



OPTIMASI PRODUKSI AMILASE MENGGUNAKAN BAKTERI MESOFILIK ISOLAT LOKAL MII₁₀

Ole1

ANDIN SETYAWAN

F 31.062



1999

JURUSAN TEKNOLOGI INDUSTRI PERTANIAN

FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN

INSTITUT PERTANIAN BOGOR

BOGOR





Andin Setyawan. F 31.0626. Optimasi Produksi Amilase Menggunakan Bakteri Mesofilik Isolat Lokal MII₁₀. Di bawah bimbingan Liesbetini Hartoto dan Nur Richana. 1999.

RINGKASAN

Amilase adalah enzim yang mampu menghidrolisis ikatan α -1,4 glikosidik pada pati. Enzim ini sering disebut enzim amilolitik karena kemampuannya menghidrolisis dua komponen utama pati yaitu amilosa dan amilopektin. Amilosa merupakan polimer linier sekitar 1 000 unit D-glukosa dengan ikatan α -1,4 glikosidik dan beberapa percabangan ikatan α -1,6. Amilopektin merupakan polimer yang sama dengan ikatan didominasi oleh percabangan α -1,6 glikosidik (Prave *et. al.*, 1987). Kebutuhan amilase untuk industri dalam negeri masih harus diimpor. Tahun 1996 jumlah impor enzim sebesar 2 490 396 kg yang senilai dengan 12 181 608 dolar AS (Biro Pusat Statistik, 1997). Penggunaan enzim ini terutama didominasi oleh kelompok industri pangan dan tekstil serta sedikit industri obat-obatan.

Mengingat ketergantungan dari impor tersebut, maka perlu diupayakan pengembangan industri enzim dalam negeri. Indonesia memiliki keragaman hayati yang sangat kaya dan penghasil bahan-bahan berpati yang sangat besar. Bahan-bahan tersebut sangat berpotensi apabila dimanfaatkan sebagai substrat mikroba penghasil enzim terutama amilase.

Dalam penelitian ini dilakukan pemanfaatan bahan berpati yaitu pati tapioka sebagai pemerkaya media untuk memproduksi amilase, penentuan kondisi kultivasi (agitasi, aerasi dan lama kultivasi) yang optimal dalam memproduksi amilase dengan menggunakan bakteri mesofilik isolat lokal MII₁₀ (*Bacillus licheniformis*), serta penentuan parameter kinetika kultivasi dan reologi cairan kultivasi sebagai dasar penggandaan skala produksinya.

Optimasi pemerkayaan media dengan pati berkadar 1%, 2%, 3% dan 4% dilakukan dengan menggunakan labu Erlenmeyer 250 ml (volume kerja 100 ml). Kondisi proses dilakukan pada pH 6.5, suhu 30 °C, kecepatan putar *orbital shaker* 140



rpm dan kultivasi selama 48 jam. Isolat MII₁₀ diinokulasikan secara aseptis sebanyak 10 % dari volume kerja. Analisa yang dilakukan meliputi aktivitas enzim, kadar protein terlarut total dan viskositas cairan kultivasi.

Hasil penelitian menunjukkan aktivitas enzim yang diperoleh pada keempat jenis media relatif tidak berbeda jauh, yaitu berturut-turut 992.727 U/ml, 1029.270 U/ml, 1133.344 U/ml dan 1182.837 U/ml. Satu unit aktivitas amilase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat menghasilkan 1mmol gula reduksi (standar maltose) per menit. Hasil yang hampir sama juga diperoleh pada kadar protein terlarut total keempat media, yaitu berturut-turut sebesar 0.340 g/l, 0.341 g/l, 0.349 g/l dan 0.355 g/l. Sedangkan viskositas cairan kultivasi pada keempat media berbeda cukup jauh yaitu 16.5 cP, 150 cP, 698 cP dan 1900 cP. Berdasarkan pertimbangan ekonomis dan teknis, media berkadar pati 1 persen dipilih untuk penelitian selanjutnya.

Optimasi kecepatan agitasi dan laju aerasi dilakukan dengan menggunakan bioreaktor Biostat-B volume 2 liter dengan kondisi lingkungan terkontrol. Perlakuan kecepatan agitasi adalah 100, 150 dan 200 rpm, sedangkan laju aerasi 0.4 dan 0.8 vvm. Kombinasi perlakuan terbaik dicapai pada kecepatan agitasi 200 rpm dan laju aerasi 0.8 vvm. Kerapatan optik tertinggi didapatkan pada absorbansi sebesar 1.718, bobot biomassa kering tertinggi sebesar 1.75 g/l, laju pertumbuhan spesifik maksimum (μ_{maks}) sebesar 0.0793/jam, aktivitas enzim tertinggi sebesar 740.083 U/ml dan kadar protein terlarut total tertinggi sebesar 0.48 g/l. Pemilihan kombinasi perlakuan terbaik lebih ditekankan kepada aktivitas enzim dan kadar protein terlarut total karena produk yang diinginkan adalah enzim.

Media berkadar pati 1 persen dengan kondisi operasi optimum (kecepatan agitasi 200 rpm dan laju aerasi 0.8 vvm) digunakan untuk penentuan parameter kinetika kultivasi. Hasil yang diperoleh menunjukkan hubungan positif antara kadar protein terlarut total (enzim) dengan kerapatan optik. Hasil tersebut menunjukkan bahwa produk merupakan metabolit primer dari sel. Hubungan aktivitas enzim dengan kadar protein terlarut total juga positif. Hasil tersebut memperkuat kesimpulan bahwa enzim yang aktif adalah α -amilase. Fase eksponensial berjalan dari jam ke-6 sampai jam ke-26. Nilai X_{maks} (biomassa maksimum) diperoleh sebesar 1.75 g/l, laju pertumbuhan spesifik



maksimum (μ_{maks}) sebesar 0.1059/jam, $Y_{P/S}$ (rendemen produk yang dihasilkan per substrat yang dikonsumsi) sebesar 0.1052 g protein/g substrat, $Y_{P/X}$ (rendemen produk yang dihasilkan per biomassa yang terbentuk) sebesar 0.4014 g protein/g biomassa, $Y_{X/S}$ (rendemen biomassa yang dihasilkan per substrat yang dikonsumsi) sebesar 0.2682 g biomassa/g substrat, α (faktor konversi produk dari biomassa yang berasosiasi dengan pertumbuhan) diperoleh sebesar 0.4014.

Reologi cairan kultivasi ditentukan dengan *Brookfield Viscometer* pada kecepatan putar 6, 12, 30 dan 60 rpm menggunakan *spindle* nomor 2. Sifat cairan kultivasi mengikuti sifat cairan bukan-Newtonian. Viskositas menurun dengan peningkatan laju geser (γ), laju geser meningkat dengan peningkatan tegangan geser (τ). Tetapan K (indeks konsistensi) diperoleh sebesar $0.242 \text{ (g cm}^{-1} \text{ det}^{n+2}\text{)}$ dan nilai n (indeks perilaku cairan) sebesar 0.145. Berdasarkan n dan K tersebut, maka cairan pada awal kultivasi termasuk pseudoplastis. Perhitungan bilangan Reynolds (NRe) memberikan nilai $11\ 311.304 \approx 11\ 300$, artinya aliran cairan kultivasi dalam bioreaktor bersifat turbulen (NRe>10 000). Konsumsi tenaga yang dibutuhkan untuk menggerakkan impeler sebesar $1.974 \times 10^4 \text{ HP}$.



OPTIMASI PRODUKSI AMILASE MENGGUNAKAN BAKTERI MESOFILIK ISOLAT LOKAL MII₁₀

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk mendapatkan gelar Sarjana
pada Jurusan Teknologi Industri Pertanian
Fakultas Teknologi Pertanian
Institut Pertanian Bogor

Oleh

ANDIN SETYAWAN

F 31.0626

1999

JURUSAN TEKNOLOGI INDUSTRI PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR



FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
INSTITUT PERTANIAN BOGOR

OPTIMASI PRODUKSI AMILASE MENGGUNAKAN
BAKTERI MESOFILIK ISOLAT LOKAL MII₁₀

SKRIPSI

Sebagai Salah Satu Syarat

untuk Memperoleh Gelar Sarjana Teknologi Pertanian
pada Jurusan Teknologi Industri Pertanian

Fakultas Teknologi Pertanian

Institut Pertanian Bogor

Oleh

ANDIN SETYAWAN

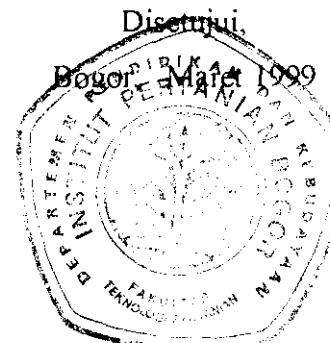
F 31.0626

Dilahirkan pada tanggal 26 September 1975

Di Batang, Jawa Tengah

Tanggal Lulus : 12 Maret 1999


Ir. Nur Richana, MSi.
Dosen Pembimbing II




Ir. Liesbetini Hartoto, MS.
Dosen Pembimbing I



KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT, karena hanya dengan rahmat dan hidayah-Nya penulis berhasil menyelesaikan skripsi yang berjudul "**Optimasi Produksi Amilase Menggunakan Bakteri Mesofilik Isolat Lokal MII₁₀**". Skripsi ini disusun berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan selama sembilan bulan, sejak April 1998 sampai bulan Desember 1998 dan tinjauan dari berbagai pustaka.

Penelitian dilakukan di laboratorium Biokimia dan Enzimatik serta laboratorium DNA Rekombinan, Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan dan Industri (Balitbio)-Cimanggu, Bogor. Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan studi pada jurusan Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor.

Selama melakukan penelitian sampai dengan tersusunnya skripsi ini, penulis banyak menerima bimbingan dan petunjuk serta bantuan dari berbagai pihak baik berupa bantuan moril maupun material. Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih yang sedalam-dalamnya kepada :

1. Kedua orang tua tercinta dan embah yang selalu mencurahkan perhatian, dorongan dan selalu mendoakan penulis setiap saat, tak lupa kepada adik-adikku Sakti dan Wina yang selalu menyertai dalam doa.
2. Ir. Liesbetini Hartoto, MS selaku dosen pembimbing utama yang telah memberikan bantuan dan membimbing penulis selama menyelesaikan tugas akhir.
3. Ir. Nur Richana, MSi. Selaku dosen pembimbing kedua atas segala bantuan, bimbingan dan fasilitas yang telah diberikan selama penelitian dan penulisan skripsi.



4. Dr. Ir. Erliza Noor yang telah bersedia menjadi dosen penguji.
5. Mbak Puji, Bapak Lalu, Bu Dini, Bu Pia, Bu Heti, Pak Eman, Pak Danu, Pak Asep, Mbak Ninon, Mbak Dini dan seluruh karyawan/karyawati Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan dan Industri (Balitbio)-Cimanggu-Bogor, mbak Emi dan mbak Pepi (lab. Rekayasa Bioproses PAU Biotek IPB) terima kasih atas candaannya.
6. Saudara-saudaraku seperjuangan : Gagan, Wiwid, mbak Rina, Edwin, Nurlela, Sri Riza terima kasih akan bantuan dan kerjasamanya selama di “lab”.
7. Adikku Lulu yang selalu mendampingi penulis dalam suka dan duka selama melakukan penelitian dan penyusunan skripsi.
8. Saudara-saudaraku di Wisma Bu Yati : Amin dan Beni yang telah menemani menginap di Balitbio, Ochim “si BOS” yang telah menemani mengambil draft ke Balitbio, Aji, Bintoro, Yuzet, Sas, Dedi, Fitrah, Eko, Mas Mamang, semoga persaudaran ini terus dapat berlanjut.
9. Saudara-saudaraku di TIN : Zaenal, Junjun, Hendra, Titi, Ratri “Gendhuk”, Ago, Fajar dan seluruh rekan-rekan TIN 15 yang selalu kompak.

Akhirnya dengan berbagai kekurangan yang ada dan kesadaran bahwa segala kesempurnaan hanyalah milik Alloh SWT, maka segala kritik dan saran penyempurnaan sangat diharapkan. Semoga skripsi ini bermanfaat bagi semua pihak yang memerlukannya.

Bogor, Maret 1999

Penulis

**DAFTAR ISI**

	Halaman
KATA PENGANTAR	i
DAFTAR ISI.....	iii
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR.....	vii
DAFTAR LAMPIRAN.....	x
I. PENDAHULUAN	1
A. LATAR BELAKANG.....	1
B. TUJUAN.....	3
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
A. AMILASE	4
1. α -amilase	6
2. β -amilase.....	7
3. Glukoamilase	8
B. PRODUKSI AMILASE	9
1. Mikroba Penghasil Amilase.....	9
2. Media Pertumbuhan	10
a. Sumber Karbon	11
b. Koenzim.....	12
c. Garam-Garam Mineral.....	13

**DAFTAR TABEL****Halaman**

Tabel 1. Beberapa Contoh Koenzim.....	13
Tabel 2. Komposisi Media dalam Sintesis α -amilase dari <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	14
Tabel 3. Karakteristik Penggunaan Berbagai Tipe Impeler.....	28
Tabel 4. Komposisi Agar Miring untuk Penyegaran Isolat (Girindra, 1986)	35
Tabel 5. Komposisi Kimia Media Kultivasi (Larutan A)	37
Tabel 6. Perbandingan Berbagai Nilai μ pada Optimasi Laju Aerasi dan Kecepatan Agitasi MII ₁₀	56
Tabel 7. Nilai Parameter Kinetika Kultivasi MII ₁₀	71



DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 1. Skema Aktivitas Amilase terhadap Amilosa (Kulp, 1975)	5
Gambar 2. Aktivitas Amilase terhadap Amilopektin (Whitaker, 1972).....	5
Gambar 3. Kurva Pertumbuhan Bakteri (McDuffie, 1991)	18
Gambar 4. Hubungan antara Suhu dengan Pertumbuhan Spesifik Mikroba (Frobisher, 1962).....	20
Gambar 5. Skema Metode Penelitian.	34
Gambar 6. Diagram Alir Penyegaran Isolat MII ₁₀	36
Gambar 7. Diagram Alir Persiapan Inokulum.....	36
Gambar 8. Diagram Alir Persiapan Substrat.....	37
Gambar 9. Diagram Alir Penentuan Konsentrasi Pati Terbaik.	38
Gambar 10.Prosedur Kerja Optimasi Kecepatan Agitasi dan Laju Aerasi serta Penentuan Parameter Kinetika Kultivasi.	40
Gambar 11.Grafik Perbandingan Aktivitas Enzim pada Berbagai Konsentrasi Pati.	42
Gambar 12.Grafik Perbandingan Kadar Protein Terlarut Total pada Berbagai Konsentrasi Pati.....	43
Gambar 13.Grafik Perbandingan Viskositas Media di Awal Kultivasi pada Berbagai Konsentrasi Pati.....	45
Gambar 14.Kurva Pertumbuhan MII ₁₀ pada Penentuan Waktu Kultivasi.	48
Gambar 15.Kurva Kerapatan Optik MII ₁₀ pada Laju Aerasi 0,4 vvm dan Berbagai Kecepatan Agitasi.....	49
Gambar 16.Kurva Kerapatan Optik MII ₁₀ pada Laju Aerasi 0,8 vvm dan Berbagai Kecepatan Agitasi.....	51



Gambar 17.Kurva Bobot Biomassa Kering MII ₁₀ pada Laju Aerasi 0,4 vvm dan Berbagai Kecepatan Agitasi.....	53
Gambar 18.Kurva Bobot Biomassa Kering MII ₁₀ pada Laju Aerasi 0,8 vvm dan Berbagai Kecapatan Agitasi.....	54
Gambar 19.Penentuan Laju Pertumbuhan Spesifik (μ) pada Berbagai Laju Aerasi dan Kecapatan Agitasi.....	55
Gambar 20.Kurva Aktivitas Amilase pada Laju Aerasi 0,4 vvm dan Berbagai Kecepatan Agitasi.....	57
Gambar 21.Kurva Aktivitas Amilase pada Laju Aerasi 0,8 vvm dan Berbagai Kecapatan Agitasi.....	58
Gambar 22.Kurva Kadar Protein Total pada Laju Aerasi 0,4 vvm dan Berbagai Kecapatan Agitasi.....	60
Gambar 23.Kurva Kadar Protein Total pada Laju Aerasi 0,8 vvm dan Berbagai Kecapatan Agitasi.....	62
Gambar 24.Kurva Kerapatan Optik MII ₁₀ pada Penentuan Parameter Kinetika	63
Gambar 25.Kurva Bobot Biomassa Kering MII ₁₀ pada Penentuan Parameter Kinetika.....	64
Gambar 26.Kurva Penentuan Laju Pertumbuh Spesifik MII ₁₀	65
Gambar 27.Hubungan antara Kerapatan Optik dengan Bobot Biomassa Kering MII ₁₀	66
Gambar 28.Kurva Aktivitas α -amilase MII ₁₀	67
Gambar 29.Kurva Kadar Protein Terlarut Total MII ₁₀	67
Gambar 30.Kurva Penurunan Kadar Pati Sisa dalam Media Kultivasi MII ₁₀	68
Gambar 31.Kurva Hubungan antara Kerapatan Optik dengan Kadar Protein Terlarut Total MII ₁₀	69
Gambar 32.Kurva Hubungan antara Aktivitas Enzim dengan Kadar Protein Terlarut Total MII ₁₀	69





Gambar 33.Kurva Linear Penentuan Nilai $Y_{P/S}$, $Y_{X/S}$ dan $Y_{P/X}$ Kultivasi MII ₁₀	70
Gambar 34.Sifat Reologi Cairan Kultivasi MII ₁₀	72
Gambar 35.Plot Linear Penentuan Nilai n dan K Media Kultivasi MII ₁₀	74

**DAFTAR LAMPIRAN****Halaman**

Lampiran 1.	Prosedur Analisis Hasil Panen.....	81
Lampiran 2.	Prosedur Pembuatan Perekusi-Perekusi	84
Lampiran 3.	Kurva Standar Maltosa Aktivitas Enzim pada Tahap Optimasi Pemerkayaan Pati Media.....	85
Lampiran 4.	Kurva Standar BSA Kadar Protein Terlarut Total pada Tahap Optimasi Pemerkayaan Pati Media.....	86
Lampiran 5.	Data Perbandingan Berbagai Aktivitas Enzim, Kadar Protein Terlarut Total dan Viskositas Media Kultivasi pada Berbagai Konsentrasi Pati.....	87
Lampiran 6.	Rekapitulasi Data Kerapatan Optik Cairan Kultivasi pada Penentuan Lama Kultivasi.....	88
Lampiran 7.	Rekapitulasi Data Kerapatan Optik Cairan Kultivasi pada Optimasi Kecepatan Agitasi dan Laju Aerasi.....	89
Lampiran 8.	Rekapitulasi Data Bobot Biomassa Kering pada Optimasi Kecepatan Agitasi dan Laju Aerasi.....	90
Lampiran 9.	Rekapitulasi Data Aktivitas Enzim pada Optimasi Kecepatan Agitasi dan Laju Aerasi.....	91
Lampiran 10.	Rekapitulasi Data Kadar Protein Terlarut Total pada Optimasi Kecepatan Agitasi dan Laju Aerasi.....	92
Lampiran 11.	Kurva Standar Maltosa Aktivitas Enzim pada Tahap Penentuan Parameter Kinetika Kultivasi.....	93
Lampiran 12.	Kurva Standar BSA Kadar Protein Terlarut Total pada Tahap Penentuan Parameter Kinetika Kultivasi.....	94
Lampiran 13.	Kurva Standar Glukosa Kadar Substrat Sisa pada Tahap Penentuan Parameter Kinetika Kultivasi.....	95
Lampiran 14.	Rekapitulasi Data Penentuan Parameter Kinetika Kultivasi	96



Lampiran 15. Data Perhitungan Laju Pertumbuhan Spesifik Maksimum (μ_{maks}) pada Penentuan Parameter Kinetika Kultivasi	97
Lampiran 16. Data Perhitungan Nilai Rendemen ($Y_{P/S}$, $Y_{X/S}$ Dan $Y_{P/X}$) pada Penentuan Parameter Kinetika Kultivasi.....	98
Lampiran 17. Data-Data Penentuan Sifat Reologi Cairan Kultivasi	99
Lampiran 18. Data-Data Geometrik Bioreaktor Model Biostat-B Volume 2 Liter.	100
Lampiran 19. Contoh Perhitungan Penentuan Konsumsi Tenaga Impeler.....	101
Lampiran 20. Grafik Fungsi Power untuk Impeler Turbin Berbilah Enam.....	103
Lampiran 21. Isolat MII ₁₀ (<i>Bacillus licheniformis</i>) dan Zona Bening Hasil Degradasi Pati dalam Media.....	104
Lampiran 22. <i>Orbital Shaker</i> dalam Optimasi Pemerkayaan Pati Media dan Sistem Agitasi-Aerasi Bioreaktor Model Biostat-B Volume 2 Liter.....	105
Lampiran 23. Bioreaktor Model Biostat-B Volume 2 Liter dengan Kontrol Proses Otomatis	106

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang
1. Dilarang menyebarkan sebagian atau seluruh karya tanpa izin (cetak, menyalin, mentransfer, memindahkan, menyimpan, mengambil bagian, pemerasan, fotokopi, mendistribusikan, atau memperdagangkan secara elektronik atau tidak) tanpa izin.
2. Penggunaan hanya untuk keperluan belajar, penelitian, dan pengembangan akademik.
3. Penggunaan tidak wajib memberikan sumber tanpa izin.
4. Penggunaan hanya untuk keperluan belajar, penelitian, dan pengembangan akademik.



I. PENDAHULUAN

A. LATAR BELAKANG

Perkembangan industri pangan maupun non-pangan di Indonesia akhir-akhir ini berjalan dengan pesat. Berbagai hasil industri yang semula diimpor perlahan-lahan dapat dihasilkan sendiri melalui pendirian industri-industri yang semakin menjamur. Seiring dengan perkembangan berbagai industri pangan maupun nonpangan tersebut, enzim sebagai katalisator berbagai reaksi kimia menjadi produk yang cenderung meningkat permintaannya dari tahun ketahun.

Berbagai industri di Indonesia mengkonsumsi enzim sebagai agen katalisator dalam jumlah yang tidak sedikit. Konsumsi enzim bagi industri dalam negeri yang masih harus diimpor selama tahun 1996 adalah sebesar 2 490 396 kg yang senilai dengan 12 181 608 dolar AS. Dalam geografi yang lebih sempit yaitu penggunaan enzim di Bandung pada tahun 1993 saja telah mencapai angka 40 ton/bulan yang senilai dengan ± 2 800 000 dolar US (Biro Pusat Statistik, 1997). Penggunaan enzim ini terutama didominasi oleh kelompok industri pangan dan tekstil serta sedikit industri obat-obatan.

Penggunaan amilase yang begitu besar oleh industri masih tergantung impor dengan harga yang mahal. Selama tahun 1994 industri pangan seperti industri gula, sirup, permen, biskuit serta beberapa industri lain yaitu industri tekstil, asam organik, dan alkohol mencukupi kebutuhannya dengan mengimpor enzim ini dalam jumlah yang cukup besar yaitu 14 823 kg/bulan (Biro Pusat Statistik, 1995).

Dalam mengatasi permasalahan tersebut, Indonesia mempunyai dua keunggulan komparatif utama yang apabila digabungkan dan ditopang dengan penguasaan pengetahuan dan teknologi produksi enzim maka akan menjadi keunggulan kompetitif. Keunggulan pertama adalah bahwa Indonesia memiliki keragaman hayati sebagai plasma nutfah yang sangat kaya. Fenomena ini menjadikan Indonesia sebagai sumber mikroba yang sangat potensial sebagai penghasil enzim. Keunggulan yang kedua adalah Indonesia merupakan negara penghasil bahan-bahan berpati yang sangat besar. Bahan-bahan tersebut sangat berpotensi apabila dimanfaatkan sebagai substrat mikroba penghasil enzim terutama amilase. Ditambah apabila enzim yang terbentuk digunakan dalam pengolahan bahan berpati secara enzimatis, maka produk yang diperoleh akan bernilai ekonomi jauh lebih tinggi bila dibandingkan dengan cara-cara konvensional yang selama ini digunakan.

Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan dan Industri (Balitbio), Cimanggu, Bogor saat ini telah mengisolasi 56 isolat bakteri mesofil dan 37 isolat bakteri termofil dari tiga lokasi, yaitu Taman Nasional Ujung Kulon (*native soil*), kawah Dieng dan Tangkuban Perahu (*exotic soil*). Beberapa bakteri mesofil telah dikaji suhu dan pH optimumnya. Namun demikian untuk produksi enzim dalam jumlah yang besar, beberapa parameter masih harus dioptimasi seperti aerasi, agitasi dan lama kultivasi.



B. TUJUAN

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk memanfaatkan bahan berpati yaitu pati tapioka sebagai pemanjangan media untuk memproduksi amilase, mendapatkan kondisi kultivasi (agitasi, aerasi dan lama kultivasi) yang optimal dalam memproduksi amilase dengan menggunakan bakteri mesofilik isolat lokal MII₁₀, mendapatkan parameter-parameter kinetika kultivasi serta reologi cairan kultivasi dan kebutuhan tenaga pengadukan sebagai dasar penggandaan skala produksinya.

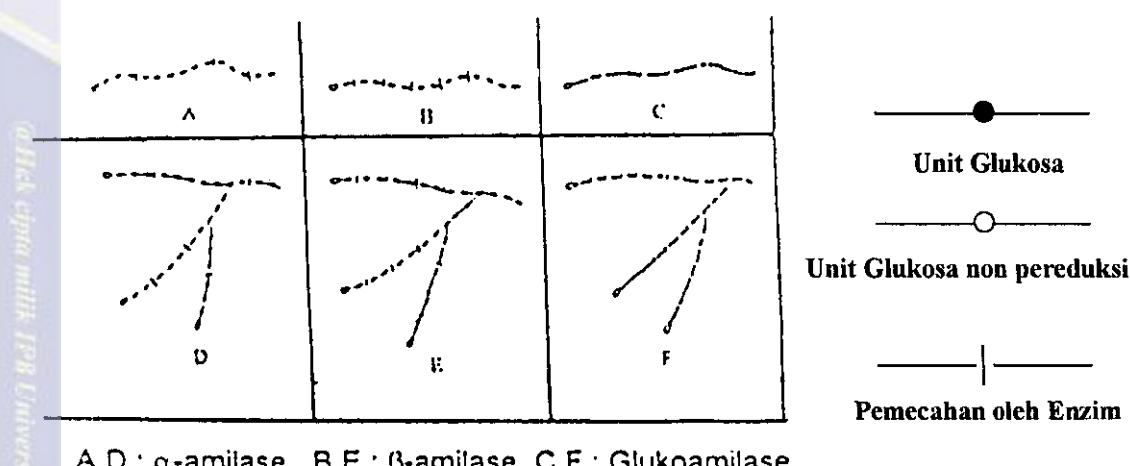


A. AMILASE

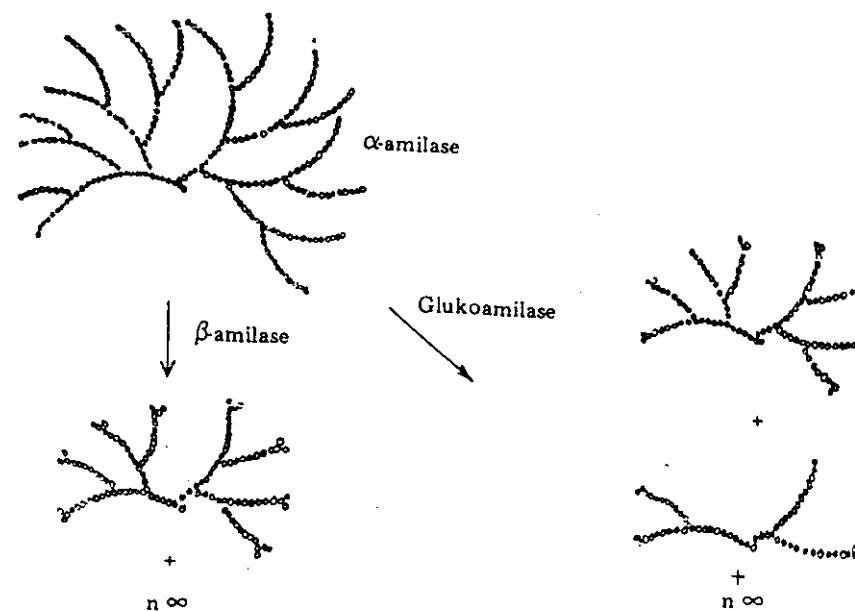
Amilase merupakan enzim ekstraseluler, yaitu enzim yang dikeluarkan ke media kultivasi karena enzim ini dapat mendegradasi senyawa polimer sehingga mudah larut dan dapat diserap melalui dinding sel. Enzim jenis ini cocok diproduksi dalam skala produksi, karena dihasilkan dalam jumlah relatif banyak serta tidak terlalu sulit metode ekstraksinya (Stanbury dan Whitaker, 1984).

Amilase mempunyai kemampuan untuk memecah molekul-molekul pati dan glikogen (Judoamidjojo *et. al.*, 1989). Molekul-molekul pati yang merupakan polimer dari α -D-glikopiranosa akan dipecah oleh enzim pada ikatan α -1,4-glikosida. Secara umum amilase dibedakan menjadi tiga berdasarkan hasil pemecahan dan letak ikatan yang dipecah. Jenis pertama adalah α -amilase yang memecah pati menjadi oligosakarida dan maltosa, yang kedua adalah β -amilase yang menghasilkan maltosa dan dekstrin dari aktivitas pemecahannya dan yang terakhir adalah glukoamilase yang menghasilkan glukosa di akhir aktivitas pemecahannya (Atlas, 1984). Mekanisme pemecahan amilase disajikan pada Gambar 1 dan Gambar 2.

II. TINJAUAN PUSTAKA



Gambar 1. Skema Aktivitas Amilase terhadap Amilosa (Kulp, 1975).



Keterangan : tiap bulatan menunjukkan satu unit glukosa.

Gambar 2. Aktivitas Amilase terhadap Amilopektin (Whitaker, 1972).

1. α -amilase

Sumber α -amilase sangat beragam mulai dari tanaman, jaringan mamalia bahkan mikroba. Enzim α -amilase dari *malt* merupakan salah satu contoh jenis enzim yang dihasilkan dari tanaman, sedangkan mamalia dapat menghasilkan enzim ini dari ludah dan pankreas. Sumber α -amilase yang paling potensial adalah mikroba yang telah banyak digunakan dalam bidang industri (Judoamidjojo *et. al.*, 1989). Enzim ini dikelompokkan menjadi dua yaitu termostabil yang tahan pada suhu tinggi dan termolabil yang bersifat labil pada suhu tinggi. Endoamilase (memecah dari dalam molekul pati) yang tahan panas biasanya berasal dari bakteri sedangkan yang tidak tahan panas berasal dari kapang (Fogarty, 1983).

Bacterial α -amylase merupakan endoenzim yang memotong ikatan α -1,4 amilosa dan amilopektin dengan cepat pada larutan pati kental yang telah mengalami gelatinasi. Proses ini juga dikenal dengan nama proses likuifikasi pati. Produk akhir yang dihasilkan dari aktivitasnya adalah oligosakarida beserta sejumlah kecil glukosa dan maltosa (Prave *et. al.*, 1987). Menurut Fogarty (1983) dan Whitaker (1972), α -amilase akan menghidrolisis ikatan α -1-4-glikosidik pada polisakarida dengan hasil degradasi secara acak di bagian tengah atau bagian dalam dari molekul. Saat ini α -amilase yang berasal dari *Bacillus licheniformis* dan *Bacillus subtilis* secara luas digunakan dalam proses hidrolisis (likuifikasi) secara komersial oleh karena ketahanannya terhadap panas hingga 90 °C bahkan ada yang mencapai 100 °C (Triwiyono, 1996).



Menurut Fogarty (1983), α -amilase stabil pada kisaran pH 5.5 – 8.0.

Aktivitas α -amilase ditentukan dengan mengukur hasil degradasi pati yang diamati dari penurunan kadar pati terlarut, kadar maltosa atau mengukur viskositas dan jumlah terbentuknya gula pereduksi pada aktivitas optimumnya secara normal yaitu pH 4.8 – 6.5.

Menurut *Commission on Enzymes of The International Union of Biochemistry*, unit enzim adalah jumlah enzim yang mengkatalisa pembentukan satu mikromol produk per menit di bawah kondisi tertentu. Enzim tidak murni dapat pula dinyatakan dalam unit per mililiter. Dapat dikatakan bahwa satu unit enzim α -amilase adalah satu mikromol α/β maltosa yang terbentuk per menit pada suhu dan pH aktivitasnya (Bernfeld, 1955).

2. β -amilase

Enzim ini memutus dari luar molekul dan menghasilkan unit-unit maltosa dari ujung nonpereduksi pada rantai polisakarida. Bila tiba pada ikatan α -1,6 glikosida seperti yang dijumpai pada amilopektin atau glikogen, aktivitas enzim ini akan terhenti. Enzim ini bekerja pada ikatan α -1,4 glikosida dengan menginversi konfigurasi posisi atom C nomor 1 molekul glukosa dari α menjadi β . Fraksi amilosa yang hanya mengandung ikatan α -1,4 glikosida dapat dihidrolisa secara lengkap oleh β -amilase serta membentuk maltosa. Pada α -amilase hal ini terjadi pula (Judoamidjojo *et. al.*, 1989).



Menurut Crueger dan Crueger (1984), β -amilase yang mempunyai nama lain α -1,4-glukan maltohidrolase atau E.C. 3.2.1.2 pada umumnya berasal dari tanaman dan mikroba. Beberapa mikroba penghasil enzim ini adalah bakteri genus *Bacillus* dan *Pseudomonas* serta kapang genus *Rhizopus* atau *Streptomyces*. Hasil utama enzim ini dalam memecah pati adalah β -maltosa dan dekstrin yang memotong ikatan α -1,4 glikosida pada ujung polimer pati nonreduktif.

Menurut Nanmori (1984), β -amilase dari berbagai genus *Bacillus* mempunyai aktivitas optimum pada nilai pH 6.5 – 7.5 dan selang suhu 45 - 50 °C.

3. Glukoamilase

Glukoamilase dikenal dengan nama lain α -1,4-glukan glukohidrolase atau EC 3.2.1.3. Enzim ini memecah ikatan polimer monosakarida pada bagian luar dan menghasilkan unit-unit β -D-glukosa dari ujung nonpereduksi rantai polimer pati (Kulp, 1975). Aktivitas enzim ini akan menurun secara drastis bila sampai pada ikatan glikosida α -1,6 glikosida seperti yang terjadi pada amilopektin atau glikogen (Judoamidjojo *et. al.*, 1989).

Berbagai jenis mikroba telah dikenal secara luas sebagai penghasil enzim ini seperti genus *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Endomycopsis*, *Saccharomyces* dan lain-lain. Secara komersial enzim ini diproduksi menggunakan *Aspergillus niger*.



Glukoamilase bekerja dengan cara menghidrolisa ikatan glikosida α -1,4, tetapi hasilnya adalah β -glukosa yang mempunyai konfigurasi berlawanan dengan hasil hidrolisa oleh α -amilase. Selain itu enzim ini dapat pula menghidrolisa ikatan glikosida α -1,6 dan α -1,3 tetapi dengan laju yang lebih lambat dibandingkan hidrolisa ikatan glikosida α -1,4 (Judoamidjojo *et. al.*, 1989).

Menurut Fogarty (1983), pH optimal mikroba penghasil amilase berkisar antara 4.5 – 5.0, sedangkan suhu optimumnya berkisar antara 40-50 °C. Pada umumnya mikroba termofil akan menghasilkan aktivitas glukoamilase yang lebih tahan terhadap panas karena adanya faktor pelindung dalam sel dan adanya protein hidrofilik yang tinggi di dalam sel, dan sebaliknya mikroba mesofil menghasilkan aktivitas glukoamilase yang kurang tahan akan panas. Menurut Rao *et. al.* (1981), sifat tahan panas glukoamilase berhubungan erat dengan struktur karbohidrat dalam enzim.

B. PRODUKSI AMILASE

1. Mikroba Penghasil Amilase

Menurut penelitian Trinovia (1997), berdasarkan hasil identifikasi bakteri, isolat-isolat bakteri mesofilik koleksi Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan dan Industri adalah bakteri batang dan termasuk gram positif. Hasil pengamatan morfologi dan fisiologi menunjukkan bahwa isolat-isolat



tersebut adalah *Bacillus*. sp. seperti *Bacillus pantothenticus*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* dan *B. coagulans*.

Galur *Bacillus* merupakan galur bakteri yang dapat menghasilkan amilase. Amilase yang tahan terhadap panas (termostabil) dapat diperoleh dari genus *Bacillus* (Judoamidjojo *et. al.*, 1989).

2. Media Pertumbuhan

Komposisi media kultivasi dapat sederhana atau kompleks tergantung jenis mikroba dan kondisi kultivasinya. Baik media sederhana maupun kompleks dapat merupakan media sintetik atau media kasar (*crude*). Media sintetik cocok untuk skala laboratorium dan industri kecil karena mempunyai beberapa keuntungan antara lain setiap komponen dapat dengan mudah dikurangi, dihilangkan atau ditambahkan, biasanya tidak membentuk buih selama proses berlangsung, dan kesalahan yang mungkin terjadi selama kultivasi akibat komposisi media yang kurang tepat dapat dicegah.

Substrat yang digunakan dalam proses kultivasi berpengaruh terhadap aktivitas dan produktivitas enzim. Adanya substrat tertentu dalam media produksi dapat memacu mikroba untuk mensekresi metabolit selnya (Boing, 1982).

Zat makanan utama bagi pertumbuhan mikroba adalah sumber karbon, nitrogen dan komponen mineral terutama fosfat (Suhartono, 1989). Formulasi media pertumbuhan dan produksi hasil kultivasi merupakan suatu tahap penting

dalam mendesain percobaan dalam berbagai skala kerja (Stanbury dan Whitaker, 1984).

a. Sumber Karbon

Beberapa contoh substrat yang baik sebagai media untuk pertumbuhan mikroba adalah molase, serealia, pati, glukosa, sukrosa, dan laktosa sebagai sumber karbon; garam amonium, urea, nitrat, *corn steep liquor*, tepung kedelai, limbah rumah potong hewan, dan sisa kultivasi sebagai sumber nitrogen (Rachman, 1989).

Sebagai salah satu sumber karbon digunakan pati, yang merupakan polimer dari monosakarida dan sumber utama energi yang terdapat pada kebanyakan makanan. Pati terdapat di berbagai bagian tanaman seperti biji (padi-padian), akar dan umbi (tapioka dan kentang) serta batang pada sagu (Kulp, 1975).

Dua komponen penting dalam struktur molekul pati adalah amilosa dan amilopektin. Amilosa mempunyai struktur lurus dengan ikatan α -1,4-glikosida, sedangkan amilopektin mempunyai ikatan α -1,4-glikosida dengan cabang yang ikatannya α -1,6-glikosida. Jumlah unit glukosa yang terdapat pada amilosa berkisar 500 – 1 000 unit sebanding dengan bobot molekul antara 80 000 – 240 000 (Haryanto dan Pangloli, 1993).

Menurut Rhem dan Reed (1981) *di dalam* Judoamidjojo *et. al.* (1989), pasokan sumber karbon merupakan faktor yang sangat berpengaruh



pada pertumbuhan optimal, tetapi pada kenyataanya konsentrasi sumber karbon mempunyai batas maksimum. Jika konsentrasi sumber karbon melampaui batas ini, maka laju pertumbuhan akan terhambat. Penghambatan timbul karena adanya perbedaan tekanan osmotik yang dapat menyebabkan plasmolisis dan terjadinya penghambatan sintesa enzim-enzim pada rantai respirasi. Dengan menggunakan karbohidrat sebagai sumber karbon, penghambatan akan dimulai pada konsentrasi di atas 50 g/l.

b. Koenzim

Mikroba membutuhkan vitamin B untuk pertumbuhannya seperti vitamin B1 (thiamin), B2 (riboflavin), B6 (piridoksin) dan vitamin B12 (kobalamin) yang diantaranya berasal dari sumber kaya vitamin B seperti ekstrak khamir (Moat, 1979). Vitamin B ini digunakan dalam proses pembentukan koenzim yang akan berikatan dengan enzim dengan ikatan yang tidak begitu kuat. Satu koenzim dapat berikatan dengan beberapa enzim pada kurun waktu yang berlainan selama pertumbuhan sel bakteri. Koenzim dapat dianggap sebagai substrat khusus karena akan diubah oleh daya kerja apoenzim (bagian protein dari enzim) secara kimia, namun kemudian akan diubah kembali pada bentuknya semula pada akhir reaksi. Fenomena ini menjadikan koenzim berperan sebagai penghubung berbagai apoenzim yang menggabungkan beberapa reaksi kimia yang berbeda.

Koenzim dapat memindahkan satu atom atau gugus dari suatu enzim ke enzim lainnya karena sifatnya tidak khusus dan dapat mengikatkan diri ke beberapa enzim. Namun demikian setiap koenzim dapat memindahkan hanya satu jenis atom atau gugus yang kecil. Berdasarkan proses demikian, maka reaksi enzimatis pembentukan produk dari substratnya tidak dapat berlangsung bila tidak ada koenzim walaupun ada apoenzimnya. Beberapa contoh koenzim dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Beberapa Contoh Koenzim.

Koenzim	Vitamin	Atom/gugus yang dipindahkan
NAD (Nikotinamid adenin dinukleotida)	Niasin	H ⁺
FAD (Flavin adenin dinukleotida)	Riboflavin (Vitamin B12)	H ⁺
Koenzim A	Asam Pantotenat	Gugus asetil
Piridoksal fosfat	Piridoksin	Gugus amino

Sumber : Lay dan Hastowo (1992)

c. Garam-Garam Mineral

Unsur-unsur mineral ditambahkan dalam bentuk garam dengan konsentrasi tepat seperti garam magnesium, fosfor, kalium, kalsium, sulfur dan klor (Stanbury dan Whitaker, 1984).

Seperti halnya sumber karbon, garam-garam mineral akan menghambat laju pertumbuhan pada konsentrasi tertentu. Bila yang digunakan garam ammonium sebagai sumber nitrogen, penghambatan





dimulai pada konsentrasi 10 g/l. Penggunaan garam nutrien dari ammonium, fosfat dan nitrat masing-masing 9 g/l, 10 g/l, 5 g/l (Wang *et. al.*, 1979).

Contoh komposisi media dalam produksi α -amilase dari *Bacillus amyloliquefaciens* disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Komposisi Media dalam Sintesis α -amilase dari *Bacillus amyloliquefaciens*.

Komponen	Jumlah (g/l)
Sumber karbon	10.0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5.0
Yeast extract	1.0
K_2HPO_4	1.0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5
Sodium sitrat	0.5
CaCl_2	0.1
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.1

Sumber : Yoo *et. al.* (1987)

3. Kultivasi

a. Kondisi Kultivasi

Secara umum kultivasi dapat diartikan sebagai proses terjadinya perubahan kimia pada suatu substrat organik melalui aktivitas enzim yang dihasilkan oleh mikroba, walaupun dalam beberapa hal dapat terjadi tanpa adanya mikroba (Machfud *et. al.*, 1989).

Kultivasi membutuhkan suatu kondisi lingkungan yang mendukung supaya prosesnya dapat berlangsung dengan baik. Faktor-faktor lingkungan fisik dan kimia perlu diatur selama proses kultivasi berlangsung.

Penggunaan bioreaktor dapat membantu tercapainya kondisi pengaturan tersebut. Oleh karena itu bioreaktor dapat diartikan sebagai alat yang dirancang untuk memberikan kondisi lingkungan terkontrol dengan baik bagi pertumbuhan mikroba yang akan menghasilkan biomassa atau produk metabolisme (Rachman, 1989). Faktor-faktor fisik yang berpengaruh antara lain suhu, tekanan, *power input* (masukan atau penggunaan tenaga), laju alir gas, level buih, laju alir cairan, viskositas dan turbiditas. Empat faktor terakhir yang disebutkan hanya terjadi dalam kultivasi media cair. Sedangkan faktor-faktor kimia yang berpengaruh adalah pH, enzim, potensial redoks, oksigen terlarut, gas lain terlarut, penggunaan gas, dan adanya ion. Faktor-faktor kimia ini terutama terjadi pada kultivasi media cair (Sikyta, 1983).

b. Kultivasi Media Cair

Kultur media cair akan lebih menguntungkan dan telah secara luas digunakan dalam produksi enzim daripada kultur media padat. Beberapa keuntungan yang dapat diperoleh melalui kultur media cair adalah komposisi dan komponen media dapat diatur dengan mudah, dapat memberikan kondisi yang optimal bagi pertumbuhan, penggunaan substrat yang efisien, aerasi dapat disesuaikan, laju pertumbuhan mikroba dapat diatur dan resiko kontaminan kecil (Blevins dan Davis, 1979).

Produksi amilase dari *Bacillus* dilakukan dalam kultur media cair pada temperatur antara 30 dan 40 °C dan nilai pH mendekati netral. Media



yang kaya dengan serealia dan pati dapat digunakan bersama-sama dengan sumber nitrogen organik. Selama kultivasi, pH haruslah berkisar 6 karena jika tidak, maka aktivitas α -amilase akan hilang akibat denaturasi. Alpha amilase dihasilkan bersamaan dengan enzim ekstraseluler lainnya. *Bacillus licheniformis* memproduksi protease serin, sedangkan *B. amyloliquefaciens* memproduksi protease netral dan juga β -glukanase serta hemiselulase. Adanya protease ini mengganggu aktivitas amilase yang dihasilkan karena kontribusinya dalam pembentukan produk samping yang berwarna (melanin) akibat reaksi antara gula pereduksi dengan asam amino. Oleh karena itu protease harus dihilangkan dengan cara adsorpsi menggunakan tanah liat atau dengan perlakuan panas saat ekstraksi amilase yang stabil terhadap panas. Amilase komersial umumnya tidak lagi mengandung protease (Prave *et. al.*, 1987).

Pada kultivasi media cair dikenal tiga metode pokok yaitu kultivasi sistem curah (*batch*), sistem sinambung (*continue*) dan sistem semi sinambung (*fed batch*). Kultivasi sistem *batch* adalah kultivasi sistem tertutup dimana inokulum ditumbuhkan dalam kondisi nutrien yang terbatas. Dalam hal ini setelah inokulasi, tidak dilakukan lagi penambahan substrat pada media steril di dalam bioreaktor, kecuali penambahan oksigen (udara steril), anti buih dan larutan asam basa untuk mengatur pH (Stanbury dan Whitaker, 1984).



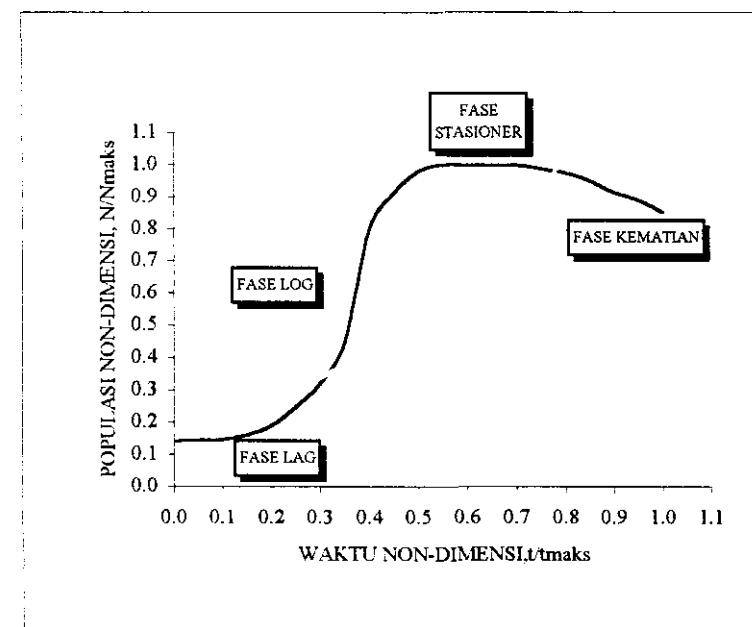
Permulaan kultivasi adalah pada saat $t = 0$ dan dihentikan pada saat $t = t_1$. Mula-mula perkembangbiakan sel-sel berlangsung dalam kondisi tanpa batas. Khususnya bagi oksigen yang dikonsumsi secara cepat, maka diperlukan pemasokan udara secara kontinyu ke dalam media agar konsentrasiya tidak menurun (Judoamidjojo *et. al.*, 1992). Dalam produksi enzim dengan kultivasi media cair, faktor-faktor yang perlu diperhatikan selain nutrien adalah suhu dan pH proses, aerasi dan agitasi (Stanbury dan Whitaker, 1984).

Laju pertumbuhan spesifik (μ) tidak konstan tergantung pada kondisi lingkungan fisik dan kimianya. Nilai μ_{maks} dicapai pada kondisi suplai nutrien dan substrat masih berlebih serta konsentrasi zat-zat metabolism yang menghambat pertumbuhan masih rendah (Judoamidjojo *et. al.*, 1989).

Berdasarkan pada laju pertumbuhan, maka pertumbuhan mikroba dapat dibagi menjadi tiga fase, yaitu fase pertumbuhan lambat (*lag phase*), fase pertumbuhan *eksponensial (exponential phase)* dan fase pertumbuhan stasioner (*stationer phase*). Gambar 3 menunjukkan laju pertumbuhan bakteri pada masing-masing fase tersebut.

Pada fase pertumbuhan lambat sel melakukan aktivitas metabolism dan fisiologik untuk mempersiapkan pembelahan sel (Moat, 1979 *di dalam* Judoamidjojo *et. al.*, 1989). Fase pertumbuhan lambat yang lama menunjukkan adanya bahan-bahan dan substrat yang berperan sebagai

penghambat, kurang inoculum atau prekultur tidak sesuai (sel mati atau inaktif). Oleh sebab itu inoculum sebaiknya dipanen pada fase eksponensial.



Gambar 3. Kurva Pertumbuhan Bakteri (McDuffie, 1991)

Fase eksponensial terjadi pada saat terdapat kelebihan semua bahan nutrien atau pengeluaran bahan-bahan pembatas (inhibitor) dengan pencampuran tidak merata atau pengendapan bahan-bahan yang tidak larut. Semua sel mempunyai kemampuan untuk berkembangbiak bila tidak terdapat penghambat pertumbuhan (Rhem dan Reed, 1981 *di dalam* Judoamidjojo *et. al.*, 1989). Laju pertumbuhan spesifik pada fase eksponensial mempunyai nilai maksimum (μ_{maks}).

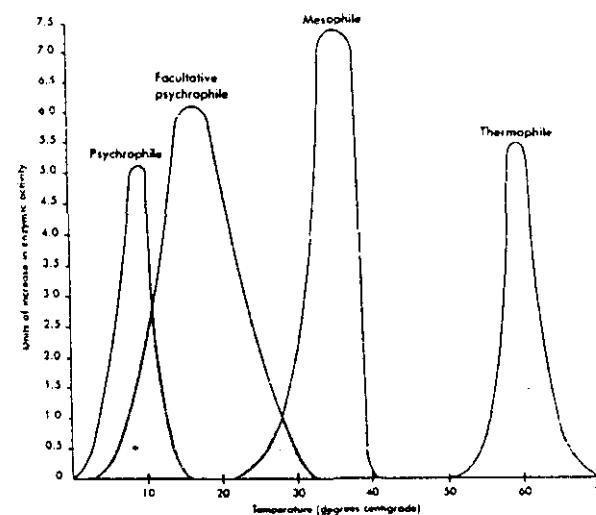
Laju pertumbuhan menurun akibat persediaan substrat berkurang dan terjadi akumulasi zat-zat metabolik yang menghambat pertumbuhan

(Rhem dan Reed, 1981 *di dalam* Judoamidjojo *et. al.*, 1989). Laju pertumbuhan akan menurun terus sampai nilainya sama dengan nol (jumlah sel yang tumbuh sama dengan jumlah sel yang mati). Selanjutnya total massa sel akan konstan, tetapi jumlah sel hidup akan berkurang dan adanya lisis akan menyebabkan penurunan massa sel (Wang *et. al.*, 1979).

c. Kondisi Suhu

Menurut Frobisher (1962), berdasarkan suhu pertumbuhan optimum dan aktivitas hidrolitik enzimnya, mikroba dapat digolongkan ke dalam empat kelompok, yaitu psikofilik, psikofilik fakultatif, mesofilik dan termofilik. Kelompok psikofilik adalah kelompok mikroba yang pertumbuhan maksimumnya terjadi pada kondisi lingkungan yang dingin yaitu pada suhu sekitar 7 °C. Galur yang mempunyai kemampuan tumbuh pada kisaran yang lebih besar pada kondisi lingkungan dingin disebut psikofil fakultatif, yang mempunyai aktivitas maksimum pada suhu sekitar 20 °C. Mesofilik adalah kelompok mikroba yang pertumbuhan optimumnya terjadi pada suhu sekitar 37 °C, namun terdapat juga mikroba kelompok ini yang mempunyai efektivitas kerja di atas 37 °C tetapi jenisnya sangat terbatas. Sedangkan termofilik adalah kelompok mikroba yang pertumbuhan optimumnya hanya terjadi pada suhu di atas 50 °C, dan terdapat pula sedikit galur yang pertumbuhan maksimumnya berada pada suhu sekitar 60 °C. Secara umum pengaruh suhu terhadap laju pertumbuhan spesifik dapat digambarkan seperti grafik pada Gambar 4.





Gambar 4. Hubungan antara Suhu dengan Pertumbuhan Spesifik Mikroba (Frobisher, 1962)

Menurut penelitian Trinovia (1997), bakteri mesofilik dengan kode MII₁₀ telah diidentifikasi sebagai *Bacillus licheniformis*. Bakteri ini dipilih karena merupakan isolat terunggul yang mampu menghasilkan amilase dengan jumlah dan stabilitas terbaik dari semua isolat bakteri mesofilik lainnya.

Kisaran suhu tidak saja mempengaruhi aktivitas enzim, namun juga mempengaruhi sifat fisik membran sel. Permeabilitas membran sel tergantung pada jenis dan jumlah lipida yang dikandungnya. Peningkatan 5 – 10 °C di atas suhu optimum dapat menyebabkan proses lisis dan kematian sel mikroba (Lay, 1994).

d. Kondisi pH

Beberapa mikroba selama kultivasi menghasilkan asam sehingga pH media turun menjadi 3.5. Namun saat metabolisme protein dan asam amino berlangsung, ion amonium akan dilepaskan sehingga pH media menjadi basa (Lay, 1994).

Untuk mencegah perubahan pH yang berjalan dengan cepat pada sistem tertutup ditambahkan bufer ke dalam media seperti K_2HPO_4 dan KH_2PO_4 , yang dimaksudkan untuk menjaga agar kondisi pH tetap mendekati pH optimum. Kedua macam garam ini dapat mengikat H^+ dari asam dan OH^- dari basa (Lay dan Hastowo, 1992).

Menurut Moat (1979) *di dalam* Judoamidjojo *et. al.* (1989), bakteri mempunyai kisaran nilai pH minimum 3 – 5, kisaran pH optimum 6.5 – 7.5 dan kisaran pH maksimum 8 – 10. Pada umumnya bakteri tumbuh dengan baik pada pH sekitar 7 meskipun dapat tumbuh pada kisaran 3 – 10 (Lay dan Hastowo, 1992). Hasil penelitian Trinovia (1997) menunjukkan pH optimum untuk MII₁₀ adalah sekitar 7.

e. Aerasi dan Agitas

Produksi biomassa dapat dicapai dengan mempertahankan konsentrasi O_2 terlarut yang lebih besar dari konsentrasi kritis. Jika konsentrasi O_2 kurang dari konsentrasi kritis, metabolisme sel akan terganggu. Konsentrasi O_2 yang dibutuhkan untuk memproduksi metabolit



kultivasi secara optimal mungkin berbeda dengan yang dibutuhkan untuk memproduksi biomassa (Rachman, 1989).

Laju konsumsi O₂ oleh mikroba aerobik cukup tinggi. Oksigen yang tidak mencukupi menyebabkan berkurangnya hasil (*yield*) dari produk mikroba seperti asam organik, enzim, atau antibiotik dan mengurangi pertumbuhan mikroba. Pemasokan oksigen biasanya berkaitan dengan aerasi dan pencampuran (*mixing*). Keduanya mempengaruhi kecepatan konsumsi oksigen dan ketersediaannya selama proses kultivasi berlangsung (Sikyta, 1983).

Menurut Sa'id (1987) *di dalam* Judoamidjojo *et. al.* (1989) dan Wang *et. al.* (1979), dalam kultivasi aerobik, aerasi dan agitasi merupakan faktor yang sangat penting. Fungsi utamanya adalah untuk mensuplai kebutuhan oksigen bagi tingkat aktivitas metabolismik mikroba, juga untuk mengaduk mikroba supaya tersuspensi secara homogen dalam bioreaktor. Aerasi diperlukan karena kebutuhan akan oksigen cukup tinggi sedangkan kelarutan oksigen dalam media cair rendah sekitar 0.9 mg/100 ml pada suhu 25 °C dan kelarutan menurun dengan naiknya suhu (Gray dan Berry, 1980 *di dalam* Judoamidjojo *et. al.*, 1989).

Kebutuhan oksigen bagi pertumbuhan mikroba tergantung pada jenis sumber karbon dan efisiensi penggunaannya oleh mikroba tersebut (Sa'id, 1987 *di dalam* Judoamidjojo *et. al.*, 1989). Peningkatan konsentrasi oksigen terlarut dalam media dapat dilakukan dengan cara meningkatkan



laju alir udara atau menambah kecepatan berputar impeler (Stanbury dan Whitaker, 1984).

Menurut Stredansky *et. al.* (1993), produksi amilase menggunakan *Bacillus licheniformis* dilakukan dengan bioreaktor tangki teraduk (*stirred tank bioreactor*) bervolume kerja 1 liter dengan laju aerasi sebesar 0,8 vvm. Ditambahkan pula oleh Yoo *et. al.* (1987), bakteri penghasil amilase tumbuh optimal pada suhu sekitar 37 °C, pH sekitar 7 dan dalam kondisi aerob dengan laju alir udara 1 vvm (volume udara per volume media per menit).

Pada kultivasi media cair untuk memproduksi enzim α -amilase dalam bioreaktor digunakan pH 10.5, suhu 50 °C, kecepatan agitasi 200 rpm, dan laju alir udara 1 vvm. Propagasi dilakukan dengan *orbital shaker* pada suhu 50 °C dengan putaran 200 rpm selama 24 jam (Kim *et. al.*, 1995).

Khamir memperbanyak sel dengan penyembulan massa sel induk, sel anak dihasilkan dengan meninggalkan bekas penyembulan pada sel induk. Sedangkan bakteri memperbanyak sel dengan pembelahan diri, sehingga peningkatan agitasi akan mempercepat proses yang berlangsung (Wang *et. al.*, 1979).



C. KINETIKA PRODUKSI AMILASE

Kinetika kultivasi mikroba secara umum dikaji berdasarkan laju penggunaan substrat, laju pertumbuhan biomassa dan laju pembentukan produk (Judoamidjojo *et. al.*, 1992). Menurut Monod (1949) *di dalam* Sa'id (1987), Pertumbuhan mikroba biasanya dicirikan dengan waktu yang dibutuhkan untuk menggandakan massa sel atau jumlah sel. Waktu ganda massa dapat berbeda dengan waktu ganda sel, karena massa sel dapat meningkat tanpa peningkatan jumlah sel. Namun demikian bila pada suatu lingkungan tertentu interval antara massa sel atau penggandaan jumlah adalah konstan dengan waktu (pertumbuhan berlangsung konstan dengan laju pertumbuhan maksimum), maka organisme itu tumbuh pada kecepatan eksponensial. Pada keadaan seperti ini maka pertumbuhan dinyatakan sebagai :

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \dots (1)$$

atau

$$\frac{dN}{dt} = \mu_n N \dots (2)$$

Keterangan X : konsentrasi sel dalam g/l, N : konsentrasi sel dalam keseluruhan sel/l, t : waktu, μ : laju pertumbuhan spesifik dalam jam^{-1} (massa), μ_n : laju pertumbuhan spesifik dalam jam^{-1} (jumlah).



Dengan demikian kesetimbangan (1) menggambarkan peningkatan massa sel dan kesetimbangan (2) menggambarkan peningkatan jumlah sel dengan fungsi waktu. Pada umumnya pertumbuhan diukur dengan peningkatan massa, sehingga μ dapat digunakan. Nilai besaran μX adalah laju pertumbuhan volumetrik (produktivitas volumetrik) dalam g/l jam.

Pengintegralan kesetimbangan (1) memberikan :

$$\int_{X_0}^{X_t} \frac{dX}{dt} = \int_{t_0}^{t_t} \mu dt \dots (3)$$

Bila laju pertumbuhan spesifik adalah tetap, maka kesetimbangan (3)

$$\ln \frac{X_t}{X_0} = \mu \Delta t \dots (4)$$

menghasilkan :

atau

$$\ln X_t = \ln X_0 + \mu \Delta t \dots (5)$$

Kesetimbangan (4) dapat diselesaikan untuk kasus dimana $\Delta t = t_d$, yaitu waktu yang dibutuhkan untuk mendapatkan biomassa dua kali jumlah biomassa semula.

$X_t = 2X_0$, maka :

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0.693}{\mu} \dots (6)$$



Dari kesetimbangan (4) terlihat bahwa laju pertumbuhan (μ) di peroleh dari kemiringan (*slope*) hubungan antara konsentrasi biomassa ($\ln X$) terhadap waktu (t). Selama fase eksponensial dalam kondisi kultur yang sesuai, mikroba tumbuh dengan laju pertumbuhan maksimum (μ_{maks}) dimana besarnya berbeda-beda tergantung pada galur mikroba dan kondisi kultur.

Berdasarkan kesetimbangan (1) pertumbuhan sel mikroba akan berlangsung dengan mengkonsumsi nutrien sekaligus mengeluarkan (sekresi) produk-produk metabolisme yang terbentuk. Setelah waktu tertentu laju pertumbuhan akan menurun dan akhirnya pertumbuhan berhenti sama sekali. Berhentinya pertumbuhan dapat pula disebabkan karena berkurangnya beberapa nutrien esensial dalam media, atau kombinasi keduanya (Rachman, 1989).

Menurut Monod (1949) *di dalam* Sa'id (1987), laju pertumbuhan spesifik yang maksimal (μ_{maks}) dapat ditentukan dengan persamaan :

$$\mu = \mu_{\text{maks}} \frac{S}{K_s + S} \dots (7)$$

Modifikasi dari persamaan (7) memberikan persamaan :

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_s}{\mu_{\text{maks}}} \frac{1}{S} + \frac{1}{\mu_{\text{maks}}} \dots (8)$$

Sehingga plot linear antara $1/\mu$ dengan $1/S$ akan memberikan garis lurus dengan intersep adalah nilai $1/\mu_{\text{maks}}$ dan kemiringan (*slope*) garis tersebut merupakan nilai dari K_s/μ_{maks} , dengan operasi aljabar biasa maka nilai-nilai dari K_s (konstanta yang sebanding pada konsentrasi substrat bila $\mu = 0,5 \mu_{\text{maks}}$) dan μ_{maks} dapat ditentukan.

Nilai dari koefisien hasil biomassa per satuan massa nutrien yang dikonsumsi ($Y_{X/S}$) dapat ditentukan menggunakan persamaan (9) yaitu :

$$-\frac{dS}{dt} = -\frac{\mu X}{Y_{X/S}} - m_s X \dots (9)$$

Modifikasi dari persamaan (9) dengan substitusi bahwa $\mu X = dX/dt$, dan semua ruas dibagi dengan X maka akan memberikan hasil :

$$\frac{dS/dt}{X} = \frac{1}{Y_{X/S}} \frac{dX/dt}{X} + m_s \dots (10)$$

Dari persamaan (10) tersebut maka plot linear antara $dS/dt/X$ dengan $dX/dt/X$

akan memberikan garis lurus dengan intersep yang akan memberikan nilai m_s (koefisien pemeliharaan) dan kemiringan garis tersebut akan memberikan nilai dari $1/Y_{X/S}$. Koefisien hasil produk per unit massa nutrien yang dikonsumsi ($Y_{P/S}$) dapat ditentukan dengan sederhana yaitu mengikuti persamaan seperti di bawah ini :

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S} \dots (11)$$

atau dapat pula dihubungkan secara linear menjadi :

$$\frac{dP}{dt} = -Y_{P/S} \frac{dS}{dt} \dots (12)$$

Sehingga plot linear dari dP/dt dengan dS/dt akan memberikan garis lurus dengan kemiringan merupakan nilai $Y_{P/S}$ yang dicari.

Menurut Monod (1949) *di dalam* Mangunwidjaja dan Suryani (1994), pada umumnya dijumpai proses yang produknya merupakan hasil langsung suatu jalur katabolik atau metabolit primer. Dalam pola ini laju pembentukan produk



berbanding secara proporsional dengan laju pertumbuhan, dan dirumuskan persamaan :

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} \dots (13)$$

atau

$$r_p = Y_{P/X} r_X \dots (14)$$

D. SIFAT REOLOGI CAIRAN KULTIVASI

Secara umum bioreaktor dilengkapi dengan sistem agitasi yang terdiri dari batang agitator (*shaft*), agitator yang berupa impeler, pedal, heliks atau baling-baling, dan *baffle* atau sekat penghambat. Beberapa tipe impeler yang sering digunakan pada beberapa kondisi proses khusus disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Karakteristik Penggunaan Berbagai Tipe Impeler.

Viskositas Kultivasi	Aliran Radial	Aliran Axial
< 500 cP	<i>Turbine Rushton, Impeller</i>	<i>Pitched blade turbine, Propeller</i>
500 – 5 000 cP	<i>Cross-beam, Grid, Blade</i>	<i>Cross-beam with inclined blade, Intermig (Ekato), Mig (Ekator)</i>
5 000 – 50 000 cP	<i>Anchor (Model jangkar)</i>	<i>Helical ribbon</i>

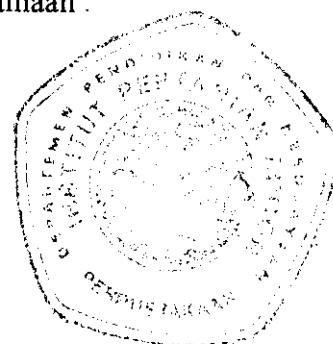
Sumber : Hartoto dan Sailah (1992).

Reologi atau sifat dan perilaku aliran media kultivasi akan sangat bermanfaat bagi perancangan dasar bioreaktor untuk skala yang lebih besar. Sifat aliran fluida dalam bioreaktor diperlukan untuk mengetahui tingkat homogenitas komponen dalam proses kultivasi. Sifat aliran dan kekentalan fluida berpengaruh nyata dalam transfer komponen-komponen media ke sel atau sebaliknya. Berbagai informasi yang didapatkan akan sangat berguna terutama dalam penggandaan skala ke skala



yang lebih besar berdasarkan peubah-peubah yang telah ditentukan pada skala yang lebih kecil. Penggandaan skala dilakukan dengan mempertahankan kesamaan geometrik bioreaktor pada berbagai skala, namun demikian kondisi lingkungan yang ideal tetap diperhatikan. Nilai pH, suhu dan kelarutan oksigen optimum diperoleh dari proses optimasi, maka perilaku terpenting cairan dalam bioreaktor berpengaduk adalah tenaga agitasi (P) dan kecepatan agitasi itu sendiri (N) (Wang *et. al.*, 1979)

Tenaga pengadukan sangat tergantung pada jenis agitator yang digunakan dan sifat reologi cairan kultivasi. Sifat aliran seperti turbulensi dapat ditetapkan berdasarkan harga bilangan Reynolds. Aliran dalam tangki dikatakan laminar apabila bilangan Reynolds lebih kecil dari 10, jenis aliran dalam tangki disebut peralihan atau transisi jika mempunyai bilangan Reynolds 10-10 000 dan turbulen apabila bilangan Reynolds lebih besar dari 10 000. Bilangan Reynolds ini sangat dipengaruhi oleh sifat kekentalan larutan. Kekentalan merupakan ketahanan cairan menahan gaya yang diberikan untuk menjaga agar bidang tetap tidak bergerak pada laju setara gaya tersebut. Gaya kekentalan secara umum dinyatakan per satuan luas yang disebut tegangan geser ($\text{shear stress} = \tau$). Tegangan geser suatu cairan kultivasi berbanding dengan perbedaan laju dalam cairan kultivasi yang disebut laju geser ($\text{shear rate} = \gamma$). Menurut Wang *et. al.* (1979), hubungan antara τ dan γ cairan Newtonian dan bukan-Newtonian ditentukan dengan persamaan :





$$\tau = \tau_y + K\gamma^n \dots (15)$$

Keterangan : τ = tegangan geser ($\text{g cm}^{-1} \text{det}^{-2}$)
 τ_y = yield stress ($\text{g cm}^{-1} \text{det}^{-2}$)
 K = indeks konsistensi ($\text{g cm}^{-1} \text{det}^{n+2}$)
 γ = laju geser (det^{-1})
 n = indeks perilaku cairan
 μ = viskositas (g/cm det).

Pada cairan kultivasi bukan-Newtonian nilai $\tau_y = 0$, kekentalan (viskositas = μ) tergantung pada laju geser (γ), sehingga persamaan (15) menjadi :

$$\tau = K\gamma^n \dots (16)$$

serta

$$\mu = K\gamma^{n-1} \dots (17)$$

Nilai K dan n tersebut sangat penting diketahui untuk pengkajian masalah pencampuran. Bila $0 < n < 1$ dan $K > 0$, maka cairan kultivasi tersebut adalah pseudoplastik, dan jika $n > 1$ dan $K > 0$, maka cairan kultivasi tersebut adalah dilatan.

Menurut Harnby *et. al.* (1992), penentuan bilangan Reynolds pada cairan bukan-Newtonian dalam memperkirakan kebutuhan tenaga agitator jenis impeler adalah sebagai berikut :





$$NRe = \frac{Di^2 N^{2-n} \rho}{K(k_s)^{n-1}} \dots (18)$$

keterangan :

NRe = bilangan Reynolds

N = kecepatan putaran agitasi

ρ = densitas cairan kultivasi

Di = garis tengah agitator

k_s = konstanta untuk *six bladed disc turbine* yang besarnya 11.5

Menurut Wang *et. al.* (1979), konsumsi tenaga (P) yang dibutuhkan untuk menggerakkan agitator mengikuti persamaan sebagai berikut :

$$P = \frac{Np Di^5 N^3 \rho}{Gc} \dots (19)$$

keterangan :

Np = bilangan tenaga

Gc = Faktor Konversi ($9.81 \text{ kg m/kg det}^2$)

P = tenaga yang terserap oleh agitator



III. BAHAN DAN METODE

A. ALAT DAN BAHAN

1. Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian adalah peralatan gelas (labu Erlenmeyer, tabung reaksi, gelas piala, gelas ukur, labu takar, cawan Petri, pipet Mohr dan pipet volumetrik), pipet mikro ukuran 100 μ l dan 1 000 μ l, sudip, pipet tetes, pinset, *bulb pipet*, termometer, timbangan analitik, sentrifus model Biofuge 15R Heraus Spatech, spektrofotometer Spectronic 20, *refrigerator*, *laminar air flow* beserta perlengkapannya (lampu UV, jarum Ose, pembakar Bunsen), pH-meter model CG 840B, inkubator, *orbital incubator (shaker)*, otoklaf, desikator, *cool room*, *magnetic stirrer*, bioreaktor Biostat-B volume 2 liter dan *Brookfield DV-II Viscometer*.

2. Bahan

Mikroba yang digunakan adalah isolat bakteri mesofil indigenous dengan kode MII₁₀ hasil isolasi dan seleksi Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan dan Industri, Cimanggu. Bahan yang digunakan dalam peremajaan dan pembuatan media propagasi awal adalah *bacto agar*, NaCl, ekstrak khamir, *bacto tryptone*, *nutrient broth* serta akuades. Media yang digunakan untuk optimasi dalam bioreaktor dan formulasi media adalah ekstrak

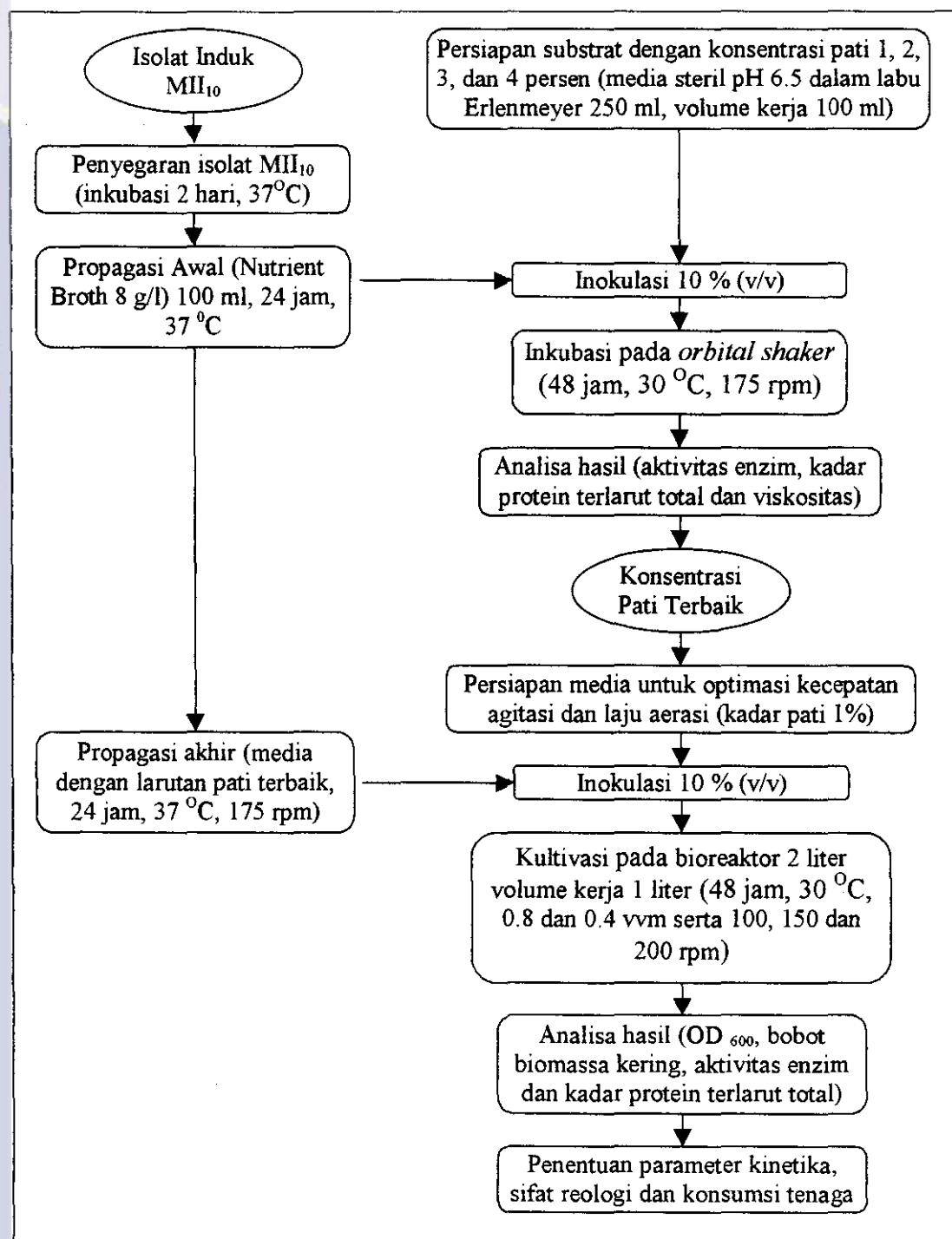


khamir, bakto tripton, $MgCl_2$, $CaCl_2$, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $NaCl$, $(NH_4)_2SO_4$, pati tapioka sebagai substrat dan akuades.

Dalam analisa produk digunakan bahan-bahan kimia seperti 3,5 – *Dinitro Salicylic Acid* (DNS), bufer fosfat sitrat (BFS), maltosa standar, glukosa standar, natrium bikarbonat anhidrat, larutan $NaOH$ 0,1 N, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, HCl 0,1 N, Natrium K-Tartarat, Folin Ciocalteau, protein standar Bovine Serum Albumin (BSA), *silicone antifoaming agent* dan pereaksi iodine. Prosedur analisa disajikan dalam Lampiran 1, sedangkan pembuatan pereaksi disajikan dalam Lampiran 2.

B. METODE PENELITIAN

Penelitian ini dibagi menjadi empat tahap yaitu penentuan konsentrasi pati terbaik, optimasi kecepatan agitasi dan laju aerasi, penentuan parameter kinetika kultivasi serta penentuan sifat reologi cairan kultivasi dan konsumsi tenaga sebagai dasar penggandaan skala produksi. Secara skematis metodologi penelitian ini disajikan dalam Gambar 5.



Gambar 5. Skema Metode Penelitian.

1. Tahap 1 : Penentuan Konsentrasi Pati Terbaik

Penentuan media pertumbuhan optimal dilakukan terhadap isolat unggulan koleksi Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan dan Industri, yaitu isolat bakteri mesofil dengan kode MII₁₀ (*Bacillus licheniformis*). Isolat ditumbuhkan dalam media sintetik A (Tabel 4) yang diperkaya dengan substrat berupa pati tapioka (larutan B). Pati ditambahkan dengan beberapa perlakuan, yaitu dengan penambahan 1, 2, 3 dan 4 persen (dilakukan dengan ulangan dua kali).

Media dalam *shaker* dikondisikan pada pH dan suhu optimum (pH 6.5 dan suhu 30 °C) dengan kecepatan 175 rpm selama 48 jam. Media yang mampu memberikan aktivitas enzim dan kadar protein terlarut total tertinggi dipilih untuk optimasi produksi amilase dengan alat bioreaktor volume kerja 1 liter.

Langkah-langkah yang dilakukan pada tahap ini meliputi :

a. Penyegaran Isolat

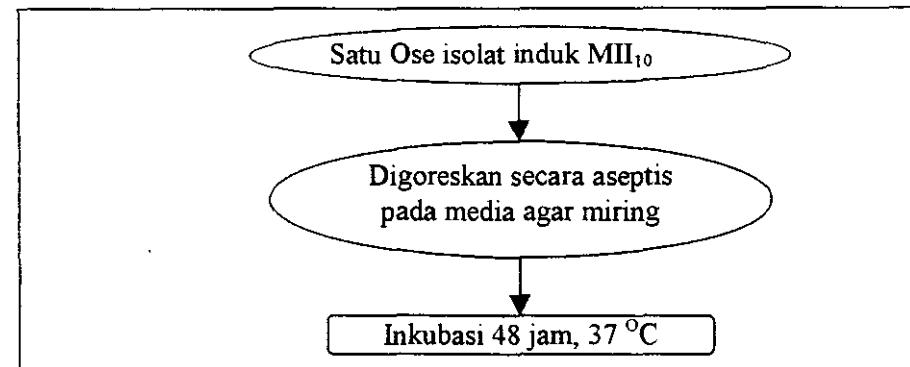
Penyegaran isolat dilakukan pada media agar miring (pH 7).

Komposisi agar miring ini disajikan dalam Tabel 4, sedangkan diagram alir penyegaran isolat MII₁₀ disajikan dalam Gambar 6.

Tabel 4. Komposisi Agar Miring untuk Penyegaran Isolat Bakteri (Girindra, 1986).

Komponen	Jumlah (%)
NaCl	0.5
Bacto tripton	1
Bacto agar	2
Ekstrak khamir	0.5

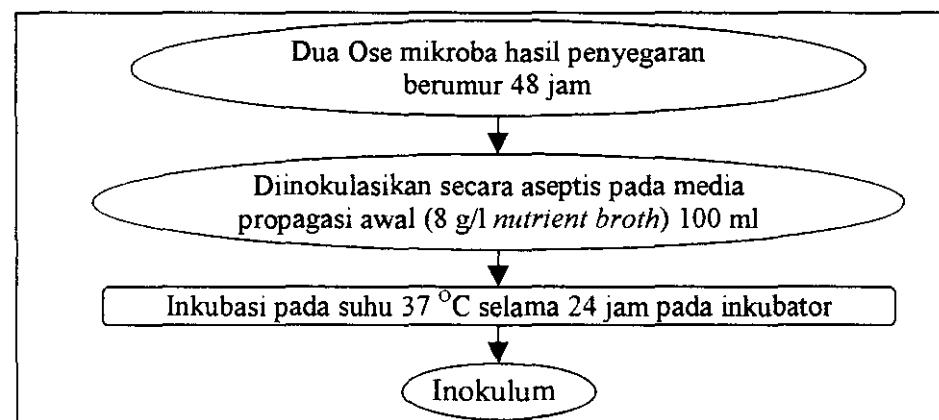




Gambar 6. Diagram Alir Penyegaran Isolat MII₁₀.

b. Persiapan Propagasi Awal

Isolat hasil penyegaran dibiakkan dalam media propagasi awal. Dua Ose isolat diinokulasikan dalam 100 ml media propagasi awal (*nutrient broth* 8 g/l) dalam labu Erlenmeyer 250 ml. Diagram alir persiapan inokulum disajikan dalam Gambar 7.



Gambar 7. Diagram Alir Persiapan Inokulum.

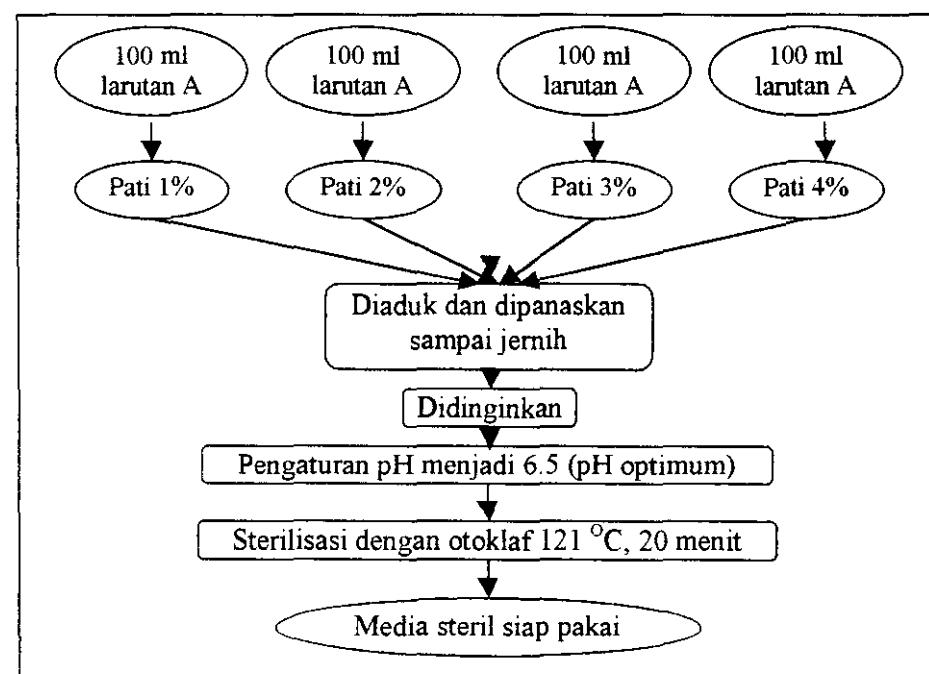
c. Persiapan Substrat

Media yang digunakan adalah media sintetik yang terdiri dari dua bagian, yaitu larutan A (Tabel 5) dan larutan B (pati tapioka dengan konsentrasi 1, 2, 3 dan 4 persen). Diagram alir persiapan substrat disajikan dalam Gambar 8.

Tabel 5. Komposisi Kimia Media Kultivasi (Larutan A).

No.	Komponen	Jumlah (g/l)
1.	Ekstrak khamir	1
2.	Bakto tripton	1
3.	MgCl ₂	0.1
4.	CaCl ₂	0.2
5.	KH ₂ PO ₄	0.2
6.	K ₂ HPO ₄	0.4
7.	NaCl	0.2
8.	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5

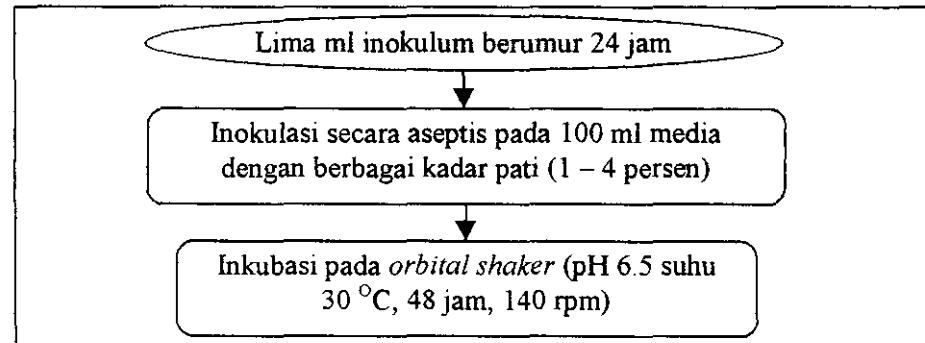
Sumber : Hasil Modifikasi Formulasi Media Balitbio dan P3GI.



Gambar 8. Diagram Alir Persiapan Substrat.

d. Penentuan Konsentrasi Pati terbaik

Media diinkubasikan pada *orbital shaker* dengan volume 100 ml per labu Erlenmeyer 250 ml (pH 6.5). Setiap labu ditambah pati dengan konsentrasi 1, 2, 3 dan 4 persen (b/v). Kultivasi dilakukan pada kecepatan 140 rpm selama 48 jam. Pada akhir kultivasi, supernatan dari setiap labu diukur aktivitas enzim dan kadar protein terlarut total. Media dengan konsentrasi pati terbaik (menghasilkan aktivitas enzim dan kadar protein terlarut total tertinggi) dipilih sebagai media terbaik. Media ini digunakan untuk optimasi produksi enzim dengan bioreaktor Biostat-B (volume kerja 1 liter). Sterilisasi media terpilih dilakukan bersamaan dengan sterilisasi bioreaktor dan perlengkapannya pada suhu 121 °C selama 20 menit. Diagram alir optimasi substrat pati disajikan dalam Gambar 9.



Gambar 9. Diagram Alir Penentuan Konsentrasi Pati Terbaik.

2. Tahap 2 : Optimasi Kecepatan Agitasi dan Laju Aerasi

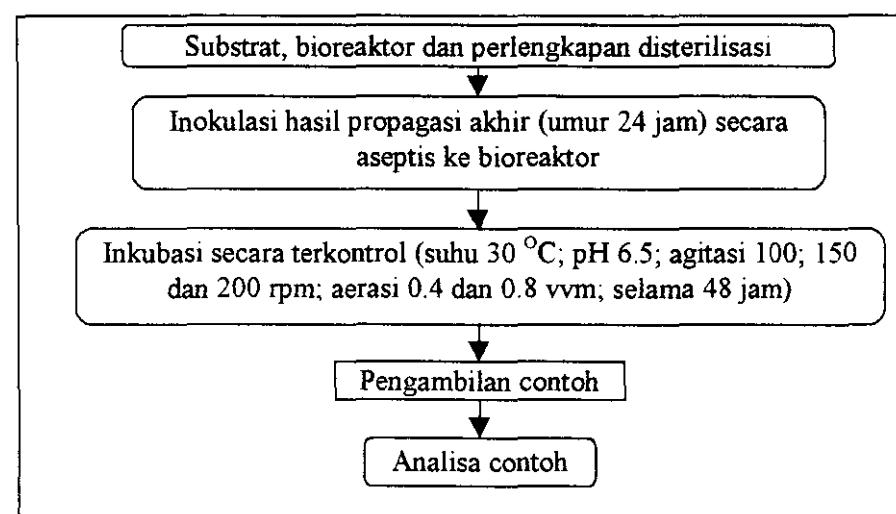
Media propagasi akhir (media yang mempunyai komposisi sama dengan media untuk produksi amilase dengan bioreaktor) dipersiapkan 24 jam sebelum

inokulasi. Media propagasi akhir dibuat dengan menginokulasikan hasil penyegaran isolat induk pada agar miring ke dalam labu Erlenmeyer 250 ml (volume kerja 100 ml dan pH 6.5). Labu Erlenmeyer diinkubasikan pada *orbital shaker* dengan suhu 30 °C dan kecepatan 175 rpm selama 24 jam. Hasil propagasi (5-10 persen dari volume kerja) diinokulasikan ke dalam media steril bioreaktor secara aseptis dengan cara menyemprotkan alkohol ke sekeliling bioreaktor.

Produksi amilase dalam bioreaktor Biostat-B (volume kerja 1 liter) dilakukan pada pH dan suhu optimum (pH 6.5 dan suhu 30 °C) selama 48 jam. Substrat dengan konsentrasi pati optimum disterilisasi bersamaan dengan bioreaktor dan perlengkapannya. Kecepatan agitasi divariasikan pada 100, 150 dan 200 rpm. Laju aerasi divariasikan pada 0.4 dan 0.8 vvm. Proses dijalankan secara terkontrol. Pemanenan dilakukan pada jam ke-0, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 24, 32, 36, 40, 44, dan jam ke-48. Hasil panen disentrifus (kecepatan 4 000 rpm) untuk memisahkan massa sel dengan supernatan yang akan dianalisa. Pengamatan massa sel meliputi kerapatan optik dan bobot biomassa kering. Pengamatan supernatan meliputi aktivitas enzim (Bernfeld, 1955) dan kandungan protein terlarut total (Lowry *et. al.*, 1951). Kombinasi laju aerasi dan kecepatan agitasi terbaik (memberikan nilai aktivitas enzim dan kadar protein terlarut total tertinggi) akan digunakan dalam penghitungan parameter kinetika. Diagram alir optimasi kecepatan agitasi dan laju aerasi disajikan dalam Gambar 10.

3. Tahap 3 : Kinetika Kultivasi dalam Bioreaktor Biostat-B

Kultivasi dilakukan pada suhu dan pH optimum, dengan kecepatan agitasi dan laju aerasi terbaik dari tahap 2. Prosedur yang dilakukan sama dengan tahap 2. Contoh diambil setiap 2 jam sekali dari jam ke-0 sampai jam ke-48 (Gambar 10). Analisa hasil panen ditambah dengan analisa kadar pati sisa yang dinyatakan dalam kadar glukosa sisa. Data-data yang diperoleh digunakan untuk menghitung parameter kinetika yang dibutuhkan.



Gambar 10. Prosedur Kerja Optimasi Kecepatan Agitasi dan Laju Aerasi serta Penentuan Parameter Kinetika Kultivasi.

4. Tahap 4 : Penentuan Reologi Cairan Kultivasi

Penentuan densitas cairan kultivasi dilakukan dengan alat piknometer, yaitu pembagian bobot cairan kultivasi dengan volumenya. Viskositas dihitung dengan alat *Brookfield Viscometer* pada kecepatan putar 6, 12, 30 dan 60 rpm menggunakan *spindle* nomor 2.



IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

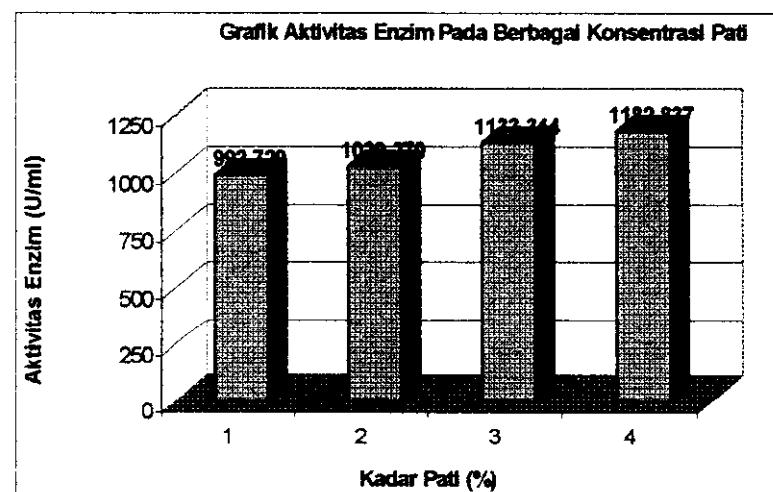
A. OPTIMASI SUBSTRAT PATI

Optimasi substrat pati dilakukan dengan menggabungkan antara media sintetik hasil optimasi sebelumnya dengan larutan pati yang telah tergelatinasi. Media sintetis digunakan karena komponen-komponennya merupakan senyawa yang relatif murni dan konsentrasi setiap komponen dalam media serta strukturnya diketahui dengan pasti, oleh karena itu beberapa komponen dapat ditambah atau dikurangi sesuai kebutuhan. Sumber nitrogen dalam media ini didapatkan dari bakto tripton dan ekstrak khamir. Sumber nitrogen digunakan oleh sel untuk tujuan pertumbuhan dan pemeliharaan sel. Media mengandung 1 g/l ekstrak khamir dan bakto tripton, sehingga diharapkan kebutuhan nitrogen selama proses kultivasi berlangsung tidak mengalami kekurangan. Ekstrak khamir juga digunakan oleh amilase sebagai koenzim dalam aktivitasnya. Kekurangan koenzim akan menyebabkan pertumbuhan terganggu dan enzim yang dihasilkan mempunyai aktivitas yang rendah.

Senyawa yang digunakan dalam media pada penelitian ini mempunyai fungsi yang berbeda-beda. Senyawa NaCl (0.2 g/l) dan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.5 g/l) berfungsi sebagai aktuator enzim. Hasil penelitian di Balitbio menunjukkan bahwa ion Na^+ dan NH_4^+ merupakan aktuator α -amilase pada konsentrasi dibawah 5 mM. Kedua senyawa ini terdapat dalam media dengan konsentrasi sebesar 3.4 mM dan 3.8 mM, sehingga efek inhibisi dari kedua senyawa ini belum terjadi. Inhibitor

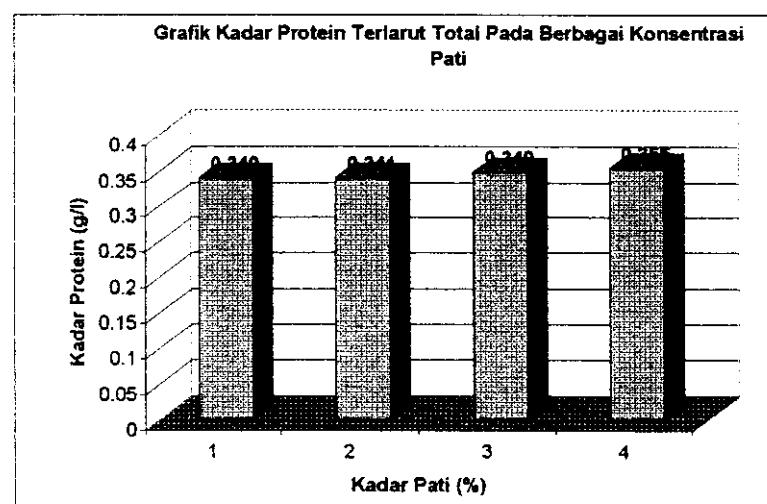
dalam media sintetik ini adalah $MgCl_2$, oleh karena itu penggunaannya dalam media sangat kecil yaitu hanya 0.1 g/l atau sebesar 1.1 mM. Kofaktor yang ada dalam media adalah $CaCl_2$ (0.2 g/l), yaitu ion Ca^+ yang akan digunakan sebagai kofaktor oleh α -amilase. Bufer yang digunakan dalam penelitian ini adalah KH_2PO_4 dan K_2HPO_4 .

Penelitian dilakukan dengan pemerkayaan pati pada media sintetik yang digunakan. Pemerkayaan dikombinasi pada konsentrasi 1 % (10 g/l), 2 % (20 g/l), 3 % (30 g/l) dan 4 % (40 g/l). Analisa contoh meliputi aktivitas enzim, viskositas dan kadar protein terlarut total. Prosedur analisa disajikan dalam Lampiran 1. Perbandingan aktivitas enzim pada berbagai konsentrasi pati disajikan dalam Gambar 11 sedangkan data-data perhitungan disajikan dalam Lampiran 5.



Gambar 11. Grafik Perbandingan Aktivitas Enzim pada Berbagai Konsentrasi Pati.

Gambar 11 memberikan ilustrasi bahwa aktivitas enzim pada keempat jenis substrat tidak memberikan pola kenaikan yang berarti. Aktivitas enzim pada konsentrasi pati 1 % adalah sebesar 992.727 U/ml, konsentrasi pati 2 % sebesar 1029.270 U/ml, konsentrasi pati 3 % sebesar 1133.344 U/ml dan konsentrasi pati 4 % memberikan aktivitas enzim sebesar 1182.837 U/ml. Konsentrasi pati 1 dan 2 persen memberikan nilai aktivitas enzim yang hampir sama yaitu 992.727 U/ml dan 1029.270 U/ml. Fenomena ini menunjukkan bahwa kedua konsentrasi pati tidak memberikan perbedaan yang begitu nyata. Pola yang sama ditunjukkan pada konsentrasi pati 3 dan 4 persen yaitu sebesar 1133.344 U/ml dan 1182.837 U/ml, sehingga dapat dikatakan bahwa konsentrasi pati 3 dan 4 persen tidak memberikan perbedaan yang nyata dan berarti. Hasil ini dipertegas pula dengan kadar protein terlarut total pada keempat jenis media seperti disajikan dalam Gambar 12 (data-data perhitungan disajikan dalam Lampiran 5).

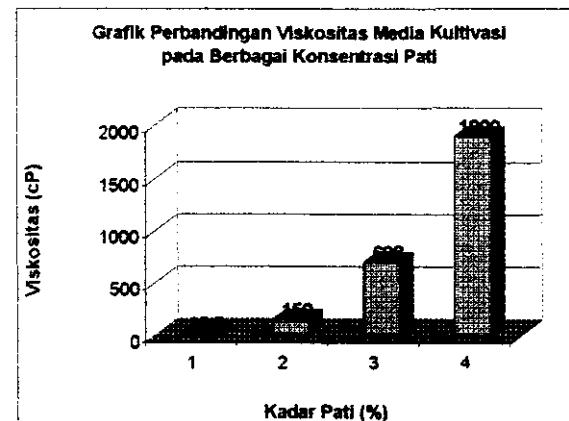


Gambar 12. Grafik Perbandingan Kadar Protein Terlarut Total pada Berbagai Konsentrasи Pati.

Gambar 12 menunjukkan pola bahwa keempat jenis media yang diperkaya dengan berbagai konsentrasi pati tidak memberikan perbedaan kadar protein terlarut total yang begitu berarti. Kadar protein terlarut total untuk konsentrasi 1 sampai 4 persen berturut-turut adalah sebesar 0.340 g/l, 0.341 g/l, 0.349 g/l dan 0.355 g/l. Konsentrasi pati 1 dan 2 persen memberikan hasil dengan kadar protein terlarut total hampir sama yaitu sebesar 0.340 g/l dan 0.341 g/l. Fenomena ini menunjukkan bahwa pada konsentrasi pati 1 dan 2 persen tidak ada perbedaan hasil yang berarti. Pada konsentrasi pati 3 dan 4 persen kenaikan kadar protein terlarut total hanya sedikit yaitu 0.349 g/l dan 0.355 g/l. Kenaikan tersebut tidak begitu besar sehingga dapat dikatakan konsentrasi pati 3 dan 4 persen tidak memberikan perbedaan hasil yang sangat nyata.

Secara keseluruhan, aktivitas enzim dan kadar protein terlarut total menunjukkan pola yang sama. Konsentrasi pati 1 persen memberikan hasil yang hampir sama dengan konsentrasi pati 2 persen, sedangkan konsentrasi pati 3 persen memberikan hasil yang hampir sama dengan konsentrasi pati 4 persen. Kenaikan hasil dari 1 sampai 4 persen hanya memberikan perbedaan yang tidak begitu besar, sebaliknya viskositas larutan media terlihat sangat berbeda. Perbandingan viskositas media pada awal kultivasi sebelum dilakukan inokulasi disajikan dalam Gambar 13, data hasil pengukuran disajikan dalam Lampiran 5.





Gambar 13. Grafik Perbandingan Viskositas Media di Awal Kultivasi pada Berbagai Konsentrasi Pati.

Gambar 13 menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi pati, maka viskositas akan semakin tinggi pula. Viskositas media pada konsentrasi 1 persen adalah 16.5 cP, pada konsentrasi 2 persen viskositas naik 8 kali lipat menjadi 150 cP. Nilai viskositas media dengan konsentrasi pati 3 persen naik 4 kali lipat dari media dengan konsentrasi pati 2 persen, pada konsentrasi 4 persen viskositas menjadi sangat kental yaitu 1 900 cP. Pertambahan nilai viskositas yang sangat ekstrim pada masing-masing media ini mengakibatkan kelarutan oksigen dalam media menjadi semakin berkurang. Fenomena ini juga menyebabkan media mempunyai sifat reologi yang semakin kompleks.

Berdasarkan ketiga parameter tersebut maka optimasi kecepatan agitasi dan laju aerasi menggunakan bioreaktor dilakukan dengan konsentrasi pati sebesar 1 persen. Alasan pemilihan ini didasarkan pada beberapa sebab, yang pertama adalah pertimbangan ekonomis. Bertambahnya konsentrasi pati dalam media berarti biaya produksi menjadi bertambah pula. Pertambahan biaya ini tidak sebanding dengan

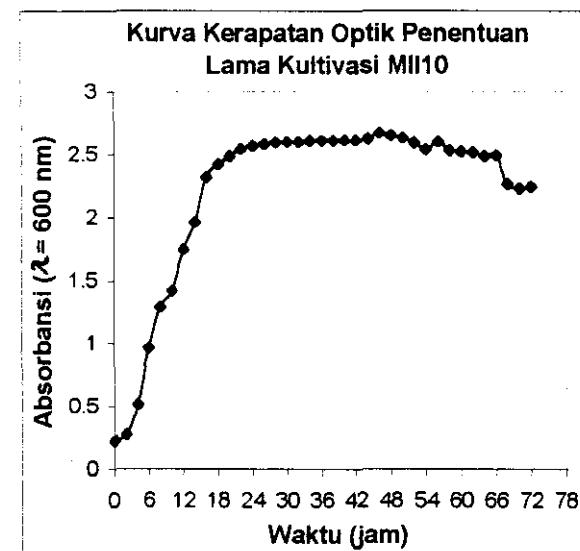
pertambahan hasil yang meningkat dalam jumlah yang relatif kecil. Apabila produksi dilakukan dalam jumlah yang besar maka pertambahan biaya ini menjadi sangat tidak ekonomis.

Alasan kedua adalah pertimbangan teknis proses produksi. Bertambahnya kekentalan pati berarti penurunan kelarutan dan dispersi oksigen dalam media. Homogenitas media juga akan semakin menurun. Apabila proses produksi dilakukan pada bioreaktor, dibutuhkan laju aerasi dan kecepatan agitasi yang semakin tinggi untuk memecah gelembung-gelembung udara yang keluar dari aerator. Stabilisasi pH akan semakin sulit karena homogenitas media yang semakin turun. Pertambahan kecepatan agitasi akan berkorelasi dengan pertambahan konsumsi energi untuk menggerakkan impeler, sekali lagi parameter biaya menjadi sangat penting. Semakin tinggi energi yang dikonsumsi maka semakin tinggi pula biaya pengoperasian bioreaktor. Pertambahan kecepatan agitasi juga akan semakin menyebabkan buih yang terbentuk semakin banyak. Penghilangan buih dilakukan dengan penambahan *antifoam* secara aseptis ke dalam bioreaktor. Semakin kental berarti semakin tinggi kecepatan impeler dan buih yang terbentuk meningkat, sehingga memerlukan *antifoam* lebih banyak. Menurut Stanbury dan Whitaker (1984) semakin banyak *antifoam* yang ditambahkan maka kelarutan oksigen akan semakin turun, sehingga berakibat pertumbuhan dan pembentukan produk terganggu.

Hasil ini memberikan kesimpulan sama dengan hasil penelitian Yoo *et. al.* (1988), yaitu kultivasi sistem curah produksi α -amilase menggunakan *Bacillus*



optimum. Kurva kerapatan optik selama kultivasi disajikan dalam Gambar 14, data pengamatan disajikan dalam Lampiran 6.



Gambar 14. Kurva Pertumbuhan MII₁₀ pada Penentuan Waktu Kultivasi.

Gambar 14 menunjukkan pola umum pertumbuhan sel, fase pertumbuhan lambat berlangsung cukup singkat yaitu kurang dari 4 jam. Pada jam ke-4 sampai jam ke-6 mulai terjadi akselerasi untuk mencapai fase eksponensial. Fase pertumbuhan lambat yang berjalan singkat menunjukkan perlakuan hasil propagasi berada pada fase eksponensial dengan kinerja optimum. Akumulasi bahan-bahan dan substrat yang berperan sebagai penghambat tidak ada. Fase eksponensial berlangsung dari jam ke-6 sampai jam ke-24, hal ini ditunjukkan dengan peningkatan kurva yang sangat tajam. Pada fase inilah sel berada dalam kondisi paling prima menjalankan aktivitas metabolismenya. Kondisi ini didukung dengan konsentrasi nutrien yang berlebih. Deselerasi

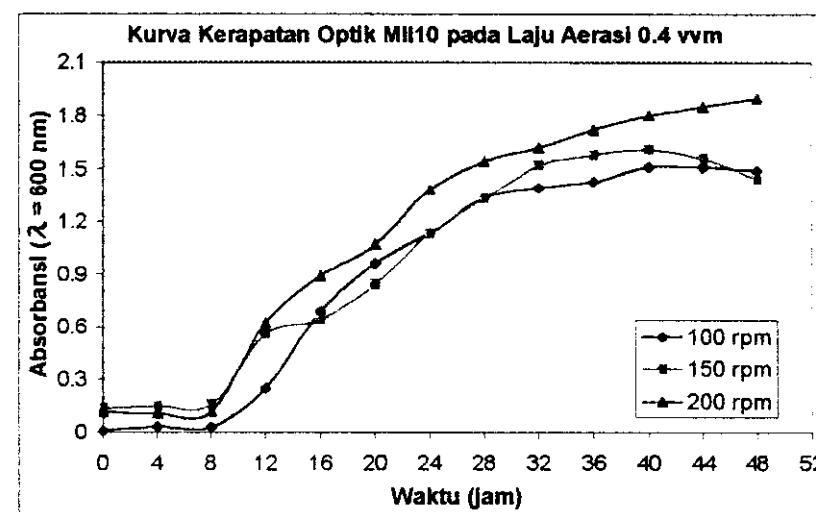




mulai terjadi pada jam ke-24 sampai jam ke-28, selanjutnya sel berada dalam fase stasioner sampai jam ke-48. Fase kematian mulai terjadi setelah jam ke-48 sampai akhir kultivasi. Fase ini diduga terjadi karena terdapat massa sel yang mengalami lisis dan nutrien telah berada pada konsentrasi kritis atau habis sama sekali. Hasil penentuan lama kultivasi ini digunakan sebagai dasar kultivasi berikutnya yaitu hanya sampai jam ke-48.

2. Optimasi Kombinasi Perlakuan Agitasi dan Aerasi

Penelitian dilaksanakan untuk mendapatkan kondisi optimum laju aerasi dan kecepatan agitasi yang dikombinasikan pada 0.4 dan 0.8 vvm serta 100, 150 dan 200 rpm. Hasil pengukuran kerapatan optik pada laju aerasi 0.4 vvm dan berbagai kombinasi agitasi disajikan dalam Gambar 15, data hasil pengamatan disajikan dalam Lampiran 7.

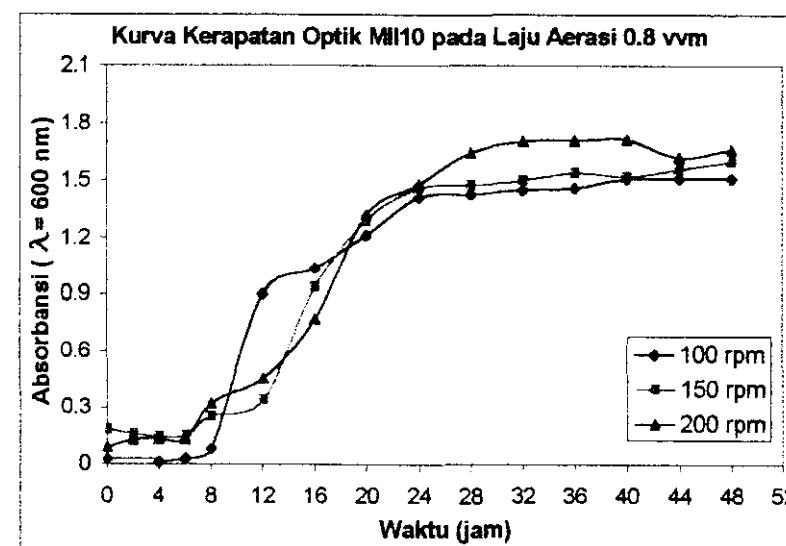


Gambar 15. Kurva Kerapatan Optik MII_{10} pada Laju Aerasi 0.4 vvm dan Berbagai Kecepatan Agitasi.

Gambar 15 menunjukkan peningkatan absorbansi sejalan dengan waktu karena padatan tersuspensi (sel) semakin banyak. Absorbansi merupakan bilangan yang menyatakan penyerapan sinar oleh media karena adanya padatan tersuspensi. Padatan tersuspensi tersebut akan meningkatkan kekeruhan (kerapatan optik) media. Semakin banyak padatan tersuspensi dalam media akan menyebabkan kekeruhan semakin tinggi. Akibatnya sinar yang diserap oleh padatan (absorbansi) akan semakin banyak pula. Gambar 15 menunjukkan pola pertumbuhan MII₁₀ mengikuti kaidah umum pertumbuhan mikroba. Fase adaptasi atau fase pertumbuhan lambat terjadi pada jam ke-4 sampai jam ke-8. Ketiga perlakuan agitasi yaitu 100, 150 dan 200 rpm menghasilkan fase adaptasi yang sama selama 8 jam. Masa adaptasi sel pada laju aerasi ini tergolong agak lama, hal ini mengindikasikan oksigen yang diberikan masih kurang. Kekurangan oksigen akan menyebabkan metabolisme terganggu sehingga pertumbuhan juga akan terhambat. Kombinasi agitasi 100 dan 150 rpm menghasilkan fase eksponensial yang berlangsung antara jam ke-8 sampai dengan jam ke-28. Mulai jam ke-28 perlakuan agitasi 100 rpm memasuki fase stasioner sampai akhir kultivasi. Perlakuan agitasi 150 rpm menunjukkan pada jam ke-40 terdapat massa sel yang lisis sehingga kurva mulai turun, pada jam tersebut sel memasuki fase kematian. Perlakuan agitasi 200 rpm memberikan hasil terbaik, terlihat dengan kecenderungan kurva yang berada di atas kedua kurva perlakuan 100 dan 150 rpm. Fase eksponensial terjadi antara jam ke-8 sampai jam ke-24, setelah jam ke-24 terjadi deselerasi. Kenaikan yang terjadi menunjukkan perubahan yang kecil, sehingga dapat dikatakan fase tersebut



merupakan fase stasioner, fase dimana telah terdapat akumulasi hasil metabolit yang menghambat pertumbuhan. Hasil yang didapatkan pada kecepatan agitasi 100, 150 dan 200 rpm memperlihatkan semakin tinggi agitasi maka hasil yang didapat akan semakin baik pula. Kenyataan ini disebabkan karena dispersi oksigen menjadi semakin baik karena gelembung udara terpecah semakin kecil. Homogenitas cairan semakin baik artinya komponen-komponen media seperti substrat dan garam-garam mineral dapat terdispersi semakin merata dalam media. Sel akan lebih cepat mengkonsumsi berbagai komponen yang dibutuhkan karena dispersi produk seperti enzim maupun sel itu sendiri sangat tinggi. Pola yang sama ditunjukkan pada laju aerasi 0.8 vvm, agitasi 200 rpm memberikan hasil terbaik seperti terlihat pada Gambar 16, data hasil pengamatan disajikan dalam Lampiran 7.



Gambar 16. Kurva Kerapatan Optik MII_{10} pada Laju Aerasi 0.8 vvm dan Berbagai Kecepatan Agitasi.



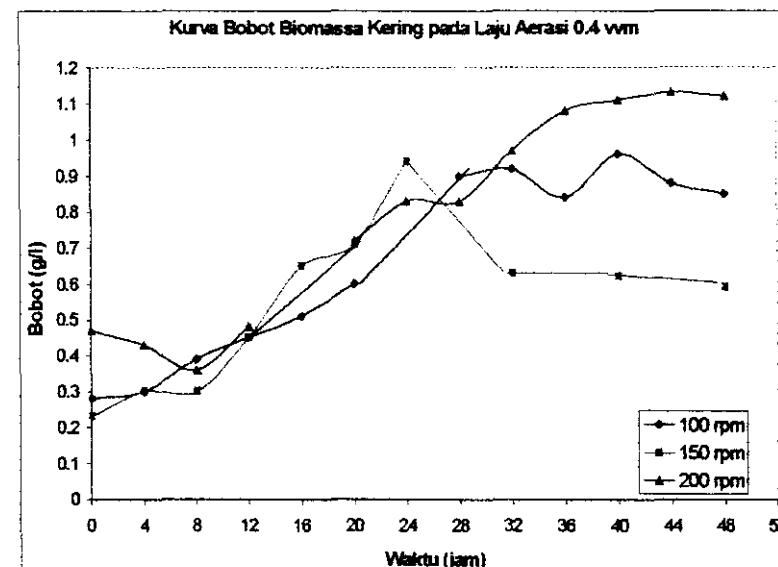
Hasil yang didapatkan pada laju aerasi 0.8 vvm lebih baik dari laju aerasi 0.4 vvm. Fase adaptasi dapat diperpendek sekitar 2 jam yang berakhir pada jam ke-6. Fenomena ini menunjukkan bahwa udara yang dialirkan dengan laju alir lebih besar memberikan pengaruh yang nyata terhadap pertumbuhan sel. Dengan demikian kekurangan oksigen dapat dihindari dan metabolisme sel dapat berjalan dengan lancar pula.

Perlakuan agitasi 100 dan 150 rpm menghasilkan fase eksponensial yang lebih pendek yaitu hanya sampai jam ke- 24. Fase eksponensial pada perlakuan agitasi 200 rpm dapat diperpanjang 4 jam sampai jam ke-28. Kurva pertumbuhan pada perlakuan agitasi 200 rpm juga berada di atas kurva pertumbuhan dua perlakuan sebelumnya. Jam berikutnya sel memasuki fase stasioner.

Perbandingan nilai-nilai kerapatan optik pada laju aerasi 0.4 vvm tampak lebih tinggi dari 0.8 vvm. Keadaan ini tidaklah dapat langsung disimpulkan bahwa laju aerasi 0.4 vvm lebih baik. Pengkajian masih harus dilakukan pada parameter lain yang lebih spesifik, mengarah kepada enzim amilase yang terbentuk. Nilai kerapatan optik tidak hanya menggambarkan banyaknya sel saja, tetapi juga produk metabolit lain yang dihasilkan akan ikut terbaca. Produk metabolit tersebut antara lain amilase, protease yang terbentuk pada fase stasioner dan pigmen lain.

Banyaknya sel yang terbentuk dilakukan dengan menganalisa bobot biomassa kering setelah proses pengendapan (sentrifusi pada kecepatan putar 4000 rpm selama 30 menit bersuhu 4 °C). Endapan selanjutnya dikeringkan

dalam oven bersuhu 37°C untuk diketahui bobot konstannya. Hasil pengamatan bobot biomassa kering pada laju aerasi 0.4 vvm disajikan dalam Gambar 17, data hasil pengamatan disajikan dalam Lampiran 8.



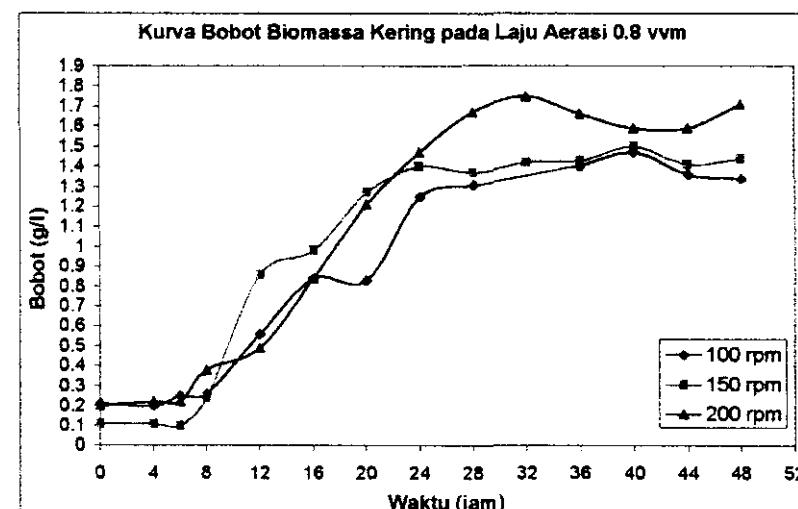
Gambar 17. Kurva Bobot Biomassa Kering MII₁₀ pada Laju Aerasi 0.4 vvm dan Berbagai Kecepatan Agitasi.

Perolehan data yang disajikan dalam Gambar 17 menunjukkan pola yang sama dengan kurva kerapatan optik. Perlakuan agitasi 200 rpm menghasilkan biomassa terbanyak pada puncak fase eksponensial yaitu sebesar 1.7 g/l. Perlakuan agitasi 150 rpm menghasilkan biomassa tertinggi sebesar 1.6 g/l dan pada perlakuan agitasi 100 rpm menghasilkan biomasa tertinggi sebesar 1.5 g/l. Fase adaptasi diakhiri pada jam ke-8. Fase eksponensial untuk perlakuan agitasi 100 rpm diakhiri pada jam ke-28, jam ke-24 untuk perlakuan agitasi 150 rpm dan jam ke-36 untuk perlakuan agitasi 200 rpm. Hasil ini menunjukkan bahwa pada kecepatan agitasi yang semakin besar akan



dihasilkan biomassa semakin banyak. Dispersi sel dalam media semakin baik sehingga sel semakin mudah memperbanyak diri.

Agitasi yang diperbesar tidak akan merusak massa sel karena sel bakteri tahan terhadap *shear stress*. Berbeda dengan kapang atau khamir, kapang memperbanyak sel dengan perpanjangan (pertumbuhan apikal) dan percabangan hifa sehingga tidak tahan terhadap *shear stress*. Peningkatan agitasi akan memutus filamen-filamen hifa sehingga pertumbuhan akan terganggu.



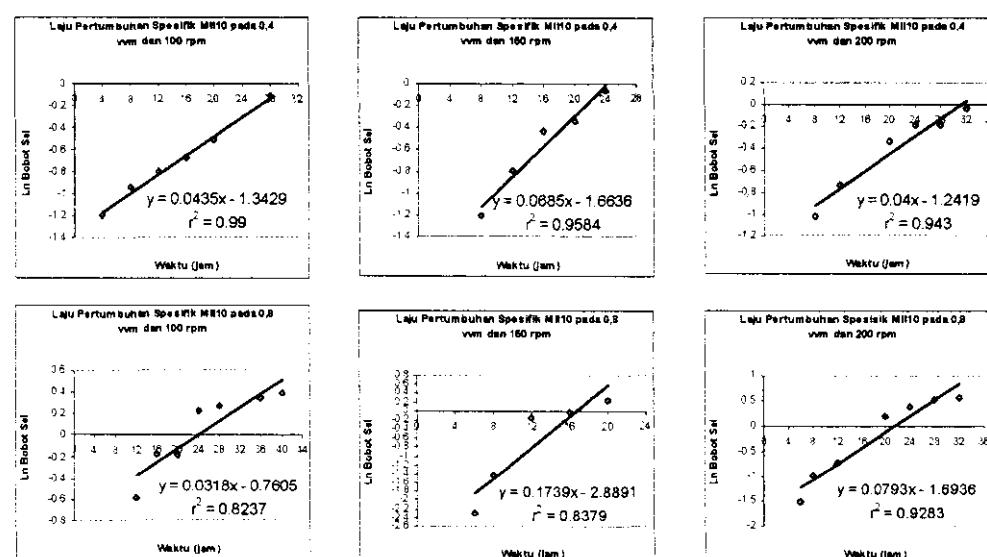
Gambar 18. Kurva Bobot Biomassa Kering MIII₁₀ pada Laju Aerasi 0.8 vvm dan Berbagai Kombinasi Kecapatan Agitasi.

Laju aerasi 0.8 vvm menunjukkan pola yang sama dengan laju aerasi 0.4 vvm seperti disajikan dalam Gambar 18 (data hasil pengamatan disajikan dalam Lampiran 8). Hasil ini juga menunjukkan pola yang sama dengan kerapatan optiknya. Fase adaptasi diakhiri pada jam ke-6, lebih cepat 2 jam dibandingkan dengan hasil pada laju aerasi 0.4 vvm. Fase eksponensial pada perlakuan agitasi



100 dan 150 rpm diakhiri pada jam ke-24 sedangkan pada perlakuan agitasi 200 rpm fase eksponensial dapat diperpanjang sampai jam ke-32.

Pertumbuhan biomassa terbaik didapat pada kecepatan agitasi 200 rpm dengan hasil tertinggi 1.75 g/l, diikuti perlakuan agitasi 150 rpm dengan hasil tertinggi 1.5 g/l dan perlakuan agitasi 100 rpm dengan hasil tertinggi 1.47 g/l. Bobot sel pada laju aerasi 0.8 vvm sedikit lebih banyak dibandingkan dengan laju aerasi 0,4 vvm. Hasil tersebut sesuai dengan teori bahwa laju konsumsi oksigen oleh mikroba aerobik cukup tinggi, oksigen yang tidak mencukupi akan mengakibatkan kurangnya hasil (*yield*).



Gambar 19. Penentuan Laju Pertumbuhan Spesifik (μ) pada Berbagai Laju Aerasi dan Kecapatan Agitasi.

Laju pertumbuhan spesifik (μ) besarnya tidak konstan tergantung kondisi lingkungan fisik dan kimia. Nilai maksimum dicapai pada saat fase eksponensial. Berbagai nilai μ disajikan dalam Gambar 19 yang merupakan kemiringan garis hubungan antara waktu (jam) dengan Ln bobot sel kering.



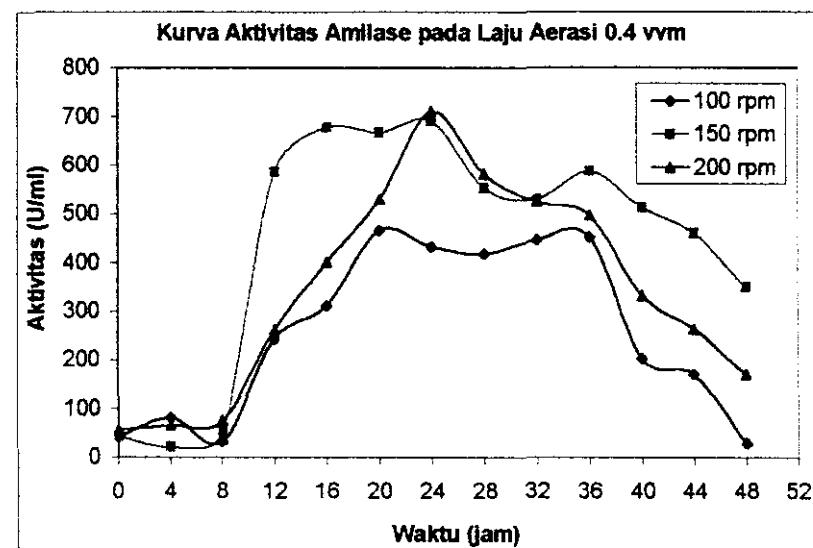
Kedua macam perlakuan laju aerasi memberikan nilai μ terbesar pada kecepatan agitasi 150 rpm. Laju aerasi 0.4 vvm dengan perlakuan 100, 150 dan 200 rpm memberikan nilai μ berturut-turut sebesar 0.0435/jam, 0.0685/jam dan 0.04/jam. Laju aerasi 0.8 vvm dengan berbagai kecepatan agitasi memberikan nilai μ berturut-turut sebesar 0.0318/jam, 0.1739/jam dan 0.0793/jam. Kenyataan ini menunjukkan bahwa secara nominal kecepatan agitasi 200 rpm memberikan hasil bobot biomassa kering terbesar, namun laju pertumbuhan spesifiknya lebih rendah dari perlakuan agitasi 150 rpm. Tujuan kultivasi adalah untuk mendapatkan enzim bukan biomassanya, maka parameter pemilihan yang lebih penting adalah aktivitas enzim dan kadar protein terlarut total yang merupakan produk enzim itu sendiri. Nilai μ terbesar dipilih jika tujuan kultivasi adalah untuk memproduksi biomass, bukan enzim. Berbagai nilai μ disajikan dalam Tabel 6.

Tabel 6. Perbandingan Berbagai Nilai μ pada Optimasi Laju aerasi dan Kecepatan Agitasi MII₁₀.

Laju Aerasi (vvm)	Kecepatan Agitasi (rpm)	Laju Pertumbuhan Spesifik (μ dalam jam ⁻¹)
0.4	100	0.0435
	150	0.0685
	200	0.0400
0.8	100	0.0318
	150	0.1739
	200	0.0793

Aktivitas amilase yang dihasilkan menunjukkan pola yang sama dengan kerapatan optik dan bobot biomassa kering. Peningkatan kerapatan optik dan bobot biomassa kering menyebabkan peningkatan aktivitas amilase.

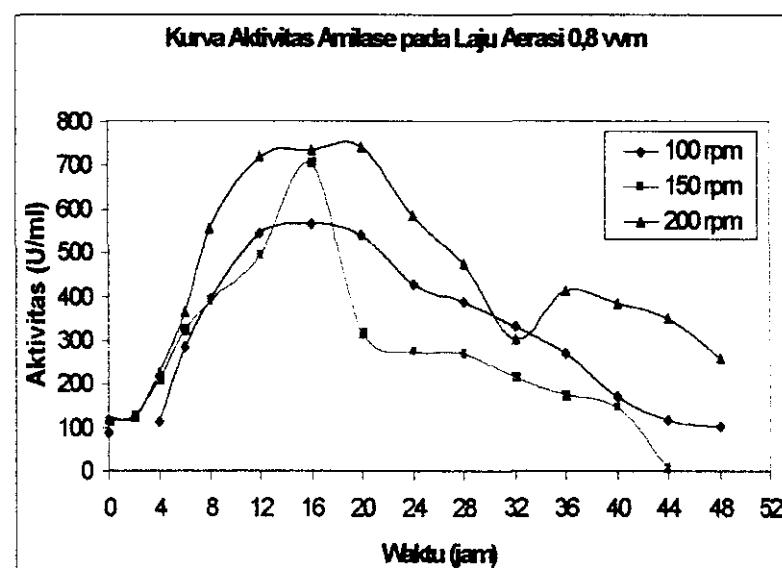
Peningkatan aktivitas enzim belum terjadi peningkatan berarti sampai jam ke-8. Fase ini merupakan fase adaptasi, sel melakukan aktivitas metabolismik dan fisiologik untuk mempersiapkan pembelahan sel sehingga enzim belum banyak dihasilkan. Ilustrasi pada laju aerasi 0.4 vvm disajikan dalam Gambar 20, data hasil perhitungan disajikan dalam Lampiran 9.



Gambar 20. Kurva Aktivitas Amilase pada Laju Aerasi 0.4 vvm dan Berbagai Kecepatan Agitasi.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kecepatan agitasi 200 rpm menghasilkan enzim dengan aktivitas tertinggi. Aktivitas enzim tertinggi pada kecepatan agitasi 200 rpm dicapai pada jam ke-24 dengan nilai 711.590 U/ml. Kecepatan agitasi 150 rpm memberikan aktivitas enzim tertinggi pada jam ke-24 dengan nilai 691.422 U/ml dan kecepatan agitasi 100 rpm menghasilkan aktivitas enzim tertinggi pada jam ke-20 dengan nilai 465.697 U/ml. Berbagai nilai aktivitas enzim tertinggi dicapai pada jam ke-20 sampai jam ke-24. Hasil ini sesuai dengan penelitian Stredansky *et.al.* (1993) yang menyatakan bahwa

aktivitas tertinggi α -amilase dari *Bacillus licheniformis* dicapai pada jam ke-26 (kultivasi sistem *fed-batch* dengan kontrol sistem *batch*), setelah jam ke-26 terdeteksi adanya protease sehingga aktivitas tidak hanya stasioner tetapi menurun dengan tajam. Penurunan aktivitas enzim terjadi karena gugus amino dari enzim akan dikonsumsi oleh protease yang terbentuk. Laju aerasi 0.8 vvm memberikan hasil dengan pola yang tidak jauh berbeda seperti disajikan dalam Gambar 21, data hasil perhitungan disajikan dalam Lampiran 9.



Gambar 21. Kurva Aktivitas Amilase pada Laju Aerasi 0.8 vvm dan Berbagai Kecepatan Agitasi.

Aktivitas enzim tertinggi pada kecepatan agitasi 200 rpm dicapai pada jam ke-20 dengan nilai 740.083 U/ml. Kecepatan agitasi 150 rpm menghasilkan aktivitas enzim tertinggi pada jam ke-16 dengan nilai sebesar 704.929 U/ml dan kecepatan agitasi 100 rpm menghasilkan aktivitas enzim tertinggi pada jam ke-16 dengan nilai 567.274 U/ml. Hasil tersebut relatif lebih besar dibandingkan dengan hasil yang dicapai pada laju aerasi 0.4 vvm terutama pada kecepatan



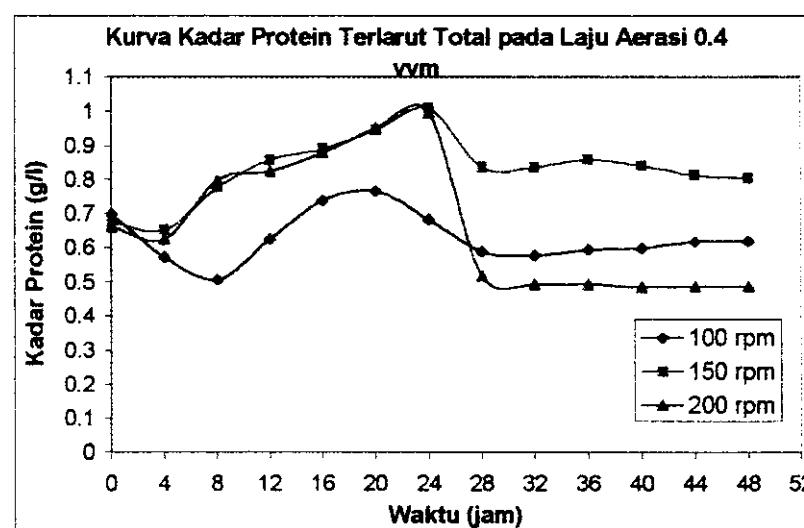
agitasi 200 rpm yang memberikan hasil tertinggi. Fenomena ini menunjukkan peningkatan laju aerasi dan kecepatan agitasi akan meningkatkan ketersediaan udara dan kelarutan yang lebih merata. Fase lag dapat diperpendek pada laju aerasi yang diperbesar seperti hasil yang diperoleh pada kerapatan optik dan bobot biomassa kering.

Hasil aktivitas enzim tertinggi (740.083 U/ml) tidak terlalu jauh berbeda jika dibandingkan hasil penelitian Yoo *et. al.* (1988), yaitu produksi α -amilase dari *Bacillus amyloliquefaciens* mempunyai aktivitas tertinggi 870 U/ml (17.554 persen lebih rendah). Namun demikian, hasil ini masih lebih tinggi jika dibandingkan dengan penelitian Yusuf (1999) yang menghasilkan aktivitas enzim sebesar 631.1 U/ml (menggunakan bakteri termofilik isolat lokal TVII₆), atau 17.269 persen lebih tinggi. Aktivitas enzim yang lebih baik didapatkan karena media pertumbuhan MII₁₀ mengandung 1 g/l ekstrak khamir, sedangkan media pertumbuhan TVII₆ hanya mengandung 0.5 g/l ekstrak khamir. Peningkatan jumlah ekstrak khamir ini menyebabkan koenzim tersedia dalam jumlah yang lebih banyak, sehingga aktivitas enzim dapat ditingkatkan. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian Yoo *et. al.* (1988) yang menggunakan *Bacillus amyloliquefaciens* dalam produksi α -amilase. Penghilangan senyawa ekstrak khamir akan menurunkan aktivitas enzim secara drastis yaitu dari 870 U/ml menjadi hanya 115 U/ml. Efek kedua dari penghilangan ekstrak khamir adalah waktu fase adaptasi menjadi lebih lama yaitu dari 5 jam pada media



yang mengandung ekstrak khamir, menjadi 5-10 jam dengan media tanpa ekstrak khamir.

Aktivitas enzim terdeteksi karena enzim telah diproduksi oleh mikroba. Parameter penentuan produksi enzim dilakukan dengan mengukur kadar protein terlarut total. Hasil penentuan kadar protein terlarut total untuk laju aerasi 0.4 vvm disajikan dalam Gambar 22, data hasil pengamatan disajikan dalam Lampiran 10.



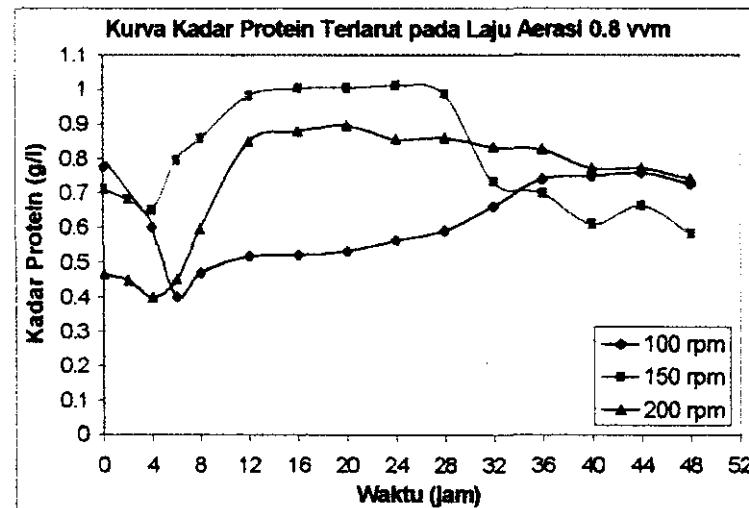
Gambar 22. Kurva Kadar Protein Total pada Laju Aerasi 0.4 vvm dan Berbagai Kecepatan Agitasi.

Hasil analisa tersebut menyatakan bahwa pada fase adaptasi terjadi penurunan kadar protein terlarut total. Kenyataan ini menunjukkan protein yang terkandung dalam media dikonsumsi oleh mikroba untuk pemeliharaan selama melakukan pembelahan sel. Kecenderungan peningkatan kadar protein terlarut total menunjukkan pola yang sama dengan kurva bobot biomassa kering dan kerapatan optik. Aktivitas enzim juga menunjukkan hal yang sama, aktivitas

enzim baru meningkat pada saat memasuki fase eksponensial. Kadar protein terlarut total terdeteksi mulai meningkat pada awal fase eksponensial, enzim diproduksi dalam jumlah yang besar pada fase ini. Fenomena ini memperlihatkan bahwa α -amilase merupakan produk metabolit primer yang berasosiasi dengan pertumbuhan karena produk digunakan untuk kelangsungan hidup sel dalam mendegradasi pati sebagai substrat.

Penurunan kadar protein terlarut total pada awal fase adaptasi dikarenakan *B. licheniformis* juga dikenal secara umum menghasilkan protease serin, sehingga pada awal fase protease telah aktif. Protease menjadi aktif karena sumber nitrogen dalam media berbentuk polipeptida (dikandung oleh bakto tripton dan ekstrak khamir). Kadar protein terlarut total terbaik dicapai pada kecepatan agitasi 200 rpm dengan kadar protein sebesar 0.372 g/l. Kecepatan agitasi 150 rpm menghasilkan kadar protein sebesar 0.354 g/l dan kecepatan agitasi 100 rpm menghasilkan kadar protein terendah yaitu sebesar 0.259 g/l. Hasil tersebut menunjukkan bahwa semakin tinggi kecepatan agitasi maka semakin tinggi pula kadar protein terlarut total yang dihasilkan, artinya semakin tinggi rendemen enzim yang diperoleh. Pola yang sama juga terlihat pada laju aerasi 0.8 vvm seperti disajikan dalam Gambar 23, data hasil pengamatan disajikan dalam Lampiran 10.





Gambar 23. Kurva Kadar Protein Total pada Laju Aerasi 0.8 vvm dan Berbagai Kecepatan Agitasi.

Kadar protein tertinggi didapatkan pada kecepatan agitasi 200 rpm yaitu sebesar 0.480 g/l. Kecepatan agitasi 150 rpm memberikan kadar protein 0.352 g/l. Kadar protein terendah terjadi pada kecepatan agitasi 100 rpm yaitu sebesar 0.339 g/l. Hasil tertinggi pada semua perlakuan didapatkan pada laju aerasi 0.8 vvm dan kecepatan agitasi 200 rpm. Laju aerasi yang diperbesar dan kecepatan agitasi dipercepat akan menyebabkan kelarutan oksigen semakin tinggi. Ketersediaan oksigen yang tinggi menyebabkan rendemen semakin tinggi pula, hasil yang serupa telah disajikan dalam kurva kerapatan optik, bobot biomassa kering dan aktivitas enzim.

Berbagai analisa tersebut menegaskan bahwa kombinasi laju aerasi 0.8 vvm dan kecepatan agitasi 200 rpm merupakan kombinasi terbaik untuk produksi α -amilase dari isolat MII₁₀ (*Bacillus licheniformis*). Dasar pemilihan utama adalah kadar protein terlarut total tertinggi (kuantitasi enzim yang

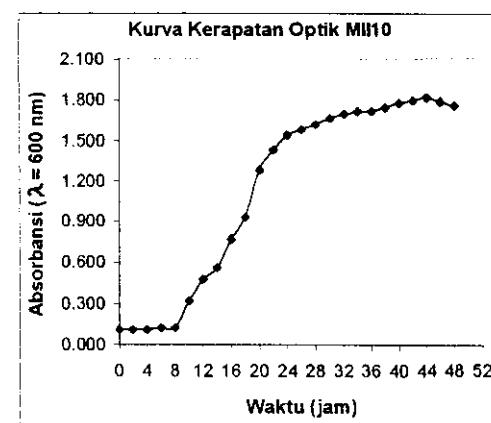


terbentuk) dan aktivitas enzim tertinggi. Kondisi operasi inilah yang digunakan untuk penentuan parameter kinetika kultivasi dan konsumsi energi impeler pada bioreaktor selama proses.

C. PENENTUAN PARAMETER KINETIKA KULTIVASI

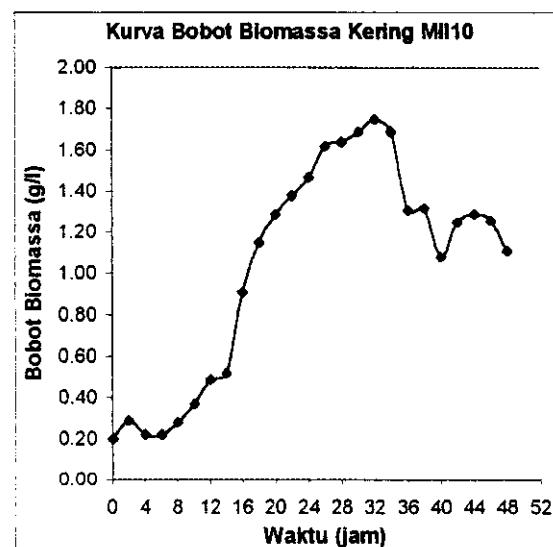
Penentuan parameter kinetika dilakukan dalam kondisi proses yang sama dengan penentuan agitasi dan aerasi optimum. Kadar pati yang digunakan adalah 1 persen dengan kecepatan putar agitasi 200 rpm dan laju aerasi 0.8 vvm. Pengambilan contoh diperketat tiap dua jam sekali dengan harapan dapat menggambarkan kondisi proses secara lebih mendalam.

Kinetika menggambarkan pertumbuhan dan pembentukan produk oleh mikroba. Pertumbuhan dicirikan dengan waktu yang dibutuhkan untuk menggandakan massa atau jumlah sel. Jumlah sel sangat sulit metode penentuannya sehingga pada umumnya pertumbuhan sel dinyatakan melalui massa sel. Hasil pengamatan terhadap kerapatan optik disajikan dalam Gambar 24, data hasil pengamatan disajikan dalam Lampiran 14.



Gambar 24. Kurva Kerapatan Optik MII₁₀ pada Penentuan Parameter Kinetika.

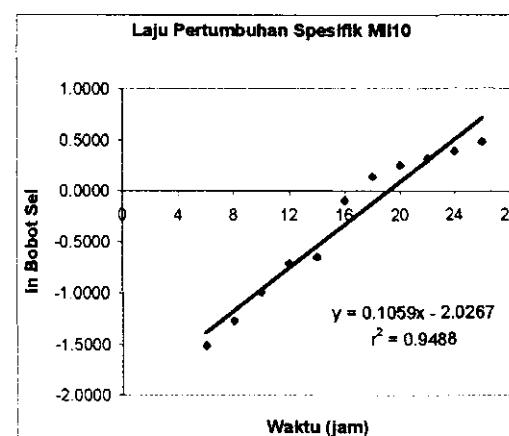
Kurva kerapatan optik tersebut menunjukkan fase adaptasi berlangsung sampai jam ke-8. Fase tersebut digunakan sel untuk melakukan pembelahan dan pemeliharaan, sel mempersiapkan diri melakukan metabolisme pada fase berikutnya. Fase eksponensial berlangsung dari jam ke-8 sampai jam ke-28, setelah jam ke-28 terjadi deselerasi pertumbuhan sel menuju fase stasioner. Jam-jam akhir terlihat masih menunjukkan kekeruhan yang meningkat. Perubahan kekeruhan yang terjadi seiring dengan waktu tidaklah begitu besar. Pola yang sama ditunjukkan pada kurva bobot biomassa kering seperti disajikan dalam Gambar 25, data hasil pengamatan disajikan dalam Lampiran 14.



Gambar 25. Kurva Bobot Biomassa Kering MII₁₀ pada Penentuan Parameter Kinetika.

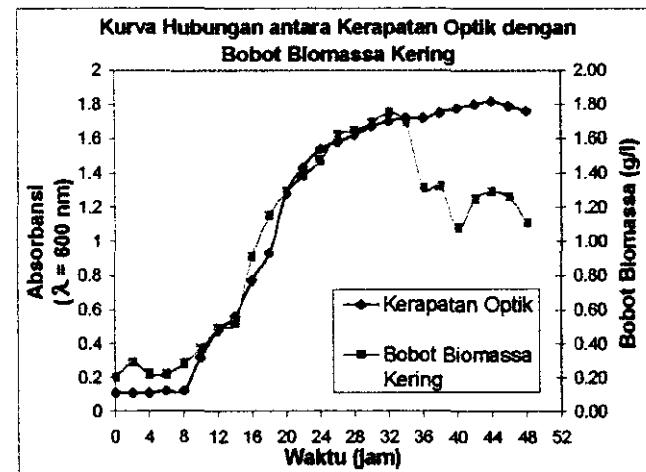
Kurva tersebut menunjukkan bahwa fase adaptasi berlangsung sampai jam ke-6. Akselerasi menuju fase eksponensial terjadi setelah jam ke-6 dan mencapai puncaknya pada jam ke-32 dengan bobot sel kering tertinggi (X_{maks}) sebesar 1.75 g/l. Jam ke-28 merupakan puncak fase eksponensial yang dilanjutkan kepada fase

kematian. Fase kematian disebabkan karena ketahanan hidup sel menurun akibat dari akumulasi berbagai produk metabolit dan inhibitor. Fase ini mengakibatkan sebagian sel lisis dan massa sel menurun. Selama fase eksponensial, laju pertumbuhan spesifik konstan dengan keadaan pertumbuhan yang mantap. Laju pertumbuhan spesifik (μ) ditentukan dengan persamaan (1). Penentuan nilai μ ini disajikan dalam Gambar 26, data hasil perhitungan disajikan dalam Lampiran 15.



Gambar 26. Kurva Penentuan Laju Pertumbuhan Spesifik MII₁₀.

Perhitungan tersebut memberikan nilai μ sebesar 0.1059/jam, dengan waktu ganda sel (td) sebesar 6.544 jam. Waktu ganda sel adalah waktu yang dibutuhkan oleh sel untuk memperbanyak diri dua kali dari jumlah atau bobot semula ($X_2 = 2X_1$). Laju pertumbuhan spesifik maksimum (μ_{maks}) besarnya sama dengan nilai μ karena nilai μ didapatkan pada fase eksponensial, fase dimana sel mengalami pertumbuhan maksimal. Kurva kerapatan optik dengan kurva bobot biomassa kering mempunyai kecenderungan pola yang sama seperti disajikan dalam Gambar 27, data hasil pengamatan disajikan dalam Lampiran 14.

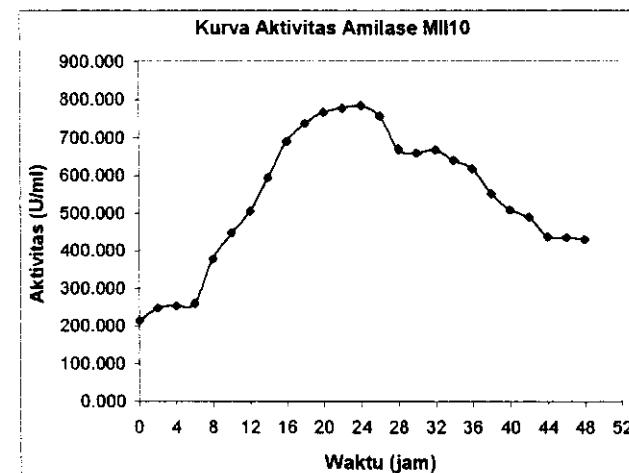


Gambar 27. Hubungan antara Kerapatan Optik dengan Bobot Biomassa Kering MII₁₀.

Perbedaan kedua kurva terjadi setelah fase eksponensial. Kerapatan optik menunjukkan fase selanjutnya adalah fase stasioner, namun pada kurva bobot biomassa kering terjadi fase kematian. Kerapatan optik yang terlihat konstan terjadi karena pada pembacaan *optical density* (OD) tersebut tidak hanya massa sel saja yang terbaca, namun berbagai hasil metabolisme sel ikut terbaca (amilase yang terbentuk dan hasil metabolit lain seperti protease). Kondisi ini mengakibatkan kurva kerapatan optik masih menunjukkan fase stasioner. Sementara itu menurut Sa'id (1987) kurva bobot biomassa kering menurun karena sebagian massa sel mengalami lisis (memasuki fase kematian).

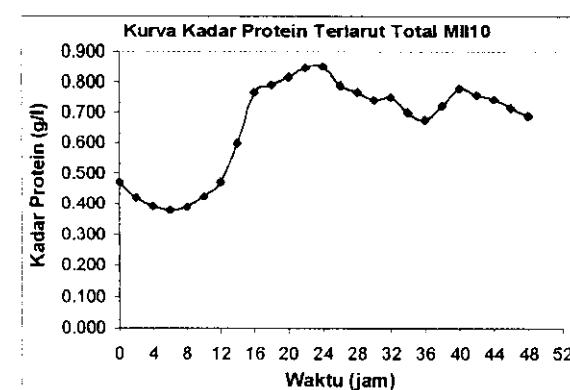
Fase eksponensial terjadi dengan aktivitas enzim yang tinggi. Sumber karbon akan dikonsumsi dengan cepat pada fase ini, oleh karena itu enzim akan aktif dengan kondisi yang paling baik untuk memecah pati. Monomer pati dimanfaatkan oleh sel sebagai penghasil energi guna pertumbuhannya. Kurva

aktivitas enzim disajikan dalam Gambar 28, data hasil pengamatan disajikan dalam Lampiran 14.



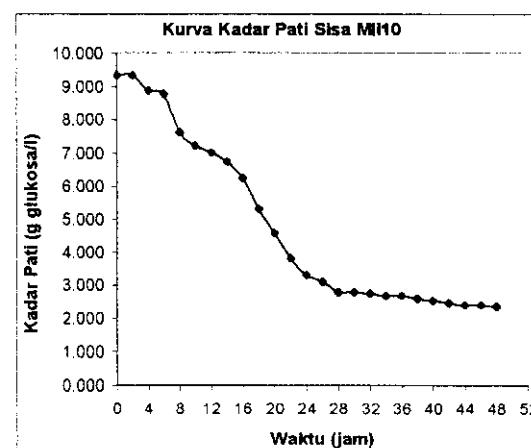
Gambar 28. Kurva Aktivitas α -Amilase MII₁₀.

Kurva tersebut menunjukkan fase adaptasi dicapai sampai jam ke-8. Fase eksponensial mencapai puncak pada jam ke-24 dengan aktivitas sebesar 783.1 U/ml. Jumlah enzim yang terbentuk ditentukan dengan pendekatan kadar protein terlarut total seperti disajikan dalam Gambar 29, data hasil pengamatan disajikan dalam Lampiran 14.



Gambar 29. Kurva Kadar Protein Terlarut Total MII₁₀.

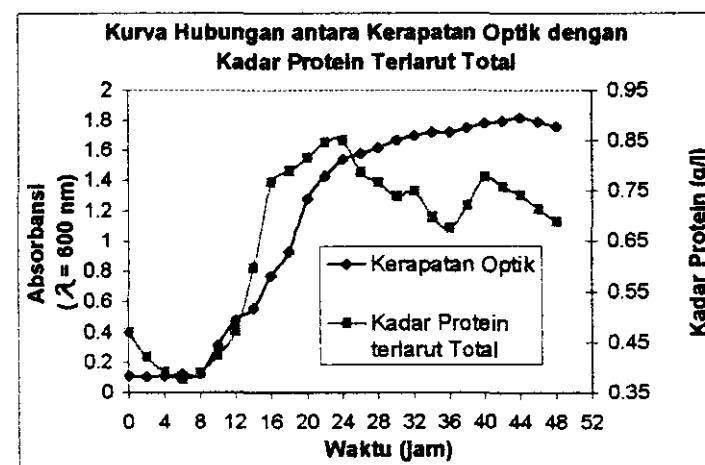
Kurva kadar protein terlarut total menunjukkan kecenderungan pola yang sama dengan kurva aktivitas enzim. Fenomena ini menegaskan bahwa pada fase eksponensial sel akan diproduksi dalam jumlah yang besar. Sel akan mengeluarkan produk metabolit yang digunakan untuk membantu pertumbuhannya yaitu amilase. Pengeluaran enzim terlihat dengan peningkatan kadar protein terlarut total dan diikuti dengan aktivitas enzim yang meningkat pula secara tajam. Bersamaan dengan produksi enzim, pati terdegradasi secara cepat. Glukosa hasil degradasi dikonsumsi dengan laju yang sama cepatnya dengan laju pertumbuhan sel. Fenomena ini diilustrasikan dengan penurunan kadar pati sisa seperti disajikan dalam Gambar 30, data hasil pengamatan disajikan dalam Lampiran 14.



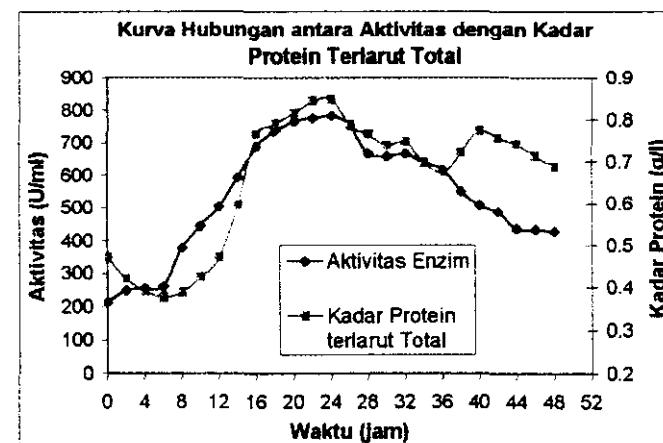
Gambar 30. Kurva Penurunan Kadar Pati Sisa dalam Media Kultivasi MII₁₀.

Kurva kadar pati sisa menunjukkan penurunan drastis mulai dari jam ke-8 sampai jam ke-28. Penurunan konsentrasi pati berjalan seiring dengan laju pertumbuhan cepat massa sel dan produk metabolit berupa α -amilase. Berbagai fenomena ini mempertegas bahwa α -amilase merupakan produk metabolit primer

yang berasosiasi dengan pertumbuhan. Pembentukan α -amilase terjadi pada awal fase eksponensial, artinya α -amilase mutlak diperlukan oleh sel untuk kelangsungan hidupnya. Kurva hubungan kadar protein total dengan kerapatan optik yang menunjukkan fenomena tersebut disajikan dalam Gambar 31. Hubungan kadar protein terlarut total dengan aktivitas α -amilase yang menegaskan bahwa enzim yang terbentuk memang α -amilase disajikan dalam Gambar 32, sedangkan data hasil pengamatan disajikan dalam Lampiran 14.

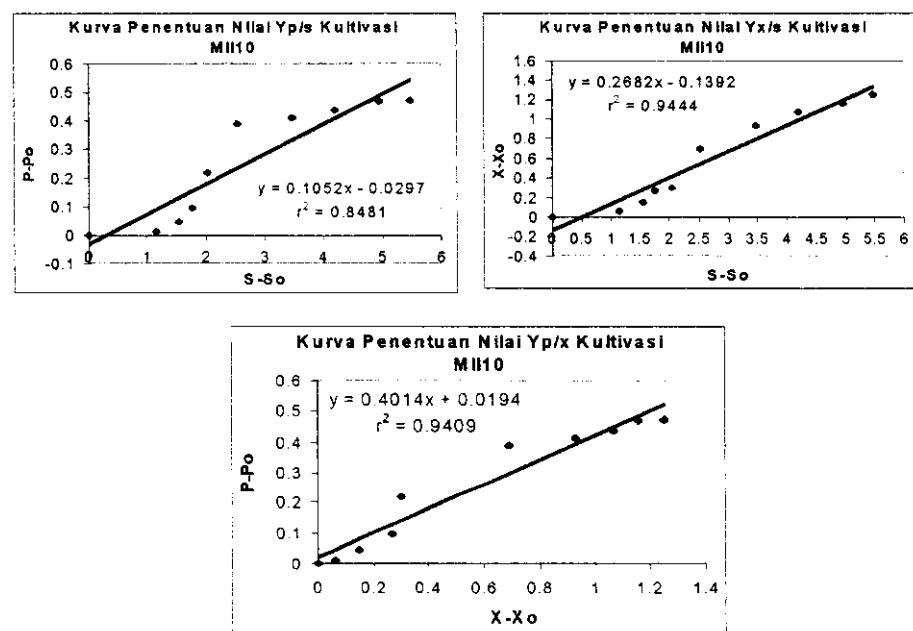


Gambar 31. Kurva Hubungan antara Kerapatan Optik dengan Kadar Protein Terlarut Total MII₁₀.



Gambar 32. Kurva Hubungan antara Aktivitas Enzim dengan Kadar Protein Terlarut Total MII₁₀.

Berbagai kurva tersebut menunjukkan bahwa pertumbuhan dan pembentukan produk berhubungan erat dengan penggunaan substrat. Eratnya hubungan tergantung pada kontrol pengaturan metabolisme sel. Fenomena ini disajikan melalui kesetimbangan–kesetimbangan bahan untuk pertumbuhan, penggunaan substrat dan pembentukan produk. Efisiensi dari ketiga parameter kesetimbangan ini dinyatakan melalui rendemen yaitu $Y_{P/S}$, $Y_{X/S}$ dan $Y_{P/X}$. Nilai ketiga parameter tersebut dihitung berdasarkan persamaan Monod (1949), perhitungan ketiga parameter tersebut disajikan dalam Gambar 33, data hasil perhitungan disajikan dalam Lampiran 16.



Gambar 33. Kurva Linear Penentuan Nilai $Y_{P/S}$, $Y_{X/S}$ dan $Y_{P/X}$ Kultivasi MII₁₀.

Kemiringan ketiga kurva linear tersebut memberikan nilai-nilai rendemen yaitu $Y_{P/S}$ sebesar 0.1052 (g protein/g substrat), $Y_{X/S}$ sebesar 0.2682 (g biomassa/g substrat) dan $Y_{P/X}$ sebesar 0.4014 (g protein/g biomassa). Faktor konversi

pembentukan produk dari biomassa yang berasosiasi dengan pertumbuhan dirumuskan berdasarkan persamaan (13). Nilai α didapatkan sebesar 0.4014, α merupakan parameter kinetika pembentukan produk. Hasil perhitungan parameter kinetika secara lengkap disajikan dalam Tabel 7.

Tabel 7. Nilai Parameter Kinetika Kultivasi MII₁₀.

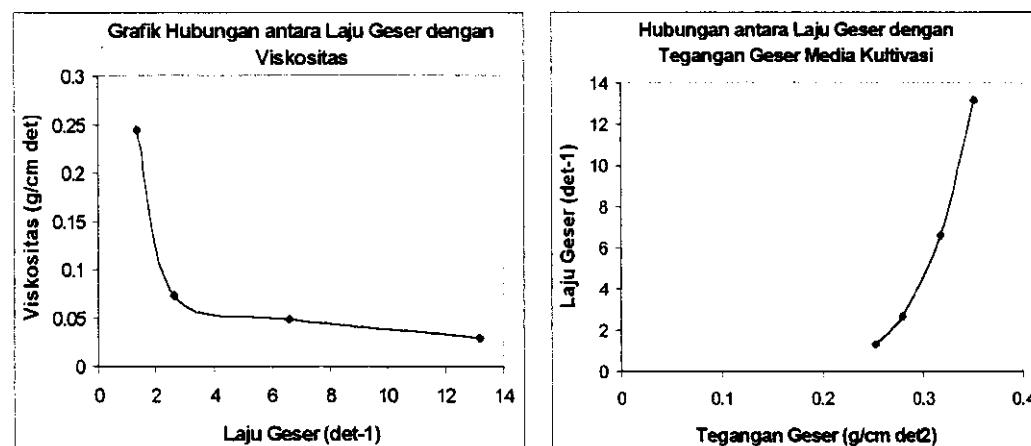
Parameter	Nilai
μ_{maks}	0.1059/jam
X_{maks}	1.75 g sel/l
td	6.544 jam
$Y_{P/S}$	0.1052 g protein/g substrat
$Y_{X/S}$	0.2682 g sel/g substrat
$Y_{P/X}$	0.4014 g protein/g sel
α	0.4014

Secara garis besar Tabel 7 dapat dijelaskan sebagai berikut, laju pertumbuhan spesifik maksimum hasil kultivasi menunjukkan nilai 0.1059/jam, nilai ini akan dipertahankan dalam skala yang lebih besar, dengan laju tersebut sel mampu memperbanyak diri hingga 1.75 g sel/l di akhir fase eksponensial. Perbanyakan sel pada fase eksponensial untuk mencapai dua kali jumlah sel semula diperlukan waktu sebesar 6.544 jam. Nilai $Y_{P/S}$ menunjukkan efisiensi pembentukan produk (enzim) berdasarkan konsumsi substrat adalah sebesar 0.1052 g produk/g substrat. Nilai-nilai $Y_{P/X}$ dan $Y_{X/S}$ juga menunjukkan efisiensi proses kultivasi, efisiensi pembentukan produk (enzim) oleh biomassa sebesar 0.4014 g produk/g biomassa, sedangkan efisiensi pembentukan biomassa berdasarkan substrat yang dikonsumsi sebesar 0.2682 g biomassa/g substrat. Nilai α menunjukkan faktor konversi produk metabolit primer dari biomassa yang dalam penelitian ini didapatkan nilai sebesar 0.4014.



C. SIFAT REOLOGI MEDIA DAN KONSUMSI ENERGI

Data penentuan sifat reologi cairan kultivasi disajikan pada Lampiran 17 dan hubungan ini disajikan dalam Gambar 34.



Gambar 34. Sifat Reologi Cairan Kultivasi MII₁₀.

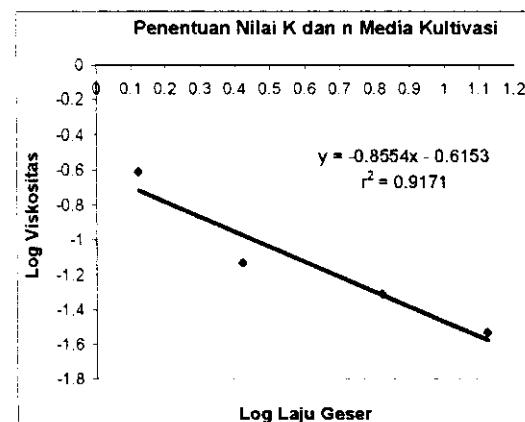
Hasil tersebut menunjukkan cairan kultivasi (pada awal kultivasi) merupakan cairan bukan-Newtonian karena kekentalan cairan akan berubah dengan perubahan laju geser (γ). Hubungan antara laju geser dengan tegangan geser semakin menegaskan bahwa cairan kultivasi mengikuti pola aliran cairan pseudoplastis. Kekentalan cairan akan semakin turun dengan peningkatan laju geser dan laju geser akan semakin tinggi dengan peningkatan tegangan geser. Kultivasi produksi amilase berlangsung dengan reologi yang kompleks, pada awal kultivasi cairan bersifat pseudoplastis (non-Newtonian), namun pada jam ke-22 ke atas cairan kultivasi berubah menjadi cairan yang bersifat Newtonian. Fenomena ini terjadi karena pada jam ke-22 ke atas cairan sudah tidak mengandung pati lagi, sehingga substrat yang ada hanyalah glukosa atau maltosa. Kesimpulan ini didapatkan dari

hasil penetesan pereaksi iodine dalam contoh yang diambil setiap 2 jam. Pada jam ke-0 sampai jam ke-16 cairan kultivasi berwarna biru jika ditetesi pereaksi iodine. Hasil tersebut menunjukkan adanya pati dalam cairan. Penetesan pereaksi iodine pada jam ke-18 sampai jam ke-22 memberikan warna coklat, menunjukkan cairan masih mengandung oligosakarida. Sedangkan jam ke-22 ke atas penetesan pereaksi iodine tidak akan memberikan efek perubahan warna pada cairan, artinya substrat dalam cairan kultivasi hanya tinggal gula sederhana saja.

Penggandaan skala dilakukan dengan tetap mempertahankan rasio P/V yaitu input tenaga per volume kerja. Tenaga yang dikonsumsi (P), dapat diketahui dengan mengetahui bilangan Reynolds. Cairan mengikuti pola cairan bukan-Newtonian, maka perhitungan bilangan Reynolds harus memperhatikan tetapan K (indeks konsistensi) dan n indeks perilaku cairan. Kedua tetapan ini ditentukan dengan persamaan (17). Plot linear antara log laju geser dengan log kekentalan akan memberikan kemiringan kurva sebagai $n-1$ dan intersep sebagai antilog nilai K. Perhitungan matematis menghasilkan nilai n sebesar 0.145 dan nilai K sebesar 0.242 ($\text{g cm}^{-1} \text{ det}^{n+2}$). Nilai n berada pada kisaran $0 < n < 1$ dan $K > 0$ maka cairan kultivasi adalah pseudoplastis. Plot linear penentuan nilai K dan n disajikan dalam Gambar 35, data hasil perhitungan disajikan dalam Lampiran 17.

Densitas cairan ditentukan dengan alat piknometer dan menghasilkan nilai sebesar 1.202 g/cm^3 . Bilangan Reynolds (NRe) ditentukan dengan persamaan (18) dan menghasilkan nilai sebesar $11\ 311.304 \approx 11\ 300$, data geometris yang diperlukan untuk perhitungan disajikan dalam Lampiran 18, sedangkan perhitungan





Gambar 35. Plot Linear Penentuan Nilai n dan K Media Kultivasi MII₁₀.

NRe dan konsumsi tenaga disajikan dalam Lampiran 19. Jenis aliran dalam tangki tersebut adalah turbulen ($NRe > 10\ 000$). Bilangan Power (Np) ditentukan dengan memplotkan NRe pada kurva Fungsi Power versus NRe untuk *six bladed disc turbine impeller* dengan *4 baffle* (Lampiran 20) dan didapatkan nilai $Np = 4.5$. Konsumsi tenaga yang dibutuhkan bioreaktor untuk menggerakkan impelernya sebesar 1.974×10^4 HP. Visualisasi isolat MII₁₀ yang digunakan disajikan dalam Lampiran 21, sedangkan bioreaktor Biostat-B, tipe impeler, serta sistem agitasi dan aerasi bioreaktor disajikan dalam Lampiran 22 dan Lampiran 23.

Nilai konsumsi tenaga per unit volume dipertahankan pada penggandaan skala. Desain bioreaktor menjadi faktor yang sangat penting karena cairan kultivasi bersifat kompleks. Kompleksitas cairan ini disebabkan berubahnya sifat reologi cairan kultivasi dari pseudoplastis (non-Newtonian) menjadi Newtonian karena peruraian pati menjadi monomernya akibat aktivitas amilase.



V. KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

Optimasi pemerkayaan substrat dengan pati tapioka berkadar 1 sampai 4 persen memberikan aktivitas enzim dan protein terlarut total yang tidak berbeda banyak, namun perbedaan viskositas cairan kultivasi sangat ekstrim. Viskositas yang meningkat dapat menyebabkan media mempunyai sifat reologi yang semakin kompleks. Berdasarkan pertimbangan ekonomis dan teknis, media yang dipilih adalah media dengan kadar pati 1 persen. Aktivitas enzim yang diperoleh sebesar 992.727 unit/ml, kadar protein terlarut total sebesar 0.340 g/l dan viskositas media sebesar 16.5 cP.

Media dengan konsentrasi pati terpilih yaitu sebesar 1 persen tersebut digunakan dalam proses optimasi kecepatan agitasi dan laju aerasi. Kombinasi kecepatan agitasi 200 rpm dan laju aerasi 0.8 vvm ternyata memberikan hasil terbaik, yang menghasilkan bobot biomassa kering tertinggi sebesar 1.75 g/l, aktivitas enzim sebesar 740.083 U/ml dan kadar protein terlarut total sebesar 0.48 g/l. Pemilihan kombinasi lebih ditekankan kepada aktivitas enzim dan kadar protein terlarut total karena produk yang diinginkan adalah α -amilase.

Fase eksponensial berjalan dari jam ke-6 sampai jam ke-26. Nilai X_{maks} (bobot biomassa tertinggi) diperoleh sebesar 1.75 g/l pada jam ke-32, μ_{maks} (laju pertumbuhan spesifik maksimum) sebesar 0.1059/jam, $Y_{P/S}$ didapatkan sebesar 0.1052 g protein/g substrat, $Y_{P/X}$ sebesar 0.4014 g protein/g biomassa, $Y_{X/S}$ sebesar

0.2682 g biomassa/g substrat, dan α (faktor konversi produk dari biomassa terbentuk) diperoleh sebesar 0.4014.

Sifat cairan kultivasi mengikuti sifat cairan bukan-Newtonian. Tetapan K (indeks konsistensi) diperoleh sebesar $0.242 \text{ (g cm}^{-1} \text{ det}^{n+2}\text{)}$ dan nilai n (indeks perilaku cairan) sebesar 0.145. Nilai n berada pada kisaran $0 < n < 1$ dan $K > 0$ sehingga cairan kultivasi termasuk pseudoplastis. Perhitungan bilangan Reynolds (NRe) memberikan nilai $11\ 311.304 \approx 11\ 300$, artinya aliran cairan dalam tangki bersifat turbulen ($NRe > 10\ 000$). Konsumsi energi yang dibutuhkan impeler sebesar 1.974×10^{-4} HP.

B. SARAN

Perlu dilakukan kajian untuk menghambat protease yang terbentuk selama kultivasi. Protease akan mengganggu aktivitas amilase bahkan dapat mendegradasi gugus protein dari enzim lain (dalam hal ini α -amilase). Kajian ekonomis hasil optimasi juga perlu dilakukan sebelum dilakukan proses penggandaan skala.





DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 1995. More Solutions to Sticky Problems, A Guide to Getting More from Brookfield Viscometer. Brookfield Engineering Laboratories, Inc., Massachusetts.
- Apriyantono, A., D. Fardiaz, N. L. Puspitasari, Sedarwati, S. Budiyanto. 1989. Analisa Pangan. PAU Pangan dan Gizi, IPB, Bogor.
- Atlas, R. M. 1984. Microbiology Fundamentals and Application. MacMillan Publishing Company, New York.
- Bernfeld, P. 1955. Amylases α and β . *di dalam* Method in Enzymology. Vol I : 149-158.
- Biro Pusat Statistik. 1995. Statistik Industri Besar dan Sedang Indonesia. Statistical Year Book of Indonesia, Jakarta.
- Biro Pusat Statistik. 1997. Statistik Indonesia. Statistical Year Book of Indonesia, Jakarta.
- Blevins, W. T. dan N. D. Davis. 1979. Methods for Laboratory Fermentation. *di dalam* H. J. Peppler dan D. Perlzman (eds.). Microbial Technology, Microbial Process. Vol I. Academic Press, New York.
- Boing, J. T. P. 1982. Enzyme Production. Avi Publishing Company, Inc., West Port.
- Crueger, W. dan A. Crueger. 1982. Biotechnology, A Textbook of Industrial Technology. Science Tech., Inc., Madison.
- Fogarty, W. M. 1983. Microbial Enzymes and Biotechnology. Appl. Sci. Pub., London.
- Frobisher. 1962. Fundamentals of Microbiology. W. B. Saunders Company, London.
- Girindra, A. 1986. Biokimia. Departemen Biokimia. IPB, Bogor.
- Harnby, N., M. F. Edwards dan A. W. Nienow. 1992. Mixing in The Process Industries. Butterworth-Heinemann, Oxford.
- Hartoto, L. dan I. Saillah. 1992. Sistem Bioreaktor. PAU-Biotek, IPB, Bogor.
- Judoamidjojo, R. M., E. G. Sa'id dan L. Hartoto. 1989. Biokonversi. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan-Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi- Pusat Antar Universitas-IPB, Bogor.



- Judoamidjojo, R. M., A. A. Darwis dan E. G. Sa'id. 1992. Teknologi Fermentasi. Rajawali Press, Jakarta.
- Kim, T. U., B. G. Gu., J. Y. Jeong, S. M. Byun dan Y. C. Shin. 1995. Purification and Characteritation of a Maltotetraose-Forming Alkaline α -Amylase from an Alkalophilic *Bacillus* Strain GM8901. *J. Appl. and Environ. Microbiol.* 195 : 3105-3112.
- Kulp, K. 1975. Carbohydrates. *di dalam* G. Reed. (eds.). Enzymes in Food Processing. Academic Press, London.
- Lay, B. W. dan S. Hastowo. 1992. Mikrobiologi. Rajawali Press, Jakarta.
- Lay, B. W. 1994. Analisis Mikroba di Laboratorium. PT. Raja Grafindo Persada, Jakarta.
- Lowry, O. H., N. P. J. Rosebrough, A. L. Farr dan R. J. Randall. 1951. Protein Mesurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biochem.* 193 : 265-275.
- Machfud, E. G. Sa'id, Krisnani. 1989. Fermentor. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi-IPB, Bogor.
- Moat, G. A. 1979. Microbial Physiology. *di dalam* Judoamidjojo, R. M., E. G. Sa'id dan L. Hartoto. 1989. Biokonversi. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan-Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi- Pusat Antar Universitas-IPB, Bogor.
- Monod, J. 1949. The Growth of Bacterial Cultures. *di dalam* Mangunwidjadja, D. dan A. Suryani. 1994. Teknologi Bioproses. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Nanmori, T. 1988. Bacterial α -Amylases. *di dalam* The Amylase Research Society of Japan, ed. Handbook of Amylases and Related Enzymes. Pergamon Press, Oxford.
- Prave, P., U. Faust, W. Sittig dan D. A. Sukatsch. 1987. Fundamentals of Biotechnology. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- Rachman, A. 1989. Pengantar Teknologi Fermentasi. Pusat Antar Universitas-IPB, Bogor.
- Rao, V. B., N. V. S. Sastri dan P. V. S. Rao. 1981. Purification and Characteritation of Thermostable Glucoamylase from Thermophilic Fungus *Thermomyces lanuginosus*. *J. Biochem.* 193 : 379-387.

- Rhem, H. J. dan G. Reed. 1981. Biotechnology Vol. 1, Microbial Fundamentals. *di dalam* Judoamidjojo, R. M., E. G. Sa'id dan L. Hartoto. 1989. Biokonversi. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan-Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi-Pusat Antar Universitas-IPB, Bogor.
- Sa'id, E. G. 1987. Bioindustri, Penerapan Teknologi Fermentasi. PT. Mediyatama Sarana Perkasa, Jakarta.
- Sa'id, E. G. 1987. Pengantar Bioindustri. *di dalam* Judoamidjojo, R. M., E. G. Sa'id dan L. Hartoto. 1989. Biokonversi. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan-Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi- Pusat Antar Universitas-IPB, Bogor.
- Sikyta, B. 1983. Methods in Industrial Microbiology. Publisher-Chichester, England.
- Stanbury, P. F. dan A. Whitaker. 1984. Principles of Fermentation Technology. Pergamon Press, London.
- Stredansky, M., R. Svore, E. Sturdik dan K. Dercova. 1993. Repeated Batch α -Amylase Production in Aqueous Two-Phase System With *Bacillus* Strain. *J. of Biotech.* 27 : 181-190.
- Suhartono, M. T. 1989. Enzim dan Bioteknologi. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan-Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi-Pusat Antar Universitas-IPB, Bogor.
- Trinovia, D. 1997. Enzim Amilase dari Beberapa Strain Bakteri *Indigenous*. *Skripsi*. Jurusan Kimia-Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam-IPB, Bogor.
- Triwiyono, B. 1996. Produksi Enzim Amilolitik Penghidrolisis Pati Mentah oleh *Aspergillus* B-04. *Tesis*. Fakultas Pasca Sarjana IPB, Bogor.
- Wang, D. I. C., C. L. Cooney., A. L. Demain, P. Dunhill, A. E. Humphrey dan M. D. Lily. 1979. Fermentation and Enzyme Technology. John Wiley and Sons, New York.
- Whitaker, J. R. 1972. Principles of Enzymology for The Food Sciences. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Yoo, Y. J., T. W. Cadman, J. Hong dan R. T. Hatch. 1988. Kinetics of α -Amylase Synthesis from *Bacillus amyloliquefaciens*. *J. Biotech. & Bioeng.* 31 : 357-365.
- Yusuf, R. G. M. 1999. Optimasi Konsentrasi Substrat Pati Tapioka, Aerasi dan agitasi pada Produksi Amilase oleh Bakteri Termofil TVII₆. *Skripsi*. Jurusan Teknologi Industri Pertanian-Fateta-IPB, Bogor.





Waka Karya Dikmasional Universitas Pendidikan

1. Dikmasional memiliki tujuan untuk menciptakan dan memproduksi konten:

a. Pengembangan literasi sains melalui penelitian, penulisan, kerja sama, seminar, presentasi, laporan, mendidik kruak atau diktirat.

b. Pengembangan tidak mengungkapkan kepentingan yang besar bagi Universitas

2. Dikmasional mengungkapkan bahwa pengembangan konten adalah kewajiban bagi IPB University.

LAMPIRAN



Lampiran 1. Prosedur Analisis Hasil Panen.

1. Biomassa

a. Kerapatan Optik

Kerapatan optik hasil panen ditentukan dengan menggunakan alat spektrofotometer. Kerapatan optik diukur pada panjang gelombang 600 nm. Blanko yang digunakan adalah media steril.

Setelah pengukuran kerapatan optik, hasil panen disentrifus dengan kecepatan 4000 rpm selama 30 menit dan suhu 4 °C. Proses ini memisahkan endapan (biomassa) dan supernatannya. Supernatan yang diperoleh digunakan untuk menghitung aktifitas enzim, protein, dan kadar pati sisa.

b. Bobot Biomassa Kering

Endapan yang berada di dalam tabung sentrifus dimasukkan ke dalam oven suhu 37 °C, tabung tersebut telah ditimbang berat kosongnya terlebih dahulu. Endapan dikeringkan dalam oven selama 3 hari. Tabung ditimbang berat keringnya sampai mencapai bobot konstan untuk memperoleh bobot biomassa kering (g/l).

2. Aktifitas Enzim (Bernfeld, 1955)

Aktifitas enzim diukur dengan menggunakan metode DNS (formulasi media). Sebanyak 0,1 ml supernatan dan 0,9 ml bufer fosfat sitrat pH 7 dimasukkan



ke dalam tabung reaksi. Supernatan diinkubasikan pada suhu 30 °C selama 5 menit. Hasil inkubasi ditambah dengan 2 ml substrat, yaitu 2 persen *soluble starch* dalam bufer fosfat sitrat pH 7. Selanjutnya supernatan dan substrat diinkubasikan lagi pada suhu 30 °C selama 30 menit. Hasilnya ditambah dengan 3 ml DNS dan dimasukkan ke dalam air mendidih selama 5 menit. Proses selanjutnya adalah pendinginan selama ± 15 menit, kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 550 nm menggunakan spektrofotometer. Hal yang sama juga dilakukan pada standar dan blanko.

Sebagai standar digunakan larutan maltosa dengan konsentrasi 0, 500, 1 000, 2 000, 4 000, 8 000, 10 000 dan 15 000 ppm. Blanko yang digunakan adalah akuades. Aktifitas amilase ditentukan dengan perhitungan sebagai berikut :

$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{\text{ppm} \times 1000}{360.32} \times \frac{1}{30} \text{ unit/ml}$$

3. Protein Terlarut Total (Lowry *et. al.*, 1951)

Sebanyak 1 ml supernatan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian supernatan ditambah 5 ml larutan alkaline cooper dan didiamkan selama 10 menit. Setelah itu larutan ditambah 0,5 ml Folin Ciocalteu dan divortex. Larutan didiamkan selama 30 menit, kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 650 nm.

Hal yang sama juga dilakukan pada standar dan blanko. Sebagai standar digunakan standar protein Bovine Serum Albumin (BSA) dengan konsentrasi 100, 200, 300, 400, 600 dan 1000 ppm. Blanko yang digunakan adalah akuades. Protein yang diperoleh dinyatakan dalam satuan g/l.



4. Gula Reduksi (Apriyantono, 1989)

Sebanyak 1 ml supernatan dipipet ke dalam tabung reaksi. Setelah itu ditambahkan 3 ml DNS lalu dipanaskan di penangas air bersuhu 100°C selama 5 menit. Setelah itu didinginkan. Pengenceran 10 kali terhadap sampel dilakukan apabila sampel terlalu pekat. Selanjutnya absorbansi diukur pada panjang gelombang 690 nm menggunakan alat spektrofotometer. Hal yang sama juga dilakukan pada larutan standar dan blanko. Standar digunakan adalah larutan maltosa dengan konsentrasi 1 000, 2 000, 4 000, dan 8 000 ppm. Blanko yang digunakan adalah akuades.

5. Kadar Pati Sisa (Apriyantono, 1989)

Sebanyak 1 ml supernatan dipipet ke dalam tabung reaksi. Setelah itu ditambahkan 0.1 ml HCl 25 persen, mulut tabung reaksi ditutup dengan aluminium foil. Kemudian dipanaskan di penangas air bersuhu 100°C selama 2.5 jam. Setelah itu didinginkan. Selanjutnya dinetralkan dengan menambahkan 0.085 ml NaOH 45 persen. Pengenceran 10 kali terhadap sampel dilakukan apabila sampel terlalu pekat. Selanjutnya kadar pati sisa yang dinyatakan dalam glukosa sisa ditetapkan dengan pengukuran gula reduksi. Hal yang sama juga dilakukan pada larutan standar dan blanko. Standar digunakan adalah larutan glukosa dengan konsentrasi 1 000, 2 000, 4 000, 6 000, 8 000 dan 10 000 ppm. Blanko yang digunakan adalah akuades.





Lampiran 2. Prosedur Pembuatan Pereaksi-Pereaksi.

1. Prosedur Pembuatan Pereaksi DNS (Bernfeld, 1955)

Sebanyak 5 g DNS dilarutkan dalam 100 ml NaOH 2 N sambil diaduk. Kemudian larutan ditambah 250 ml akuades sambil terus diaduk hingga DNS larut. Setelah itu larutan ditambah 150 g Na,K-tartrat, diaduk, kemudian ditepatkan sampai 500 ml dengan menambahkan akuades.

2. Prosedur Pembuatan Pereaksi Metode Lowry *et. al.* (1951)

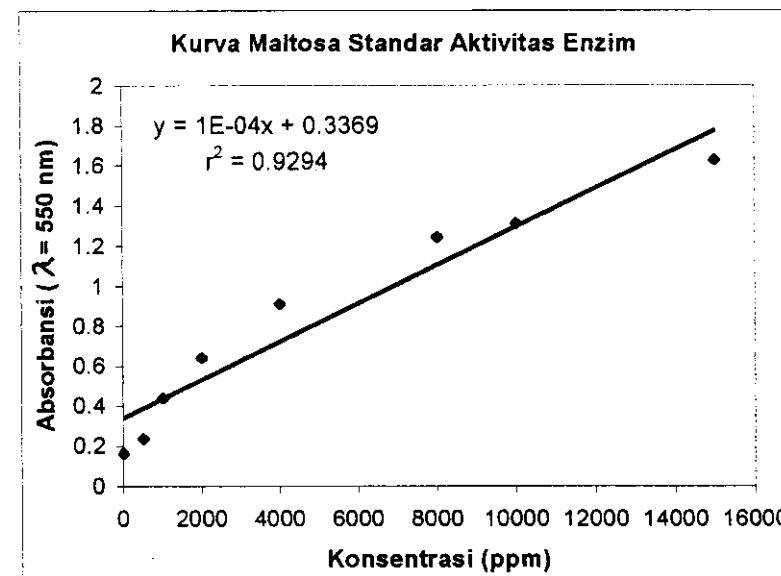
Pereaksi A : 2 persen Natrium bikarbonat anhidrat dalam larutan NaOH 0,1 N.

Pereaksi B : 0,5 persen CuSO₄.5H₂O dalam larutan Na,K-tartrat 1 persen (larutan ini dibuat pada saat akan digunakan).

Pereaksi C : larutan segar yang dibuat dari 50 ml pereaksi A dengan 1 ml perekasi B (disebut juga larutan Cooper Alkaline).

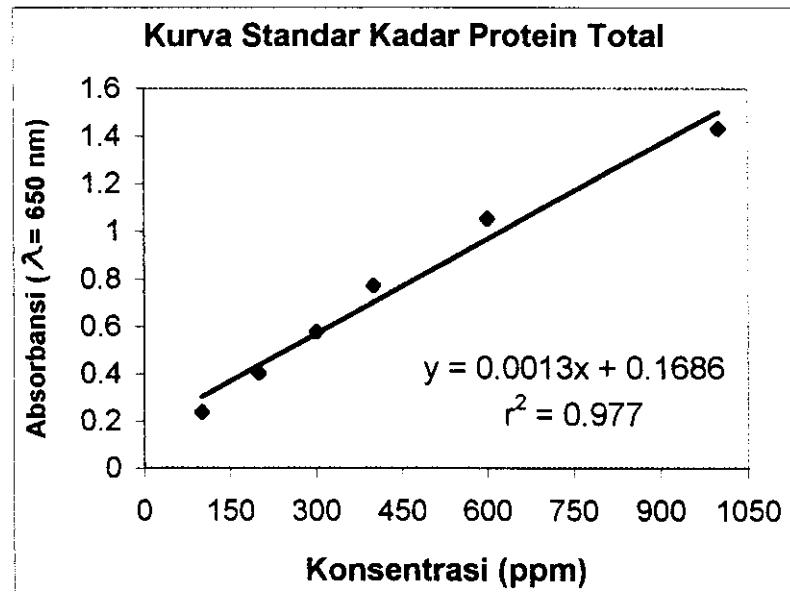
Pereaksi D : Folin Ciocalteu (dengan perbandingan 1 : 1) (Merck).

Lampiran 3. Kurva Standar Maltosa Aktivitas Enzim pada Tahap Optimasi Pemerkayaan Pati Media.



Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
0	0.164
500	0.237
1000	0.439
2000	0.642
4000	0.912
8000	1.244
10000	1.312
15000	1.627

Lampiran 4. Kurva Standar BSA Kadar Protein Terlarut Total pada Tahap Optimasi Pemerkayaan Pati Media.



Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
100	0.237
200	0.403
300	0.578
400	0.772
600	1.051
1000	1.43

Lampiran 5. Data Perbandingan Berbagai Aktivitas Enzim, Kadar Protein Terlarut Total dan Viskositas Media Kultivasi pada Berbagai Konsentrasi Pati.

Konsentrasi Pati	Aktivitas Enzim (U/ml)	
	Ulangan I	Ulangan II
1%	1007.530	977.927
2%	1032.508	1026.032
3%	1175.899	1090.790
4%	1195.326	1170.349

Konsentrasi Pati	Kadar Protein Terlarut Total(g/l)	
	Ulangan I	Ulangan II
1%	0.344	0.336
2%	0.342	0.339
3%	0.352	0.345
4%	0.359	0.35

Konsentrasi Pati	Viskositas (cP)
1%	16.5
2%	150
3%	698
4%	1900



Lampiran 6. Rekapitulasi Data Kerapatan Optik Cairan Kultivasi pada Penentuan Lama Kultivasi.

Waktu (jam)	Absorbansi
0	0.224
2	0.276
4	0.515
6	0.963
8	1.288
10	1.42
12	1.746
14	1.96
16	2.32
18	2.421
20	2.486
22	2.544
24	2.57
26	2.582
28	2.595
30	2.598
32	2.6
34	2.606
36	2.61
38	2.612
40	2.614
42	2.614
44	2.622
46	2.672
48	2.651
50	2.631
52	2.59
54	2.541
56	2.6
58	2.532
60	2.519
62	2.515
64	2.484
66	2.492
68	2.268
70	2.232
72	2.248



Lampiran 7. Rekapitulasi Data Kerapatan Optik Cairan Kultivasi pada Optimasi Kecepatan Agitasi dan Laju Aerasi.

Waktu (jam)	Absorbansi		
	0.4 vvm 100 rpm	0.4 vvm 150 rpm	0.4 vvm 200 rpm
0	0.011	0.135	0.117
4	0.033	0.148	0.106
8	0.031	0.160	0.119
12	0.251	0.559	0.623
16	0.688	0.642	0.891
20	0.963	0.846	1.070
24	1.133	1.130	1.380
28	1.333	1.330	1.540
32	1.393	1.520	1.620
36	1.433	1.580	1.720
40	1.513	1.610	1.800
44	1.513	1.560	1.850
48	1.493	1.445	1.900

Waktu (jam)	Absorbansi		
	0.8 vvm 100 rpm	0.8 vvm 150 rpm	0.8 vvm 200 rpm
0	0.026	0.185	0.090
2		0.160	0.129
4	0.011	0.149	0.136
6	0.031	0.154	0.132
8	0.081	0.255	0.323
12	0.901	0.343	0.457
16	1.041	0.940	0.768
20	1.211	1.290	1.320
24	1.411	1.460	1.480
28	1.431	1.480	1.652
32	1.451	1.500	1.708
36	1.461	1.540	1.712
40	1.511	1.520	1.718
44	1.511	1.560	1.623
48	1.511	1.600	1.663

Lampiran 8. Rekapitulasi Data Bobot Biomassa Kering pada Optimasi Kecepatan Agitasi dan Laju Aerasi.

Waktu (jam)	Bobot Sel Kering (g/l)		
	0.4 vvm 100 rpm	0.4 vvm 150 rpm	0.4 vvm 200 rpm
0	0.280	0.230	0.470
4	0.300	0.300	0.430
8	0.390	0.300	0.360
12	0.450	0.450	0.480
16	0.510	0.650	
20	0.600	0.710	0.720
24		0.940	0.830
28	0.900		0.830
32	0.920	0.630	0.970
36	0.840		1.080
40	0.960	0.620	1.110
44	0.880		1.130
48	0.850	0.590	1.120

Waktu (jam)	Bobot Sel Kering (g/l)		
	0.8 vvm 100 rpm	0.8 vvm 150 rpm	0.8 vvm 200 rpm
0	0.210	0.110	0.200
4	0.200	0.110	0.220
6	0.250	0.100	0.220
8	0.260	0.240	0.380
12	0.560	0.860	0.490
16	0.840	0.980	0.840
20	0.830	1.270	1.210
24	1.250	1.400	1.470
28	1.310	1.370	1.670
32		1.420	1.750
36	1.400	1.430	1.660
40	1.470	1.500	1.590
44	1.360	1.410	1.590
48	1.340	1.440	1.710

Lampiran 9. Rekapitulasi Data Aktivitas Enzim pada Optimasi Kecepatan Agitasi dan Laju Aerasi.

Waktu (jam)	Aktivitas Enzim Pada 0,4 vvm (U/ml)		
	100 rpm	150 rpm	200 rpm
0	43.850	43.850	56.616
4	80.854	21.647	65.867
8	32.749	53.101	75.118
12	241.822	585.961	261.989
16	312.130	678.471	400.755
20	465.697	667.370	530.269
24	432.393	691.422	711.590
28	417.592	552.657	582.075
32	447.195	530.454	524.719
36	452.746	587.811	496.966
40	202.968	511.952	332.297
44	169.664	460.147	263.840
48	29.048	349.134	169.479

Waktu (jam)	Aktivitas Enzim Pada 0,8 vvm (U/ml)		
	100 rpm	150 rpm	200 rpm
0	88.070	114.713	120.263
2		129.515	123.964
4	112.123	210.924	227.575
6	284.192	323.786	364.491
8	395.204	390.394	555.062
12	545.071	494.005	719.731
16	567.274	704.929	734.532
20	539.520	316.385	740.083
24	426.658	275.681	584.665
28	387.803	270.130	473.653
32	332.297	216.474	301.584
36	271.240	175.770	414.446
40	171.329	146.166	384.843
44	117.673	7.401	351.539
48	102.872		260.879

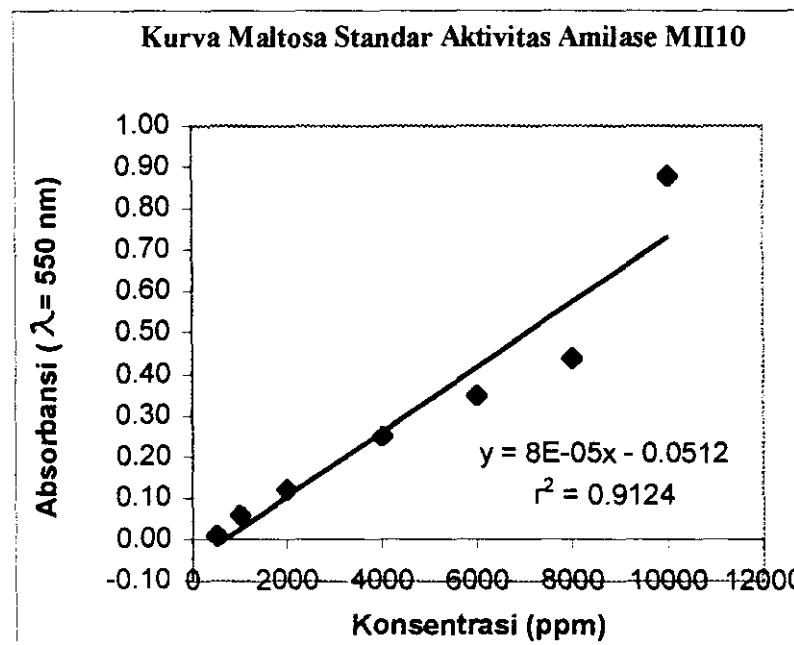


Lampiran 10. Rekapitulasi Data Kadar Protein Terlarut Total pada Optimasi Kecepatan Agitasi dan Laju Aerasi.

Waktu (jam)	Kadar Protein Terlarut Total (g/l)		
	0.4 vvm 100 rpm	0.4 vvm 150 rpm	0.4 vvm 200 rpm
0	0.698	0.675	0.662
4	0.573	0.651	0.624
8	0.507	0.777	0.799
12	0.625	0.857	0.824
16	0.739	0.891	0.880
20	0.766	0.945	0.951
24	0.683	1.009	0.996
28	0.589	0.836	0.518
32	0.578	0.836	0.494
36	0.594	0.859	0.494
40	0.600	0.841	0.485
44	0.618	0.813	0.487
48	0.620	0.804	0.487

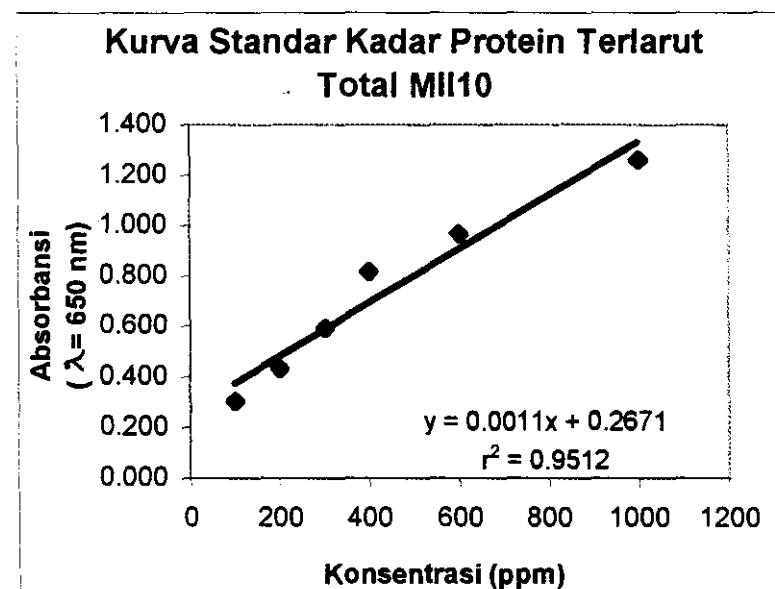
Waktu (jam)	Kadar Protein Terlarut Total (g/l)		
	0.8 vvm 100 rpm	0.8 vvm 150 rpm	0.8 vvm 200 rpm
0	0.775	0.710	0.466
2		0.681	0.449
4	0.602	0.650	0.399
6	0.400	0.794	0.452
8	0.470	0.857	0.597
12	0.517	0.982	0.848
16	0.520	1.002	0.879
20	0.532	1.004	0.894
24	0.563	1.010	0.856
28	0.591	0.986	0.859
32	0.662	0.731	0.833
36	0.739	0.699	0.825
40	0.748	0.609	0.771
44	0.757	0.663	0.771
48	0.726	0.583	0.740

Lampiran 11. Kurva Standar Maltosa Aktivitas Enzim pada Tahap Penentuan Parameter Kinetika Kultivasi.



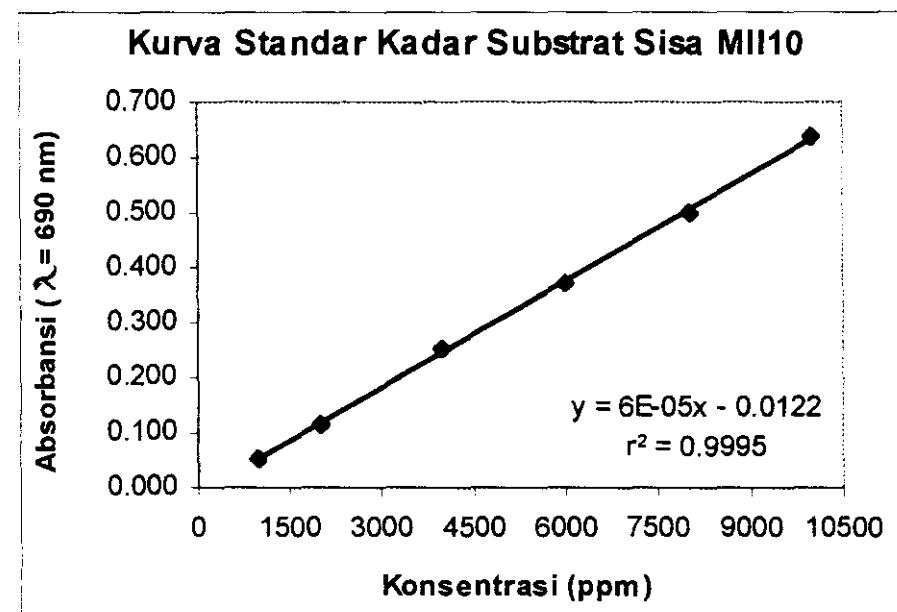
Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
500	0.01
1000	0.06
2000	0.12
4000	0.25
6000	0.35
8000	0.44
10000	0.88

Lampiran 12. Kurva Standar BSA Kadar Protein Terlarut Total pada Tahap Penentuan Parameter Kinetika Kultivasi.



Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
100	0.305
200	0.430
300	0.590
400	0.815
600	0.965
1000	1.259

Lampiran 13. Kurva Standar Glukosa Kadar Substrat Sisa pada Tahap Penentuan Parameter Kinetika Kultivasi.



Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
1000	0.052
2000	0.116
4000	0.254
6000	0.373
8000	0.500
10000	0.640



Lampiran 14. Rekapitulasi Data Penentuan Parameter Kinetika Kultivasi

Waktu (jam)	Absorbansi	Bobot Sel (g/l)	Aktivitas (U/ml)	Kadar Protein (g/l)	Kadar Glukosa Sisa (g/l)
0	0.110	0.200	215.318	0.470	9.337
2	0.109	0.290	247.696	0.420	9.337
4	0.111	0.220	253.478	0.391	8.887
6	0.122	0.220	260.417	0.377	8.770
8	0.123	0.280	378.367	0.389	7.620
10	0.317	0.370	446.594	0.424	7.220
12	0.480	0.490	505.569	0.472	7.003
14	0.562	0.520	594.610	0.596	6.737
16	0.772	0.910	689.433	0.766	6.237
18	0.931	1.150	738.001	0.790	5.303
20	1.280	1.290	766.911	0.815	4.570
22	1.430	1.380	777.318	0.846	3.820
24	1.540	1.470	783.100	0.850	3.303
26	1.580	1.620	756.503	0.787	3.087
28	1.620	1.640	668.619	0.766	2.787
30	1.670	1.690	659.368	0.739	2.787
32	1.700	1.750	667.462	0.749	2.737
34	1.720	1.690	640.866	0.697	2.670
36	1.720	1.310	618.894	0.675	2.670
38	1.750	1.320	551.824	0.721	2.587
40	1.780	1.080	509.038	0.777	2.520
42	1.800	1.250	489.380	0.757	2.453
44	1.820	1.290	437.343	0.742	2.403
46	1.790	1.260	435.030	0.714	2.403
48	1.760	1.110	430.404	0.689	2.353

Lampiran 15. Data Perhitungan Laju Pertumbuhan Spesifik Maksimum (μ_{maks}) pada Penentuan Parameter Kinetika Kultivasi

Waktu (jam)	Bobot Sel Kering (g/l)	Ln Bobot Sel Kering
6	0.220	-1.514
8	0.280	-1.273
10	0.370	-0.994
12	0.490	-0.713
14	0.520	-0.654
16	0.910	-0.094
18	1.150	0.140
20	1.290	0.255
22	1.380	0.322
24	1.470	0.385
26	1.620	0.482



Lampiran 16. Data Perhitungan Nilai Rendemen ($Y_{P/S}$, $Y_{X/S}$ dan $Y_{P/X}$) pada Penentuan Parameter Kinetika Kultivasi

Waktu (jam)	Produk (g/l)	Substrat (g/l)	Biomassa (g/l)	P-Po	S-So	X-Xo
6	0.377	8.770	0.220	0.000	0.000	0.000
8	0.389	7.620	0.280	0.012	1.150	0.060
10	0.424	7.220	0.370	0.047	1.550	0.150
12	0.472	7.003	0.490	0.095	1.767	0.270
14	0.596	6.737	0.520	0.219	2.033	0.300
16	0.766	6.237	0.910	0.389	2.533	0.690
18	0.790	5.303	1.150	0.413	3.467	0.930
20	0.815	4.570	1.290	0.438	4.200	1.070
22	0.846	3.820	1.380	0.469	4.950	1.160
24	0.850	3.303	1.470	0.473	5.467	1.250



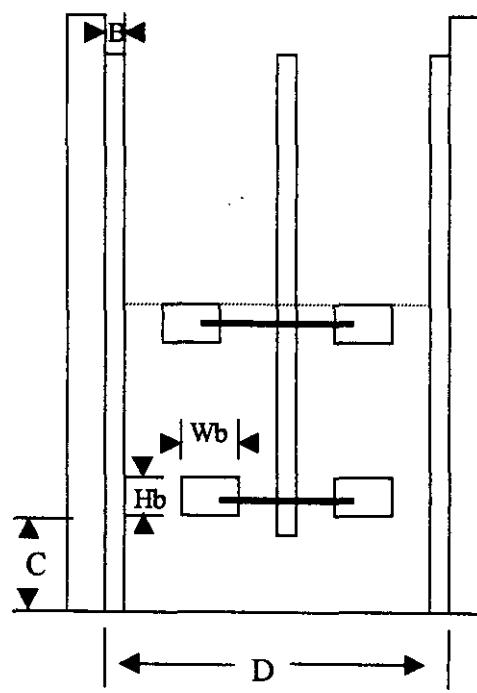
Lampiran 17. Data Penentuan Sifat Reologi Cairan Kultivasi .

Konentrasi Pati (%)	Bobot Cawan (g)	Volume Cawan (ml)	Densitas (g/ml)
1	6.0121	5	1.2024

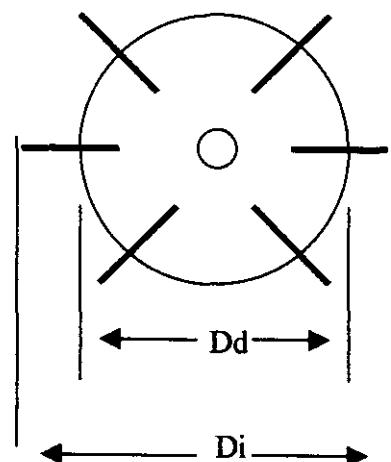
Putaran Spindel (rpm)	Lawi Gores (mm-1)	Vidikositas (Pa/cm ^{0.5})	Empendit Gores (micron)	Log Lawi Gores	Log Vidikositas
60	12.7200	0.0294	0.3522	1.1045	-1.5313
30	6.3600	0.0490	0.3186	0.8035	-1.3095
12	2.5440	0.0736	0.2790	0.4055	-1.1334
6	1.2720	0.2452	0.2524	0.1045	-0.6105



Lampiran 18. Data-Data Geometrik Bioreaktor Model Biostat-B Volume 2 Liter.



Bioreaktor Tampak Samping



Impeler Tampak Atas

Keterangan

Tipe Impeler	:	<i>Six bladed disc turbine</i>	C	:	D/3
Jumlah Impeler (Ni)	:	2 set	Wb	:	1.5 cm
Tinggi Bioreaktor	:	25 cm	Hb	:	1 cm
Diameter Impeler (Di)	:	5.5 cm	Dd	:	5 cm
Diameter Dalam Tangki (D)	:	13 cm			
Diameter Luar Tangki (Dt)	:	16 cm			
Ketebalan Kaca Tangki (T)	:	3 cm			
Volume Tangki (Vt)	:	2 liter			
Tinggi Kultivasi (Hl)	:	8 cm			
Lebar Baffle (B)	:	1.3 cm (D/10)			

Lampiran 19. Contoh Perhitungan Penentuan Konsumsi Tenaga Impeler.

- Diketahui data geometri *Brookfield Viscometer* (Anonim, 1995), konversi laju geser *spindle* kedua = $(0.212)N$, dimana N = rpm
- $1 \text{ cP} = 9.807 \times 10^{-3} \text{ g/cm det}$
- $1 \text{ g cm/det} = 4.07 \times 10^{-7} \text{ HP}$
- $G_c = 981 \text{ g cm/g det}^2$
- $\mu = K\gamma^{n-1}$
- $\tau = K\gamma^n$
- $D_i = 5.5 \text{ cm}$
- $\rho = 1.202 \text{ g/cm}^3$
- $k_s = 11.5$
- $N = 200 \text{ rpm} = 3.333 \text{ rps}$

Data Hubungan antara μ dan γ

Putaran Spindle (N = rpm)	N = rps	Viskositas (cP)	Viskositas (g/cm det)	Laju Geser (det-1)
60	1.0	3.0	0.0294	12.7200
30	0.5	5.0	0.0490	6.3600
12	0.2	7.5	0.0736	2.5440
6	0.1	25.0	0.2452	1.2720

Data Hubungan antara γ dan τ

Putaran Spindle (N = rpm)	Laju Geser (det-1)	Tegangan Geser (g/cm det)
60	12.7200	0.3522
30	6.3600	0.3186
12	2.5440	0.2790
6	1.2720	0.2524

- Dari data yang tersedia, berdasarkan rumus $\mu = K\gamma^{n-1}$ apabila diintegrasikan maka akan dihasilkan nilai $K = 0.242 \text{ g cm}^{-1} \text{ det}^{n+2}$ dan $n = 0.145$.





$$NRe = \frac{Di^2 N^{2-n} \rho}{K(k_s)^{n-1}}$$

$$NRe = \frac{5.5^2 \times 3.333^{2-0.145} \times 1.202}{0.242 (11.5)^{0.145-1}} = \frac{339.226}{2.999 \times 10^{-2}} = 11311.304$$

- Berdasarkan data-data geometri bioreaktor (Lampiran 18) maka akan diperoleh $NRe = 11311.304 \approx 11300$, aliran cairan kultivasi adalah turbulen.
- N_p diperoleh dari plot NRe pada grafik fungsi power (Lampiran 20) dan memberikan nilai $= 4.5$, sehingga diperoleh $P = 4.182 \times 10^{-4}$ HP.

$$P = \frac{\rho N^3 Di^5 N_p}{Gc}$$

$$P = \frac{1.202 \times 3.333^3 \times 5.5^5 \times 4.5}{981} = 1027.466 \text{ g/cm det} = 4.182 \times 10^{-4} \text{ HP}$$

- Dengan menggunakan *six bladed disc turbine impeller*, menurut Wang *et. al.* (1979) didapat faktor koreksi :

$$\blacksquare (Di/Dt)^* = 3 \text{ dan } \blacksquare (Hl/Di)^* = 3$$

$$\text{Faktor Koreksi} = \left[\frac{(Di/Dt) \times (Hl/Di)}{(Di/Dt)^* \times (Hl/Di)^*} \right]^{0.5}$$

- Geometrik standar diperoleh dari Lampiran 18, sehingga dengan $Di = 0.055 \text{ m}$ dan $Dt = 0.160 \text{ m}$ akan diperoleh Faktor Koreksi (FK) = 0.236

$$\text{● Maka } P \text{ Koreksi} = P \times FK$$

$$= 9.870 \times 10^{-5} \text{ HP}$$

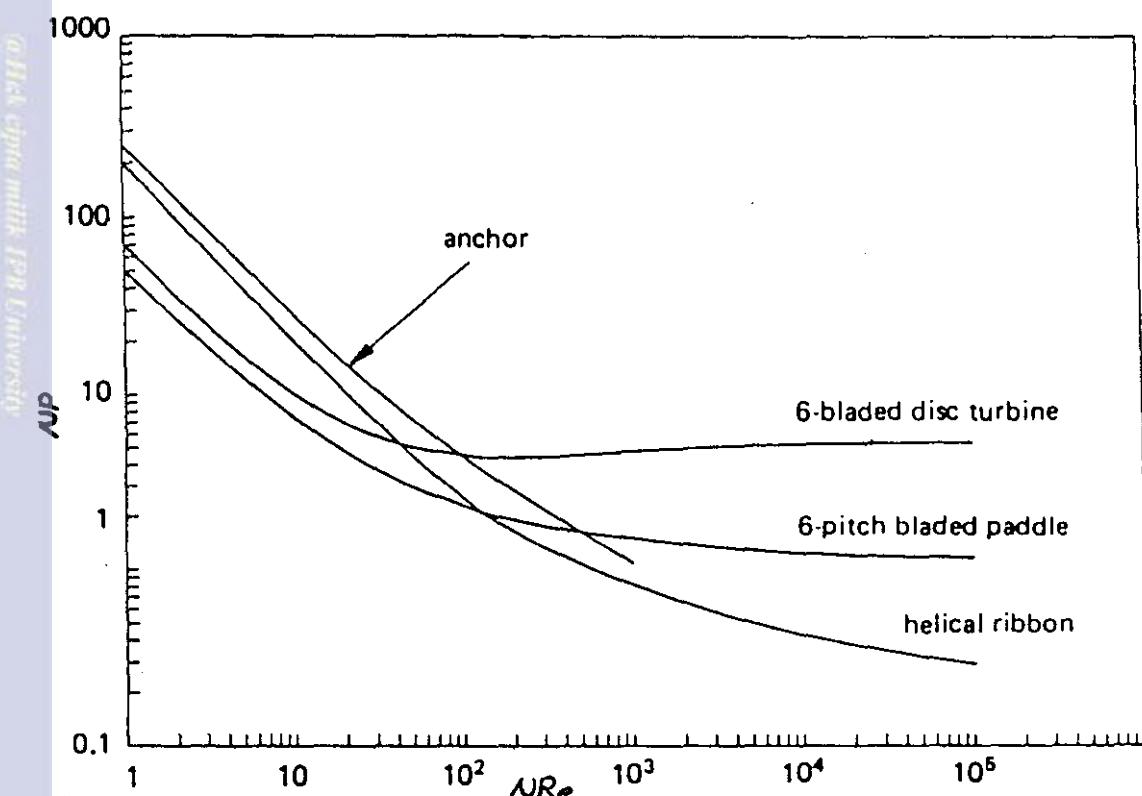
- Ketebalan lempeng besi impeler = 0.1 cm, sehingga volume agitator :

$$\blacksquare (2 \times 3.14 \times 0.025^2 \times 0.001) + (12 \times 0.015 \times 0.010 \times 0.001) = 5.725 \times 10^{-6} \text{ m}^3$$

- Dengan 2 set agitator maka P yang dibutuhkan = P Koreksi $\times 2$

$$= 1.974 \times 10^{-4} \text{ HP atau } 34.480 \text{ HP/m}^3$$

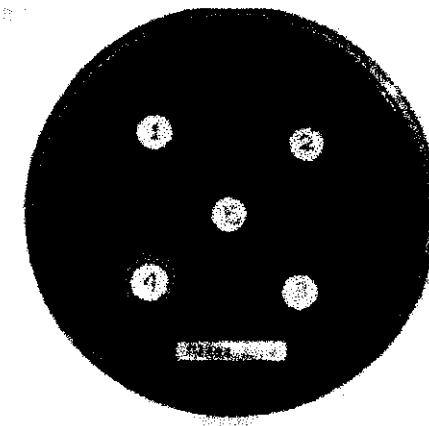
Lampiran 20. Grafik Fungsi Power untuk Impeler Turbin Berbilah Enam (Harnby *et. al.* 1992)



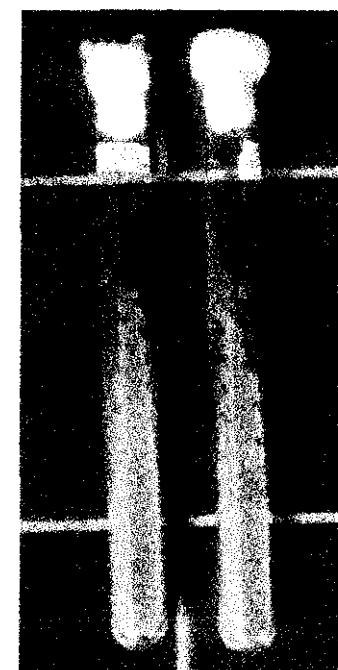
Lampiran 21. Isolat MII₁₀ (*Bacillus licheniformis*) dan Zona Bening Hasil Degradasi Pati dalam Media.



Isolat MII₁₀ (*Bacillus licheniformis*)



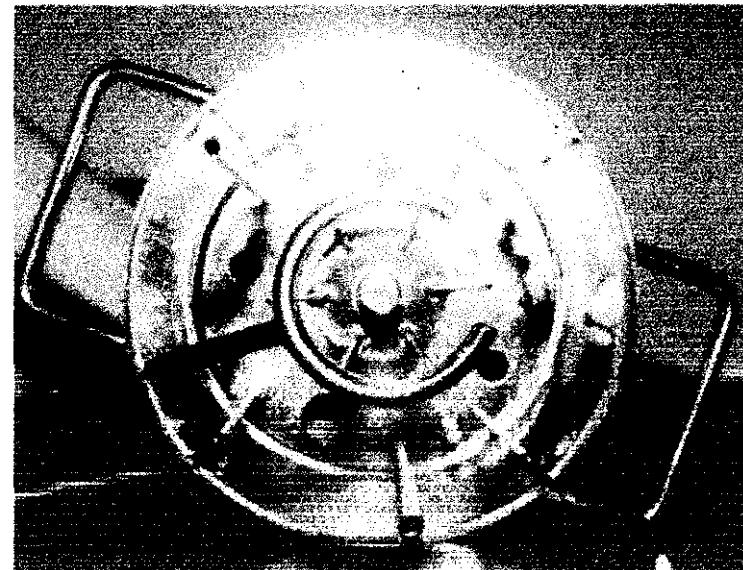
Zona Bening Aktivitas Amilase MII₁₀



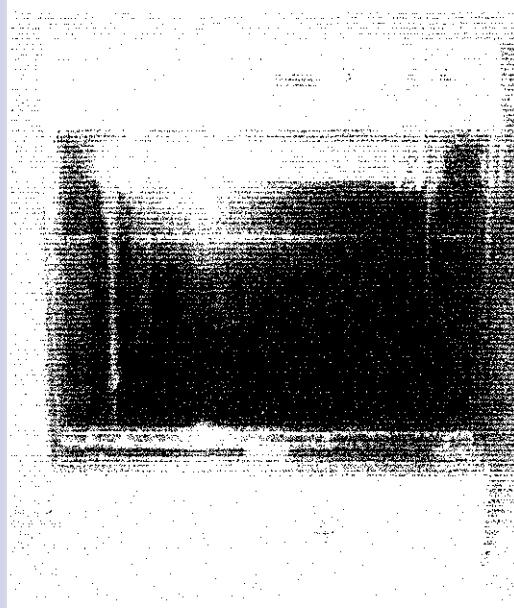
Stok Kultur MII₁₀ Berumur 48 Jam



Lampiran 22. *Orbital Shaker* dalam Optimasi Pemerkayaan Pati Media dan Sistem Agitasi-Aerasi Bioreaktor Model Biostat-B Volume 2 Liter.



Six Bladed Disc Turbine Impeller

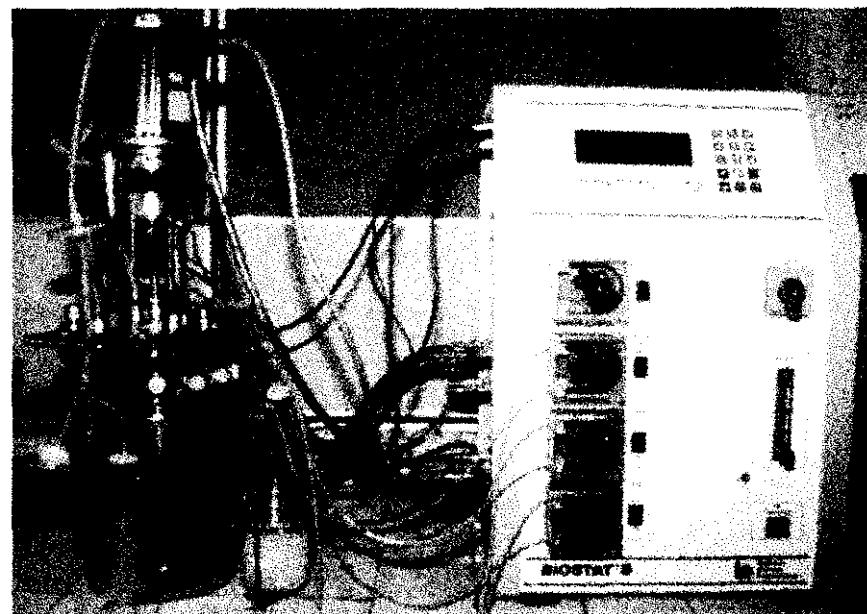


Orbital Incubator (Shaker)

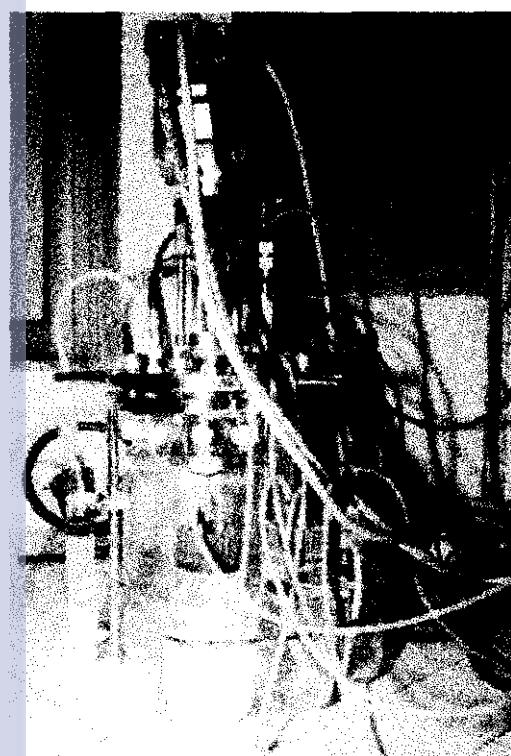


Sistem Agitasi dan Aerasi Bioreaktor Biostat-B Volume 2 Liter

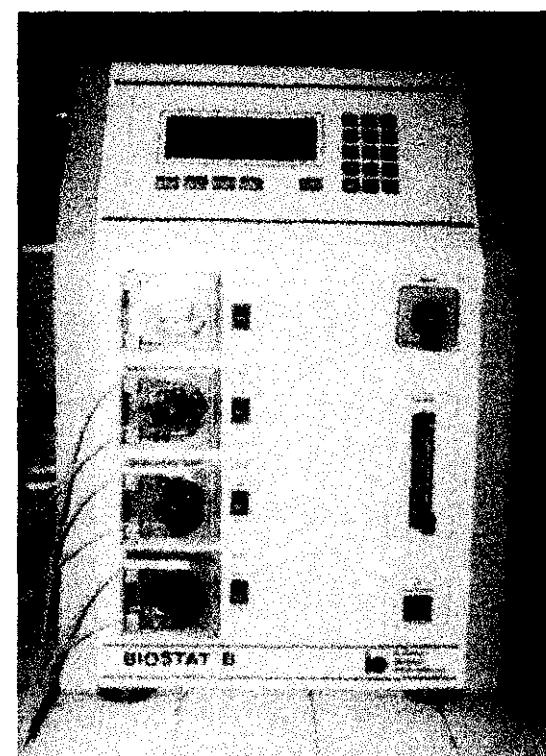
Lampiran 23. Bioreaktor Model Biostat-B Volume 2 Liter dengan Kontrol Proses Otomatis.



Kultivasi Sistem Curah (*Batch*) pada bioreaktor Biostat-B Volume 2 Liter



Bioreaktor Biostat-B Volume 2 Liter



Kontrol Proses Otomatis Bioreaktor Biostat-B Volume 2 Liter