1) pembuatan serta pemilihan komposisi medium dan produksi enzim (2) proses fermentasi (3) penggunaan *response surface methodology* dengan menggunakan software *design expert* dalam menentukan titik optimum Selulase (4) serta uji aktivitas dan kadar enzim. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat *Bacillus* sp. BPPT CC RK 2 optimum menghasilkan selulase selama 12 jam pada media dengan konsentrasi dedak padi 50% (b/v), dan konsentrasi air kelapa 20% (v/v).

Kata kunci:

Selulase, *Bacillus* sp. BPPT CC RK 2, dan Metode Respon Permukaan

ABSTRACT

Name : Agung Marssada Biorata

Study Program: Teknologi Bioproses

Title : Optimization of Cellulase Production from *Bacillus* sp. BPPT CC RK2 Using *Response Surface Methodology* by The Variations of Ratio C/N and Time of Fermentation

This study aims to obtain optimum operating conditions in the production of cellulase by response surface methodology using *Bacillus* sp. BPPT CC RK 2. This optimization using the natural substrate that is widely available in Indonesia dan cheap as a source of carbon dan nitrogen sources are used as a medium for enzyme production to replace Carboxymethyl cellulose (carbon source) and Yeast Extract (nitrogen source) that still expensive. The research process is done by 4 stages, namely: (1) the production and selection of medium composition and enzyme production (2) the fermentation process (3) the use of response surface methodology using design expert software in determining the optimum cellulase (4) activity assay and protein levels. The results showed that *Bacillus* sp. BPPT CC RK 2 isolates produce optimum cellulase for 12 hours in media with concentrations of rice husk 50% (w/v), and coconut water concentration of 20% (v/v).

Keyword:

Cellulase, *Bacillus sp.*BPPT CC RK 2, and 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
I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Tujuan Penelitian	3
1.4. Batasan Masalah	3
1.5. Sistematika Penulisan.....	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Selulosa.....	5
2.2. Enzim Selulase.....	7
2.3. Sumber Karbon dan Sumber Nitrogen	8
2.4. <i>Submerged Fermentation</i>	10
2.5. <i>Bacillus sp.</i> BPPT CC RK 2	12
2.6. Metode Respon Permukaan	13
2.6.1. Model Orde Dua.....	15
2.6.2. Central Composite Design.....	16
2.7. <i>State of The Arts</i>	18
III. METODE PENELITIAN.....	19
3.1. Diagram Alir Penelitian.....	19
3.2. Variabel Penelitian	20
3.3. Desain Penelitian.....	21

3.3.1.	Penentuan konsentrasi sumber karbon, sumber nitrogen, pH dan suhu optimum (Pembuatan Matrik dilakukan paralel dengan peneliti lain).....	21
3.3.2.	Penentuan waktu inkubasi optimum	23
3.4.	Alat dan Bahan.....	23
3.4.1.	Alat.....	23
3.4.2.	Bahan.....	23
3.5.	Prosedur Penelitian.....	24
3.5.1.	Pembuatan Media dan Produksi Enzim.....	24
3.5.2.	Optimasi komposisi medium dan waktu	25
3.5.3.	Pengujian Aktivitas Selulase	26
3.5.4.	Penentuan kadar protein	27
3.5.5.	Pembuatan kurva standar BSA	28
3.6.	Lokasi Penelitian.....	28
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN		29
4.1.	Penentuan Sumber Karbon dan Sumber Nitrogen	29
4.2.	Optimasi Menggunakan <i>Response Surface Methodology</i>	34
4.2.1.	Pemilihan model berdasarkan uraian jumlah kuadrat dari urutan model.....	36
4.2.2.	Pemilihan model berdasarkan pengujian ketidaktepatan model (<i>Lack of Fit Tests</i>).....	37
4.2.3.	Pemilihan model berdasarkan ringkasan model secara statistik (<i>Model Summary Statistics</i>).....	37
4.3.	Optimasi Waktu Produksi Selulase	43
V. KESIMPULAN DAN SARAN.....		46
5.1.	Kesimpulan.....	46
5.2.	Saran.....	46
DAFTAR PUSTAKA		47
LAMPIRAN		52

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Struktur Selubiosa	5
Gambar 2. Struktur Selulosa	6
Gambar 3. Jenis dan Aksi Enzim Selulase	8
Gambar 4. <i>Bacillus</i> .sp	13
Gambar 5. Contoh Respon Permukaan RSM (Coelho et al. 2011)	17
Gambar 6. Diagram Alir Penelitian	20
Gambar 7. Aktivitas Selulase Berbagai Sumber Karbon	29
Gambar 8. Medium B pada Konsentrasi Sama (10% b/v) Menunjukkan Kejenuhan yang Berbeda	31
Gambar 9. Aktivitas Sumber Sumber Nitrogen	32
Gambar 10. Kadar Protein Sumber Karbon dan Nitrogen	32
Gambar 11. Aktivitas Dedak dan Air Kelapa	33
Gambar 12. Kadar Protein Dedak dan Air Kelapa	34
Gambar 13. Hubungan <i>Response Surface Methodology</i> Nilai Actual dan Prediksi Aktivitas Selulase	40
Gambar 14. Hubungan <i>Response Surface Methodology</i> Sumber Karbon (Dedak Padi) Dengan Sumber Nitrogen (Air Kelapa)	41
Gambar 15. Hubungan <i>Response Surface Methodology</i> Sumber Karbon (Dedak Padi) Dengan pH	41
Gambar 16. Hubungan <i>Response Surface Methodology</i> Sumber Karbon (Dedak Padi) Dengan Suhu	42
Gambar 17. Kontur 2 Dimensi <i>Response Surface Methodology</i> Sumber Karbon (Dedak Padi) Dengan Sumber Nitrogen (Air Kelapa)	42
Gambar 18. Hubungan Waktu Produksi terhadap Aktivitas dan Kadar Protein yang Diberi Selulase	44
Gambar 19. Jumlah Sel terhadap waktu	45

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Klasifikasi <i>Bacillus</i> sp.	12
Tabel 2. <i>State of The Arts</i> Penelitian.....	18
Tabel 3. Penentuan Kondisi Optimum.....	22
Tabel 4. Penentuan Waktu Inkubasi Optimum.....	23
Tabel 5. Standar Protein.....	28
Tabel 6. Kecocokan Model Orde 2 Pada RSM	36
Tabel 7. Lack of Fit Tests Orde 2.....	37
Tabel 8. Model Summary Statistics Orde 2	38
Tabel 9. ANOVA Model Orde 2 RSM	39
Tabel 10. Nilai Akurat Eksperimen	39

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Indonesia merupakan salah satu negara yang mengarah pada pemanfaatan bioenergi sebagai salah satu energi terbarukan yang ramah lingkungan. Salah satu yang menjadi dasar pemanfaatan bioenergi dikarenakan Indonesia memiliki basis yang besar pada sektor pertanian, perkebunan dan kehutanan. Bioetanol merupakan produk energy alternatif yang menggunakan gula sebagai bahan baku pembuatan bioetanol. Hal ini dikhawatirkan akan menciptakan konflik bahan pangan dan bahan energy yang besar sehingga perlu dicari sumber bahan baku baru untuk proses produksi bioetanol. Sumber bahan baku baru yang digunakan untuk memproduksi bioetanol adalah limbah biomassa. Biomassa mengandung selulosa yang merupakan polisakarida yang dapat diubah menjadi monosakarida. Monosakarida tersebut dapat di fermentasi sehingga diperoleh bioetanol. Dalam mengubah polisakarida menjadi monosakarida diperlukan suatu enzim yang dapat mendegradasi selulosa tersebut menjadi suatu monomer glukosa sehingga dapat digunakan untuk proses fermentasi.

Enzim merupakan protein yang berfungsi sebagai katalis yang mempercepat suatu proses reaksi tanpa habis bereaksi dalam suatu reaksi kimia organik. Penggunaan enzim dalam mendegradasi polimer telah banyak digunakan dalam berbagai jenis industri maupun sektor lainnya. Enzim yang digunakan untuk mendegradasi selulosa adalah enzim selulase. Proses enzimatik dalam hidrolisis selulosa merupakan cara yang lebih baik dan menguntungkan karena kondisi lingkungan bagi aktivitas enzim dapat diatur sehingga menghasilkan hidrolisat yang mengandung glukosa. Dalam memproduksi enzim selulase secara besar terdapat kendala dikarenakan biaya produksi selulase ini mencapai setengah dari 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, Yu, & Yan, 2006). Enzim selulase menjadi penting karena meningkatnya permintaan

akan enzim ini pada kegiatan penelitian, maupun kegiatan industri tidak sejalan dengan ketersediaan yang ada di pasaran. Perlu adanya tahapan proses pembuatan enzim selulase hingga ke tahap scale up kedepannya. Untuk itu perlu dilakukannya proses optimasi produksi enzim sehingga diketahui kondisi yang optimum. Ini menjadi penting karena melalui proses optimasi dapat dilakukan langkah untuk minimalisasi biaya, penggunaan bahan baku, memaksimalkan hasil produksi ataupun efisiensi dari proses produksi yang dilakukan.

Enzim selulase dapat diperoleh melalui mikroorganisme. Salah satu mikroorganisme yang dapat menghasilkan enzim selulase adalah Bakteri *Bacillus* sp. Meskipun produksi selulase oleh bakteri ini tidak sebanyak produksi selulase oleh jamur golongan *Trichoderma*, 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, Abdullah, Kalsom, Shirai, & Hassan, 2006).

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 (rasio C:N dan waktu) yang menghasilkan selulase dalam jumlah yang paling maksimal dengan menggunakan bakteri *Bacillus* sp. pada substrat dedak dan limbah tahu. Bakteri *Bacillus* sp. merupakan bakteri yang didapat dari BPPT, sedangkan substrat dedak beras dan limbah tahu dipilih sebagai pengganti sumber C dan N karena ketersediaannya melimpah di alam sebagai produk sampingan (limbah), sehingga harganya pun murah.

Untuk melakukan proses optimasi, salah satu metode yang digunakan adalah metode respon permukaan (*Response Surface Methodology*, RSM) (Satriaji 2010). Metode ini merupakan suatu teknik penyelesaian masalah untuk menemukan kondisi optimal suatu operasi dengan menggunakan matematika dan statistika dalam bentuk suatu model yang dapat menganalisis masalah tersebut. Dengan menggunakan metode ini dapat meminimalisasi hasil yang

diperoleh jika menggunakan teknik konvensional yang diperoleh dengan melakukan percobaan berulang ulang. Penggunaan RSM melalui *software Design-Expert* dapat memperoleh tingkat keakuratan yang tinggi sekaligus meminimalisasi terjadinya kesalahan seperti di penggunaan metode konvensional.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan di atas, rumusan masalah yang diangkat dalam penelitian :

1. Bagaimana kondisi operasi optimum (komposisi medium substrat, dan waktu) produksi selulase pada bakteri dari *Bacillus sp.*BPPT CC RK 2 dengan menggunakan metode respon permukaan untuk dapat menghasilkan selulase yang maksimal?

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan kondisi optimal operasi produksi selulase melalui proses fermentasi dengan menggunakan metode respon permukaan pada bakteri *Bacillus sp.*BPPT CC RK 2 melalui:

1. Variasi komposisi sumber C:N sebagai medium proses
2. Variasi waktu fermentasi

1.4. Batasan Masalah

Adapun yang menjadi batasan masalah dalam penelitian ini, meliputi :

1. Bakteri yang digunakan pada penelitian ini *Bacillus sp.*BPPT CC RK 2.
2. Penelitian yang dilakukan dibatasi hanya pada optimasi komposisi medium substrat dan waktu fermentasi dengan volume media sebesar 50 ml tabung erlenmeyer
3. Substrat yang digunakan adalah dedak padi, bagas, tandan kosong kelapa sawit (TKKS), dan tongkol jagung sebagai sumber karbon, serta urea, air kelapa, dan limbah cair tahu sebagai sumber nitrogen
4. Penelitian dilakukan di Puspiptek Serpong, provinsi Banten.

1.5. Sistematika Penulisan

Sistematika penulisan yang digunakan adalah sebagai berikut:

Bab I Pendahuluan

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

Bab II Tinjauan Pustaka

Tinjauan pustaka berisikan ulasan mengenai selulosa, selulase, bakteri *Bacillus sp.*BPPT CC RK 2, *submerged fermentation*, metode respon permukaan.

Bab III Metode Penelitian

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

Bab IV Hasil dan Pembahasan

Pada bab ini berisi penjelasan hasil eksperimen dan analisis hasil eksperimen

Bab V Kesimpulan dan Saran

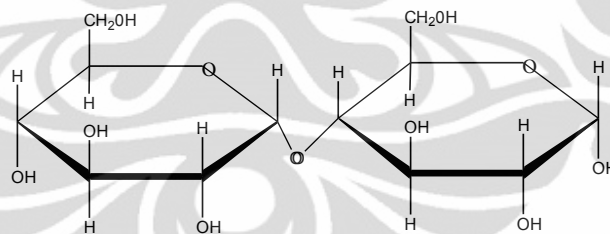
Berisi Kesimpulan akhir penelitian dan saran untuk penelitian lanjutan yang dilakukan terkait hasil penelitian sekarang

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Selulosa

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. Perbedaan terbesarnya adalah pada komposisi dan struktur anatomi dari dinding sel antara tumbuhan, hewan dan bakteri (Galbe & Zacchi, 2007). Kandungan selulosa pada kayu rata-rata 48%-50% sedangkan pada bagas berkisar antara 49%-55%. Selulosa adalah polimer linier dari molekul D-glukosa yang merupakan ikatan bersama rantai β -1,4-glycosidic. Dua unit glukosa yang berdekatan terbentuk dari eliminasi pada satu molekul air antara dua gugus hidroksil pada atom karbon 1 dan 4. Pengulangan dari rantai selulosa yang terdiri dari dua buah glukosa akan membentuk selubiosa (Galbe & Zacchi, 2007). Struktur selubiosa dapat dilihat pada gambar 1.



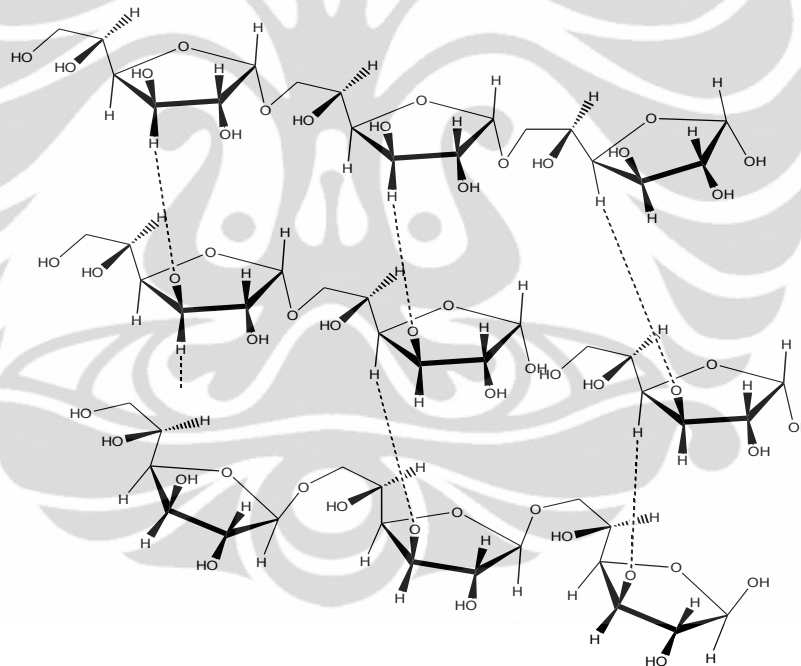
Gambar 1. Struktur Selubiosa

Sumber : (Galbe & Zacchi, 2007)

Selulosa tersintesis di alam sebagai molekul individu (rantai lurus dari residu glukosil), sekitar 30 molekul individu selulosa bergabung membentuk unit yang lebih besar yang dikenal dengan nama fibril dasar (*protofibril*). Unit ini bergabung lagi membentuk unit yang lebih besar yang disebut dengan mikrofibril. Mikrofibril ini bergabung dan membentuk serat selulosa. Karakteristik serat selulosa merupakan serat cukup halus, berstruktur linier, memiliki ikatan hidrogen intramolekul dan antarmolekul yang cukup tinggi. Akibatnya selulosa tidak termoplastik dan sulit untuk diuraikan tanpa bantuan bahan kimia atau enzim.

Kristalin alami dari selulosa adalah suatu struktur dimana semua atom mempunyai posisi tetap dengan posisi tersendiri dari antar atom yang ada. Kumpulan kristalin merupakan kumpulan komponen molekul individu mikrofibril yang tersusun secara kuat untuk mencegah penetrasi dari enzim dan molekul yang lebih kecil seperti air.

Serat selulosa di alam sebenarnya tidak murni hanya kristalin, tetapi terdapat daerah lain yang disebut daerah *amorphous*. Total area permukaan selulosa lebih besar daripada area permukaan serat lain dalam dimensi yang sama. Efek dari heterogennya struktur serat, dapat menyebabkan sebagian kecil serat yang terhidrasi oleh air ketika direndam dalam larutan dan beberapa pori-pori mikro dapat dipenetrasi oleh molekul yang lebih besar seperti enzim (Victor & Ogbe, 2003).



Gambar 2. Struktur Selulosa

Sumber : (Galbe & Zacchi, 2007)

Derajat Polimerisasi glukosa pada rantai selulosa berada pada *range* 7.500-15.000 untuk selulosa pada tanaman. Selain itu, glukosa pada rantai selulosa dapat berputar 180° . Hal ini disebabkan karena gugus OH yang membentuk dua jembatan H antara molekulnya sendiri (intramolekular) yang membentuk fibril dan dengan rantai tetangganya (intermolekular) akan membentuk mikrofibril.

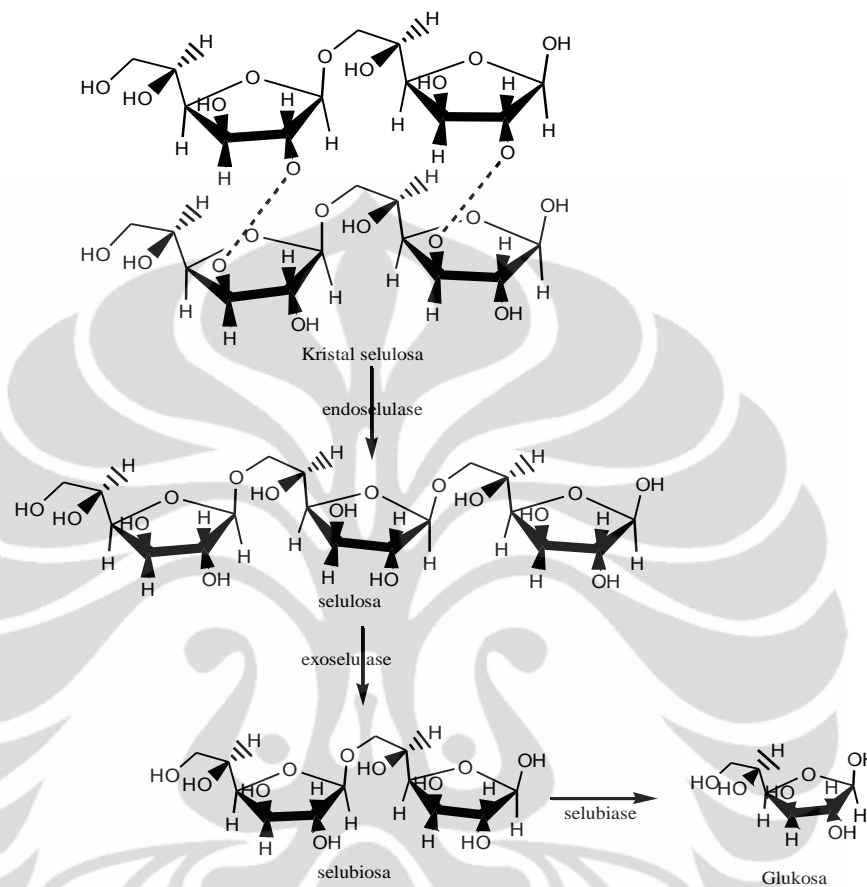
Gugus fungsi pada rantai selulosa adalah gugus fungsi hidroksil (OH). Grup hidroksil mampu berinteraksi dengan grup -OH yang lainnya atau dengan grup O-, N-, S- membentuk ikatan hidrogen. Ikatan hidrogen terdapat juga pada grup OH dari selulosa dan molekul air. Gugus hidroksil membuat permukaan selulosa menjadi sangat hidrofilik. Rantai selulosa mempunyai gugus OH pada kedua ujungnya dan rantai selulosa sangat stabil karena adanya ikatan hidrogen sepanjang rantainya. Pada tumbuhan, rantai selulosa tersusun bersama-sama untuk membentuk kristalin mikrofibril pada tiap rantai selulosa dan saling berikatan satu dengan yang lainnya. Pada tiap kristal selulosa mengandung sepuluh rantai glukosa. Dan tujuh dari sepuluh kristal *polymorph* selulosa telah teridentifikasi, yaitu $I\alpha$, $I\beta$, II, III_I, III_{II}, IV_I, IV_{II}. Di alam, selulosa $I\alpha$ dan $I\beta$ adalah kristal yang paling banyak ditemui.

Proses degradasi selulosa dapat dilakukan oleh mikroorganisme selulolitik yang berasal dari bakteri ataupun jamur. Degradasi sempurna selulosa akan melepaskan karbon dioksida (CO₂) dan air pada kondisi aerobik. Pada kondisi anaerobik, akan melepaskan karbon dioksida, metana, dan air. Mikroorganisme tersebut dapat mendegradasi selulosa karena menghasilkan enzim dengan spesifikasi berbeda yang saling bekerja sama. Enzim tersebut akan menghidrolisis ikatan β -1,4-*glycosidic* pada selulosa. Hidrolisis sempurna selulosa akan menghasilkan monomer selulosa yaitu glukosa, dan hidrolisis tak sempurna akan menghasilkan disakarida dari selulosa yang disebut selobiosa (Galbe & Zacchi, 2007).

2.2. Enzim Selulase

Selulase adalah enzim kompleks yang memecah selulosa menjadi glukosa. Selulase terutama diproduksi oleh bakteri simbiotik dalam lambung hewan memamah biak pada golongan herbivora (Sa & S, 2010). Disisi lain banyak juga hewan termasuk manusia yang tidak bisa memproduksi selulase dalam tubuhnya. Oleh karena itu, manusia tidak mendapatkan banyak energi yang terkandung dalam tumbuhan. Selulase dapat dihasilkan dari mikroorganisme diantaranya yaitu *Trichoderma reesei*, *Trichoderma longbrachiatum*, dan *Trichoderma* spp yang terdiri dari *Trichoderma harzianum*, *T. hamatum*, *T. koningii*, *T.*

Pseudokoningii, *T. Pilulifemm*, dan *T. aureoviride*. Mikroorganisme lainnya yang juga bisa memproduksi selulase adalah *Aspergillus terreus*.



Gambar 3. Jenis dan Aksi Enzim Selulase

Sumber : (Galbe & Zacchi, 2007)

Tiga jenis enzim selulase yang membentuk enzim selulase kompleks adalah sebagai berikut :

- Endocelulase yaitu enzim yang memecah ikatan internal untuk memutuskan struktur kristalin pada selulosa dan membuka rantai polisakarida.
- Eksocelulase adalah enzim yang membelah 2-4 unit dari akhir rantai yang diproduksi oleh endocelulase menghasilkan tetrasakarida atau disakarida.
- Selobiase atau beta-glukosidase yakni enzim yang menghidrolisis produk eksocelulase menjadi monosakarida (Sukumaran, Singhanian, Mathew, & Pandey, 2009).

2.3. Sumber Karbon dan Sumber Nitrogen

Sumber karbon yang digunakan pada penelitian kali ini adalah sebagai berikut:

- a. Bagas

Menurut Samsuri dkk melalui publikasi jurnal makara, bagian teknologi, volume 11, nomor 1, bulan april 2007 halaman 17 hingga 24 menunjukkan kandungan lignoselulosa sebesar lebih kurang 52,7 % selulosa, 20 % hemiselulosa, dan 24,2% lignin (Samsuri et al., 2007).

b. Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS)

TKKS mengandung kurang lebih 45,95% selulosa, 22,84% hemiselulosa, dan lignin sebesar 16,49 % (Darnoko, 1992).

c. Dedak Padi

Secara umum limbah hasil pertanian baik gandum, jerami padi, bekatul memiliki kemiripan kandungan lignoselulosa. Kandungan lignoselulosa sebesar 32,1% selulosa, 24% hemiselulosa dan lignin 18 % (Octavia, Soerawidjaja, Purwadi, & Putrawan, 2011).

d. Tetes Tebu (molase)

Molase tebu mengandung kurang lebih 39 % sellulosa dan 27,5 % hemisellulosa. Kedua bahan polisakarida ini dapat dihidrolisa menjadi gula sederhana yang selanjutnya dapat difermentasi menjadi bioetanol. Polisakarida dalam molase terdiri dari glukosa 21,7 % dan sukrosa 34,19 %. Selain itu juga terkandung 26,46 % air dan 17,26 % abu (Nur Fatimah, 2011).

e. Tongkol Jagung

Pada publikasi Richana dkk pada tahun 2004 pada jurnal penelitian pertanian tanaman pangan diketahui bahwa kandungan lignoselulosa pada tongkol jagung sebesar 65,96 % selulosa, 10,82% hemiselulosa, dan 23,74% lignin (Richana, N., P. Lestina, 2004).

Sumber nitrogen yang digunakan pada penelitian kali ini adalah sebagai berikut:

a. Limbah cair tahu

Limbah cair tahu mengandung banyak senyawa organik. Diantara senyawa tersebut protein karbohidrat dan lemak merupakan komponen terbesar yakni 40-60 % protein, 25-50% karbohidrat dan 10% lemak. Protein sebagai komponen

terbesar limbah tahu memiliki nilai (N-total) 226,06-434,78 mg/l (Kaswinarni, 2007).

b. Air kelapa

Air kelapa tua mengandung protein 0,52 g/100 g, dengan kandungan total gula sebanyak 3,42 g/100g (Yong, Ge, Ng, & Tan, 2009)

c. Urea

Urea merupakan senyawa organik yang berbentuk butiran kecil yang larut dalam air serta tidak mengasamkan tanah. Urea mengandung kadar N 45-46% (Septama et al., 2009).

2.4. *Submerged Fermentation*

Submerged Fermentation adalah fermentasi yang melibatkan air sebagai fase kontinyu dari sistem pertumbuhan sel bersangkutan atau substrat, baik sumber karbon maupun mineral terlarut atau tersuspensi sebagai partikel-partikel dalam fase cair (Jabasingh & Nachiyar, 2010).

Fermentasi cair dengan teknik tradisional tidak dilakukan pengadukan, berbeda dengan teknik fermentasi cair modern melibatkan fermentor yang dilengkapi dengan: pengaduk agar medium tetap homogen, aerasi, pengatur suhu (pendinginan dan pemanasan) dan pengaturan pH. Proses fermentasi cair modern dapat dikontrol lebih baik dan hasil lebih seragam dan dapat diprediksi. Juga tidak dilakukan sterilisasi, namun pemanasan, perebusan dan pengukusan mematikan banyak mikroba *competitor* (Jabasingh & Nachiyar, 2010).

- Fermentasi yang diagitasi dimana substratnya larut dalam air

Jenis fermentasi ini dikerjakan dalam suatu labu atau gelas yang cocok atau lebih modern dengan menggunakan *fermentor* dimana substratnya larut sempurna dalam air. Pengambilan substrat oleh mikroba melalui fase larutan dalam air. Pada kultur labu yang dikocok, agitasi dilakukan dengan bantuan alat pengocok (*shacker*). Pada *fermentor* agitasi dikerjakan oleh motor dan dapat dibantu oleh aerasi (gelembung udara).

- Fermentasi yang diagitasi dimana zat yang tidak larut dalam air tersuspensi dalam fase cair

Pada fermentasi ini substrat zat padat tidak larut dalam air tetapi dalam bentuk bubuk-bubuk halus yang tersuspensi dalam sejumlah air yang banyak. Garam dan zat-zat hara lain mungkin terlarut dalam air. Konsentrasi substrat dalam media dapat bervariasi mulai dari satu persen sampai pada suatu keadaan yang menyerupai bubur. Pengambilan substrat oleh mikroba biasanya disertai dengan produksi suatu faktor yang dapat melarutkan yang mungkin sifatnya ekstraseluler atau terletak didalam dinding dalam air sehingga partikel substrat tersuspensi secara merata dalam medium yang mengandung air agar terjadi kontak dengan mikroba secara maksimum.

- Fermentasi yang diagitasi dimana zat cair yang tidak larut dalam air tersuspensi dalam fase cair

Jenis fermentasi ini dan mekanisme pengambilan substrat sama dengan yang kedua, kecuali sifat bersifat cair.

- Fermentasi yang tidak diagitasi dimana substratnya larut dalam fase cair

Pada fermentasi ini substrat larut dalam air tetapi medianya tidak diagitasi atau dikocok. Pengambilan substrat melalui fase cair. Medium didistribusikan berupa larutan yang dangkal dalam bentuk baki atau dalam suatu wadah yang mempunyai permukaan yang luas dan dalamnya media biasanya 2,5 – 5,0 cm untuk produksi yang tinggi.

Untuk produksi komponen-komponen pakan yang paling banyak digunakan adalah fermentasi cair jenis pertama, menyusul jenis keempat untuk memproduksi asam-asam organik seperti asam sitrat, asam glutamat dan jenis ketiga untuk produksi protein sel tunggal (PST) (P, S, K, & K, 2010).

Fermentasi media cair untuk memproduksi pakan secara langsung memungkinkan dilakukan jika dalam proses fermentasi telah terbentuk komponen yang diinginkan disamping sejumlah biomassa yang dapat digunakan. Proses ini biasanya masih membutuhkan proses tambahan setelah akhir fermentasi (Jabasingh & Nachiyar, 2010).

2.5. *Bacillus sp.* BPPT CC RK 2

Pada penelitian ini bakteri yang digunakan adalah *Bacillus sp.* BPPT CC RK 2. Dimana isolat ini merupakan koleksi BPPT Puspiptek, Serpong. *Bacillus* merupakan bakteri gram positif berbentuk batang yang memiliki endospora, bersifat motil dan tergolong ke dalam bakteri aerob atau fakultatif anaerob. Genus *Bacillus* merupakan bakteri yang sangat baik digunakan sebagai kandidat agen biokontrol karena dapat menghasilkan beberapa metabolit aktif seperti antibiotik, proteinase dan bakteriosin (Mawadza, Hatti-Kaul, Zvauya, & Mattiasson, 2000; Schallmey, Singh, & Ward, 2004). Pada umumnya antimikrob yang dihasilkan *Bacillus* berupa polipeptida seperti bakteriosin dan antibiotik. Klasifikasi bakteri *Bacillus sp.* BPPT CC RK 2. Tertera pada tabel di bawah ini :

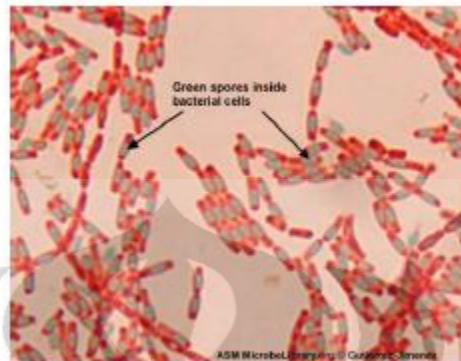
Tabel 1. Klasifikasi *Bacillus sp.*

Kingdom	Bacteria
Klas	Bacilli
Ordo	Bacillales
Famili	Bacillaceae
Genus	Bacillus
Species	<i>B.Subtilis.</i>

Bacillus subtilis berbentuk batang, $0,3 - 2,2 \mu \times 127 - 7,0 \mu \text{m}$. Sebagian besar motil, flagelum khas lateral. Bakteri ini membentuk endospora dan tidak lebih dari satu dalam satu sel sporangium. Metabolisme jenis bakteri ini dengan respirasi sejati fermentasi sejati, atau kedua-duanya, yaitu respirasi dan fermentasi. Umum dijumpai di dalam tanah.

Bacillus merupakan perwakilan dari bakteri genus gram-positif yang terdapat di alam (tanah, air, dan debu di udara). Beberapa spesies merupakan flora normal di saluran intestin manusia. Ketika ditumbuhkan di media agar dapat menghasilkan *Bacillus* yang banyak, menyebar, koloni yang berwarna abu-abu dengan pinggiran yang tidak rata (Otajevwo & Aluyi, 2010). Berbentuk tongkat serta spora bersifat aerobik. Karakteristik yang unik dari bakteri ini adalah kemampuan untuk membentuk endospora ketika kondisi lingkungan yang tertekan (Immanuel et al., 2006). Spora ini dapat bertahan 60 tahun atau lebih pada

kondisi lingkungan yang ekstrem. spesies *Bacillus* yang diketahui menghasilkan spora adalah *clostridium*.



Gambar 4. *Bacillus*.sp

Sumber : (<http://www.amrita.ac.in/bioprojects/>)

Koloni *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. mycooides* ditemukan pada serasah daun *A. marina* yang mengalami proses dekomposisi. Genus *Bacillus* merupakan salah satu kelompok bakteri yang mampu mendegradasi selulosa.

2.6. Metode Respon Permukaan (*Response Surface Methodology*)

Response surface methodology adalah suatu metodologi yang terdiri dari suatu grup teknik statistik untuk membangun model empiris dan mengeksploitasi model.2 Suatu eksperimen yang melibatkan k buah faktor antara lain: x_1, x_2, \dots, x_k , dimana k buah faktor disebut sebagai variabel bebas, prediktor ataupun variabel kontrol, dan menghasilkan Y, dimana Y adalah suatu variabel terikat, variabel tak bebas ataupun variabel respon. Semua variabel ini dapat diukur dan diketahui bahwa Y adalah merupakan respon dari x_1, x_2, \dots, x_k , maka dikatakan bahwa Y adalah fungsi dari x_1, x_2, \dots, x_k , dan secara umum ditulis dalam bentuk $Y = f(x_1, x_2, \dots, x_k)$. Fungsi tersebut dikatakan sebagai *response surface* (Albert, 2009).

Response surface methodology (RSM) memiliki beberapa kegunaan antara lain:

1. Menunjukkan bagaimana variabel respon y dipengaruhi oleh variabel bebas x diwilayah yang secara tertentu diperhatikan.
2. Menentukan pengaturan variabel bebas yang paling tepat dimana akan memberikan hasil yang memenuhi spesifikasi dari respon yang berupa hasil, kekotoran, warna, tekstur dan lain sebagainya.

3. Mengeksplorasi ruang dari variabel bebas x untuk mendapatkan hasil maksimum dan menentukan sifat dasar dari nilai maksimum

Salah satu pertimbangan penting yang muncul dalam RSM adalah bagaimana menentukan faktor dan level yang dapat cocok dengan model yang akan dikembangkan. Jika faktor atau level yang dipilih dalam suatu eksperimen tidak tepat maka kemungkinan terjadinya ketidakcocokan model akan sangat besar dan jika itu terjadi maka penelitian yang dilakukan bersifat *bias*.

Response surface methodology (RSM) erat kaitannya dengan desain eksperimen karena dalam pelaksanaannya data yang dikumpulkan adalah melalui desain eksperimen. Beberapa alasan mengapa desain eksperimen sangat diperlukan, antara lain

1. Variabel *input* yang penting yang mempengaruhi respon sering merupakan salah satu variabel yang tidak akan diubah.
2. Hubungan antara variabel respon dan berbagai variabel *input* mungkin dipengaruhi oleh variabel yang tidak tercatat dimana variabel tersebut mempengaruhi respon dan variabel *input*. Hal tersebut dapat membangun suatu korelasi yang salah.
3. Data operasi masa lalu sering mengandung celah dan mengandung informasi tambahan yang penting

Tahapan dalam metode respon permukaan 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

2.6.1. Model Orde Dua

Model orde kedua adalah persamaan polinomial yang memiliki pangkat dua atau berbentuk kuadrat. Tujuan dari pembuatan model orde kedua adalah untuk menentukan titik yang memberikan respon yang optimum. Alasan pembuatan model orde kedua dibangun karena percobaan pertama yang dilakukan sebelumnya bertujuan untuk mencari daerah optimal yang akan digunakan dalam eksperimen berikutnya sehingga wilayah optimum yang diperkirakan akan dieksplorasi lebih jauh dapat diperkirakan dengan model yang lebih kompleks.

Adapun langkah-langkah yang diperlukan untuk menentukan model orde kedua antara lain:

1. Melakukan eksperimen dengan *Central Composite Design*.
2. Model desain eksperimen dan hasil percobaan kemudian dihitung dengan melakukan pendekatan matriks agar diperoleh koefisien model orde kedua.

Untuk membangun model orde kedua, terlebih dahulu dilakukan pengumpulan data dengan desain eksperimen. Untuk menentukan koefisien regresi pada model orde kedua, tiap variabel x_i harus memiliki sekurang-kurangnya 3 level berbeda. Hal ini mengindikasikan bahwa desain faktorial 3^k dapat digunakan, dimana tiga level dikodekan sebagai -1, 0 dan 1. Akan tetapi, ada kerugian dari penggunaan desain faktorial 3^k yaitu dengan lebih dari 3 variabel, percobaan menjadi sangat besar. Untuk alasan tersebut Box dan Wilson (1951) mengembangkan suatu desain yang dapat cocok dengan desain model orde kedua. Pengembangan desain eksperimen awal untuk membangun model orde kedua dinamakan *Central Composite Design*, dimana terdapat beberapakombinasi perlakuan tambahan yang ditambahkan ke dalam desain eksperimen 2^k .

Pertanyaan yang menarik sering ditanyakan adalah apakah model orde pertama cukup merepresentasikan fungsi respon dimana pada desain orde pertama tidak ada replikasi sehingga tidak ada perkiraan terhadap *error*. Mengenai hal ini pada asumsi bahwa model yang memadai disediakan oleh model orde kedua yang memberikan jawaban bahwa tidak ada alasan untuk meragukan representasi model orde pertama ketika pada uji ketidaksesuaian ternyata model orde kedua sesuai

dengan fungsi respon sehingga model orde pertama dapat diterima merepresentasikan fungsi respon.

2.6.2. Central Composite Design

Central Composite Design adalah suatu rancangan percobaan dengan faktor yang terdiri dari 2 level yang diperbesar titik-titik lebih lanjut yang memberikan efek kuadratik (G. E. P. Box, Ibid, hal 306). Desain ini dimulai dengan level yang sama dengan desain 2^k , ditambah dengan level tambahan yang terdiri dari *center points* dan *star points* (α). Total kombinasi level yang terdapat pada *central composite design* adalah $2k + 2k + 1$, dimana k adalah jumlah faktor. *Center points* yang dimaksud pada desain ini adalah level pada titik (0, 0, dan *star points* (α) ditentukan oleh rumus: $\alpha = 2^{k/4}$

Beberapa hal yang menjadi pertimbangan dalam menentukan jumlah titik *center* antara lain:

1. Menghasilkan desain yang bagus untuk informasi fungsi
2. Meminimasi *error*.
3. Memberikan deteksi yang bagus untuk uji ketidaksesuaian model orde tiga.
4. Memberikan rangsangan terhadap desain yang *robust*.

Setelah desain eksperimen dilakukan, data yang dikumpulkan akan digunakan untuk menaksir koefisien b_0, b_1, \dots, b_i . Cara yang digunakan untuk menentukan koefisien prediktor sama dengan cara yang digunakan sewaktu menentukan koefisien prediktor pada model orde pertama. Untuk menentukan apakah model yang dibangun telah cocok dengan data yang telah dikumpulkan maka dilakukan uji ketidaksesuaian terhadap model orde kedua. Ketidaksesuaian menyatakan deviasi respon terhadap model yang dibangun. Dalam uji ini juga mengukur besar kekeliruan eksperimen yang telah dilakukan.

Metode ini dipilih karena memiliki kalitas prediksi yang lebih besar dari metode Box-Behnken dengan selisih pengerjaan yang sedikit (Box:CCD = 27:30) untuk jumlah faktor sebanyak empat buah (Carroll et al. 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. Dalam tahapan yang ketiga, pencarian titik optimum dilakukan dengan mencari model dari sistem dengan cara melakukan regresi orde dua. Proses perhitungan regresi dan analisis dilakukan menggunakan software (Design Expert). Dengan bantuan software, proses regresi dan analisis dapat lebih cepat dan memiliki error yang lebih sedikit bila dibandingkan perhitungan secara manual. Hubungan antara variable bebas x dan variable terikat diberikan menurut persamaan

$$Y = k_0 + k_1x_i + k_2x_i^2 + k_3x_ix_j$$

Untuk percobaan ini digunakan 4 faktor, sehingga persamaan tersebut disederhanakan menjadi

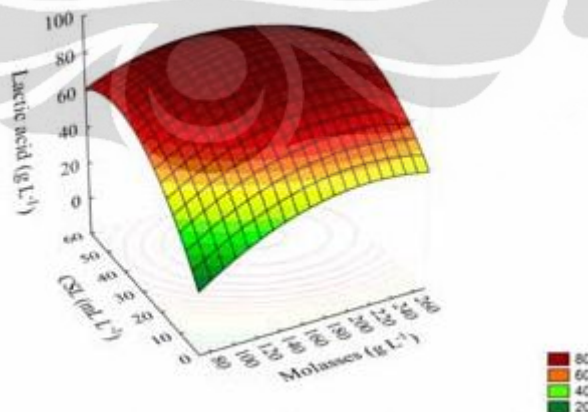
$$Y = f(X_1, X_2, X_3, X_4) + \epsilon$$

Dimana ϵ menerangkan galat yang terdapat pada respon y. X_1 adalah suhu, X_2 adalah pH, X_3 adalah konsentrasi karbon, dan X_4 adalah konsentrasi nitrogen.

Contoh hasil regresi orde dua dengan 4 faktor adalah

$$Y = 85,5 + 3,9X_1 + 8,2X_2 + 4,4X_3 + 2,7X_4 - 3,6X_1^2 - 6,4X_2^2 - 3,4X_3^2 - 1X_4^2 - 1,8X_1X_2 - 0,4X_1X_3 + 0,4X_1X_4 - 0,2X_2X_3 - 0,5X_2X_4 + 0,3X_3X_4$$

Dengan grafik respon permukaannya adalah



Gambar 5. Contoh Respon Permukaan RSM (Coelho et al. 2011)

2.7. State of The Arts

Produksi Selulase ini bertujuan untuk mengetahui metode produksi yang optimum dengan jalur *Response Surface Methodology* menggunakan *Bacillus Subtilis* sebagai bakterinya. Selama ini penelitian dalam memproduksi selulase lebih banyak dilakukan dengan menggunakan jamur dan dengan menggunakan RSM hanya satu merujuk jurnal yang diperoleh dalam kurun 15 tahun ini dan menggunakan mikroorganisme non bakteri (jamur) sebagai penghasil enzim. Belum ditemui penggunaan metode RSM dalam memproduksi enzim selulase melalui apa yang penulis baca melalui referensi jurnal. Berikut adalah beberapa penelitian dengan yang telah dilakukan :

Tabel 2. State of The Arts Penelitian

		Produksi Selulase	
		Bakteri	Non Bakteri
Response Surface Methodology	Solid State Fermentation	Belum ada penelitian yang dilakukan	(Maryam, Mohsen et al. 2007) (Ioana, George et al. 2009)
	Submerged Fermentation	Penelitian yang dilakukan	(Viviana, Ana et al. 1999)
		(Bhavik, Sarayu et al. 2010)	(Rocky, Hamidi et al. 2010) (Hao, Chen et al. 2010) (Rajesh, Rajender et al. 2009) (Laura, Claudia et al. 2008) (Tari, Fokatli et al. 2007)

BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Diagram Alir Penelitian

Penelitian ini akan dibagi menjadi beberapa tahap, yaitu tahap pra-penelitian yaitu melakukan studi literatur mengenai hal-hal yang berhubungan dengan proses produksi selulase. Penelitian ini secara umum dibagi menjadi tiga proses utama, yaitu :

1. Tahapan Awal

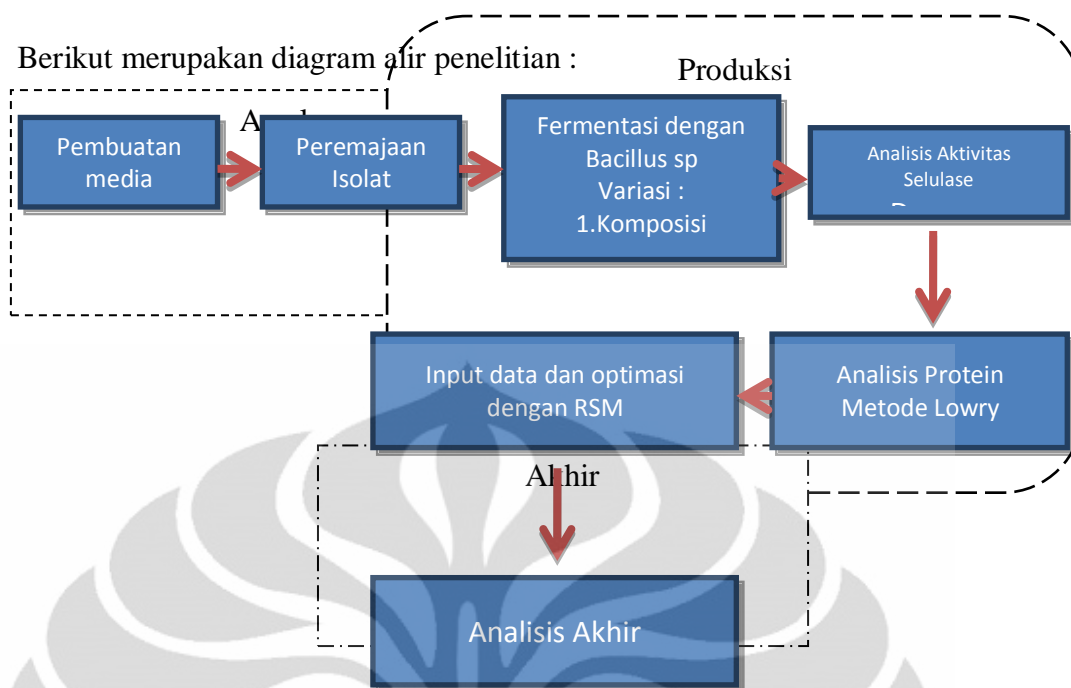
Pada tahapan ini, merupakan tahapan yang dimulai dengan studi literatur dan persiapan alat untuk tahapan selanjutnya. Setelah persiapan alat dan studi literatur telah selesai, peneliti akan melakukan produksi selulase dilakukan pada medium *Luriabertani* dengan cara *submerged fermentation* (medium cair), dan dengan sentrifugasi diperoleh supernatan enzim kasar.

2. Tahapan Produksi

Tahapan produksi ini dimulai setelah tahapan pendahuluan selesai, serta pada tahapan ini membutuhkan waktu 2 hingga 3 bulan. Tahapan proses dilakukan dengan melakukan variasi C:N melalui komposisi medium yang akan digunakan sebagai substrat dan waktu yang digunakan selama proses fermentasi.

3. Tahapan Analisis

Hasil data percobaan di simulasikan kembali dengan piranti lunak memakai *response surface methodology* untuk diketahui kondisi optimal produksi. Pengujian aktivitas dan kadar protein enzim setelah dilakukan optimasi produksinya



Gambar 6. Diagram Alir Penelitian

3.2. Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian ini terbagi menjadi variabel bebas dan variabel terikat. Berikut ini adalah rincian dari variabel bebas dan terikat yang digunakan dalam penelitian ini.

❖ Variabel bebas

Variabel bebas merupakan variabel yang diatur pada suatu harga tertentu. Variabel bebas pada penelitian ini adalah medium substrat dan waktu reaksi. Medium yang digunakan untuk sumber pengganti karbon standar (CMC) adalah dedak padi, molase, TKKS, Bagas, dan Tongkol Jagung. Medium yang digunakan untuk sumber pengganti nitrogen adalah air kelapa, urea dan limbah tahu.

❖ Variabel terikat

Variabel ini merupakan variabel yang diukur nilainya setelah diberikan harga tertentu pada variabel bebas. Variabel terikat pada penelitian ini adalah aktivitas enzim dan yield.

❖ Variabel kontrol

Variabel tetap dalam penelitian ini adalah enzim selulase dan menggunakan bakteri *Bacillus sp.*BPPT CC RK 2.

3.3. Desain Penelitian

Pada penelitian ini dilakukan uji pendahuluan untuk mengetahui sumber karbon dan sumber nitrogen terpilih yang akan digunakan pada saat optimasi memakai response surface methodology dengan bantuan software design expert. Pada penelitian kali ini digunakan sumber karbon sebagai berikut :

- Dedak padi
- Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS)
- Tetes Tebu (molase)
- Tongkol Jagung
- Bagas

Untuk sumber nitrogen digunakan bahan alam sebagai berikut:

- Urea
- Air limbah tahu
- Air kelapa (tua)

3.3.1. Penentuan konsentrasi sumber karbon, sumber nitrogen, pH dan suhu optimum (Pembuatan Matrik dilakukan paralel dengan peneliti lain)

Pada penentuan optimasi menggunakan matriks, terlebih dahulu dicari konsentrasi substrat karbon dan nitrogen terbaik untuk dilanjutkan ke tahap optimasi.

Tabel 3. Penentuan Kondisi Optimum

Run	Konsentrasi		pH	Suhu (°C)	Aktivitas (U/mL)
	Sumber Karbon (% b/v)	Sumber Nitrogen (% v/v)			
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	

Penentuan kondisi optimum sumber karbon dan nitrogen menggunakan variasi pH dan suhu yang dikerjakan praktikan Chandra Paska Bakti sebagai mitra penelitian kali ini.

3.3.2. Penentuan waktu inkubasi optimum

Uji waktu optimum dilakukan setelah diperoleh substrat terbaik dengan komposisi maksimum pada saat proses optimasi menggunakan response surface methodology. Komposisi terbaik itu akan dilakukan optimasi kembali untuk diketahui waktu terbaik produksi dari jam 0 hingga jam ke 24.

Tabel 4. Penentuan Waktu Inkubasi Optimum

Jam ke	Kadar Protein (mg/mL)	Aktivitas (U/mL)
0		
3		
6		
9		
12		
15		
18		
21		
24		

3.4. Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini, sebagai berikut :

3.4.1. Alat

Alat peralatan yang digunakan adalah *shaking incubator* (Kuhner), *static incubator* (Memmert), mikroskop (nikon), autoklaf (Hitachi), timbangan analitik (Radwag), *sentrifuge* (Hitachi), *hotplate stirrer* (Heindolph), *laminar air flow* (Babcock BF), *thermomixer* (Eppendorf), *microtube* (Eppendorf), pipet mikro (thermo), tabung sentrifusi (Nunc), spektrofotometer UV-vis (Hitachi), lemari asam (Esco), *high speed refrigerated centrifuge* dan rotor R10A2 (HIMAC), alat gelas (Pyrex) dan pH meter (Ino Lab).

3.4.2. Bahan

Alat Mikroorganisme yang digunakan yaitu isolat bakteri *Bacillus sp.* BPPT CC RK 2 (BPPT). Bahan kimia yang digunakan adalah ekstrak *yeast* (Scharlau), bacto pepton (Pronadisa), kultur agar (phyto-gel), dedak padi (Pamulang), TKKS (BPPT Serpong), Tongkol Jagung (BPPT Serpong), Molase (BPPT Serpong), Bagas (BPPT Serpong), Urea (BPPT Serpong), limbah tahu

(pabrik tahu di Serpong), air kelapa tua (Pasar Serpong), amonium heptamolibdat (Merck), amonium monovanadat (Merck), HNO₃ (Merck), buffer asetat 0,1M pH 6,0 (Merck), asam fitat (Sigma-Aldrich), KH₂PO₄ (Merck), NaOH (Merck), NaCl (Merck), Na₂HPO₄ (Merck), NaCO₃ (Merck), CuSO₄ (Merck), NaKC₄H₄O₆ (Merck), ddH₂O (milipore), Folin-Ciocalteu (Merck), Bouvine Serum Albumine (Sigma-Aldrich), MgSO₄ (Merck), MnSO₄ (Merck), dan CaSO₄ (Merck).

3.5. Prosedur Penelitian

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

3.5.1. Pembuatan Media dan Produksi Enzim

A. Pembuatan media standar

Media pemeliharaan yang digunakan adalah Luria Bertani (LB) cair (pH 7,0) dengan komposisi yaitu, 10 g pepton, 5g ekstrak *yeast* (sumber nitrogen), dan 5g NaCl. LB ditambahkan dengan 1 % CMC (sumber karbon). Media dilarutkan dengan akuades sesuai ukuran volume produksi yang diinginkan. Pada penelitian kali ini produksi yang dilakukan dalam volume 50 ml. Kemudian media disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1,2 atm selama 15 menit.

B. Peremajaan Isolat

Isolat *Bacillus sp* 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.

C. Produksi Enzim

Media starter dibuat dengan menginokulasikan sebanyak 1-2 ose isolat *Bacillus sp*.BPPT CC RK 2 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.

D. 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.

3.5.2. Optimasi komposisi medium dan waktu

A. Penentuan medium optimum

Metode yang digunakan sama seperti metode pembuatan media produksi standar, hanya saja dilakukan modifikasi pada luria bertani standar. Modifikasi yang dilakukan adalah mengganti sumber karbon (CMC) dengan dedak padi, bagas, TKKS, molase, dan tongkol jagung, serta mengganti sumber nitrogen (ekstrak ragi) dengan limbah tahu, urea dan air kelapa. Setelah itu dibuat dengan berbagai variasi konsentrasi. Kemudian media disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1,2 atm selama 15 menit. Selanjutnya ke tahap produksi enzim.

B. Optimasi dengan metode respon permukaan (RSM)

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

C. Penentuan waktu inkubasi optimum

Metode yang digunakan sama seperti metode pembuatan media produksi standar. Kemudian media disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1,2 atm selama 15 menit. Setelah itu ke tahap produksi enzim dan dilakukan analisis penentuan aktivitas setiap 3 jam mulai jam ke 0 hingga jam ke 24. Analisis dihentikan jika aktivitas sudah mulai menurun.

3.5.3. Pengujian Aktivitas Selulase

Untuk mengetahui ada atau tidaknya enzim selulase maka perlu dilakukan uji aktivitas dengan menentukan kadar glukosa sebagai hasil hidrolisa dengan tahapan analisis sebagai berikut:

Pembuatan kurva standart:

1. Menyediakan 10 tabung reaksi kosong untuk kontrol dan 10 tabung reaksi untuk sampel. 10 tabung mengindikasikan 10 titik sampel yang akan di buat sebagai patokan pembuatan kurva standar glukosa
2. Tiap tiap tabung reaksi diisi hingga 1 ml larutan campuran, dengan 1 ml larutan berisi 900 μL glukosa + 100 μL enzim, sedangkan untuk kontrol enzim ditambahkan setelah DNS dimasukkan
3. Setelah itu dilakukan inkubasi 30 menit dengan suhu 50 $^{\circ}\text{C}$, lalu dilakukan penambahan DNS sebanyak 1 mL tiap tabung reaksi
4. Semua tabung reaksi dipanaskan di dalam water bath selama 5 menit agar terjadi reaksi antara glukosa dengan DNS.
5. Tabung reaksi didinginkan dan kemudian dikocok agar bercampur
6. Absorbansi tiap larutan diukur pada 540 nm.
7. Konsentrasi glukosa standar ditunjukkan dengan kurva standar.

Analisa Glukosa :

1. Menyiapkan 900 μL CMC 1 % dengan dilarutkan pada 0,05 M buffer phospat pH 7
2. Tiap tiap tabung reaksi yang akan di ujikan diisi hingga 1 ml larutan campuran, dengan 1 ml larutan berisi 900 μL glukosa + 100 μL enzim untuk sampel, sedangkan untuk kontrol enzim ditambahkan setelah DNS dimasukkan
3. Setelah itu dilakukan inkubasi 30 menit dengan suhu 50 $^{\circ}\text{C}$, lalu dilakukan penambahan DNS sebanyak 1 mL tiap tabung reaksi
4. Semua tabung reaksi dipanaskan di dalam water bath selama 5 menit agar terjadi reaksi antara glukosa dengan DNS.
5. Tabung reaksi didinginkan dan kemudian dikocok agar bercampur
6. Absorbansi tiap larutan diukur pada 540 nm.

7. Konsentrasi Harga absorbansi yang diperoleh diplotkan pada kurva standar untuk mengetahui konsentrasi glukosa pada sampel asi glukosa standar ditunjukkan dengan kurva standar (Yin, Huang, & Lin, 2010).

Dimana hasil yang diperoleh berupa U/ml dimana Satu unit (U) didefinisikan sebagai jumlah enzim yang melepas 1 μmol gula tereduksi dari CMC per menit pada suhu 50°C dan pH 7.

3.5.4. Penentuan kadar protein

1. Kadar protein enzim ditentukan dengan metode Lowry yang telah dimodifikasi. 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.
2. Kondisi basa dapat dihasilkan dari buffer fosfat atau *phosphate buffer saline* (PBS). Dalam satu liter larutan PBS terdiri dari 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g KH_2PO_4 dan 0,24 g Na_2HPO_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 20 g Na_2CO_3 dan 0,4 g NaOH, satu liter larutan B terdiri dari 10g 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.
3. Larutan standar protein dibuat dari *Bovine Serum Albumin* (BSA) dengan variasi konsentrasi 100-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, interval 100. ddH₂O digunakan sebagai blanko. Mula-mula sebanyak 20 μL masing-masing larutan BSA direaksikan dengan 180 μL larutan
4. PBS untuk membuat kondisi basa kemudian diikuti dengan penambahan 2000 μL reagen Lowry *fresh*. Setelah diaduk dengan vortex, analit diinkubasi selama 10 menit lalu direaksikan dengan reagen Follin Ciocalteu sebanyak 200 μL dan diinkubasi kembali selama 30 menit. Hasilnya, larutan yang mengandung protein akan berubah warna dari bening hingga biru.

5. Analisis kuantitatif dilakukan dengan menggunakan instrumen spektrofotometer *visible* dengan panjang gelombang 750 nm. Konsentrasi analit berfungsi sebagai sumbu X pada grafik dan absorbansi sebagai sumbu Y, sehingga akan diperoleh suatu garis linear dengan gradien tertentu (Satriaji, 2010).

3.5.5. Pembuatan kurva standar BSA

BSA dilarutkan dalam mili-Q-water. 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.

Larutan standar disiapkan dengan pengenceran larutan induk disajikan pada tabel dibawah ini.

Tabel 5. Standar Protein

Larutan Induk BSA(μL)	Buffer Asetat 0,05M pH 7,0 (μL)	Konsentrasi Protein (mg/mL)
0	500	0
50	450	0,1
100	400	0,2
150	350	0,3
200	300	0,4
250	250	0,5
300	200	0,6
350	150	0,7
400	100	0,8
450	50	0,9
500	0	1

3.6. Lokasi Penelitian

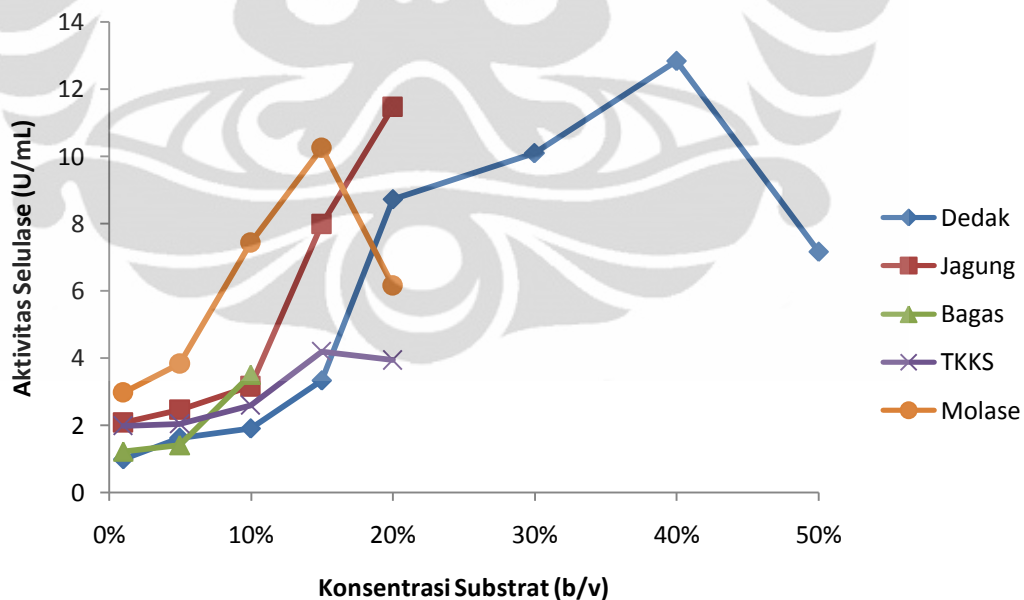
Penelitian ini sepenuhnya dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Bioindustri, LAPTIAB - BPPT, Serpong, Tangerang, Banten.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Penentuan Sumber Karbon dan Sumber Nitrogen

Pada penelitian ini sumber karbon yang digunakan adalah dedak padi, bagas, TKKS (Tandan Kosong Kelapa Sawit), molase, dan tongkol jagung. Sumber nitrogen yang digunakan antara lain limbah cair air tahu, urea, dan air kelapa. Dipilihnya sumber sumber tersebut juga didasarkan pada ketersediaan yang cukup melimpah di Indonesia dan cenderung menjadi limbah hasil produksi.

Pada penelitian ini kualitas sumber karbon dari tiap bahan ditentukan dengan melihat aktivitas selulase tertinggi dari tiap sumber karbon dan nitrogen, dimana aktivitas ini menyatakan banyaknya selulosa yang terkonversi dari bahan yang digunakan. Hasil penentuan sumber karbon disajikan pada gambar di bawah ini.



Gambar 7. Aktivitas Selulase Berbagai Sumber Karbon

Pada gambar di atas terlihat beberapa aktivitas dari berbagai sumber karbon. Dari kelima sumber karbon terdapat 3 sumber karbon yang menunjukkan kejenuhan. Ketiga sumber karbon tersebut adalah bagas, TKKS, dan molase. Dari

grafik di atas TKKS dan molase menunjukkan grafik yang cenderung naik seiring bertambahnya jumlah konsentrasi substrat yang digunakan, namun pada TKKS aktivitas selulase tidak menunjukkan kenaikan yang signifikan hingga pada konsentrasi 20 persen aktivitas yang dimiliki mengalami penurunan yang diduga akibat jenuhnya substrat yang digunakan pada saat fermentasi berlangsung. Molase yang digunakan pada penelitian ini merupakan molase kelas 2 (*Black Strap*) dimana mengalami kenaikan aktivitas yang cukup besar pada konsentrasi 15 persen, namun saat mencapai konsentrasi 20 persen terjadi penurunan. Hal ini diduga tingginya kadar gula yang terkandung pada molase untuk proses fermentasi (50-60 persen), sedangkan selulase hanya dapat mengkonversi selulosa sehingga kadar gula yang diinginkan sebesar 14 persen untuk dapat dilakukan fermentasi (Nur Fatimah, 2011). Selain itu menurut Goksungur dan Zorlu di tahun 2001 pada jurnal penelitiannya mengenai produksi etanol menggunakan molase, hal tersebut diduga dapat berasal dari proses fermentasi dimana fermentasi dilakukan dalam kondisi batch dan bakteri berada pada kondisi bebas yang menyebabkan terjadinya plasmolisis, terlepasnya membrane plasma dari dinding sel ke lingkungannya serta sifat substrat yang inhibitor terhadap sel yang menyebabkan nilai fermentasi turun (Goksungur & Zorlu, 2001).

Pada gambar 8, perhitungan aktivitas karbon terhenti pada konsentrasi berat 10 persen. Ini dikarenakan bagas tidak dapat larut akibat jenuhnya jumlah substrat sehingga tidak dapat dilakukan proses fermentasi. Gambar 8 menunjukkan perbedaan kelarutan antara tongkol jagung dan bagas pada persen berat yang sama. Pada medium tongkol jagung substrat masih dapat ditambahkan dan penambahan masih dapat dilakukan sampai dengan konsentrasi 20 %. Ada sedikit fasa padat yang terjadi pada tongkol jagung, sehingga tidak sepenuhnya terlarut. Sementara pada medium berisi bagas, padatan menyerap air dan tidak dapat melarut ketika konsentrasi mencapai 10 persen.



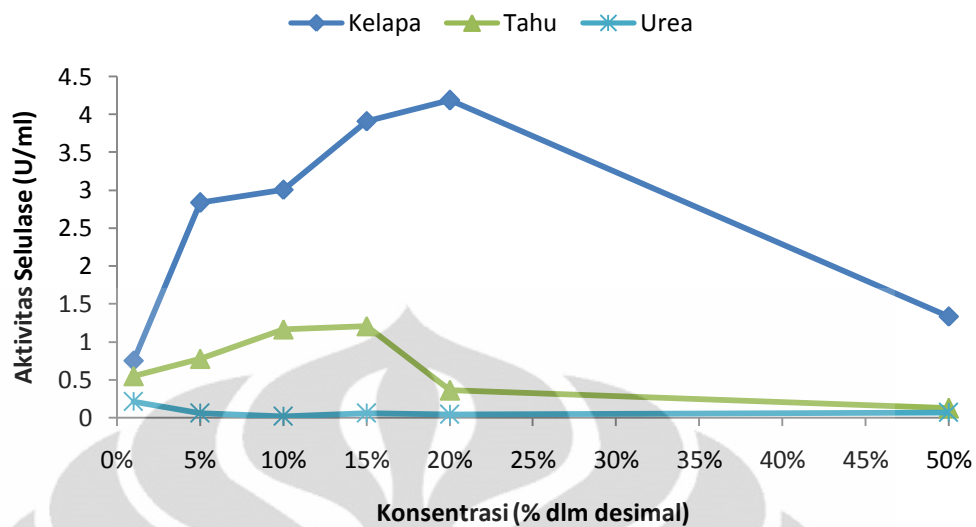
(A) Tongkol Jagung (b/v) (B) Bagas (10% b/v)

Gambar 8. Medium B pada Konsentrasi Sama (10% b/v) Menunjukkan Kejenuhan yang Berbeda

Selain tiga sumber karbon yang mengalami penurunan aktivitas, terdapat 2 sumber karbon yang terus mengalami kenaikan aktivitas. Kedua sumber tersebut adalah tongkol jagung dan dedak padi. Aktivitas selulase pada gambar 6 menunjukkan tongkol jagung memiliki aktivitas yang lebih besar dibandingkan dedak padi, oleh karena itu dilakukan peningkatan konsentrasi substrat sehingga diperoleh substrat yang terbaik. Pada pengujian lebih lanjut terhadap aktivitas selulase, tongkol jagung mengalami kejenuhan pada konsentrasi di atas 20 persen sedangkan dedak padi dapat ditingkatkan hingga konsentrasi 50 persen.

Aktivitas yang diperoleh dedak padi lebih tinggi dari aktivitas yang dimiliki tongkol jagung. Ini terjadi setelah dilakukan penambahan substrat terhadap dedak padi dengan konsentrasi 40 persen. Substrat dedak padi dapat dilihat pada gambar 10 bersama dengan substrat nitrogen terpilih.

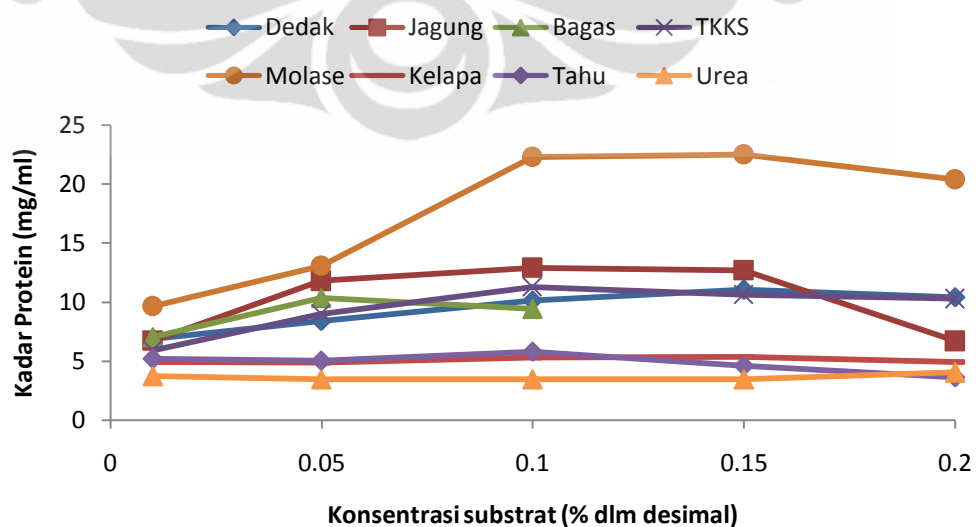
Pada penentuan sumber nitrogen pengganti dapat dilihat pada gambar di bawah ini.



Gambar 9. Aktivitas Sumber Sumber Nitrogen

Berdasarkan sumber nitrogen di atas diperoleh aktivitas tertinggi pada air kelapa dimana aktivitas tertinggi terdapat pada konsentrasi kelapa 20%. Pada konsentrasi diatas 20 % terjadi penurunan yang diakibatkan akumulasi produk beracun dari sumber nitrogen yakni ammonia yang mengurangi laju pertumbuhan atau mengurangi laju metabolisme dan pembentukan produk (Satriaji, 2010).

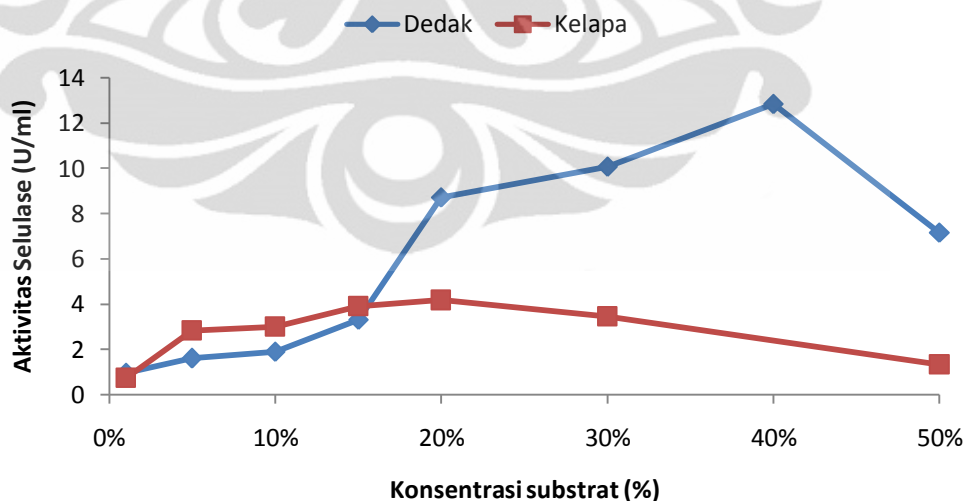
Gambar 10 merupakan kadar protein dari sumber karbon dan sumber nitrogen yang diperoleh pada pemilihan sumber karbon dan nitrogen yang terbaik.



Gambar 10. Kadar Protein Sumber Karbon dan Nitrogen

Pada uji protein terlihat dari sumber sumber yang ada diperoleh data molase memiliki kadar protein yang tinggi dibandingkan dengan sumber lain. Molase merupakan produk hasil sampingan produksi gula. Limbah gula ini merupakan sisa proses pengkristalan gula pasir dimana produk ini telah menjadi gula terlebih dahulu yakni glukosa dan fruktosa yang tidak dapat dikristalkan. Nutrisi ini dapat digunakan mikroba untuk berkembang biak dengan maksimal dan dapat membentuk banyak protein.

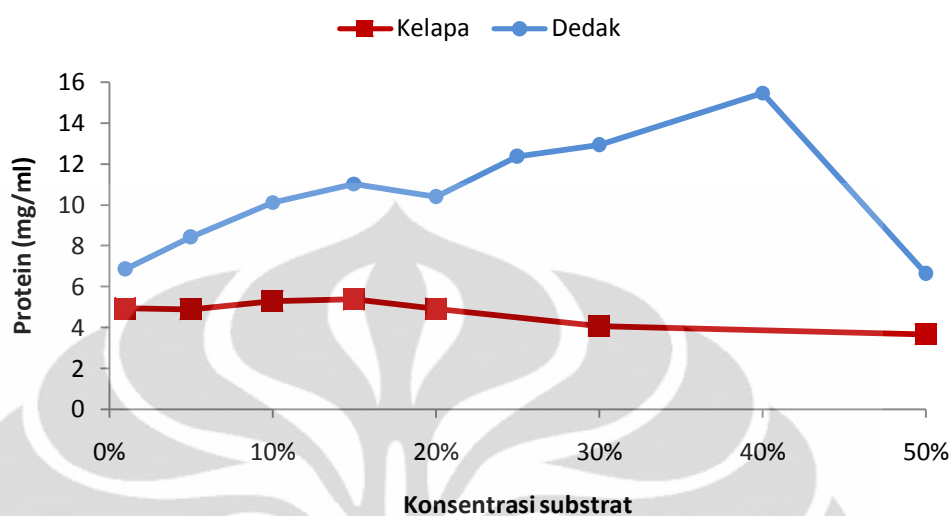
Melalui data yang diperoleh diketahui dedak padi dan air kelapa menjadi sumber karbon dan nitrogen yang dipilih untuk dilakukan proses optimasi menggunakan RSM dengan konsentrasi air kelapa 20 persen dan dedak padi memiliki nilai optimum pada konsentrasi 40 persen. Ini diketahui setelah dedak padi dan tongkol jagung sama sama berada pada fase naik di konsentrasi 20 persen, sehingga dilanjutkan hingga di anantara ke dua sumber karbon tersebut mendapati titik jenuh. Titik jenuh tongkol jagung di konsentrasi 20 persen sehingga tidak dapat dilanjutkan peningkatan substrat, sedangkan dedak padi dapat dilakukan mencapai 50 persen. Gambar 11 dan 12 menunjukkan kedua substrat adalah terbaik melalui pengujian yang diperoleh berdasarkan aktivitas dan kadar protein.



Gambar 11. Aktivitas Dedak dan Air Kelapa

Pada gambar di atas menunjukkan aktivitas yang diperoleh dari kedua substrat terpilih. Aktivitas tertinggi yang diperoleh dari dedak padi adalah 12,84

U/mL untuk konsentrasi 40 persen dan 4,18 U/mL untuk konsentrasi 20 persen dari air kelapa.



Gambar 12. Kadar Protein Dedak dan Air Kelapa

Gambar 12 menunjukkan kadar protein yang diperoleh dari kedua substrat terpilih. Kadar protein tertinggi yang diperoleh dari dedak padi adalah 15,48 mg/mL dan 5,38 mg/mL untuk air kelapa.

4.2. Optimasi Menggunakan *Response Surface Methodology*

Sumber karbon dan sumber nitrogen pada medium produksi selulase standar yang menggunakan sumber karbon CMC dan sumber nitrogen ekstrak *yeast*, diganti dengan dedak beras (sumber karbon) dan air kelapa (sumber nitrogen) yang harganya relatif murah dan belum terlalu banyak dimanfaatkan. Untuk mendapatkan produksi selulase maksimal perlu dilakukan optimasi konsentrasi sumber karbon pengganti, sumber nitrogen pengganti, pH, dan suhu. Optimasi yang dilakukan pada penelitian ini adalah kombinasi konsentrasi dedak beras, konsentrasi air kelapa, pH dan suhu. Pada tahap optimasi ini akan didapat titik-titik optimum produksi dari penggantian sumber karbon, penggantian sumber nitrogen, pH, dan suhu. Untuk dapat mengetahui titik optimum pada proses fermentasi multivariabel ini digunakan metode permukaan respon (*Response Surface Methodology* / RSM). RSM adalah salah satu metode yang sesuai untuk mengidentifikasi efek variabel tunggal dan mencari kondisi optimum pada sistem multivariabel secara efisien. Metode ini telah sukses

digunakan pada optimasi komposisi medium, kondisi hidrolisis enzimatik dan optimasi proses fermentasi (Vohra and Satyanarayana, 2001).

Pada penelitian ini digunakan RSM dengan Rancangan Komposit Pusat (*Central Composite Design / CCD*) Box-Wilson yang merupakan salah satu desain RSM dengan sebuah desain fraksional dan nilai tengah (*center point*) yang diperbesar dengan sekelompok *start point* yang memungkinkan penentuan titik lengkung kurva. Dalam melakukan metode RSM terdapat dua tahap yakni eksperimen orde 1 dan eksperimen orde 2. Eksperimen orde 1 merupakan tahap *screening*, sedangkan eksperimen tahap 2 merupakan tahap optimasi (Jeff Wu, 2000). Metode orde 2 dilakukan untuk mengoptimasi hasil dari proses *screening*. Untuk mengestimasi model RSM orde dua ini menggunakan *Central Composite Design (CCD)*. Nilai tengah diperoleh dari nilai optimum acuan penelitian pendahuluan. Dari penelitian sumber karbon sub bab (4.1) konsentrasi air kelapa untuk titik tengah adalah 20% (v/v), konsentrasi dedak padi untuk titik tengah adalah 40% (b/v), untuk titik tengah pH adalah 7, sedangkan titik tengah untuk suhu adalah 37°C.

Dengan menggunakan CCD pada *software Design Expert*, dihasilkan total 30 perlakuan kombinasi konsentrasi dedak padi, konsentrasi limbah tahu, pH dan suhu yang berbeda. Respon aktivitas selulase yang maksimal diamati pada jam ke-24 fermentasi. Selain karena penetapan sendiri, pengamatan dengan waktu 24 jam juga didasarkan perkembangan bakteri yang mensekresi selulase. Dalam pertumbuhan bakteri terdapat 4 fase pertumbuhan dimana fase penyesuaian (*lag phase*) berlangsung selama 2 jam, fase pembelahan yang berlangsung 18-24 jam dimana semua nutrisi dalam sel berada dalam keadaan seimbang sehingga pada fase ini dimungkinkan diperolehnya hasil maksimal. Setelah melalui fase pembelahan bakteri memasuki fase stasioner dimana meningkatnya jumlah bakteri meningkatkan juga jumlah hasil metabolisme yang toksis, sehingga bakteri mulai ada yang mati dan terjadi penghambatan proses pembelahan yang berujung konstannya jumlah bakteri yang hidup. Hasil pengamatan dianalisis menggunakan *Analysis of Variance (ANOVA)*. Data hasil pengamatan dilampirkan pada lampiran 8. Dengan menggunakan regresi analisis berganda pada data penelitian

menghasilkan persamaan polinomial orde kedua yang menunjukkan produksi secara tepat.

Analisis pemilihan model ini dilakukan berdasarkan jumlah kuadrat dari urutan model (*Sequential Model Sum of Squares*), pengujian ketidaktepatan model (*Lack of Fit Tests*) dan ringkasan model secara statistik (*Model Summary Statistics*). Model yang mungkin terpilih dari metode permukaan respon adalah linier, 2FI (antara dua faktor), dan kuadratik.

4.2.1. Pemilihan model berdasarkan uraian jumlah kuadrat dari urutan model

Pada RSM dengan rancangan model komposit terpusat (CCD) terdapat banyak model yang disesuaikan untuk digunakan pada perhitungan melalui nilai probabilitas terkecil. Pada saat *running* menggunakan *software design expert* diperoleh model matematika seperti tertera pada tabel 7. Syarat model yang diterima bernilai nyata dengan probabilitas $< 5\%$.

Tabel 6. Kecocokan Model Orde 2 Pada RSM

Sumber	Jumlah	Derajat	Mean	F	Nilai P	Model
	Kuadrat	Bebas	Square	Nilai	Prob > F	Yang disarankan
Mean vs Total	858.77432	1	858.77432			
Linear vs Mean	70.311554	4	17.577888	3.8672127	0.0140	
2FI vs Linear	28.187658	6	4.697943	1.0446418	0.4282	
Quadratic vs 2FI	83.320161	4	20.83004	146.94753	< 0.0001	Suggested
Cubic vs Quadratic	1.4612466	8	0.1826558	1.922616	0.2021	
Residual	0.6650266	7	0.0950038			
Total	1042.72	30	34.757332			

Berdasarkan Tabel 6 dapat diketahui bahwa model terpilih untuk dapat menjelaskan respon (aktivitas selulase) adalah model kuadratik vs interaksi dua faktor (2FI), karena mempunyai nilai P sebesar $< 0,0001$ ($<5\%$) yang menunjukkan bahwa peluang kesalahan dari model kurang dari 5%, dengan kata lain model tersebut berpengaruh nyata untuk dapat menjelaskan respon yang dimaksud. Model kuadratik vs 2FI tersebut berstatus disarankan (*suggested*) oleh program yang digunakan (*design expert*).

4.2.2. Pemilihan model berdasarkan pengujian ketidaktepatan model (*Lack of Fit Tests*)

Pada pemilihan model ini dianggap tepat apabila ketidaktepatan model berpengaruh tidak nyata dengan nilai P yang paling tinggi dan model tersebut berstatus *suggested*. Hasil pemilihan model berdasarkan pengujian ketidaktepatan model dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Lack of Fit Tests Orde 2

Sumber	Jumlah	Derajat	Mean	F	Nilai P	Model Yang disarankan
	Kuadrat	Bebas	Square	Nilai	Prob > F	
Linear	113.42	20	5.67	133.83	< 0.0001	
2FI	85.23	14	6.08	143.68	< 0.0001	
Quadratic	1.914	10	0.19	4.51	0.0549	Suggested
Cubic	0.453	2	0.22	5.34	0.0573	
Pure Error	0.21	5	0.04			

Untuk pengujian kesesuaian model digunakan uji lack of fit. Hipotesis yang digunakan adalah:

Ho : Tidak ada Lack of Fit dalam Orde dua

Hi : Ada Lack of Fit dalam Orde dua

Dari hasil analisa berdasarkan keluaran software Design Expert dengan tingkat signifikan 5% (0,05), untuk respon aktivitas diperoleh p- value > 0,05 sehingga Ho diterima yang berarti tidak ada ketidaksesuaian dalam model orde 2 untuk respon aktivitas pada eksperimen sehingga model orde 2 cocok dan dengan model orde yang lebih tinggi tidak diperlukan. Tabel 7 menunjukkan bahwa model yang memiliki nilai P yang paling tinggi adalah model kuadrat yang berarti ketidaktepatan model tersebut tidak berpengaruh nyata terhadap respon.

4.2.3. Pemilihan model berdasarkan ringkasan model secara statistik (*Model Summary Statistics*)

Proses pemilihan model ini berdasarkan ringkasan model secara statistik. Parameter statistik yang digunakan untuk memilih model yang tepat difokuskan pada akar R-kuadrat dan prediksi R-kuadrat terendah. Hasil pemilihan model berdasarkan ringkasan model secara statistik dapat dilihat pada Tabel 8.

Tabel 8. Model Summary Statistics Orde 2

Sumber	Std. Dev.	R-Squared	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared	Presisi	Model Yang disarankan
Linear	2.1319859	0.38224	0.283399471	0.0863156	168.068	
2FI	2.1206557	0.53548	0.290995766	0.2552593	136.992	
Quadratic	0.3764991	0.98844	0.977652122	0.9383944	11.3321	Suggested
Cubic	0.3082269	0.99638	0.98502215	0.6435866	65.5607	

Tabel 8 menunjukkan bahwa diantara model-model yang ada, yaitu linier, 2FI, dan kuadrat, hanya model kuadrat yang menunjukkan status *sugessted* yang berarti bahwa model tersebut disarankan untuk digunakan.

Penelitian ini berjalan paralel dengan optimasi suhu dan keasaman yang dikerjakan oleh anggota tim peneliti lain. Gabungan hasil optimasi kedua penelitian menyarankan persamaan aktivitas enzim yang diperoleh menggunakan *design expert* pada orde 2 sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas} = -18.51 - 2.08 * C - 1.52 * N + 11.17 * \text{pH} + 2.12 * \text{suhu} + 0.01 * C * N - 0.06 * C * \text{pH} + 0.02 * C * \text{suhu} + 0.12 * N * \text{pH} + 0.04 * N * \text{suhu} - 0.01 * \text{pH}^2 - 0.02 * C^2 - 0.03 * N^2 - 0.79 * \text{pH}^2 - 0.05 * \text{suhu}^2$$

Dengan demikian persamaan tersebut dapat disederhanakan menjadi :

$$Y_i = -18,51 - 2,08X_1 - 1,52X_2 + 11,17X_3 + 2,12X_4 + 1,13 \cdot 10^{-2}X_1X_2 - 0,07X_1X_3 + 1,93 \cdot 10^{-2}X_1X_4 + 0,12X_2X_3 - 3,9 \cdot 10^{-2}X_2X_4 - 0,01X_3X_4 + 2,38 \cdot 10^{-2}X_1^2 - 3,38 \cdot 10^{-2}X_2^2 - 0,79X_3^2 - 0,05X_4^2$$

Dimana: X_1 = Sumber Karbon (Dedak Padi)

X_2 = Sumber Nitrogen (Air Kelapa)

X_3 = pH

X_4 = Suhu

Hasil persamaan di atas diperoleh melalui *software design expert*. Koefisien model regresi pada persamaan terdiri atas satu koefisien blok, empat koefisien linier, enam koefisien interaksi, dan empat koefisien kuadrat. Model persamaan merupakan interaksi empat faktor.

Tabel 9 menjelaskan *Analysis of Variance* (ANOVA) dari eksperimen yang dilakukan. Dimana dari keempat faktor yang dilakukan proses optimasi yakni sumber karbon (A), sumber nitrogen (B), pH (C), dan suhu (D)

menunjukkan hubungan keterkaitan satu dengan lain melalui model kuadratik yang disarankan untuk digunakan.

Tabel 9. ANOVA Model Orde 2 RSM

Sumber	Std.	R-Squared	Adjusted	Predicted	Presisi	Model
	Dev.		R-Squared	R-Squared		Yang disarankan
Model	181.819	14	12.98709804	91.61873895	< 0.0001	significant
A-Karbon	51.771	1	51.7711033	365.2242543	< 0.0001	
B-Nitrogen	7.851	1	7.851417715	55.38858547	< 0.0001	
C-pH	7.415	1	7.415158337	52.3109515	< 0.0001	
D-suhu	3.273	1	3.273874218	23.09586224	0.0002	
AB	1.275	1	1.275497198	8.998118316	0.0090	
AC	1.793	1	1.793696092	12.65380252	0.0029	
AD	3.732	1	3.732815354	26.33350686	0.0001	
BC	6.067	1	6.067764856	42.80563391	< 0.0001	
BD	15.259	1	15.2593908	107.6488479	< 0.0001	
CD	0.058	1	0.058493699	0.412649457	0.5303	
A ²	9.682	1	9.682793073	68.30820002	< 0.0001	
B ²	19.528	1	19.52801493	137.7622696	< 0.0001	
C ²	17.128	1	17.12864476	120.8356807	< 0.0001	
D ²	38.687	1	38.68717607	272.9224245	< 0.0001	
Residual	2.126	15	0.141751548			
Lack of Fit	1.914	10	0.191441054	4.518045793	0.0549	not significant
Pure Error	0.211	5	0.042372535			
Cor Total	183.945	29				

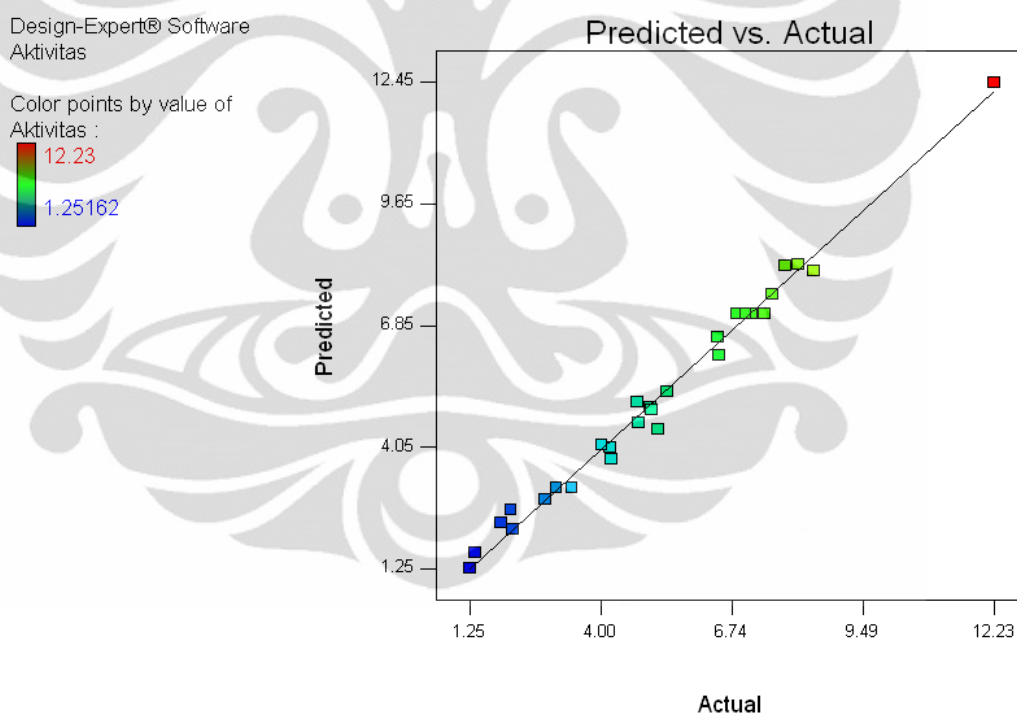
Tabel 9 menunjukkan bahwa nilai F hitung adalah 91,61873895 yang mengindikasikan bahwa model signifikan terhadap produksi selulase. Apabila nilai P (Prob > F) kurang dari 0,05 berarti berpengaruh signifikan. Berdasarkan data tersebut dapat diketahui bahwa konsentrasi dedak beras, konsentrasi air kelapa, pH dan suhu menunjukkan pengaruh signifikan pada produksi selulase.

Tabel 10. Nilai Akurat Eksperimen

Std. Dev.	0.376499067	R-Squared	0.9884408
Mean	5.350309394	Adj R-Squared	0.9776521
C.V. %	7.036958792	Pred R-Squared	0.9383944
Presisi	11.33208696	Adeq Precision	42.004837

Berdasarkan uji ANOVA pada Tabel 10 diperoleh nilai koefisien determinasi $R^2=0,988$ yang menunjukkan bahwa 98,8% variabel sampel pada produksi selulase dipengaruhi oleh variabel independen.

Keakuratan model juga dapat diketahui dari perbandingan nilai aktual penelitian dengan prediksi dari standar deviasi. Hasil prediksi model (*predicted*) dinyatakan sebagai garis lurus dan aktual hasil penelitian (*actual*) dinyatakan sebagai kotak. Berdasarkan gambar 13 dapat diketahui nilai aktual dan prediksi tersebar mendekati garis linier. Model ini menunjukkan deviasi yang rendah dan nilai presisi yang baik dibandingkan model lainnya sesuai dengan uji ANOVA dengan standar deviasi yaitu 0,37 dan nilai presisi 11,33. Nilai standar deviasi yang rendah ini memiliki keakuratan yang baik atau model tersebut sesuai (*fitmodel*).



Gambar 13. Hubungan *Response Surface Methodology* Nilai Actual dan Prediksi Aktivitas Selulase

Gambar di atas menjelaskan nilai aktivitas berdasarkan nilai persamaan yang diperoleh melalui perhitungan software design expert dengan hasil actual percobaan yang dilakukan. Hasil perhitungan berdasarkan nilai prediksi berupa garis lurus yang linear pada gambar di atas. Hasil actual eksperimen berada pada daerah garis lurus. Ini menandakan eksperimen yang dilakukan memiliki nilai

presisi yang baik, sehingga data yang diperoleh tidak mempunyai amplitude yang jauh. Melalui persamaan yang diperoleh nilai optimum dari konsentrasi sumber karbon, sumber nitrogen, pH dan suhu dapat diketahui saat melakukan produksi enzim. Gambar 14 - 17 menunjukkan respon permukaan dan respon kontur dari hasil optimasi yang dilakukan pada fermentasi produksi selulase.

Design-Expert® Software

Aktivitas

● Design points above predicted value

○ Design points below predicted value

12.23

1.25162

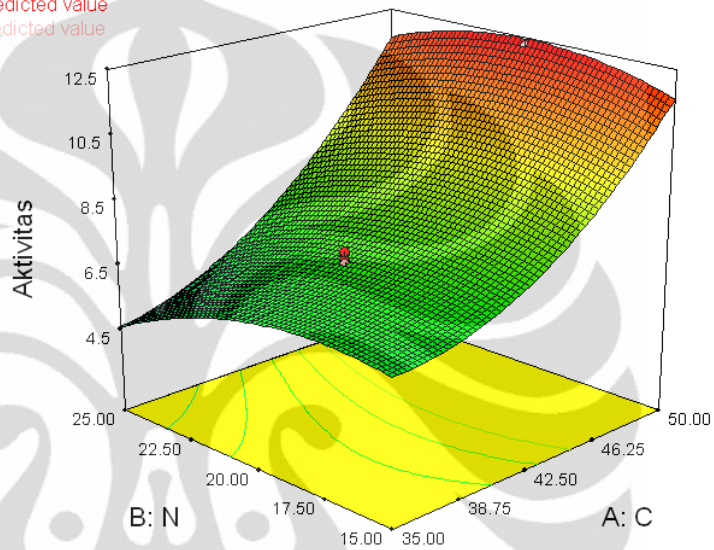
X1 = A: C

X2 = B: N

Actual Factors

C: pH = 7.00

D: suhu = 37.00



Gambar 14. Hubungan *Response Surface Methodology* Sumber Karbon (Dedak Padi) Dengan Sumber Nitrogen (Air Kelapa)

Design-Expert® Software

Aktivitas

● Design points above predicted value

○ Design points below predicted value

12.23

1.25162

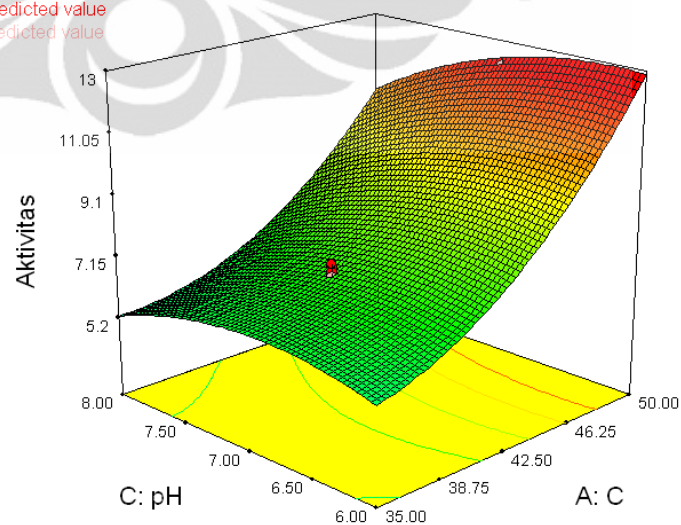
X1 = A: C

X2 = C: pH

Actual Factors

B: N = 20.00

D: suhu = 37.00



Gambar 15. Hubungan *Response Surface Methodology* Sumber Karbon (Dedak Padi) Dengan pH

Design-Expert® Software

Aktivitas

● Design points above predicted value

○ Design points below predicted value

12.23

1.25162

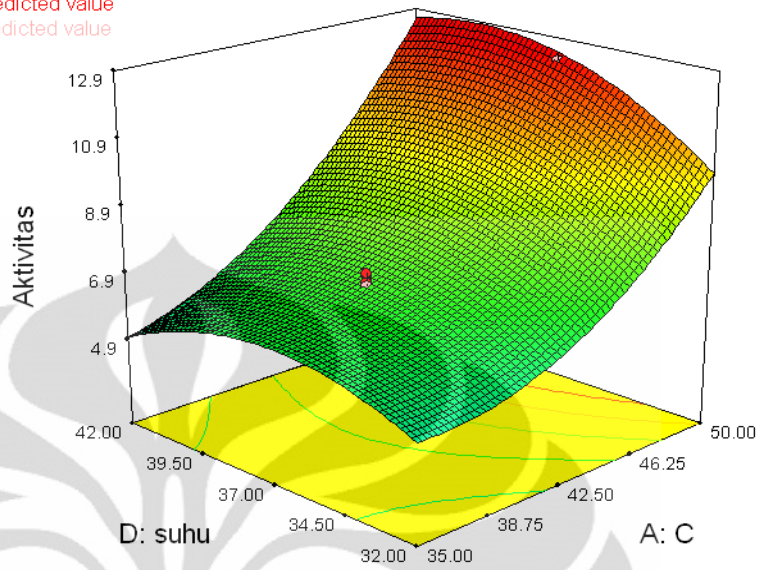
X1 = A: C

X2 = D: suhu

Actual Factors

B: N = 20.00

C: pH = 7.00



Gambar 16. Hubungan *Response Surface Methodology* Sumber Karbon (Dedak Padi) Dengan Suhu

Design-Expert® Software

Aktivitas

● Design Points

12.23

1.25162

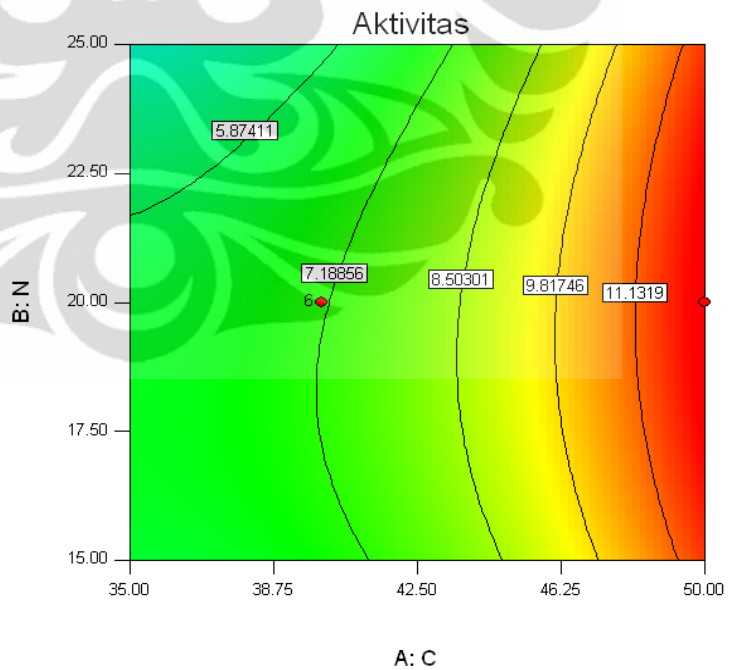
X1 = A: C

X2 = B: N

Actual Factors

C: pH = 7.00

D: suhu = 37.00



Gambar 17. Kontur 2 Dimensi *Response Surface Methodology* Sumber Karbon (Dedak Padi) Dengan Sumber Nitrogen (Air Kelapa)

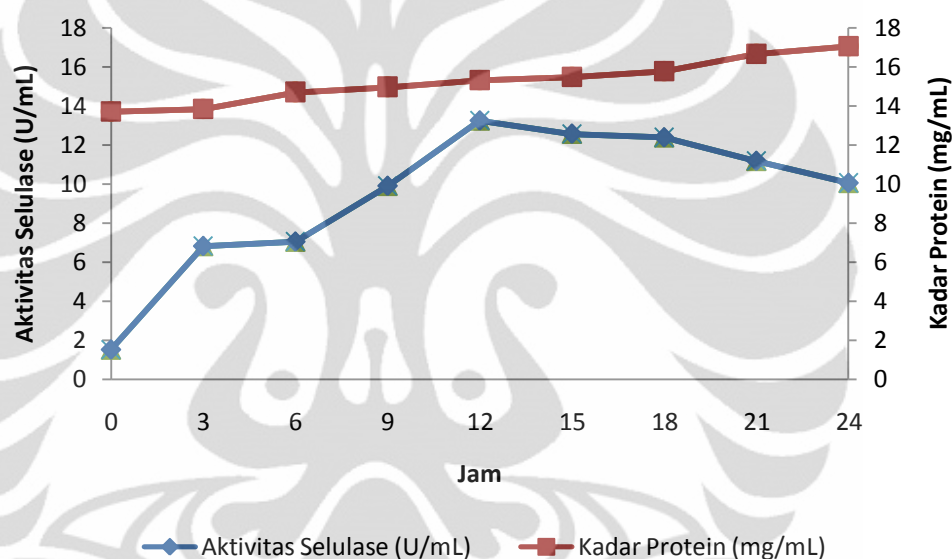
Eksperimen menggunakan *response surface methodology* mendapatkan hasil dengan kondisi fermentasi optimum untuk aktivitas selulase tertinggi dicapai pada konsentrasi dedak beras 50 %, konsentrasi air kelapa 20 %, pH 7, dan suhu produksi 37°C. Pada kondisi ini diperoleh nilai aktivitas sebesar 12,23 U/mL. Pada gambaran model di atas sebaran nilai aktivitas banyak terdapat di tengah pada gambar yang berkisar antara 6 hingga 8 U/mL dengan titik tengah 7,31 U/mL sedangkan titik optimum berada pada titik paling atas grafik. Titik ini merupakan nilai alfa plus 1 dari rancangan model komposit terpusat (CCD). Nilai ini tidak berbeda jauh dengan nilai prediksi yang menggunakan persamaan didapat. Nilai tersebut merupakan nilai tertinggi dan menjadi nilai pembatas pada produksi selulase. Nilai yang menggunakan persamaan orde dua yang diperoleh melalui software design expert dapat melebihi nilai eksperimen yang ada, namun hal ini tidak bisa dilakukan mengingat jenuhnya konsentrasi yang dibutuhkan sehingga tidak mungkin dapat dilakukan produksi. Pengujian hasil optimasi ini selanjutnya dilakukan dengan menguji optimasi waktu produksi optimum.

4.3. Optimasi Waktu Produksi Selulase

Optimasi waktu dilakukan setelah melakukan optimasi menggunakan metode *response surface methodology*. Pada tahap ini dilakukan pengujian kondisi optimum hasil optimasi sumber karbon, sumber nitrogen, pH dan suhu dengan pH dan suhu dilakukan paralel oleh mahasiswa yang melakukan penelitian yang juga terkait. Waktu inkubasi produksi enzim didapatkan dengan pengujian aktivitas enzim dari isolat yang difermentasi selama 24 jam dengan pengambilan sampel tiap 3 jam. Waktu optimasi dilakukan 24 jam untuk menghindari terjadinya kontaminasi yang mungkin terjadi akibat kurang higienis dalam melakukan prosedur yang dapat menimbulkan jamur setelah proses 24 jam. Reaksi enzimatik yang terjadi pada pengujian tersebut muncul karena adanya kontak antara enzim dengan substrat yang digunakan. Interaksi terjadi pada bagian sisi aktif enzim dan hanya dapat terjadi apabila sisi aktif mempunyai ruang yang tepat dan sesuai dengan substrat membentuk kompleks enzim-substrat. Pada akhirnya menurut Hames *et al* kompleks enzim-substrat akan terurai menjadi hasil

reaksi atau produk dan membebaskan enzim kembali (Satriaaji, 2010). Waktu fermentasi saat pengambilan sampel ketika menunjukkan aktivitas optimum merupakan saat dimana enzim bekerja secara maksimal pada jangka waktu fermentasi tersebut, sehingga waktu panen enzim dilakukan pada saat aktivitas enzim optimum. Grafik produksi selulase dapat dilihat pada Gambar 18.

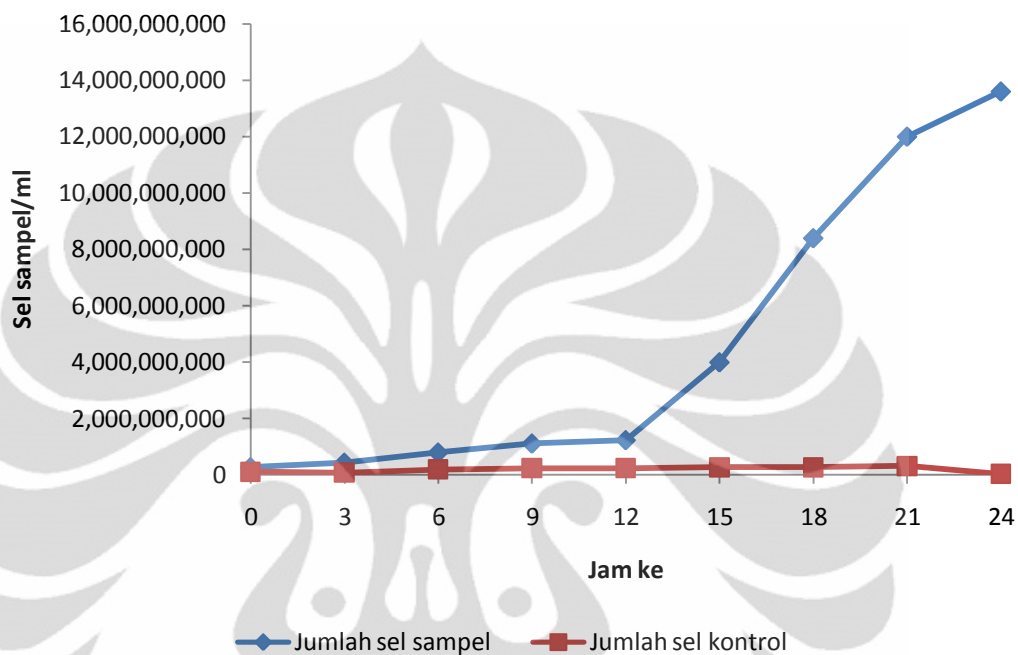
Selama pengamatan aktivitas enzim setiap 3 jam selama 24 jam didapatkan aktivitas enzim terus meningkat sampai pada waktu fermentasi 12 jam dan pada jam ke-15 aktivitas enzim mulai menurun (Gambar 18). Data hasil optimasi waktu disajikan pada Gambar 18 di bawah :



Gambar 18. Hubungan Waktu Produksi terhadap Aktivitas dan Kadar Protein yang Diberi Selulase

Pada saat puncak aktivitas selulase, bakteri mengeluarkan enzim selulase secara maksimal ke lingkungan luarnya, Aktivitas selulase tertinggi terjadi pada jam ke-12 dengan menghasilkan aktivitas selulase sebesar 13,25 U/mL dan kadar protein sebesar 17,05 mg/mL yang disajikan pada Gambar 18. Terjadinya proses produksi yang cepat pada jam ke 12 disebabkan terjadinya *feed back inhibition* yang diterima enzim sehingga menghambat aktivitas selulase melalui jumlah konsentrasi substrat yang cukup pekat pada jam jam sesudahnya setelah fase tertinggi pada jam ke 12 sehingga bakteri menerima fase jenuh lebih cepat dalam memproduksi selulase. Pada optimasi produksi selulase, kadar protein mengalami peningkatan seiring pertambahan waktu produksi. Hal ini disebabkan bakteri yang mengalami perkembangan hingga menuju fase stasioner memproduksi

banyak protein selain selulase. Secara umum mikroorganisme selulolitik dari kelompok bakteri memiliki tingkat pertumbuhan yang cepat sehingga waktu yang dibutuhkan untuk produksi enzim menjadi lebih pendek. Selain penentuan kondisi optimum juga dilakukan pengamatan parameter lainnya (jumlah sel) setiap 3 jam selama 24 jam. Berikut grafik hubungan waktu produksi dengan jumlah bakteri.



Gambar 19. Jumlah Sel terhadap waktu

Pada grafik terlihat jumlah bakteri terus mengalami peningkatan sejak jam ke 0 inkubasi di mana pada kondisi 24 jam waktu inkubasi yang dilakukan bakteri belum mencapai fase stasioner sedangkan untuk jumlah bakteri yang terkandung pada control mengalami fase stasioner dan terjadi penurunan pada jam terakhir. Hal ini disebabkan bakteri tidak mendapat nutrisi yang baik pada saat perkembangan dan bukan merupakan bakteri yang dipakai pada eksperimen. Bakteri yang terlibat dimungkinkan bakteri hasil kontaminasi yang tidak higienis pada saat prosedur eksperimen dilakukan ini juga ditunjukkan dengan lebih sedikitnya bakteri yang ada pada kontrol.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Pada penelitian kali ini didapat kesimpulan sebagai berikut :

1. Proses optimasi produksi selulase dari *Bacillus* sp.BPPT CC RK 2 yang optimal diperoleh komposisi substrat 50 % (b/v) dedak padi (sumber karbon) dan 20 % (v/v) dalam media termodifikasi dengan aktivitas enzim sebesar 12,23 U/mL.
2. Waktu optimum untuk produksi enzim selulase dari *Bacillus* sp.BPPT CC RK 2 diperoleh pada jam ke 12 dengan aktivitas sebesar 13,25 U/mL dengan jumlah bakteri sebanyak 1.24×10^9 sel/ml.

5.2. Saran

Pada penelitian kali ini diperoleh saran sebagai berikut :

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terkait analisis komponen yang terkandung dalam dedak beras dan air kelapa sehingga dapat diperoleh hasil aktivitas selulase yang maksimum untuk dipergunakan secara besar.
2. Perlu dilakukannya penelitian mengenai pemurnian enzim selulase terhadap sumber karbon dan sumber nitrogen dari bahan pengganti.

DAFTAR PUSTAKA

- Anon, Bacillus. Available at:
<http://www.amrita.ac.in/bioprojects/IndusMicroBio/microb%20cultech/Mbocultech66.php> [Accessed June 30, 2011].
- 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), 4147-4152.
- Ahamed, A., & Vermette, P. (2008). Culture-based strategies to enhance cellulase enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in bioreactor culture conditions. *Biochemical Engineering Journal*, 40, 399-407.
doi:10.1016/j.bej.2007.11.030
- Ariffin, H., Abdullah, N., Kalsom, M. S. U., Shirai, Y., & Hassan, M. A. (2006). Production and Characterisation of Cellulase by *Bacillus Pumilus* Eb3. *International Journal of Engineering*, 3(1), 47-53.
- 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. Available at: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-66322011000100004&lng=en&nrm=iso&tlng=en [Accessed January 14, 2012].
- Darnoko. (1992). Potensi Pemanfaatan Limbah Lignoselulosa Kelapa Sawit melalui bio konversi. *Berita Penelitian Perkebunan*, 2.
- Galbe, M., & Zacchi, G. (2007). Pretreatment of Lignocellulosic Materials for Efficient Bioethanol Production. *Adv Biochem Engin/Biotechnol*, 108, 41-65.
- Goksungur, Y., & Zorlu, N. (2001). Production of Ethanol From Beet Molasses by Ca-Alginate Immobilized Yeast Cells in a Packed-Bed Bioreactor. *Turk J. Biol*, 25, 265-275.
- 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), 89-94.

- Han, L., Feng, J., Zhu, C., & Zhang, X. (2009). Optimizing cellulase production of *Penicillium waksmanii* F10-2 with response surface methodology. *Journal of Biotechnology*, 8(16), 3879-3886.
- Immanuel, G., Dhanusha, R., Prema, P., Palavesam, A., Division, M. B., & District, K. (2006). Effect of different growth parameters on endoglucanase enzyme activity by bacteria isolated from coir retting effluents of estuarine environment. *Marine Biotechnology*.
- Jabasingh, S. A., & Nachiyar, C. V. (2010). *Aspergillus nidulans*. *Journal of Science and Technology*, 3(8), 871-878.
- Jeya, M., Zhang, Y.-W., Kim, I.-W., & Lee, J.-K. (2009). Enhanced saccharification of alkali-treated rice straw by cellulase from *Trametes hirsuta* and statistical optimization of hydrolysis conditions by RSM. *Bioresource technology*, 100(21), 5155-61. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.biortech.2009.05.040
- Kaswinarni, F. (2007). *“Kajian Teknis Pengolahan Limbah Padat dan Cair Industri Tahu (Studi Kasus di Industri Tahu Tandang Semarang, Sederhana Kendal dan Gagak Sipat Boyolali)*. Universitas Diponegoro.
- Kimia, J., Matematika, F., Ilmu, D. A. N., Alam, P., & Jakarta, U. N. (2010). Bacillus subtilis AQ1 MENGGUNAKAN RESPONSE PERSETUJUAN PANITIA UJIAN SKRIPSI OPTIMASI PRODUKSI FITASE OLEH Bacillus subtilis AQ1 MENGGUNAKAN RESPONSE SURFACE METHODOLOGY. *Methodology*.
- Kasana, R. C., Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S., & Gulati, A. (2008). A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. *Current microbiology*, 57(5), 503-7. doi:10.1007/s00284-008-9276-8
- Khanna, S., & Srivastava, A. K. (2006). Optimization of nutrient feed concentration and addition time for production of poly(β -hydroxybutyrate). *Enzyme and Microbial Technology*, 39(5), 1145-1151. doi:10.1016/j.enzmictec.2006.02.023
- Kim, B.-K., Lee, B.-H., Lee, Y.-J., Jin, I.-H., Chung, C.-H., & Lee, J.-W. (2009). Purification and characterization of carboxymethylcellulase isolated from a marine bacterium, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* A-53. *Enzyme and Microbial Technology*, 44(6-7), 411-416. doi:10.1016/j.enzmictec.2009.02.005
- Liu, Y.-T., Luo, Z.-Y., Long, C.-N., Wang, H.-D., Long, M.-N., & Hu, Z. (2011). Cellulase production in a new mutant strain of *Penicillium decumbens* ML-017 by solid state fermentation with rice bran. *New biotechnology*, 00(00), 3-7. doi:10.1016/j.nbt.2010.12.003

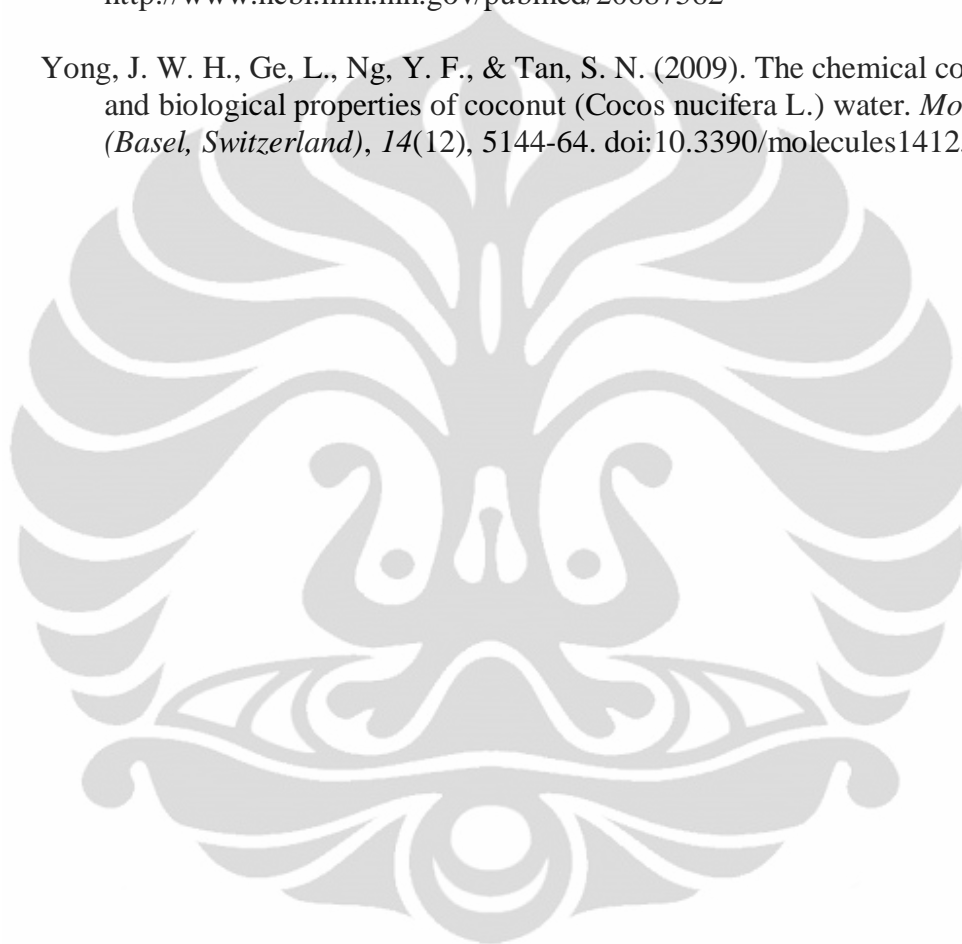
- Lo, C.-M., Zhang, Q., Callow, N. V., & Ju, L.-K. (2010). Roles of extracellular lactose hydrolysis in cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C30 using lactose as inducing substrate. *Process Biochemistry*, 45(9), 1494-1503. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.procbio.2010.05.031
- Lowry, O.H., Randall, R.J. & Lewis, A., 1951. Protein Measurement with The Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*.
- Martins, L. F., Kolling, D., Camassola, M., Dillon, A. J. P., & Ramos, L. P. (2008). Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. *Bioresource technology*, 99(5), 1417-24. doi:10.1016/j.biortech.2007.01.060
- Mawadza, C., Hatti-Kaul, R., Zvauya, R., & Mattiasson, B. (2000). Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains. *Journal of biotechnology*, 83(3), 177-87. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11051415>
- Nur Fatimah, S. T. (2011). "Bioetanol Molase Tebu" Hasil Samping Industri Tebu yang Menguntungkan.
- Octavia, S., Soerawidjaja, T. H., Purwadi, R., & Putrawan, I. D. G. A. (2011). Review : Pengolahan Awal Lignoselulosa Menggunakan Amoniak Untuk Meningkatkan Perolehan Gula Fermentasi. *Program*.
- Odeniyi, O. A., Onilude, A. A., & Ayodele, M. A. (2009). Production characteristics and properties of cellulase / polygalacturonase by a *Bacillus coagulans* strain from a fermenting palm-fruit industrial residue. *Journal of Microbiology*, 3(8), 407-417.
- 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), 2168 - 2182.
- 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), 2168 - 2182.
- P, G. S., S, B. P., K, P. A., & K, A. M. (2010). Optimization of the medium for the production of cellulase by the *Trichoderma viride* using submerged fermentation, 1(4), 656-665.
- Rajoka, M. I., & Malik, K. A. (1997). CELLULASE PRODUCTION BY CELLULOMONAS BIAZOTEA CULTURED IN MEDIA CONTAINING DIFFERENT CELLULOSIC SUBSTRATES. *Bioresource Technology*, 59, 21-27.

- Rastogi, G., Bhalla, A., Adhikari, A., Bischoff, K. M., Hughes, S. R., Christopher, L. P., & Sani, R. K. (2010). Characterization of thermostable cellulases produced by *Bacillus* and *Geobacillus* strains. *Bioresource technology*, *101*(22), 8798-806. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.001
- Richana, N., P. Lestina, dan T. T. I. (2004). Karakterisasi lignoselulosa dari limbah tanaman pangan dan pemanfaatannya untuk pertumbuhan bakteri RXA III-5 penghasil xilanase. *Jurnal Penelitian Pertanian Tanaman Pangan*, *23*(3), 171-176.
- Sa, Z., & S, N. I. (2010). Produksi Enzim Selulase oleh *Aspergillus niger* Menggunakan Substrat Jerami dengan Sistem Fermentasi Padat. *Enzyme*.
- S, R. S., Z, A. M., & A, K. M. I. (2009). Optimization of the Nutrient Suppliers for Cellulase Production with the Basal Medium Palm Oil Mill Effluent. *Media*, 809-815.
- Samsuri, M., Gozan, M., Mardias, R., Baiquni, M., Hermansyah, H., Wijanarko, A., Prasetya, B., et al. (2007). ENZIM XYLANASE, *11*(1), 17-24.
- Sarjana, T. (2009). Studi penerapan. *Universitas Stuttgart*.
- Sinitsyn, A. P., Gusakov, A. V., Grishutin, S. G., Sinitsyna, O. A., & Ankudimova, N. V. (2001). Application of microassays for investigation of cellulase abrasive activity and backstaining. *Journal of Biotechnology*, *89*, 233- 238.
- Schallmeyer, M., Singh, A., & Ward, O. P. (2004). Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production, *17*(January), 1-17. doi:10.1139/W03-076
- Septama, J., Residu, E., Limbah, P., Pabrik, P., Dan, R., Fosfat, P., Ultisol, P., et al. (2009). EFEK RESIDU PEMBERIAN LIMBAH PADAT PABRIK ROKOK DAN PUPUK FOSFAT PADA ULTISOL TERHADAP KETERSEDIAAN SERTA SERAPAN FOSFAT DAN KALIUM PADA TANAH SERTA TANAMAN PADI (*Oryza*.
- Sukumaran, R. K., Singhanian, R. R., Mathew, G. M., & Pandey, A. (2009). Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. *Renewable Energy*, *34*(2), 421-424. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.renene.2008.05.008
- Victor, T., & Ogbe, B. (2003). Cellulase Production by *Aspergillus flavus* Linn Isolate NSPR 101 fermented in sawdust , bagasse and corncob. *Journal of Biotechnology*, *2*(June), 150-152.
- Watanabe, H., Nakamura, M., Tokuda, G., Yamaoka, I., Scrivener, a M., & Noda, H. (1997). Site of secretion and properties of endogenous endo-beta-1,4-

glucanase components from *Reticulitermes speratus* (Kolbe), a Japanese subterranean termite. *Insect biochemistry and molecular biology*, 27(4), 305-13. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9134711>

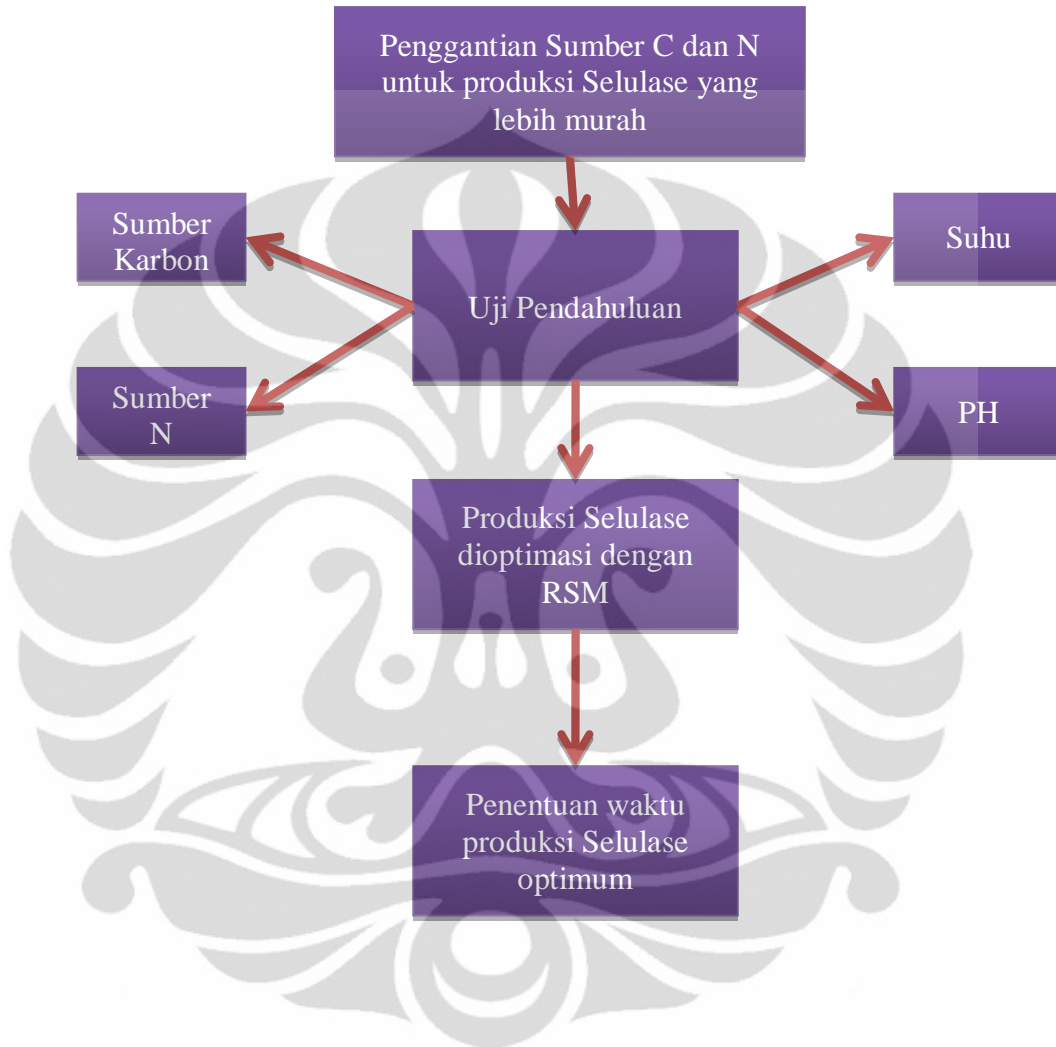
Yin, L.-J., Huang, P.-S., & Lin, H.-H. (2010). Isolation of cellulase-producing bacteria and characterization of the cellulase from the isolated bacterium *Cellulomonas* sp. YJ5. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(17), 9833-9837. American Chemical Society. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20687562>

Yong, J. W. H., Ge, L., Ng, Y. F., & Tan, S. N. (2009). The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 14(12), 5144-64. doi:10.3390/molecules14125144

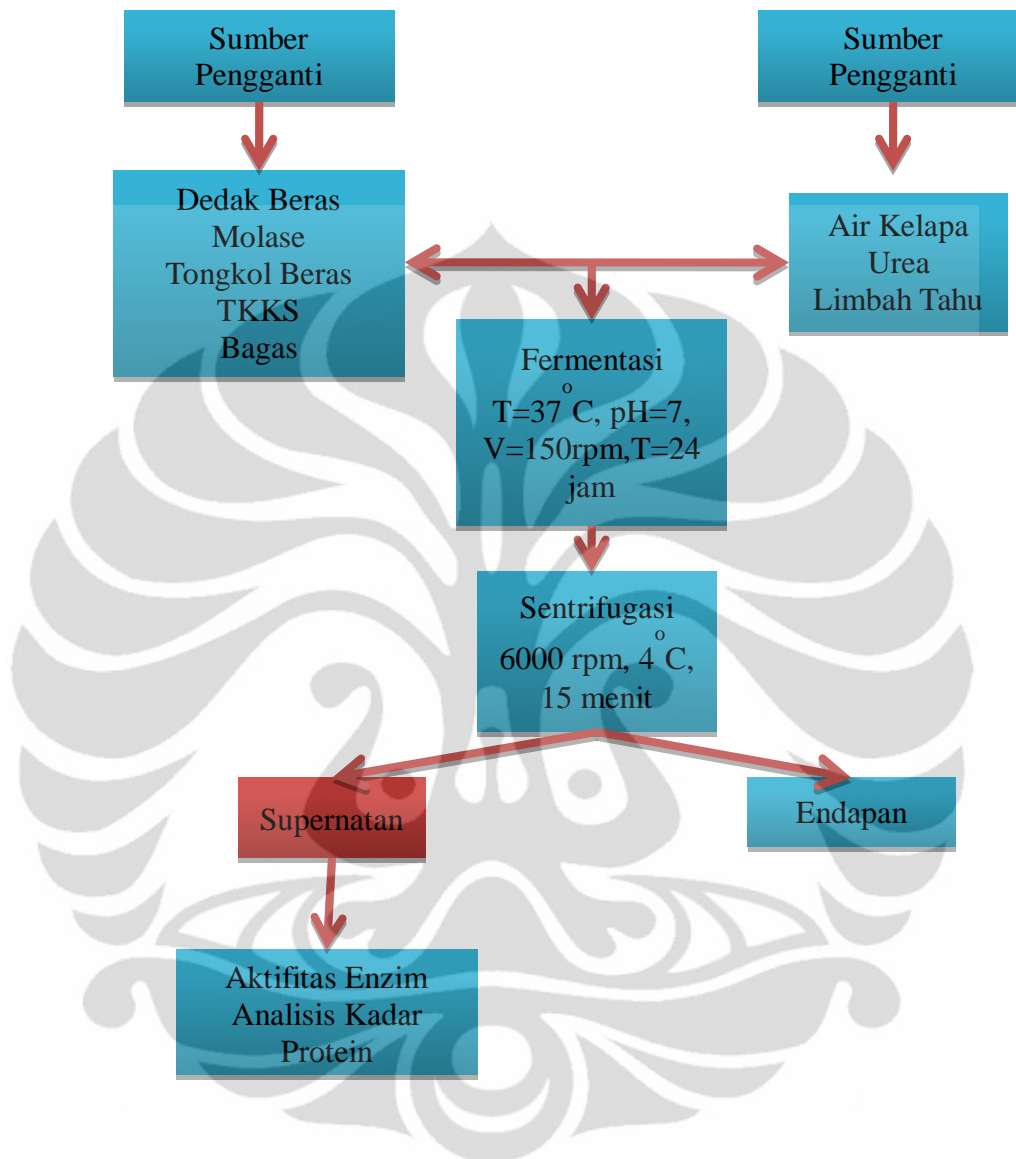


LAMPIRAN

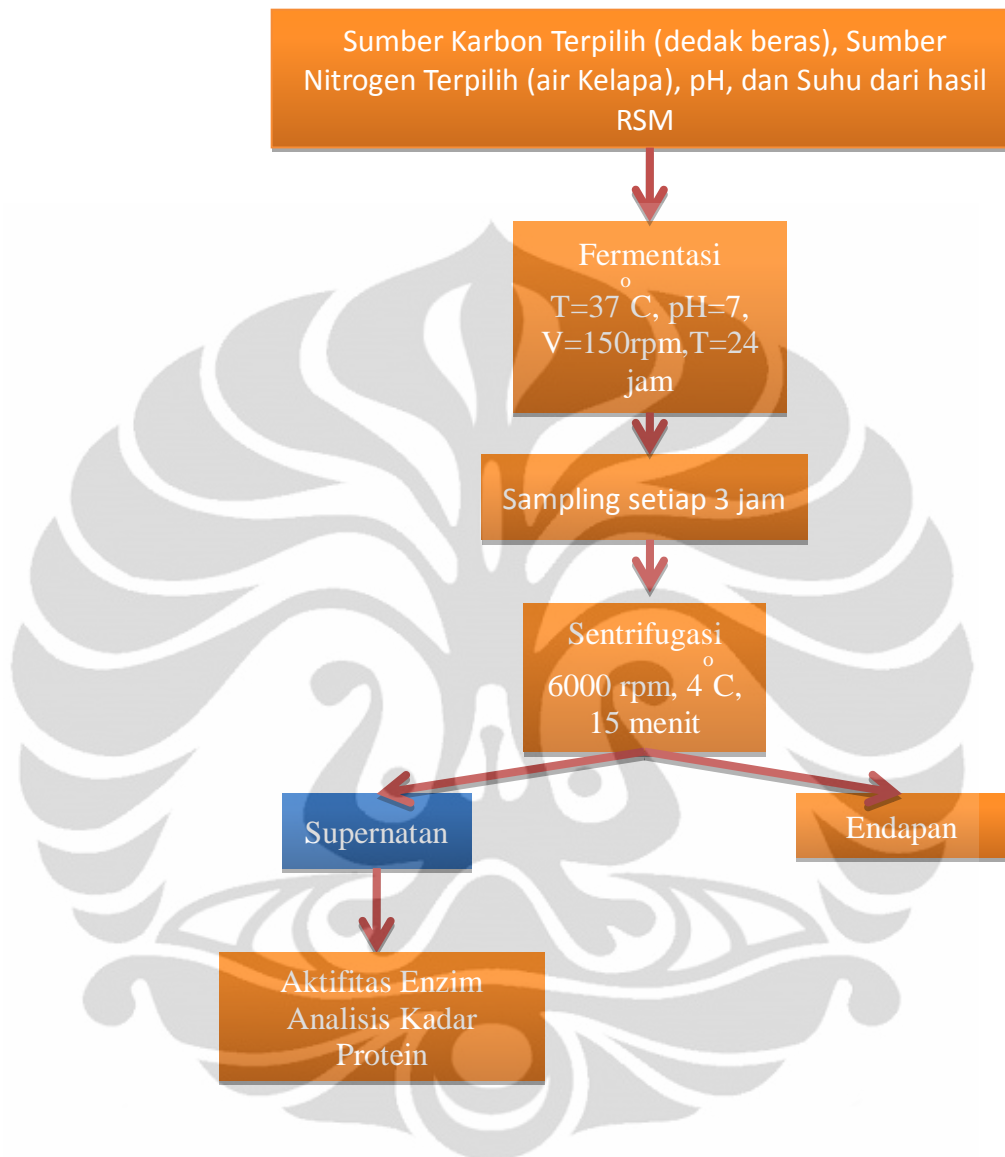
a. Alur Kerja Penelitian



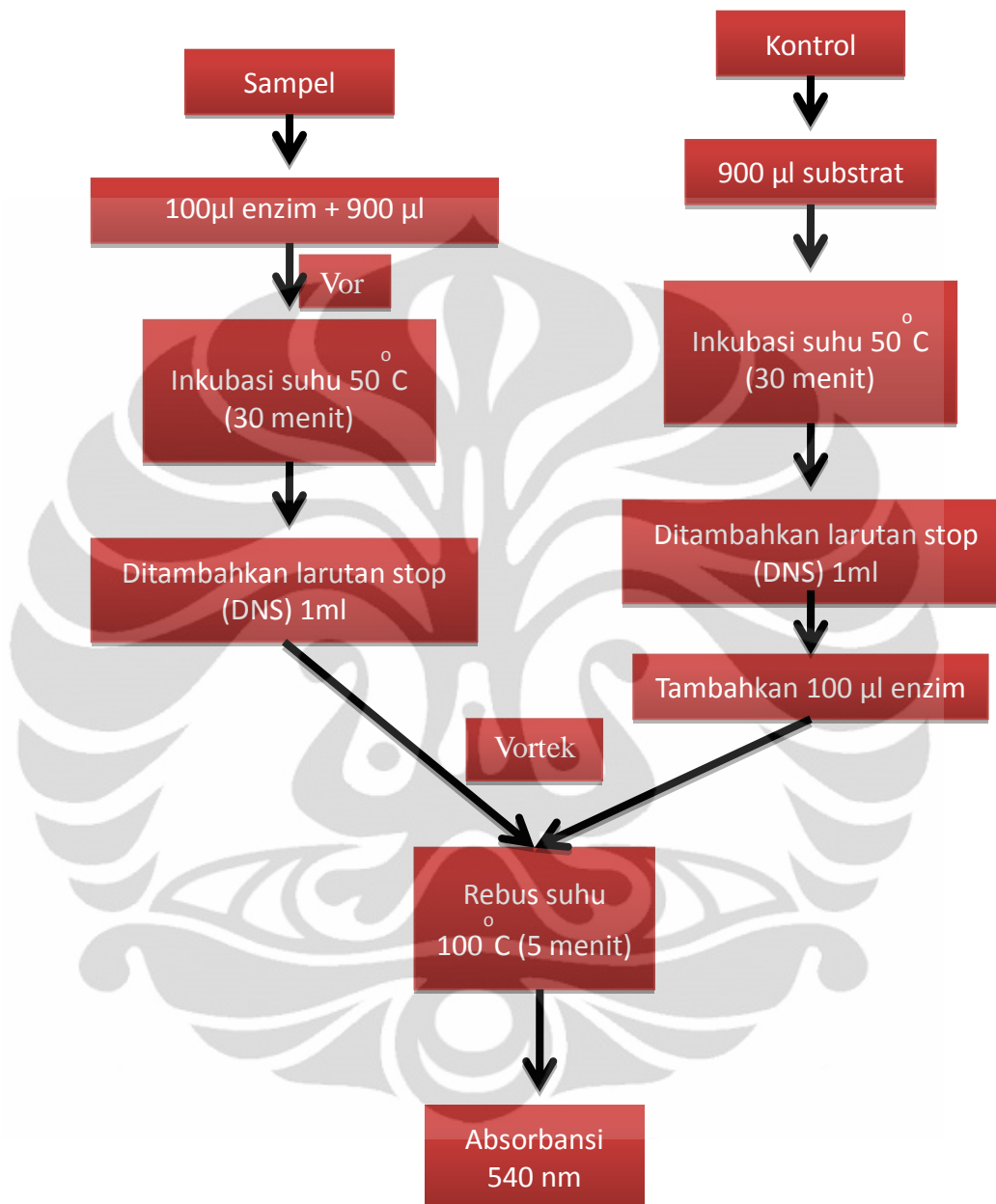
b. Penentuan Media Optimum Produksi Selulase



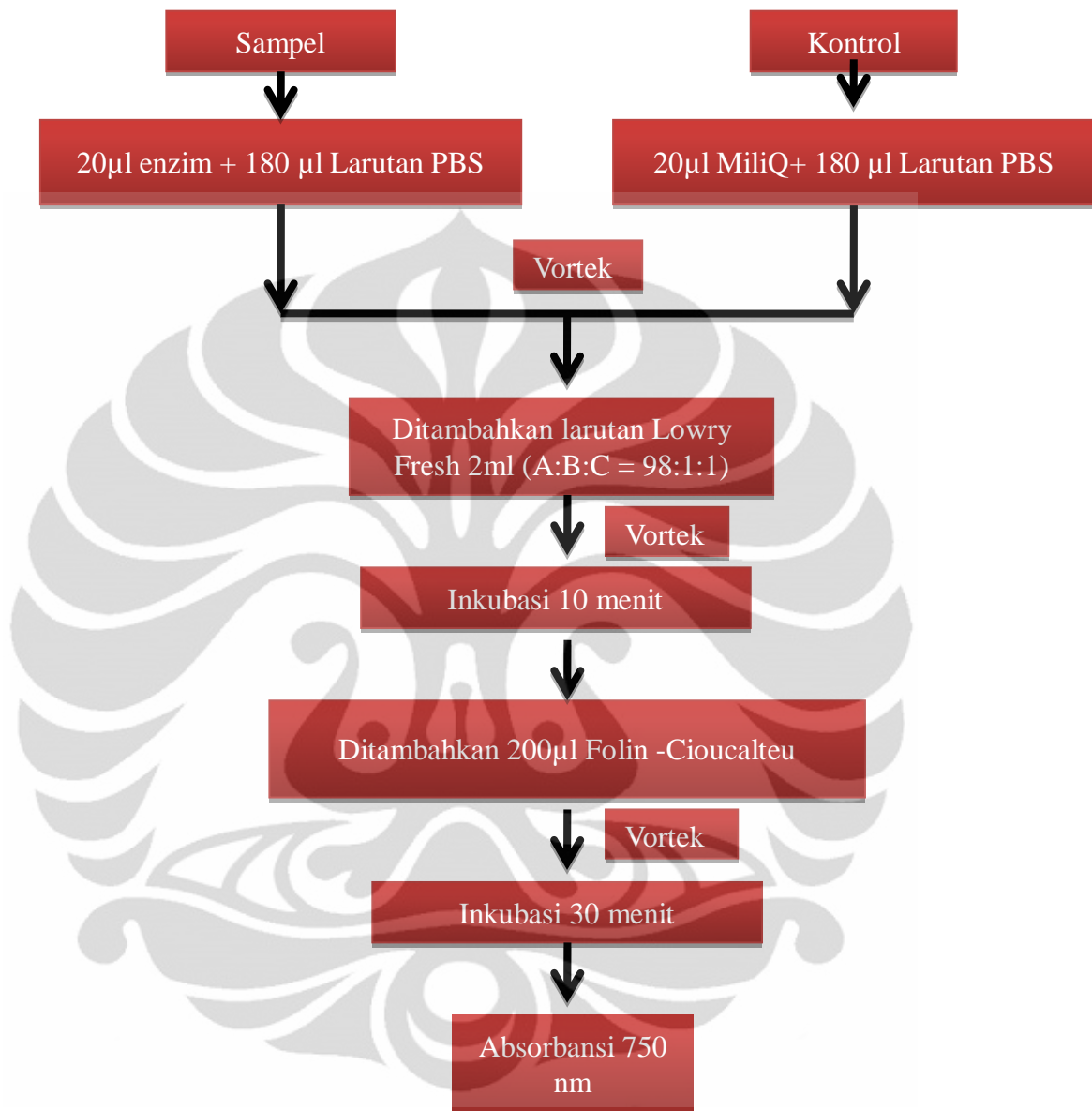
c. Penentuan Waktu Optimum Produksi Selulase



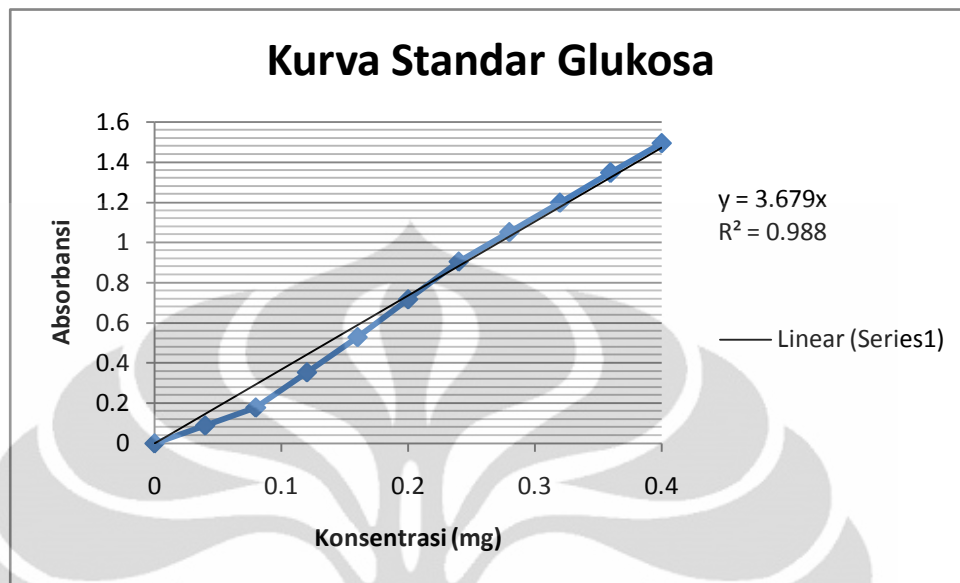
d. Uji Aktivitas Selulase



e. Uji Kadar Protein



f. Kurva Standar Glukosa

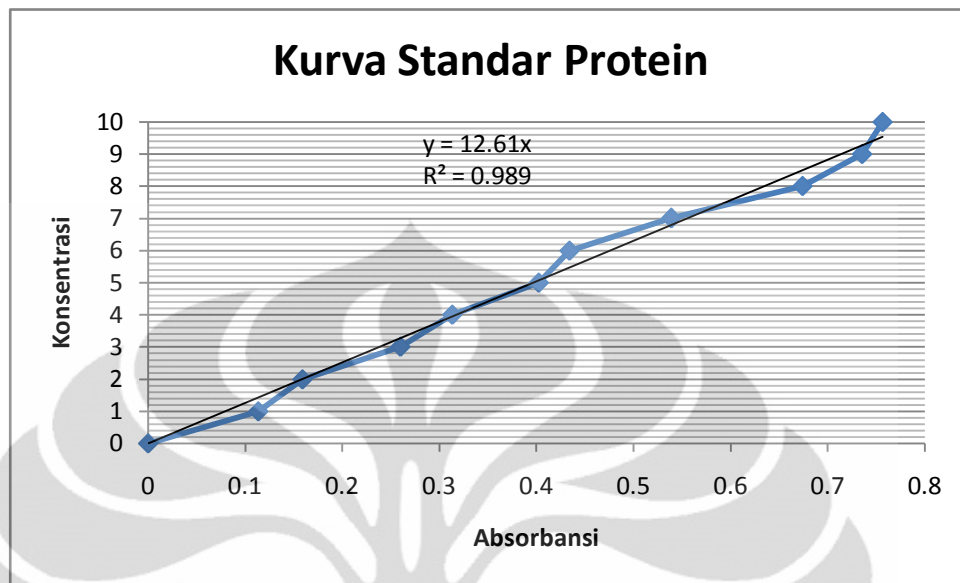


Absorbansi BSA dalam berbagai konsentrasi

Kurva Standar Glukosa pada $\alpha = 540 \text{ nm}$

Konsentrasi mg/mL	abs terkoreksi
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

g. Kurva Standar Protein



Absorbansi BSA dalam berbagai konsentrasi

Kurva Standar Protein pada $\alpha = 750 \text{ nm}$

C	Absorbansi
0	0
1	0.1135
2	0.1592
3	0.2602
4	0.3135
5	0.4025
6	0.434
7	0.5388
8	0.6745
9	0.7355
10	0.7565

h. Data Aktivitas Selulase pada Tongkol Jagung Sebagai Sumber Karbon

% b/v	Aktivitas (U/ml)	Konsentrasi Protein mg/ml
1%	2.08	6.74
5%	2.46	11.80
10%	3.15	12.91
15%	7.99	12.68
20%	11.47	6.70
30%	-	-
40%	-	-
50%	-	-

i. Data Aktivitas Selulase pada Molase Sebagai Sumber Karbon

% b/v	Aktivitas (U/ml)	Konsentrasi Protein mg/ml
1%	2.97	9.68
5%	3.82	13.06
10%	7.43	22.32
15%	10.24	22.52
20%	6.14	20.41
30%	-	-
40%	-	-
50%	-	-

j. Data Aktivitas Selulase pada Bagas Sebagai Sumber Karbon

% b/v	Aktivitas (U/ml)	Konsentrasi Protein mg/ml
1%	1.22	7.07
5%	1.41	10.37
10%	3.51	9.43
15%	-	-
20%	-	-
30%	-	-
40%	-	-
50%	-	-

k. Data Aktivitas Selulase pada TKKS Sebagai Sumber Karbon

% b/v	Aktivitas (U/ml)	Konsentrasi Protein mg/ml
1%	1.98	5.90
5%	2.04	9.02
10%	2.59	11.30
15%	4.19	10.64
20%	3.93	10.28
30%	-	-
40%	-	-
50%	-	-

l. Data Aktivitas Selulase pada Dedak padi Sebagai Sumber Karbon

% b/v	Aktivitas (U/ml)	Konsentrasi Protein mg/ml
1%	0.99	6.86
5%	1.61	8.42
10%	1.90	10.81
15%	3.33	11.61
20%	8.73	10.05
30%	10.09	12.93
40%	12.84	15.48
50%	7.17	6.63

m. Data Aktivitas Selulase pada Air Kelapa Sebagai Sumber Nitrogen

% b/v	Aktivitas (U/ml)	Konsentrasi Protein mg/ml
1%	0.75	4.93
5%	2.83	4.90
10%	3.00	5.31
15%	3.91	5.38
20%	4.18	4.91
30%	3.45	4.06
50%	1.33	3.68

n. Data Aktivitas Selulase pada Air Limbah Tahu Sebagai Sumber Nitrogen

%	Aktivitas	Konsentrasi Protein
b/v	(U/ml)	mg/ml
1%	0.55	5.18
5%	0.78	5.04
10%	1.17	5.80
15%	1.21	4.61
20%	0.36	3.65
50%	0.12	3.26

o. Data Aktivitas Selulase pada Urea Sebagai Sumber Nitrogen

%	Aktivitas	Konsentrasi Protein
b/v	(U/ml)	mg/ml
1%	0.21	3.72
5%	0.06	3.48
10%	0.02	3.48
15%	0.06	3.48
20%	0.04	4.04
50%	0.07	2.79

p. Data Analisa *Response Surface Methodology*

Run	C	N	pH	Suhu	Aktivitas (U/ml) Pengamatan	Aktivitas (U/ml) Prediksi
1	45	15	6	42	8.45	8.11
2	35	25	6	32	1.25	1.26
3	40	20	7	37	7.41	7.13
4	40	20	7	37	6.84	7.13
5	35	15	6	32	6.46	6.16
6	40	10	7	37	5.06	4.90
7	45	25	6	32	5.18	4.47
8	35	25	6	42	3.38	3.11
9	35	15	6	42	4.01	4.10
10	45	25	6	42	8.12	8.25
11	40	20	5	37	4.76	5.08
12	40	20	7	37	7.06	7.13
13	40	20	7	37	7.02	7.13
14	45	15	6	32	7.85	8.23
15	40	20	7	47	3.05	3.12
16	45	25	8	32	4.18	4.04
17	40	20	7	27	1.35	1.64
18	40	20	7	37	7.15	7.13
19	40	20	7	37	7.31	7.13
20	30	20	7	37	6.43	6.57
21	45	15	8	32	5.38	5.34
22	35	15	8	32	4.78	4.60
23	45	15	8	42	5.03	4.97
24	50	20	7	37	12.23	12.45
25	35	25	8	32	2.14	2.17
26	35	25	8	42	4.21	3.78
27	40	20	9	37	2.83	2.86
28	40	30	7	37	2.10	2.61
29	35	15	8	42	1.90	2.30
30	45	25	8	42	7.58	7.58

q. Data Analisa Optimasi Waktu (Dengan Enzim)

Jam	Aktivitas (U/ml)	Konsentrasi Protein (mg/ml)
0	1.54	13.7
3	6.83	13.84
6	7.06	14.7
9	9.91	14.97
12	13.25	15.31
15	12.58	15.47
18	12.39	15.77
21	11.19	16.66
24	10.06	17.05

r. Data Analisa Optimasi Waktu (Tanpa Enzim)

Jam	Aktivitas (U/ml)	Konsentrasi Protein (mg/ml)
0	-1.5	10.55
3	-0.56	10.92
6	-2.77	10.92
9	-1.28	10.68
12	-1.91	10.29
15	-2.07	10.27
18	-0.9	10.18
21	-1.54	9.89
24	-1.58	9.82

s. Jumlah Sel *Bakteri Subtilis*

Jam ke-	Jumlah	Jumlah sel
	Sel Sampel	kontrol
0	2.80E+08	1.20E+08
3	4.40E+08	8.00E+07
6	8.00E+08	2.00E+08
9	1.12E+09	2.40E+08
12	1.24E+09	2.40E+08
15	4.00E+09	2.80E+08
18	8.40E+09	2.80E+08
21	1.20E+10	3.20E+08
24	1.36E+10	4.00E+07