

OPTIMASI PRODUKSI SELULASE DARI BAKTERI LAUT
Bacillus cereus

FATIA IZZATY CHOIRINA EKA PUTRI



**DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2014**

PERNYATAAN MENGENAI SKRIPSI DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi Optimasi Produksi Selulase dari Bakteri Laut *Bacillus cereus* adalah karya saya dengan arahan dari komisi pembimbing dan belum diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka di bagian akhir skripsi ini.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya kepada Institut Pertanian Bogor.

Bogor, Agustus 2014

Fatia Izzaty Choirina Eka Putri
NIM G44100058

ABSTRAK

FATIA IZZATY CHOIRINA EKA PUTRI. Optimasi Produksi Selulase dari Bakteri Laut *Bacillus cereus*. Dibimbing oleh IRMA HERAWATI SUPARTO dan NANIK RAHMANI.

Penelitian ini bertujuan menentukan kondisi optimum untuk memproduksi selulase dari *Bacillus cereus* yang berasal dari Laut Bali. Parameter yang dioptimasi terdiri atas konsentrasi substrat, pH media, suhu fermentasi, dan sumber karbon. Pemilihan kondisi optimum didasarkan pada data aktivitas selulase yang tertinggi yang ditentukan menggunakan metode dinitrosalisilat. Kondisi optimum yang diperoleh adalah konsentrasi substrat sebesar 2.0% (b/v), pH media 5, suhu fermentasi 30 °C, dan sumber karbon glukosa, dengan aktivitas selulase yang dihasilkan sebesar 4.419 U ml⁻¹ pada jam ke-72. Meskipun setelah optimasi pH aktivitas selulase menurun, setelah optimasi suhu fermentasi aktivitasnya meningkat, dan menjadi 7 kali lebih besar setelah optimasi sumber karbon. Proses optimasi pada penelitian ini telah berhasil meningkatkan aktivitas selulase yang dihasilkan bakteri laut *B. cereus*.

Kata kunci: *Bacillus cereus*, bakteri laut, optimasi produksi, selulase

ABSTRACT

FATIA IZZATY CHOIRINA EKA PUTRI. Optimization of Cellulase Production from Marine Bacteria *Bacillus cereus*. Supervised by IRMA HERAWATI SUPARTO and NANIK RAHMANI.

The objective of this study is to determine the optimum conditions for producing cellulase from *Bacillus cereus* of the Bali Sea. Parameters for the optimization were substrate concentration, pH of the media, fermentation temperature, and carbon source. Selection of the optimum condition was based on the highest cellulase activity as determined by dinitrosalicylic method. The optimum conditions obtained were substrate concentration 2.0% (w/v), pH of the media 5, fermentation temperature of 30 °C, and glucose as carbon source, giving cellulase activity of 4.419 U ml⁻¹ at the 72th hour. Although after pH media optimization the cellulase activity decreased, after fermentation temperature optimization the activity increased, up to 7 fold higher after carbon source optimization. The optimization process in this experiment has been successful increasing the activity of cellulase produced by marine bacteria *B. cereus*.

Keywords: *Bacillus cereus*, cellulase, marine bacteria, optimization of production

© Hak Cipta milik IPB, tahun 2014
Hak Cipta dilindungi Undang-Undang

Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan atau menyebutkan sumbernya. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik, atau tinjauan suatu masalah; dan pengutipan tersebut tidak merugikan kepentingan IPB

Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apa pun tanpa izin IPB

OPTIMASI PRODUKSI SELULASE DARI BAKTERI LAUT
Bacillus cereus

FATIA IZZATY CHOIRINA EKA PUTRI

Skripsi
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains
pada
Departemen Kimia

DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2014

Judul Skripsi : Optimasi Produksi Selulase dari Bakteri Laut *Bacillus cereus*
Nama : Fatia Izzaty Choirina Eka Putri
NIM : G44100058

Disetujui oleh

Dr dr Irma Herawati Suparto, MS
Pembimbing I

Nanik Rahmani, SPt MSi
Pembimbing II

Diketahui oleh

Prof Dr Dra Purwantiningsih Sugita, MS
Ketua Departemen

Tanggal Lulus:

PRAKATA

Segala puji bagi Allah yang telah memberikan rahmat dan hidayah-Nya sehingga laporan hasil penelitian ini berhasil disusun. Laporan ini disusun berdasarkan penelitian yang dilakukan penulis di Laboratorium Biokatalis dan Fermentasi, Bidang Bioproses, Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Cibinong, pada bulan Februari hingga Mei 2014, dengan judul “Optimasi Produksi Selulase dari Bakteri Laut *Bacillus cereus*”. Penelitian ini didanai oleh Proyek DIPA-Biorefinery, Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI Tahun Anggaran 2014.

Terima kasih penulis ucapkan kepada Dr dr Irma Herawati Suparto, MS selaku pembimbing pertama dari Departemen Kimia IPB dan Nanik Rahmani, SPT MSi selaku pembimbing kedua dari Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI Cibinong atas bimbingannya, Dr Yopi selaku Kepala Laboratorium Biokatalis dan Fermentasi, Nadia Ulfa Jabbar R, seluruh staf di Laboratorium Biokatalis dan Fermentasi, dan rekan kerja yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu atas bantuannya selama penulis melaksanakan penelitian sehingga penelitian dapat diselesaikan dengan baik. Ucapan terima kasih juga penulis sampaikan kepada ayah, ibu, adik, Yusuf Bramastya A, dan teman-teman yang telah memberikan doa serta dukungannya.

Semoga karya ilmiah ini bermanfaat bagi pembaca.

Bogor, Agustus 2014

Fatia Izzaty Choirina Eka Putri

DAFTAR ISI

| | |
|-------------------------------|----|
| DAFTAR GAMBAR | vi |
| DAFTAR LAMPIRAN | vi |
| PENDAHULUAN | 1 |
| Latar Belakang | 1 |
| METODE | 2 |
| Alat dan Bahan | 2 |
| Prosedur | 2 |
| HASIL DAN PEMBAHASAN | 5 |
| Optimasi Konsentrasi Substrat | 5 |
| Optimasi pH Media | 7 |
| Optimasi Suhu Fermentasi | 9 |
| Optimasi Sumber Karbon | 10 |
| SIMPULAN DAN SARAN | 12 |
| DAFTAR PUSTAKA | 13 |
| LAMPIRAN | 15 |
| RIWAYAT HIDUP | 24 |

DAFTAR GAMBAR

| | |
|--|----|
| 1 Pengaruh berbagai konsentrasi substrat pada pertumbuhan bakteri dan aktivitas selulase yang dihasilkan | 5 |
| 2 Pengaruh berbagai pH media pada pertumbuhan bakteri dan aktivitas selulase yang dihasilkan | 8 |
| 3 Pengaruh berbagai suhu fermentasi pada pertumbuhan bakteri dan aktivitas selulase yang dihasilkan | 9 |
| 4 Pengaruh berbagai sumber karbon pada pertumbuhan bakteri dan aktivitas selulase yang dihasilkan | 11 |

DAFTAR TABEL

| | |
|--|----|
| 1 Data aktivitas selulase pada berbagai konsentrasi substrat | 7 |
| 2 Data aktivitas selulase pada berbagai pH media | 8 |
| 3 Data aktivitas selulase pada berbagai suhu fermentasi | 10 |
| 4 Data perubahan aktivitas selulase setelah proses optimasi | 12 |

DAFTAR LAMPIRAN

| | |
|---|----|
| 1 Bagan alir penelitian | 15 |
| 2 Data OD 660 nm contoh pada berbagai konsentrasi CMC | 16 |
| 3 Data aktivitas selulase pada berbagai konsentrasi CMC | 17 |
| 4 Data OD 660 nm contoh pada berbagai pH media | 18 |
| 5 Data aktivitas selulase pada berbagai pH media | 19 |
| 6 Data OD 660 nm contoh pada berbagai suhu fermentasi | 20 |
| 7 Data aktivitas selulase pada berbagai suhu fermentasi | 21 |
| 8 Data OD 660 nm contoh pada berbagai sumber karbon | 22 |
| 9 Data aktivitas selulase pada berbagai sumber karbon | 23 |

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Pertambahan jumlah penduduk dan pertumbuhan ekonomi membuat kebutuhan akan bahan bakar minyak terus meningkat, sementara cadangan minyak bumi terus menurun jumlahnya. Oleh karena itu, diperlukan energi alternatif yang bersifat terbarukan, salah satu sumber energi alternatif yang saat ini banyak diteliti adalah bioetanol. Bioetanol dapat diproduksi dari bahan lignoselulosa. Hampir semua limbah pertanian dan perkebunan merupakan bahan lignoselulosa. Pemanfaatan limbah tersebut untuk menghasilkan bioetanol tentu akan meningkatkan nilai ekonomisnya. Bioetanol dapat dibuat secara kimiawi maupun enzimatis, tetapi proses enzimatis lebih ramah lingkungan sehingga perlu dikembangkan (Anindyawati 2009).

Bahan lignoselulosa mengandung 3 komponen utama, yaitu selulosa, hemiselulosa, dan lignin. Selulosa ($C_6H_{10}O_5)_n$ adalah homopolimer linear dari monomer-monomer glukosa yang dihubungkan dengan ikatan β -1,4-glikosida (Suvorov *et al.* 2011). Selulosa harus dipecah menjadi monosakarida (glukosa) sebelum difermentasi menjadi bioetanol. Pemecahan selulosa menjadi glukosa dapat dilakukan salah satunya menggunakan enzim selulase. Selulase merupakan kompleks enzim yang terdiri atas 3 enzim utama, yaitu endoglukanase, eksoglukanase, dan β -1,4-glukosidase (selobiase). Ketiga enzim tersebut bekerja bersama-sama menghidrolisis selulosa menjadi glukosa melalui pemutusan ikatan β -1,4-glikosida (Sadhu dan Maiti 2013).

Selulase dapat diproduksi dari bakteri atau jamur, tetapi bakteri lebih dipilih karena memiliki laju pertumbuhan yang lebih cepat dan lebih mudah direkayasa secara genetis, meskipun jumlah enzim yang dihasilkan tidak sebanyak jamur (Sadhu dan Maiti 2013). Selulase dapat diproduksi oleh bakteri selulolitik pada lingkungan yang mengandung selulosa karena mikroorganisme tersebut menginginkan produk pemecahan selulosa, berupa glukosa yang digunakan sebagai sumber karbon. Mahalnya biaya produksi selulase menjadi kendala dalam proses produksi sehingga diperlukan optimasi produksi agar lebih ekonomis dan efisien (Suvorov *et al.* 2011; Sadhu dan Maiti 2013). Selain itu, optimasi produksi diperlukan karena setiap bakteri selulolitik menghasilkan kompleks enzim selulase yang berbeda, bergantung pada gen yang dimiliki dan sumber karbon yang digunakan, sehingga kondisi optimum fermentasinya juga berbeda. Parameter yang perlu dioptimasi di antaranya adalah konsentrasi substrat, pH media, suhu fermentasi, sumber karbon, dan waktu inkubasi karena merupakan faktor-faktor yang memengaruhi pertumbuhan bakteri (Ray *et al.* 2007).

Hatmanti (2000) melaporkan bahwa salah satu bakteri yang berpotensi sebagai penghasil selulase adalah *Bacillus* spp. Marga *Bacillus* dilaporkan memiliki beberapa keunggulan, seperti mudah ditumbuhkan dan tidak memerlukan media pertumbuhan yang mahal. Tingginya keanekaragaman hayati di Indonesia memungkinkan pemanfaatan bakteri *Bacillus* yang berasal dari darat maupun laut. Penelitian mengenai optimasi produksi selulase dari *Bacillus* yang berasal dari darat di antaranya dilakukan oleh Hidayat (2005), Ray *et al.* (2007), Baehaki *et al.* (2008), Meryandini *et al.* (2009), Susanti (2011), dan Sethi *et al.* (2013). Mengingat telah banyaknya penelitian terhadap *Bacillus* yang berasal dari

darat, pada penelitian ini digunakan *Bacillus* yang berasal dari laut. Bakteri laut umumnya lebih mampu bertahan pada lingkungan yang kompleks, seperti suhu rendah, tekanan tinggi, salinitas tinggi, dan cahaya yang kurang (Zhang dan Kim 2010).

Penelitian bertujuan menentukan kondisi optimum untuk memproduksi selulase dari bakteri laut *Bacillus cereus*. Parameter yang dioptimasi terdiri atas konsentrasi substrat, pH media, suhu fermentasi, dan sumber karbon. Manfaat yang diharapkan dari proses optimasi ini adalah peningkatan aktivitas enzim selulase yang dihasilkan bakteri laut tersebut.

METODE

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah alat-alat kaca, neraca analitik, pengaduk bermagnet, penangas air, sentrifuga Hitachi tipe CS 150 NX dengan rotor S55A2, foil aluminium, spektrofotometer UV-Vis berkas ganda Hitachi tipe U-3900H, pipet mikro, tabung mikro, inkubator kocok, inkubator statik, laminar, oven, autoklaf, pH-meter, pemusing (vortex), termometer, kawat ose, dan kapas. Bahan yang digunakan adalah bakteri *Bacillus cereus* yang berasal dari pinggiran Laut Bali bagian Timur, media kultur berupa artificial sea water (ASW), ekstrak khamir, pepton, karboksimetil selulosa (CMC) dari Sigma Aldrich, D-glukosa, laktosa, maltosa, sukrosa, akuades, pereaksi DNS berupa asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS) dari Sigma Aldrich, NaOH, K-Na-Tartrat, bufer fosfat pH 8, HCl, dan alkohol 70%.

Prosedur

Penelitian ini terdiri atas tahap peremajaan isolat, optimasi produksi selulase yang terdiri atas tahap prekultur dan kultur, panen selulase, pengamatan pertumbuhan sel, dan uji aktivitas selulase. Parameter yang dioptimasi terdiri atas konsentrasi substrat, pH media, suhu fermentasi, dan sumber karbon. Bagan alir penelitian dapat dilihat pada Lampiran 1.

Peremajaan Isolat

Media padat dibuat terlebih dahulu dengan cara melarutkan ASW sebanyak 3.8% (b/v), pepton 0.5% (b/v), ekstrak khamir 0.1% (b/v), substrat CMC 0.5% (b/v), dan agar 1.5% (b/v) dalam akuades menggunakan pengaduk bermagnet. Media kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Media yang telah steril dituang ke dalam cawan petri dan dibiarkan hingga padat. Stok kultur dibuat dengan cara menginokulasikan isolat bakteri sebanyak 1-2 ose pada media padat secara zig-zag. Pekerjaan ini dilakukan di dalam laminar untuk memperkecil kemungkinan kontaminasi. Isolat selanjutnya diinkubasi pada inkubator statik dengan suhu 30 °C selama 1 hari.

Optimasi Produksi Selulase

Optimasi produksi selulase terdiri atas 2 tahap, yaitu tahap prekultur dan kultur. Media prekultur dan kultur dibuat sebanyak 2 ulangan (duplo), tetapi bakteri yang digunakan pada ulangan 1 diambil dari titik yang berbeda dengan bakteri yang digunakan pada ulangan 2. Tahap prekultur dilakukan dengan cara menginokulasikan isolat bakteri sebanyak 1 ose ke dalam media kultur cair yang telah steril. Media kultur yang digunakan adalah sebanyak 10 ml dalam labu erlenmeyer 100 ml. Pembuatan media kultur cair sama dengan pembuatan media padat, tetapi tanpa penambahan agar. Media kemudian diinkubasi dalam inkubator kocok (agitasi 150 rpm) pada suhu 30 °C selama 1 hari sehingga diperoleh suspensi bakteri. Suspensi bakteri kemudian diambil sebanyak 1 ml untuk diukur rapatannya optis selnya pada panjang gelombang 660 nm (OD 660 nm). Nilai absorbansi yang diperoleh dimasukkan ke dalam rumus di bawah ini sehingga diperoleh volume suspensi bakteri (V_B) yang akan diinokulasikan ke dalam media kultur.

$$OD\ 660\ nm \times V_B = 0.02 \times (30\ ml + V_B)$$

Tahap kultur dilakukan dengan cara menginokulasikan suspensi bakteri sebanyak V_B (ml) ke dalam media kultur cair yang telah steril. Media kultur yang digunakan adalah sebanyak 30 ml dalam labu erlenmeyer 300 ml. Media kemudian diinkubasi dalam inkubator kocok (agitasi 150 rpm) pada suhu 30 °C selama 6 hari. Pengambilan contoh dilakukan pada jam ke-0, 24, 48, 72, 96, 120, dan 144. Contoh diambil sebanyak 2 ml untuk diuji, 1 ml untuk uji OD 660 nm dan 1 ml untuk uji aktivitas selulase.

Parameter yang dioptimasi terdiri atas konsentrasi substrat, pH media, suhu fermentasi, dan sumber karbon. Optimasi setiap parameter dilakukan bertahap, artinya hasil optimasi parameter sebelumnya digunakan pada optimasi parameter selanjutnya. Optimasi konsentrasi substrat dilakukan dengan meragamkan konsentrasi CMC pada pembuatan media prekultur dan kultur, yaitu 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, dan 2.5% (b/v). Optimasi pH media dilakukan dengan meragamkan pH media, yaitu 5, 6, 7, 8, dan 9. Pengaturan pH dilakukan dengan menambahkan HCl 10% dan NaOH 2%. Optimasi suhu fermentasi dilakukan dengan meragamkan suhu dari inkubator kocok, yaitu 20, 30, 40, dan 50 °C. Sementara itu optimasi sumber karbon dilakukan dengan meragamkan jenis sumber karbon yang ditambahkan pada media prekultur dan kultur, yaitu glukosa, laktosa, maltosa, dan sukrosa sebanyak 0.5% (b/v). Pemilihan kondisi optimum didasarkan pada data aktivitas selulase, sementara itu data OD 660 nm digunakan untuk mengamati pertumbuhan sel.

Panen Selulase

Panen selulase dilakukan dengan memusingkan contoh menggunakan sentrifuga sebanyak 2 kali dengan kecepatan $7,000 \times g$ selama 10 menit pada suhu 4 °C. Supernatan diambil sebagai fraksi selulase kasar (tidak dimurnikan).

Pengamatan Pertumbuhan Sel

Pengamatan pertumbuhan sel dilakukan dengan mengukur rapat optis sel pada panjang gelombang 660 nm (OD 660 nm). Contoh yang belum dipanen enzimnya diukur OD 660 nm-nya dengan cara melarutkan 0.1 ml contoh dalam 0.9 ml akuades steril dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 660 nm. Nilai OD 660 nm yang diperoleh diplotkan sebagai sumbu Y dan waktu pengambilan contoh diplotkan sebagai sumbu X sehingga diperoleh kurva pertumbuhan sel (Susanti 2011).

Uji Aktivitas Selulase

Selulase kasar diuji aktivitasnya menggunakan metode DNS (Miller 1959). Pereaksi DNS dibuat dengan melarutkan asam 3,5-dinitrosalisilat, K-Na-Tartrat, dan NaOH ke dalam akuades. Pengujian dilakukan dengan mereaksikan 0.25 ml selulase yang telah diencerkan dengan bufer fosfat pH 8 0.05 M (faktor pengenceran 10) dengan 0.25 ml substrat CMC 0.5% (b/v) dalam bufer fosfat pH 8 0.05 M di dalam tabung reaksi. Tabung reaksi berisi contoh kemudian diinkubasi di dalam penangas air (suhu 50 °C) selama 5 menit, setelah itu ditambahkan pereaksi DNS sebanyak 0.75 ml, dan reaksi dihentikan dengan cara merendam tabung reaksi di dalam air mendidih (suhu \pm 100 °C) selama 15 menit. Tabung reaksi kemudian didinginkan dengan cara direndam di dalam air es selama 5 menit. Kontrol dibuat dengan cara yang sama dengan contoh, tetapi tanpa penambahan selulase (hanya bufer), sementara itu blangko dibuat dengan cara mereaksikan 0.5 ml bufer dengan 0.75 ml DNS, dan reaksi dihentikan dengan cara merendam tabung reaksi di dalam air mendidih (suhu \pm 100 °C) selama 15 menit. Tabung reaksi kemudian didinginkan dengan cara direndam di dalam air es selama 5 menit.

Gula pereduksi yang dibebaskan ditentukan jumlahnya dengan cara mengukur warna yang terbentuk menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm, lalu nilai absorbans yang diperoleh diubah menjadi konsentrasi gula pereduksi (ppm) menggunakan persamaan yang didapat dari kurva standar glukosa. Kurva standar glukosa dibuat dengan cara melarutkan 0.01 g D-glukosa ke dalam 10 ml bufer fosfat pH 8 (0.05 M), kemudian diencerkan secara bertingkat sehingga diperoleh konsentrasi 20-400 ppm. Setiap hasil pengenceran diambil sebanyak 0.5 ml, direaksikan dengan 0.75 ml pereaksi DNS, direndam di dalam air mendidih (suhu \pm 100 °C) selama 15 menit, direndam di dalam air es selama 5 menit, dan diukur nilai absorbansnya pada panjang gelombang 540 nm. Aktivitas selulase dapat dihitung menggunakan rumus di bawah ini. Satu unit aktivitas selulase ($U\ ml^{-1}$) merupakan kemampuan selulase untuk melepaskan 1 μ mol gula pereduksi per menit pada kondisi pengukuran.

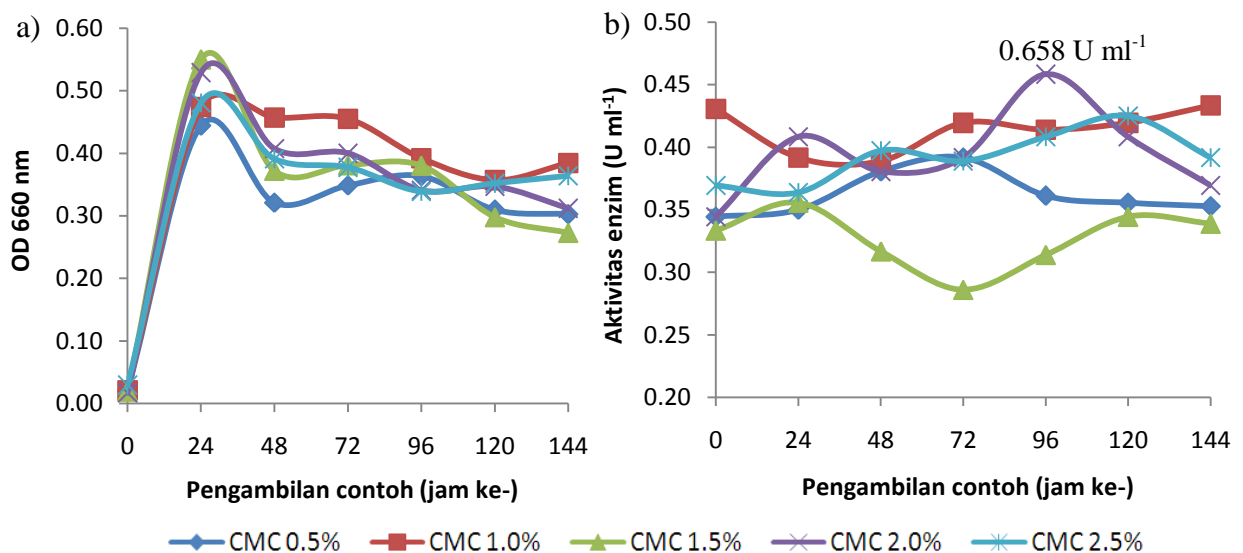
$$\text{Aktivitas selulase} = \frac{\text{Gula pereduksi (mg/ml)} \times \text{Faktor pengenceran} \times 1000}{\text{Waktu reaksi (menit)} \times \text{BM glukosa (g/mol)}}$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Optimasi produksi selulase dilakukan dengan metode fermentasi menggunakan inkubator kocok (agitasi 150 rpm). Pengadukan akan memperbesar kontak antara enzim dan substrat sehingga aktivitas selulase akan meningkat (Meryandini *et al.* 2009). Abou-Taleb *et al.* (2009) melaporkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan antara aktivitas enzim yang difermentasi pada agitasi 150 rpm dan 200 rpm. Fermentasi adalah metode untuk mengubah substrat kompleks menjadi senyawa yang lebih sederhana menggunakan mikroorganisme, salah satunya bakteri (Sadhu dan Maiti 2013). Selama proses fermentasi bakteri menghasilkan selulase, selulase tersebut dipisahkan dari sel menggunakan teknik sentrifugasi. Gaya gravitasi akan mengendapkan sel, sementara selulase tetap terdapat dalam supernatan. Sentrifugasi dilakukan pada suhu rendah (4 °C) untuk mencegah kerusakan selulase (Baehaki *et al.* 2008). Bakteri yang digunakan pada penelitian ini adalah *Bacillus cereus* yang berasal dari laut.

Optimasi Konsentrasi Substrat

Substrat yang digunakan pada penelitian ini adalah substrat selulosa murni komersial berupa CMC, yang memiliki viskositas tinggi. Ray *et al.* (2007) juga menggunakan CMC (viskositas tinggi) untuk melakukan optimasi produksi selulase dari *Bacillus subtilis* CY5 dan *Bacillus circulans* TP3. Abou-Taleb *et al.* (2009) melaporkan bahwa CMC adalah substrat terbaik untuk produksi selulase karena dapat menginduksi bakteri untuk memproduksi enzim tersebut. Pengaruh berbagai konsentrasi substrat pada pertumbuhan bakteri ditunjukkan pada Gambar 1a, sedangkan pengaruhnya pada aktivitas selulase ditunjukkan pada Gambar 1b. Nilai OD 660 nm dan aktivitas selulase dari masing-masing konsentrasi substrat disajikan pada Lampiran 2 dan 3.



Gambar 1 Pengaruh berbagai konsentrasi substrat pada: a) pertumbuhan bakteri *Bacillus cereus*; b) aktivitas selulase yang dihasilkan

Berdasarkan Gambar 1a, bakteri mengalami fase adaptasi pada jam ke-0, fase eksponensial pada jam ke-24, fase stasioner pada jam ke-48, 72, dan 96, dan fase kematian pada jam ke-120 dan 144. Pada fase adaptasi bakteri belum melakukan pembelahan sel karena masih beradaptasi dengan media (lingkungan) baru, pada fase eksponensial bakteri mulai melakukan pembelahan sel, pada fase stasioner jumlah bakteri yang hidup konstan, dan pada fase kematian terjadi penurunan populasi karena semakin habisnya nutrisi di dalam media tumbuh. Kerapatan sel bakteri (OD 660 nm) pada konsentrasi CMC 1.5 dan 2.0% lebih tinggi dibandingkan dengan konsentrasi yang lain meskipun tampaknya tidak ada perbedaan yang signifikan. Sementara itu berdasarkan Gambar 1b, aktivitas selulase kasar paling tinggi pada konsentrasi CMC 2.0% (jam ke-96), yaitu sebesar 0.658 U ml⁻¹ sehingga dapat disimpulkan bahwa konsentrasi optimum substrat adalah 2.0%. Trivedi *et al.* (2013) dan Singh *et al.* (2013) juga menggunakan substrat CMC dengan konsentrasi 2.0% (b/v) untuk melakukan optimasi produksi selulase dari bakteri laut. Konsentrasi substrat yang digunakan pada media tumbuh bakteri harus mencukupi untuk pertumbuhan sel dan produksi enzim (Ray *et al.* 2007).

Bakteri yang baru dipindahkan ke media kultur (pada jam ke-0) belum memproduksi enzim, tetapi berdasarkan Gambar 1b pada jam ke-0 aktivitas selulase sudah tinggi, hal ini diduga disebabkan oleh adanya substrat yang telah terhidrolisis menjadi monosakarida atau disakarida saat proses sterilisasi. Hal ini dimungkinkan karena proses sterilisasi menggunakan suhu tinggi (121 °C). Aktivitas selulase tertinggi dicapai pada jam ke-96, yaitu pada saat fase stasioner. Hal ini serupa dengan hasil penelitian Baehaki *et al.* (2008) yang melaporkan bahwa enzim protease (dari bakteri *Pseudomonas aeruginosa*) diproduksi seiring dengan pertumbuhan sel dan mencapai maksimum pada fase stasioner. Pada fase stasioner laju pertumbuhan bakteri sama dengan laju kematiannya, sehingga bakteri mengeluarkan selulase lebih banyak sebagai pertahanan diri, selulase akan memecah selulosa dalam media untuk dijadikan sumber karbon. Susanti (2011) juga melaporkan bahwa produksi selulase harus diinduksi terlebih dahulu dalam media terbatas yang hanya mengandung substrat selulosa.

Aktivitas selulase yang dihasilkan pada jam ke-96 meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi substrat (kecuali pada konsentrasi 1.5%), mencapai nilai paling tinggi pada konsentrasi 2.0%, dan menurun pada konsentrasi 2.5% (Tabel 1). Tetapi peningkatan aktivitas selulase tampaknya tidak terlalu signifikan. Aktivitas selulase yang menurun pada konsentrasi 1.5% diduga disebabkan oleh kerusakan selulase kasar saat proses penyimpanan dan pengujian. Enzim kasar memiliki stabilitas yang rendah sehingga mudah rusak, salah satunya oleh suhu. Susanti (2011) melaporkan bahwa jumlah substrat yang digunakan berbanding lurus dengan aktivitas selulase yang dihasilkan, tetapi jika konsentrasi substrat terlalu besar akan menghambat pertumbuhan bakteri tersebut sehingga aktivitas enzimnya menurun. Konsentrasi substrat ini berhubungan dengan ketersediaan oksigen di dalam media tumbuh bakteri.

Tabel 1 Data aktivitas selulase yang dihasilkan pada jam ke-96 pada berbagai konsentrasi substrat

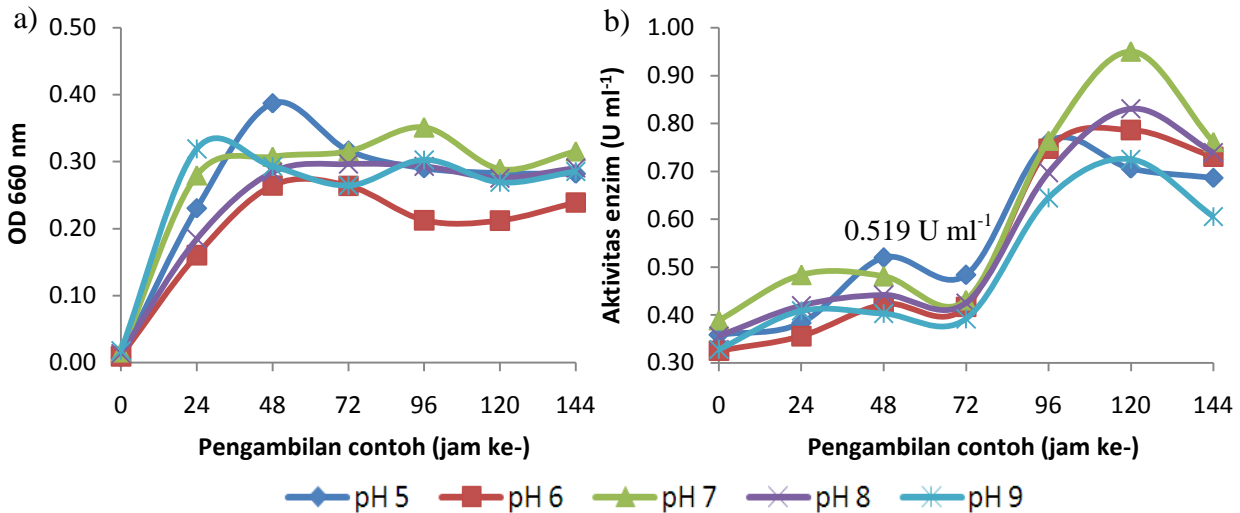
| Konsentrasi CMC (% b/v) | Aktivitas selulase (U ml ⁻¹) |
|-------------------------|--|
| 0.5 | 0.509 |
| 1.0 | 0.590 |
| 1.5 | 0.436 |
| 2.0 | 0.658 |
| 2.5 | 0.581 |

Pertumbuhan bakteri pada penelitian ini diamati secara kualitatif menggunakan metode turbidimetri dengan instrumen spektrofotometer UV-Vis. Prinsip penentuan OD menggunakan spektrofotometer adalah sinar dari sumber akan menembak contoh yang merupakan suspensi sel bakteri, sel bakteri akan menghamburkan sinar yang mengenainya sehingga sinar yang diteruskan (transmitan) berkurang. Semakin banyak sel bakteri yang terdapat di dalam contoh semakin banyak juga sinar yang dihamburkan, sehingga nilai transmitan akan semakin kecil. Sementara itu aktivitas selulase kasar ditentukan menggunakan metode DNS. Substrat yang umum digunakan pada penentuan gula pereduksi ini adalah karboksimetil selulosa (CMC). CMC umum digunakan untuk deteksi awal aktivitas enzim selulase khususnya endoglukanase (Hidayat 2005).

Prinsip penentuan gula pereduksi menggunakan metode DNS adalah glukosa (hasil degradasi selulosa oleh selulase) dalam contoh akan mereduksi asam 3,5-dinitrosalisilat menjadi asam 3-amino-5-nitrosalisilat sehingga contoh berwarna jingga. K-Na-Tartrat di dalam pereaksi DNS akan menstabilkan warna yang terbentuk. Sementara itu NaOH di dalam pereaksi DNS membuat suasana basa sehingga reaksi reduksi-oksidasi dapat berlangsung (Miller 1959). Semakin banyak gula pereduksi dalam contoh absorbans yang terbaca juga semakin besar. Menurut Hidayat (2005) semakin tinggi aktivitas enzim semakin banyak pula gula pereduksi yang dihasilkan.

Optimasi pH Media

Faktor penting dalam produksi enzim yang juga perlu dioptimasi adalah pH media. Ragam pH yang digunakan pada penelitian ini adalah 5, 6, 7, 8, dan 9, dengan konsentrasi substrat sebesar 2.0% hasil optimasi sebelumnya. Pengaruh berbagai pH media pada pertumbuhan bakteri ditunjukkan pada Gambar 2a, sedangkan pengaruhnya pada aktivitas selulase ditunjukkan pada Gambar 2b. Nilai OD 660 nm dan aktivitas selulase dari masing-masing pH media disajikan pada Lampiran 4 dan 5.



Gambar 2 Pengaruh berbagai pH media pada: a) pertumbuhan bakteri *Bacillus cereus*; b) aktivitas selulase yang dihasilkan

Berdasarkan Gambar 2a, bakteri dapat tumbuh dengan baik pada berbagai pH media. Bakteri mengalami fase adaptasi pada jam ke-0, fase eksponensial pada jam ke-24 dan 48, fase stasioner pada jam ke-72 dan 96, dan fase kematian pada jam ke-120 dan 144. Menurut Acharya dan Chaudhary (2012) dan Ray *et al.* (2007) sebagian besar mikroorganisme mampu tumbuh pada rentang pH yang luas. OD 660 nm paling tinggi pada pH media 5, yaitu pada jam ke-48. Berdasarkan Gambar 2b, kurva aktivitas selulase menunjukkan dua kurva sigmoid. Kurva sigmoid yang pertama menunjukkan aktivitas selulase paling tinggi pada jam ke-48 (pH media 5), sedangkan kurva sigmoid yang kedua menunjukkan aktivitas selulase paling tinggi pada jam ke-120 (pH media 7). Kurva sigmoid yang pertama diduga merupakan kurva aktivitas enzim selulase ekstraseluler sedangkan kurva sigmoid yang kedua diduga merupakan kurva aktivitas enzim selulase intraseluler. Selulase ekstraseluler diproduksi seiring dengan pertumbuhan sel karena bakteri menggunakan enzim ini untuk memecah selulosa di dalam media, sementara itu selulase intraseluler dihasilkan oleh bakteri karena lisis sel pada fase kematian.

Tabel 2 Data aktivitas selulase yang dihasilkan pada jam ke-48 pada berbagai pH media

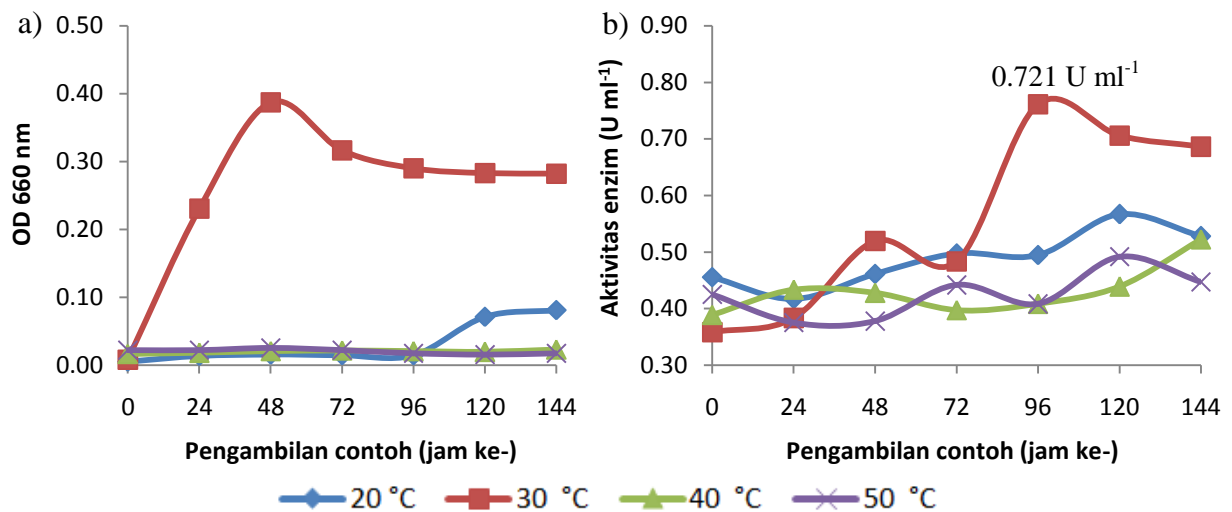
| pH media | Aktivitas selulase (U ml ⁻¹) |
|----------|--|
| 5 | 0.519 |
| 6 | 0.438 |
| 7 | 0.487 |
| 8 | 0.455 |
| 9 | 0.422 |

Meskipun aktivitas selulase pada jam ke-120 lebih tinggi, penentuan pH optimum menggunakan data aktivitas selulase pada jam ke-48 karena pada

penelitian ini aktivitas selulase yang diamati adalah ekstraseluler. Kanmani *et al.* (2011) dan Singh *et al.* (2013) juga melakukan optimasi pH media untuk produksi selulase dari bakteri laut *Bacillus* sp. dan menemukan pH media optimum berturut-turut pada jam ke-36 dan jam ke-24. Berdasarkan Tabel 2, aktivitas selulase yang dihasilkan pada jam ke-48 paling tinggi pada pH media 5, tetapi aktivitas selulase pada berbagai pH media tampaknya tidak jauh berbeda. Hasil ini didukung oleh laporan Hidayat (2005) yang menyatakan bahwa *Bacillus* sp. aktif mendegradasi CMC pada kisaran pH netral hingga asam (pH 7 hingga pH 4). Tingkat keasamaan media memengaruhi aktivitas selulase yang dihasilkan (Hidayat 2005). Seperti pada optimasi konsentrasi substrat, aktivitas selulase yang sudah tinggi pada jam ke-0 diduga disebabkan oleh adanya substrat yang terhidrolisis saat proses sterilisasi.

Optimasi Suhu Fermentasi

Selain konsentrasi substrat dan pH media, suhu juga memengaruhi produksi enzim ekstraseluler oleh bakteri, kemungkinan dengan mengubah sifat fisik membran sel (Sethi *et al.* 2013). Pengaruh berbagai suhu fermentasi pada pertumbuhan bakteri ditunjukkan pada Gambar 3a, sedangkan pengaruhnya pada aktivitas selulase ditunjukkan pada Gambar 3b. Nilai OD 660 nm dan aktivitas selulase dari masing-masing suhu fermentasi disajikan pada Lampiran 6 dan 7.



Gambar 3 Pengaruh berbagai suhu fermentasi pada: a) pertumbuhan bakteri *Bacillus cereus*; b) aktivitas selulase yang dihasilkan

Berdasarkan Gambar 3a, bakteri *Bacillus cereus* tidak dapat tumbuh dengan baik pada suhu 20, 40, dan 50 °C, bakteri hanya tumbuh dengan baik pada suhu 30 °C. Pada suhu 30 °C bakteri menunjukkan kurva pertumbuhan yang ideal, yaitu fase adaptasi pada jam ke-0, fase eksponensial pada jam ke-24 dan 48, fase stasioner pada jam ke-72, 96, dan 120, dan fase kematian pada jam ke-144. Menurut Ray *et al.* (2007) mikroorganisme akan tumbuh secara lambat pada suhu di bawah atau di atas suhu pertumbuhan normal. Berdasarkan Gambar 3b, selulase yang dihasilkan menunjukkan aktivitas paling tinggi pada suhu fermentasi 30 °C

(jam ke-96), yaitu sebesar 0.721 U ml⁻¹. Aktivitas selulase yang dihasilkan pada jam ke-96 pada berbagai suhu fermentasi disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3 Data aktivitas selulase yang dihasilkan pada jam ke-96 pada berbagai suhu fermentasi

| Suhu fermentasi (°C) | Aktivitas selulase (U ml ⁻¹) |
|-------------------------|---|
| 20 | 0.499 |
| 30 | 0.721 |
| 40 | 0.427 |
| 50 | 0.427 |

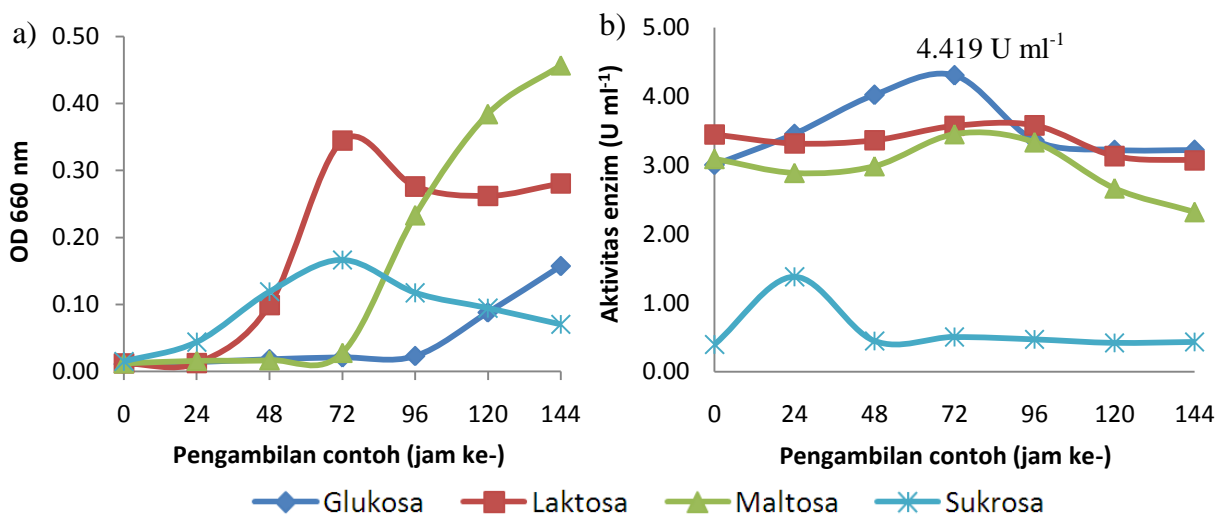
Berdasarkan Tabel 3, aktivitas selulase yang dihasilkan pada suhu fermentasi 30 °C berbeda jauh dengan aktivitas selulase yang dihasilkan pada suhu fermentasi 20 dan 40 °C. Selisih suhu 10 °C tampaknya sangat memengaruhi produksi selulase. Meskipun demikian aktivitas selulase yang dihasilkan pada suhu fermentasi 40 °C sama dengan yang dihasilkan pada suhu 50 °C, yaitu sebesar 0.427 U ml⁻¹. Suhu pertumbuhan yang terlalu tinggi diduga dapat membuat ekspresi protein target kurang sempurna sehingga aktivitas enzim yang dihasilkan rendah (Ray *et al.* 2007). Seperti pada proses optimasi sebelumnya, aktivitas selulase yang sudah tinggi pada jam ke-0 diduga disebabkan oleh adanya substrat yang terhidrolisis saat proses sterilisasi.

Aktivitas selulase optimum pada jam ke-96, yaitu pada fase stasioner, sesuai dengan hasil penelitian Baehaki *et al.* (2008) yang melaporkan bahwa enzim diproduksi seiring dengan pertumbuhan sel dan mencapai maksimum pada fase stasioner. Data aktivitas selulase yang dihasilkan sejalan dengan data pertumbuhan bakteri sehingga disimpulkan bahwa suhu optimum untuk memproduksi selulase dari bakteri laut *Bacillus cereus* adalah 30 °C. Hasil optimasi ini sesuai dengan laporan Trivedi *et al.* (2013) dan Suvorov *et al.* (2011) yang juga menggunakan bakteri laut, sementara itu Kanmani *et al.* (2011) dan Kalaiselvi *et al.* (2013) melaporkan bahwa suhu optimum untuk memproduksi selulase dari bakteri laut adalah 35 °C.

Optimasi Sumber Karbon

Faktor lain yang juga memengaruhi produksi selulase oleh bakteri adalah sumber karbon. Menurut Singh *et al.* (2013) monosakarida dan disakarida merupakan sumber karbon terbaik untuk produksi selulase dari bakteri laut. Sumber karbon yang digunakan pada penelitian ini adalah glukosa yang merupakan monosakarida, laktosa, maltosa, dan sukrosa yang merupakan disakarida. Sumber karbon yang memiliki struktur lebih sederhana dari substrat akan dikonsumsi terlebih dahulu oleh bakteri, kemudian bakteri akan memanfaatkan substrat selulosa dengan menyintesis selulase (Meryandini *et al.* 2009).

Berbeda dengan Sethi *et al.* (2013) yang menggunakan sumber karbon sebagai pengganti substrat, sumber karbon pada penelitian ini ditambahkan pada media kultur yang telah mengandung substrat. Dengan kata lain sumber karbon pada penelitian ini berfungsi sebagai nutrisi tambahan untuk bakteri sehingga diharapkan aktivitas selulase yang dihasilkan meningkat. Pengaruh berbagai sumber karbon pada pertumbuhan bakteri ditunjukkan pada Gambar 4a, sedangkan pengaruhnya pada aktivitas selulase yang dihasilkan ditunjukkan pada Gambar 4b. Nilai OD 660 nm dan aktivitas selulase pada berbagai sumber karbon disajikan pada Lampiran 8 dan 9.



Gambar 4 Pengaruh berbagai sumber karbon pada: a) pertumbuhan bakteri *Bacillus cereus*; b) aktivitas selulase yang dihasilkan

Berdasarkan Gambar 4a, bakteri *Bacillus cereus* tidak dapat tumbuh dengan baik dalam media yang mengandung sumber karbon glukosa dan maltosa, tetapi justru tumbuh dengan baik pada media dengan sumber karbon laktosa dan sukrosa. Padahal aktivitas selulase paling tinggi dihasilkan saat sumber karbon yang digunakan adalah glukosa, dengan aktivitas sebesar 4.419 U ml⁻¹ (pada jam ke-72), disusul dengan laktosa dan maltosa. Sementara itu saat sukrosa digunakan sebagai sumber karbon aktivitas selulase yang dihasilkan rendah (Gambar 4b). Ketidaksesuaian data antara pertumbuhan bakteri dan aktivitas enzim ini juga dilaporkan oleh Abou-Taleb *et al.* (2009) dan Hidayat (2005). Keduanya melaporkan bahwa perubahan jumlah biomassa berdasarkan nilai OD tidak selalu sebanding dengan perubahan aktivitas enzim. Aktivitas selulase yang sudah tinggi pada jam ke-0 diduga selain disebabkan oleh adanya substrat yang telah terhidrolisis saat proses sterilisasi, juga disebabkan oleh belum adanya selulase di dalam contoh, sehingga saat uji aktivitas gula pereduksi yang terdeteksi tinggi.

Glukosa sebagai sumber karbon optimum diduga karena merupakan sumber karbon yang paling sederhana yang digunakan pada penelitian ini (berupa monosakarida). Berdasarkan data yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa sumber karbon optimum untuk memproduksi selulase dari bakteri laut *Bacillus cereus* adalah glukosa. Hasil penelitian ini sesuai dengan laporan Sethi *et al.* (2013) yang menemukan bahwa glukosa merupakan sumber karbon optimum untuk memproduksi selulase, tetapi bakteri *Bacillus* sp. yang digunakan berasal dari darat. Sementara itu Singh *et al.* (2013) yang menggunakan *Bacillus* sp. yang

berasal dari laut menemukan sumber karbon optimum berupa xilosa. Kalaiselvi *et al.* (2013) yang juga menggunakan bakteri laut melaporkan bahwa sumber karbon optimum untuk memproduksi selulase adalah selulosa. Perbedaan hasil ini kemungkinan disebabkan oleh perbedaan jenis bakteri yang digunakan. Manfaat yang diharapkan dari optimasi produksi selulase pada penelitian ini adalah peningkatan aktivitas selulase yang dihasilkan. Perubahan aktivitas selulase setelah proses optimasi disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4 Data perubahan aktivitas selulase setelah proses optimasi

| Parameter yang dioptimasi | Kondisi optimum | Aktivitas selulase (U ml ⁻¹) |
|------------------------------|-----------------|--|
| Konsentrasi substrat (% b/v) | 2.0 | 0.658 |
| pH media | 5 | 0.519 |
| Suhu fermentasi (°C) | 30 | 0.721 |
| Sumber karbon | Glukosa | 4.419 |

Meskipun setelah optimasi pH aktivitas selulase menurun, setelah optimasi suhu fermentasi aktivitasnya meningkat dan menjadi 7 kali lebih besar setelah optimasi sumber karbon, dengan aktivitas sebesar 4.419 U ml⁻¹ (Tabel 4). Peningkatan aktivitas enzim yang signifikan ini diduga karena *Bacillus cereus* yang digunakan pada penelitian ini membutuhkan nutrisi tambahan berupa sumber karbon sederhana (glukosa) dalam media tumbuhnya. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa optimasi produksi selulase yang dilakukan pada penelitian ini telah berhasil meningkatkan aktivitas selulase yang dihasilkan oleh bakteri laut *Bacillus cereus*.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Berdasarkan penelitian dapat disimpulkan bahwa kondisi optimum untuk memproduksi selulase dari bakteri laut *Bacillus cereus* adalah konsentrasi substrat 2.0%, pH media 5, suhu fermentasi 30 °C, dan sumber karbon glukosa. Perubahan nilai OD 660 nm tidak selalu sejalan dengan perubahan aktivitas enzim. Meskipun setelah optimasi pH aktivitas selulase menurun, setelah optimasi suhu fermentasi aktivitasnya meningkat, dan menjadi 7 kali lebih besar setelah optimasi sumber karbon, dengan aktivitas sebesar 4.419 U ml⁻¹ pada jam ke-72. Proses optimasi pada penelitian ini telah berhasil meningkatkan aktivitas enzim selulase yang dihasilkan oleh bakteri laut *Bacillus cereus*.

Saran

Metode pengamatan pertumbuhan sel menggunakan spektrofotometer pada penelitian ini memiliki kekurangan, yaitu tidak dapat membedakan antara sel bakteri yang hidup dan mati, oleh karena itu penulis menyarankan pengamatan pertumbuhan sel menggunakan metode hitungan cawan sehingga dapat diperoleh jumlah sel bakteri yang hidup dan data yang lebih valid untuk dihubungkan dengan data aktivitas enzimnya. Uji aktivitas selulase kasar sebaiknya dilakukan segera setelah proses pemanenan karena memiliki stabilitas yang rendah.

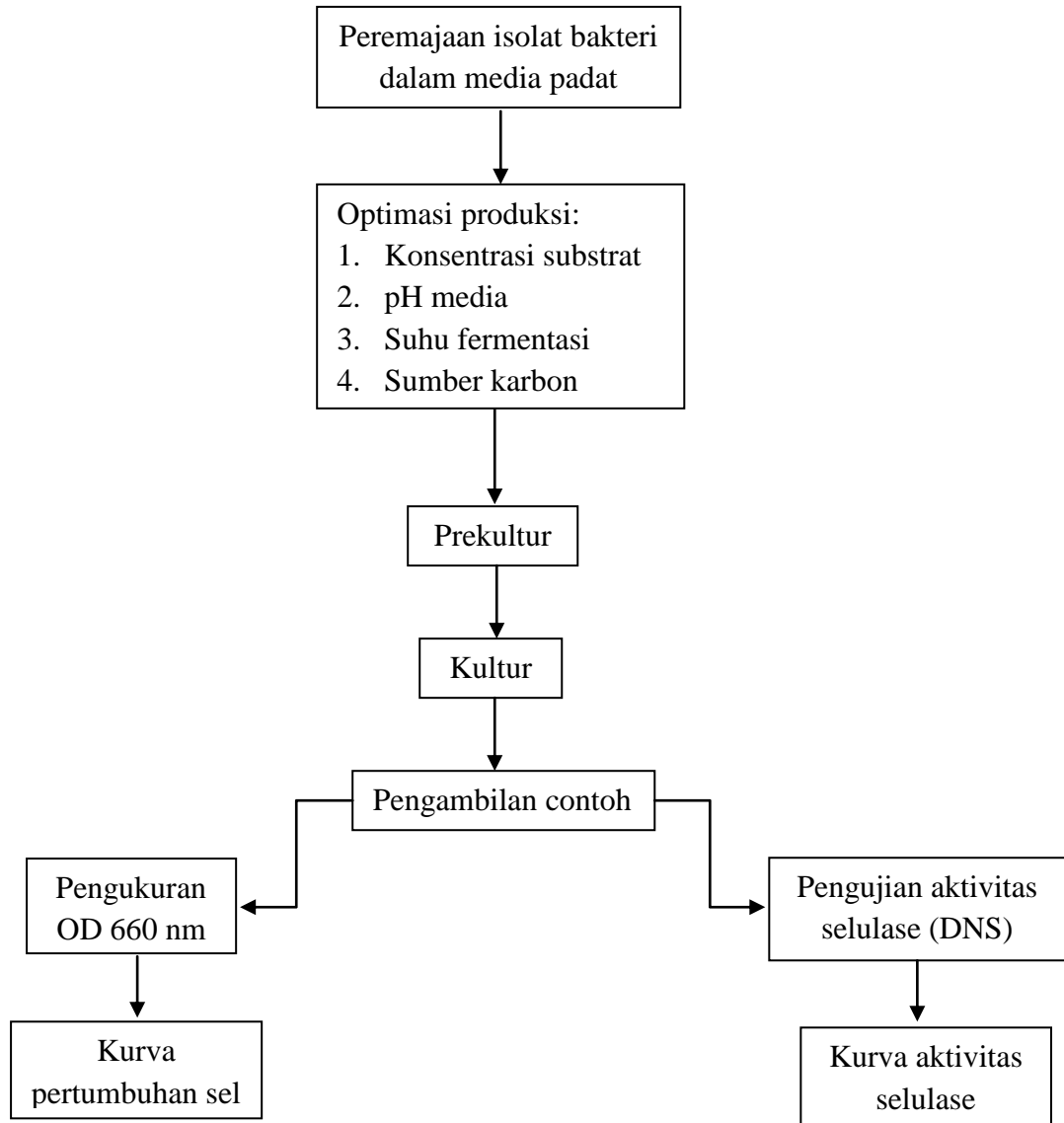
DAFTAR PUSTAKA

- Abou-Taleb KAA, Mashhoor WA, Nasr SA, Sharaf MS, Abdel-Azeem HHM. 2009. Nutritional and environmental factors affecting cellulase production by two strains of cellulolytic bacilli. *AJBAS*. 3(3):2429-2436.
- Acharya S, Chaudhary A. 2012. Optimization of fermentation conditions for cellulases production by *Bacillus licheniformis* MVS1 and *Bacillus* sp. MVS3 isolated from Indian hot spring. *Braz Arch Biol Technol*. 55(4):497-503.
- Anindyawati T. 2009. Prospek enzim dan limbah lignoselulosa untuk produksi bioetanol. *BS*. 44(1):49-56.
- Baehaki A, Suhartono MT, Palupi NS, Nurhayati T. 2008. Purifikasi dan karakterisasi protease dari bakteri patogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J Teknol Indust Pangan*. 19(1):80-87.
- Hatmanti A. 2000. Pengenalan *Bacillus* spp. *Oseana*. 25(1):31-41.
- Hidayat I. 2005. Pengaruh pH terhadap aktivitas *endo-1,4-β-glucanase Bacillus* sp. AR 009. *Biodiversitas*. 6(4):242-244.
- Kalaiselvi V, Jayalakshmi S, Narayanan RL. 2013. Biofuel production using marine microbes. *Int J Curr Microbiol App Sci*. 2(5):67-74.
- Kanmani R, Vijayabaskar P, Jayalakshmi S. 2011. Sacharification of banana-agro waste and clarification of apple juice by cellulase enzyme produced from *Bacillus pumilis*. *World Appl Sci J*. 12(11):2120-2128.
- Meryandini A, Widosari W, Maranatha B, Sunarti TC, Rachmania N, Satria H. 2009. Isolasi bakteri selulolitik dan karakterisasi enzimnya. *Makara Sains*. 13(1):33-38.
- Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem*. 31(3):426-428.
- Ray AK, Bairagi A, Ghosh KS, Sen SK. 2007. Optimization of fermentation conditions for cellulase production by *Bacillus subtilis* CY5 and *Bacillus circulans* TP3 isolated from fish gut. *Acta Ichthyol Piscat*. 37(1):47-53.
- Sadhu S, Maiti TK. 2013. Cellulase production by bacteria: a review. *British Microbiol Res J*. 3(3):235-258.
- Sethi S, Datta A, Gupta BL, Gupta S. 2013. Optimization of cellulase production from bacteria isolated from soil. *ISRN Biotechnol*. 2013:1-7. doi:10.5402/2013/985685.

- Singh K, Richa K, Bose H, Karthik L, Kumar G, Bhaskara Rao KV. 2013. Statistical media optimization and cellulase production from marine *Bacillus* VITRKHB. *3 Biotech*. DOI 10.1007/s13205-013-0173-x.
- Susanti E. 2011. Optimasi produksi dan karakterisasi sistem selulase dari *Bacillus circulans* strain lokal dengan inducer avicel. *J Ilmu Dasar*. 12(1):40-49.
- Suvorov M, Kumar R, Zhang H, Hutcheson S. 2011. Novelty of the cellulolytic system of a marine bacterium applicable to cellulosic sugar production. *Biofuels*. 2(1):1-12.
- Trivedi N, Gupta V, Reddy CRK, Jha B. 2013. Detection of ionic liquid stable cellulase produced by the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. isolated from brown alga *Sargassum polycystum* C. Agardh. *Bioresource Technol*. 132(2013):313-319.doi:10.1016/j.biortech.2013.01.04.
- Zhang C, Kim S. 2010. Research and application of marine microbial enzymes: status and prospects. *Mar Drugs*. 2010(8):1920-1934.doi:10.3390/md8061920.

LAMPIRAN

Lampiran 1 Bagan alir penelitian



Lampiran 2 Data OD 660 nm contoh pada berbagai konsentrasi CMC

| Konsentrasi CMC (%) | Pengambilan contoh (jam ke-) | Absorbans | | |
|---------------------|------------------------------|-----------|-----------|--------|
| | | Ulangan 1 | Ulangan 2 | Rerata |
| 0.5 | 0 | 0.016 | 0.024 | 0.020 |
| | 24 | 0.585 | 0.303 | 0.444 |
| | 48 | 0.420 | 0.222 | 0.321 |
| | 72 | 0.431 | 0.266 | 0.348 |
| | 96 | 0.479 | 0.248 | 0.363 |
| | 120 | 0.366 | 0.253 | 0.309 |
| | 144 | 0.342 | 0.263 | 0.302 |
| 1.0 | 0 | 0.024 | 0.018 | 0.021 |
| | 24 | 0.436 | 0.512 | 0.474 |
| | 48 | 0.525 | 0.389 | 0.457 |
| | 72 | 0.490 | 0.420 | 0.455 |
| | 96 | 0.440 | 0.344 | 0.392 |
| | 120 | 0.432 | 0.282 | 0.357 |
| | 144 | 0.378 | 0.391 | 0.384 |
| 1.5 | 0 | 0.016 | 0.022 | 0.019 |
| | 24 | 0.555 | 0.545 | 0.550 |
| | 48 | 0.360 | 0.384 | 0.372 |
| | 72 | 0.373 | 0.389 | 0.381 |
| | 96 | 0.365 | 0.395 | 0.380 |
| | 120 | 0.296 | 0.300 | 0.298 |
| | 144 | 0.252 | 0.294 | 0.273 |
| 2.0 | 0 | 0.017 | 0.017 | 0.017 |
| | 24 | 0.539 | 0.519 | 0.529 |
| | 48 | 0.432 | 0.383 | 0.407 |
| | 72 | 0.413 | 0.387 | 0.400 |
| | 96 | 0.318 | 0.364 | 0.341 |
| | 120 | 0.307 | 0.387 | 0.347 |
| | 144 | 0.300 | 0.324 | 0.312 |
| 2.5 | 0 | 0.037 | 0.022 | 0.030 |
| | 24 | 0.386 | 0.575 | 0.481 |
| | 48 | 0.386 | 0.396 | 0.391 |
| | 72 | 0.362 | 0.393 | 0.378 |
| | 96 | 0.300 | 0.378 | 0.339 |
| | 120 | 0.342 | 0.362 | 0.352 |
| | 144 | 0.346 | 0.382 | 0.364 |

Lampiran 3 Data aktivitas selulase pada berbagai konsentrasi CMC

| Konsentrasi CMC (%) | Pengambilan contoh (jam ke-) | Aktivitas selulase (U ml ⁻¹) | | |
|---------------------|------------------------------|--|-----------|--------|
| | | Ulangan 1 | Ulangan 2 | Rerata |
| 0.5 | 0 | 0.500 | 0.466 | 0.483 |
| | 24 | 0.500 | 0.483 | 0.491 |
| | 48 | 0.543 | 0.534 | 0.538 |
| | 72 | 0.560 | 0.551 | 0.556 |
| | 96 | 0.517 | 0.500 | 0.509 |
| | 120 | 0.500 | 0.500 | 0.500 |
| | 144 | 0.491 | 0.500 | 0.496 |
| 1.0 | 0 | 0.654 | 0.577 | 0.615 |
| | 24 | 0.466 | 0.645 | 0.556 |
| | 48 | 0.449 | 0.654 | 0.551 |
| | 72 | 0.449 | 0.748 | 0.598 |
| | 96 | 0.483 | 0.697 | 0.590 |
| | 120 | 0.474 | 0.722 | 0.598 |
| | 144 | 0.449 | 0.791 | 0.620 |
| 1.5 | 0 | 0.397 | 0.534 | 0.466 |
| | 24 | 0.474 | 0.526 | 0.500 |
| | 48 | 0.397 | 0.483 | 0.440 |
| | 72 | 0.432 | 0.355 | 0.393 |
| | 96 | 0.380 | 0.491 | 0.436 |
| | 120 | 0.440 | 0.526 | 0.483 |
| | 144 | 0.423 | 0.526 | 0.474 |
| 2.0 | 0 | 0.466 | 0.500 | 0.483 |
| | 24 | 0.551 | 0.611 | 0.581 |
| | 48 | 0.594 | 0.483 | 0.538 |
| | 72 | 0.594 | 0.517 | 0.556 |
| | 96 | 0.679 | 0.637 | 0.658 |
| | 120 | 0.560 | 0.603 | 0.581 |
| | 144 | 0.577 | 0.466 | 0.521 |
| 2.5 | 0 | 0.603 | 0.440 | 0.521 |
| | 24 | 0.568 | 0.457 | 0.513 |
| | 48 | 0.611 | 0.517 | 0.564 |
| | 72 | 0.645 | 0.457 | 0.551 |
| | 96 | 0.611 | 0.551 | 0.581 |
| | 120 | 0.577 | 0.637 | 0.607 |
| | 144 | 0.585 | 0.526 | 0.556 |

Lampiran 4 Data OD 660 nm contoh pada berbagai pH media

| pH | Pengambilan contoh (jam ke-) | Absorbans | | |
|----|------------------------------|-----------|-----------|--------|
| | | Ulangan 1 | Ulangan 2 | Rerata |
| 5 | 0 | 0.008 | 0.008 | 0.008 |
| | 24 | 0.198 | 0.263 | 0.230 |
| | 48 | 0.314 | 0.460 | 0.387 |
| | 72 | 0.375 | 0.258 | 0.316 |
| | 96 | 0.238 | 0.342 | 0.290 |
| | 120 | 0.213 | 0.353 | 0.283 |
| | 144 | 0.230 | 0.334 | 0.282 |
| 6 | 0 | 0.009 | 0.010 | 0.009 |
| | 24 | 0.156 | 0.165 | 0.160 |
| | 48 | 0.270 | 0.259 | 0.264 |
| | 72 | 0.247 | 0.281 | 0.264 |
| | 96 | 0.228 | 0.197 | 0.212 |
| | 120 | 0.159 | 0.265 | 0.212 |
| | 144 | 0.214 | 0.264 | 0.239 |
| 7 | 0 | 0.017 | 0.014 | 0.016 |
| | 24 | 0.180 | 0.379 | 0.280 |
| | 48 | 0.196 | 0.419 | 0.308 |
| | 72 | 0.277 | 0.354 | 0.316 |
| | 96 | 0.271 | 0.431 | 0.351 |
| | 120 | 0.251 | 0.327 | 0.289 |
| | 144 | 0.245 | 0.386 | 0.315 |
| 8 | 0 | 0.015 | 0.012 | 0.013 |
| | 24 | 0.200 | 0.169 | 0.184 |
| | 48 | 0.374 | 0.195 | 0.284 |
| | 72 | 0.300 | 0.293 | 0.296 |
| | 96 | 0.287 | 0.299 | 0.293 |
| | 120 | 0.270 | 0.281 | 0.275 |
| | 144 | 0.291 | 0.290 | 0.290 |
| 9 | 0 | 0.014 | 0.022 | 0.018 |
| | 24 | 0.294 | 0.344 | 0.319 |
| | 48 | 0.301 | 0.285 | 0.293 |
| | 72 | 0.298 | 0.231 | 0.265 |
| | 96 | 0.331 | 0.274 | 0.303 |
| | 120 | 0.304 | 0.234 | 0.269 |
| | 144 | 0.299 | 0.272 | 0.285 |

Lampiran 5 Data aktivitas selulase pada berbagai pH media

| pH | Pengambilan contoh (jam ke-) | Aktivitas selulase ($U\ ml^{-1}$) | | |
|----|------------------------------|-------------------------------------|-----------|--------|
| | | Ulangan 1 | Ulangan 2 | Rerata |
| 5 | 0 | 0.374 | 0.397 | 0.385 |
| | 24 | 0.383 | 0.429 | 0.406 |
| | 48 | 0.526 | 0.513 | 0.519 |
| | 72 | 0.452 | 0.526 | 0.489 |
| | 96 | 0.698 | 0.744 | 0.721 |
| | 120 | 0.642 | 0.707 | 0.675 |
| | 144 | 0.647 | 0.670 | 0.658 |
| 6 | 0 | 0.313 | 0.401 | 0.357 |
| | 24 | 0.388 | 0.378 | 0.383 |
| | 48 | 0.434 | 0.443 | 0.438 |
| | 72 | 0.508 | 0.360 | 0.434 |
| | 96 | 0.739 | 0.679 | 0.709 |
| | 120 | 0.749 | 0.735 | 0.742 |
| | 144 | 0.730 | 0.661 | 0.695 |
| 7 | 0 | 0.429 | 0.392 | 0.411 |
| | 24 | 0.457 | 0.522 | 0.489 |
| | 48 | 0.503 | 0.471 | 0.487 |
| | 72 | 0.434 | 0.457 | 0.445 |
| | 96 | 0.716 | 0.730 | 0.723 |
| | 120 | 0.934 | 0.823 | 0.878 |
| | 144 | 0.735 | 0.707 | 0.721 |
| 8 | 0 | 0.397 | 0.369 | 0.383 |
| | 24 | 0.429 | 0.443 | 0.436 |
| | 48 | 0.471 | 0.438 | 0.455 |
| | 72 | 0.425 | 0.457 | 0.441 |
| | 96 | 0.712 | 0.624 | 0.668 |
| | 120 | 0.818 | 0.739 | 0.779 |
| | 144 | 0.721 | 0.684 | 0.702 |
| 9 | 0 | 0.360 | 0.360 | 0.360 |
| | 24 | 0.415 | 0.438 | 0.427 |
| | 48 | 0.438 | 0.406 | 0.422 |
| | 72 | 0.406 | 0.420 | 0.413 |
| | 96 | 0.545 | 0.702 | 0.624 |
| | 120 | 0.633 | 0.749 | 0.691 |
| | 144 | 0.554 | 0.628 | 0.591 |

Lampiran 6 Data OD 660 nm contoh pada berbagai suhu fermentasi

| Suhu (°C) | Pengambilan contoh (jam ke-) | Absorbans | | |
|-----------|------------------------------------|-----------|-----------|--------|
| | | Ulangan 1 | Ulangan 2 | Rerata |
| 20 | 0 | 0.005 | 0.005 | 0.005 |
| | 24 | 0.014 | 0.013 | 0.013 |
| | 48 | 0.015 | 0.016 | 0.015 |
| | 72 | 0.016 | 0.013 | 0.014 |
| | 96 | 0.014 | 0.015 | 0.014 |
| | 120 | 0.118 | 0.024 | 0.071 |
| | 144 | 0.153 | 0.009 | 0.081 |
| 30 | 0 | 0.008 | 0.008 | 0.008 |
| | 24 | 0.198 | 0.263 | 0.230 |
| | 48 | 0.314 | 0.460 | 0.387 |
| | 72 | 0.375 | 0.258 | 0.316 |
| | 96 | 0.238 | 0.342 | 0.290 |
| | 120 | 0.213 | 0.353 | 0.283 |
| | 144 | 0.230 | 0.334 | 0.282 |
| 40 | 0 | 0.017 | 0.016 | 0.017 |
| | 24 | 0.018 | 0.018 | 0.018 |
| | 48 | 0.016 | 0.025 | 0.021 |
| | 72 | 0.021 | 0.022 | 0.021 |
| | 96 | 0.019 | 0.022 | 0.021 |
| | 120 | 0.022 | 0.017 | 0.019 |
| | 144 | 0.027 | 0.019 | 0.023 |
| 50 | 0 | 0.018 | 0.026 | 0.022 |
| | 24 | 0.023 | 0.021 | 0.022 |
| | 48 | 0.028 | 0.023 | 0.025 |
| | 72 | 0.023 | 0.021 | 0.022 |
| | 96 | 0.019 | 0.016 | 0.017 |
| | 120 | 0.014 | 0.017 | 0.015 |
| | 144 | 0.018 | 0.017 | 0.017 |

Lampiran 7 Data aktivitas selulase pada berbagai suhu fermentasi

| Suhu (°C) | Pengambilan contoh (jam ke-) | Aktivitas selulase (U ml ⁻¹) | | |
|-----------|------------------------------|--|-----------|--------|
| | | Ulangan 1 | Ulangan 2 | Rerata |
| 20 | 0 | 0.475 | 0.457 | 0.466 |
| | 24 | 0.526 | 0.341 | 0.434 |
| | 48 | 0.494 | 0.448 | 0.471 |
| | 72 | 0.499 | 0.503 | 0.501 |
| | 96 | 0.531 | 0.466 | 0.499 |
| | 120 | 0.452 | 0.665 | 0.559 |
| | 144 | 0.536 | 0.517 | 0.526 |
| 30 | 0 | 0.374 | 0.397 | 0.385 |
| | 24 | 0.383 | 0.429 | 0.406 |
| | 48 | 0.526 | 0.513 | 0.519 |
| | 72 | 0.452 | 0.526 | 0.489 |
| | 96 | 0.698 | 0.744 | 0.721 |
| | 120 | 0.642 | 0.707 | 0.675 |
| | 144 | 0.647 | 0.670 | 0.658 |
| 40 | 0 | 0.420 | 0.401 | 0.411 |
| | 24 | 0.411 | 0.485 | 0.448 |
| | 48 | 0.401 | 0.485 | 0.443 |
| | 72 | 0.406 | 0.429 | 0.418 |
| | 96 | 0.415 | 0.438 | 0.427 |
| | 120 | 0.434 | 0.471 | 0.452 |
| | 144 | 0.480 | 0.563 | 0.522 |
| 50 | 0 | 0.462 | 0.420 | 0.441 |
| | 24 | 0.406 | 0.392 | 0.399 |
| | 48 | 0.438 | 0.364 | 0.401 |
| | 72 | 0.434 | 0.475 | 0.455 |
| | 96 | 0.397 | 0.457 | 0.427 |
| | 120 | 0.452 | 0.540 | 0.496 |
| | 144 | 0.452 | 0.466 | 0.459 |

Lampiran 8 Data OD 660 nm contoh pada berbagai sumber karbon

| Sumber karbon | Pengambilan contoh (jam ke-) | Absorbans | | |
|---------------|------------------------------|-----------|-----------|--------|
| | | Ulangan 1 | Ulangan 2 | Rerata |
| Glukosa | 0 | 0.011 | 0.011 | 0.011 |
| | 24 | 0.013 | 0.015 | 0.014 |
| | 48 | 0.023 | 0.014 | 0.018 |
| | 72 | 0.029 | 0.013 | 0.021 |
| | 96 | 0.031 | 0.015 | 0.023 |
| | 120 | 0.031 | 0.145 | 0.088 |
| | 144 | 0.042 | 0.273 | 0.157 |
| Laktosa | 0 | 0.013 | 0.011 | 0.012 |
| | 24 | 0.011 | 0.014 | 0.012 |
| | 48 | 0.013 | 0.185 | 0.099 |
| | 72 | 0.355 | 0.334 | 0.344 |
| | 96 | 0.295 | 0.257 | 0.276 |
| | 120 | 0.289 | 0.235 | 0.262 |
| | 144 | 0.299 | 0.262 | 0.280 |
| Maltosa | 0 | 0.011 | 0.013 | 0.012 |
| | 24 | 0.010 | 0.022 | 0.016 |
| | 48 | 0.023 | 0.011 | 0.017 |
| | 72 | 0.037 | 0.019 | 0.028 |
| | 96 | 0.034 | 0.432 | 0.233 |
| | 120 | 0.046 | 0.722 | 0.384 |
| | 144 | 0.064 | 0.85 | 0.457 |
| Sukrosa | 0 | 0.015 | 0.015 | 0.015 |
| | 24 | 0.079 | 0.009 | 0.044 |
| | 48 | 0.013 | 0.225 | 0.119 |
| | 72 | 0.011 | 0.322 | 0.167 |
| | 96 | 0.012 | 0.223 | 0.117 |
| | 120 | 0.018 | 0.171 | 0.094 |
| | 144 | 0.015 | 0.126 | 0.070 |

Lampiran 9 Data aktivitas selulase pada berbagai sumber karbon

| Sumber karbon | Pengambilan contoh (jam ke-) | Aktivitas selulase ($U\ ml^{-1}$) | | |
|---------------|------------------------------|-------------------------------------|-----------|--------|
| | | Ulangan 1 | Ulangan 2 | Rerata |
| Glukosa | 0 | 3.117 | 3.122 | 3.119 |
| | 24 | 3.694 | 3.450 | 3.572 |
| | 48 | 3.828 | 4.444 | 4.136 |
| | 72 | 3.972 | 4.867 | 4.419 |
| | 96 | 3.539 | 3.417 | 3.478 |
| | 120 | 3.450 | 3.228 | 3.339 |
| | 144 | 3.889 | 2.783 | 3.336 |
| Laktosa | 0 | 3.306 | 3.817 | 3.561 |
| | 24 | 3.489 | 3.372 | 3.431 |
| | 48 | 3.706 | 3.250 | 3.478 |
| | 72 | 3.639 | 3.733 | 3.686 |
| | 96 | 3.589 | 3.800 | 3.694 |
| | 120 | 3.100 | 3.394 | 3.247 |
| | 144 | 3.333 | 3.039 | 3.186 |
| Maltosa | 0 | 2.944 | 3.467 | 3.206 |
| | 24 | 3.122 | 2.883 | 3.003 |
| | 48 | 3.183 | 3.022 | 3.103 |
| | 72 | 3.483 | 3.650 | 3.567 |
| | 96 | 3.461 | 3.433 | 3.447 |
| | 120 | 3.200 | 2.356 | 2.778 |
| | 144 | 3.144 | 1.722 | 2.433 |
| Sukrosa | 0 | 0.517 | 0.506 | 0.511 |
| | 24 | 1.478 | 1.511 | 1.494 |
| | 48 | 0.561 | 0.561 | 0.561 |
| | 72 | 0.700 | 0.539 | 0.619 |
| | 96 | 0.672 | 0.500 | 0.586 |
| | 120 | 0.600 | 0.467 | 0.533 |
| | 144 | 0.622 | 0.472 | 0.547 |

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Malang pada tanggal 02 April 1992 dari pasangan Eko Sulistyono dan Siti Fatimah. Penulis adalah anak pertama dari tiga bersaudara. Tahun 2010 penulis lulus dari Sekolah Menengah Atas Negeri (SMAN) 1 Genteng, Banyuwangi dan melanjutkan studi di Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor melalui jalur Undangan Seleksi Masuk IPB (USMI).

Selama mengikuti perkuliahan, penulis menjadi asisten praktikum Kimia B (2011-2013) dan asisten praktikum Kimia Dasar II (2013). Penulis pernah aktif sebagai bendahara Departemen Kewirausahaan Badan Eksekutif Mahasiswa Tingkat Persiapan Bersama (BEM TPB) tahun 2010 hingga 2011, staf Departemen Eksternal Ikatan Mahasiswa Kimia (Imasika) tahun 2011 hingga 2012, dan panitia beberapa kegiatan kemahasiswaan. Penulis berkesempatan melaksanakan Praktik Lapangan di Pusat Penelitian dan Pengembangan Keteknikan Kehutanan dan Pengolahan Hasil Hutan pada bulan Juli hingga Agustus 2013. Penulis juga aktif dalam Program Kreativitas Mahasiswa sebagai anggota kelompok PKM-KC dengan judul “INDOLIBERTi” Pipa Mini Pengurang Bahan pencemar dalam Limbah Domestik Cair, didanai DIKTI tahun 2013.