

7/7/1999  
1999  
0115

84

**OPTIMASI KONSENTRASI SUBSTRAT PATI TAPIOKA,  
AERASI DAN AGITASI PADA PRODUKSI AMILASE OLEH BAKTERI  
TERMOFIL TVII<sub>6</sub>**

Olek

R. GAGAN MAULANA YUSUR

F 31.0887



1990

**FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN  
INSTITUT PERTANIAN BOGOR  
BOGOR**



R.Gagan Maulana Yusuf. F 31.0887. **Optimasi Konsentrasi Substrat Pati Tapioka, Aerasi dan Agitasi Pada Produksi Amilase Oleh Bakteri Termofil TVII<sub>6</sub>**. Di bawah bimbingan Liesbetini Hartoto dan Nur Richana .

## Ringkasan

Indonesia kaya dengan sumber daya alam hayati, contohnya adalah bahan-bahan berpati seperti ubi kayu dan sagu. Tahun 1993 produksi ubi kayu di Indonesia mencapai 17.3 juta ton (BPS, 1994). Dengan kandungan pati yang tinggi, yaitu sebesar 88,2% (Syarieff dan Irawati, 1986), ubi kayu dapat menjadi alternatif substrat untuk produksi enzim amilase. Kandungan pati tersebut terdiri dari 17 % (w/w) amilosa dan 83 % (w/w) amilopektin (Schoch, 1941). Amilase merupakan enzim yang dapat menghidrolisis pati, glikogen dan turunan polisakarida. Enzim amilase digunakan untuk industri pangan, farmasi dan tekstil. Impor enzim secara keseluruhan untuk industri di Indonesia pada tahun 1996 adalah sebesar 2 490 396 kg dengan nilai 12 181 608 US\$ (BPS, 1997). Untuk mengantisipasi kebutuhan enzim yang terus meningkat yang selama ini dipenuhi melalui impor, perlu dirintis penelitian untuk memproduksi enzim.

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan konsentrasi pati terbaik dalam media kultivasi, kombinasi agitasi dan aerasi optimum serta parameter kinetika produksi amilase dengan menggunakan bakteri termofil TVII<sub>6</sub>. Konsentrasi pati yang dicobakan adalah 1%, 2%, 3%, dan 4%, kecepatan agitasi 150, 200, 250 rpm serta laju aerasi 0.4 vvm dan 1.0 vvm dengan lama kultivasi 48 jam. Untuk penelitian optimasi substrat pati, analisa yang dilakukan meliputi kadar protein terlarut dan aktivitas amilase, sedangkan analisa kadar protein terlarut, aktivitas amilase, bobot sel kering, dan kadar pati sisa dilakukan untuk penentuan kombinasi aerasi dan agitasi optimum.

Hasil analisa optimasi konsentrasi substrat pati menunjukkan bahwa aktivitas enzim masing-masing media kultivasi berturut-turut adalah 431.0 U/ml, 427.25 U/ml, 434.7 U/ml, 430.25 U/ml dan kadar protein terlarut adalah 0.206 mg/ml, 0.230 mg/ml, 0.276 mg/ml dan 0.291 mg/ml. Dengan melihat hasil yang tidak begitu berbeda, maka dipilih media kultivasi dengan kadar pati 1% dengan pertimbangan teknis dan ekonomis.

Untuk mengetahui pengaruh kombinasi aerasi dan agitasi terhadap laju pertumbuhan mikroba, dilakukan pengamatan terhadap kerapatan optik (OD) cairan media kultivasi setiap 2 jam selama 24 jam dan selanjutnya setiap 4 jam sampai jam ke-48. Hasil penelitian optimasi agitasi dan aerasi, menunjukkan bahwa dengan semakin bertambahnya kecepatan agitasi dan laju aerasi, fase pertumbuhan eksponensial lebih cepat dicapai, yaitu dimulai pada jam ke-4.

Kandungan protein terlarut dalam media kultivasi paling tinggi diperoleh dari media kultivasi dengan agitasi 250 rpm dan aerasi 1.0 vvm, yaitu sebesar 0.399



mg/ml, sedangkan yang terendah diperoleh dari media kultivasi beragitasi 150 rpm dan aerasi 0.4 vvm, yaitu sebesar 0.212 mg/ml.

Hasil pengamatan terhadap aktivitas enzim menunjukkan bahwa aktivitas enzim tertinggi diperoleh dari media kultivasi dengan agitasi 250 rpm dan aerasi 1.0 vvm, yaitu sebesar 631.1 U/ml. Aktivitas enzim terendah diperoleh dari media kultivasi beragitasi 150 rpm dan aerasi 0.4 vvm, yaitu sebesar 218 U/ml. Aktivitas enzim ini didefinisikan sebagai sejumlah enzim yang dapat menghasilkan sejumlah  $\mu$  mol gula pereduksi per menit pada kondisi reaksi 50°C dan pH 7.0 (Bernfeld, 1951).

Perhitungan laju pertumbuhan spesifik ( $\mu$ ) masing-masing media kultivasi menunjukkan bahwa nilai  $\mu$  paling besar ( $0.147 \text{ jam}^{-1}$ ) diperoleh dari media kultivasi dengan agitasi 250 rpm dan aerasi 1.0 vvm.

Perhitungan parameter kinetika pada produksi amilase dengan media kultivasi berkadar pati 1% dengan agitasi 250 rpm dan aerasi 1.0 vvm, yaitu sebagai berikut :  $\mu = 0.147 \text{ jam}^{-1}$  dan  $Y_p/s$  (koefisien hasil yang menggambarkan efisiensi konversi nutrien menjadi produk) sebesar 0.129 (g/g). Jika dilihat dari jumlah produk yang dihasilkan per jumlah sel yang tumbuh, maka diperoleh nilai  $Y_p/x$  sebesar 0.37 (g/g), sedangkan nilai  $Y_x/s$  (efisiensi konversi nutrien dalam substrat menjadi biomassa) adalah 0.315 (g/g).

Jika dilihat dari pola pertumbuhan sel dan pembentukan produk, amilase dapat digolongkan sebagai produk yang berasosiasi dengan pertumbuhan sel, dengan nilai tetapan pembentukan produk yang berasosiasi dengan pertumbuhan ( $\alpha$ ) sebesar 0.37.



**OPTIMASI KONSENTRASI SUBSTRAT PATI TAPIOKA,  
AERASI DAN AGITASI PADA PRODUKSI AMILASE OLEH BAKTERI  
TERMOFIL TVII<sub>6</sub>**

**SKRIPSI**  
Sebagai Salah Satu Syarat  
untuk Memperoleh Gelar **Sarjana Teknologi Pertanian**  
pada Jurusan Teknologi Industri Pertanian  
Fakultas Teknologi Pertanian  
Institut Pertanian Bogor

**Oleh**

**R.GAGAN MAULANA YUSUF**

**F 31.0887**

**1999**

**FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN  
INSTITUT PERTANIAN BOGOR  
BOGOR**





FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN  
INSTITUT PERTANIAN BOGOR

OPTIMASI KONSENTRASI SUBSTRAT PATI TAPIOKA,  
AERASI DAN AGITASI PADA PRODUKSI AMILASE OLEH BAKTERI  
TERMOFIL TVII<sub>6</sub>

**SKRIPSI**

Sebagai Salah Satu Syarat  
untuk Memperoleh Gelar Sarjana Teknologi Pertanian  
pada Jurusan Teknologi Industri Pertanian  
Fakultas Teknologi Pertanian  
Institut Pertanian Bogor

**Oleh**

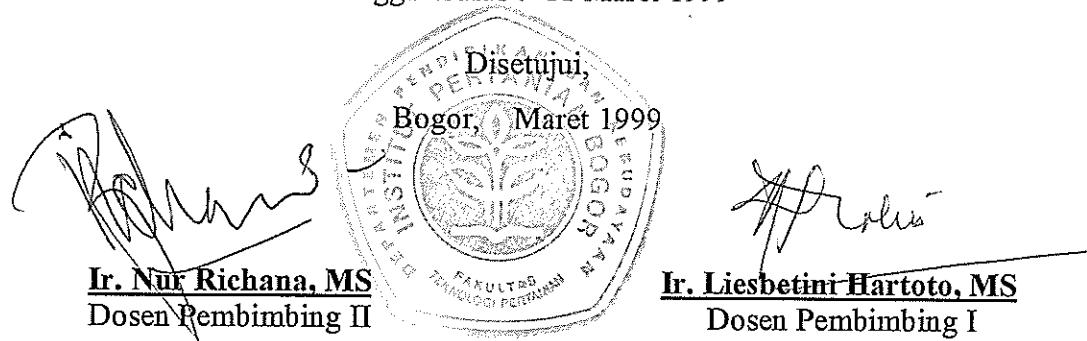
**R.GAGAN MAULANA YUSUF**

**F 31.0887**

Dilahirkan pada tanggal 5 April 1975

Di Cianjur

Tanggal Lulus : 11 Maret 1999





## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Illahi Rabbi yang telah memberikan nikmat dan karunia-Nya sehingga penulis diberikan kesempatan untuk menyelesaikan tugas akhir karya ilmiah (skripsi) dengan mengetengahkan judul “Optimasi Konsentrasi Substrat Pati Tapioka, Aerasi dan Agitasi Pada Produksi Amilase Oleh Bakteri Termofil *TVII<sub>6</sub>*”. Tugas akhir ini merupakan salah satu syarat untuk menyelesaikan jenjang pendidikan Strata I di Jurusan Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor. Penyusunan tugas akhir ini didasarkan pada hasil penelitian serta pengolahan data di Balai Penelitian Bioteknologi dan Tanaman Pangan Bogor (Balitbio) dari bulan Juli 1998 – Januari 1999.

Pada kesempatan ini sangatlah pantas apabila penulis mengucapkan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Kedua orang tua penulis, R.H. Mochamad E, BA dan Nina M atas segala dorongan moril dan materil serta curahan kasih sayang yang begitu besarnya dan tak akan penulis lupakan untuk selamanya. Juga kepada adik-adik tercinta, Santi, Maya, Helmi dan Mang Robbi, semoga selalu ada dalam lindungan Allah SWT.
2. Ir. Liesbetini Hartoto, MS. selaku *orang tua* dan Dosen Pembimbing I yang senantiasa memberikan arahan, bimbingan, dan semangat dalam selama perkuliahan dan pelaksanaan penyelesaian tugas akhir ini.
3. Ir. Nur Richana, MSi. selaku *orang tua* dan Dosen Pembimbing II yang senantiasa memberikan bantuan, arahan, bimbingan dan kesempatan serta kesabaran dalam pelaksanaan penyelesaian tugas akhir ini.
4. Felly “Yiyi” “RM” atas dorongan, perhatian, kesabaran dan kasih sayangnya.
5. Saudara seperjuangan Andin, Wiwid, Edwin, Mba’ Rina, Mba’ Erna, dan Noeng, semoga selalu sukses dan sabar.
6. Seluruh staf Balitbio yang tidak dapat penulis sebutkan satu-persatu atas kerjasamanya.



7. Saudaraku Ex-Villa HD, semoga sukses menyertaimu.
8. Saudaraku di PC 125, *thanks for your friendship and may God blessing all of you.*
9. Seluruh kru rental Zoom, terima kasih atas kerjasamanya.
10. Rekan seperjuangan TIN 31 atas keceriaan dan persaudaraanya. *Always be happy.*

Tiada karya yang sempurna selain karya-Nya. Oleh karenanya kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan. Akhirnya penulis hanya dapat berharap semoga tulisan ini dapat bermanfaat bagi kita semua. Amiin.

Bogor, Maret 1999

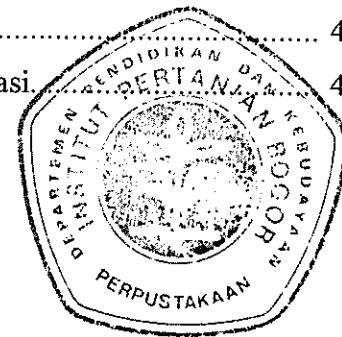
Penulis



	Halaman
KATA PENGANTAR .....	i
DAFTAR ISI .....	iii
DAFTAR GAMBAR .....	vi
DAFTAR TABEL .....	viii
DAFTAR LAMPIRAN .....	ix
 I. PENDAHULUAN .....	 1
A. LATAR BELAKANG .....	1
B. TUJUAN .....	3
 II. TINJAUAN PUSTAKA .....	 4
A. AMILASE .....	4
1. $\alpha$ -amilase .....	4
2. $\beta$ -amilase .....	6
3. Glukoamilase .....	6
B. KONDISI KERJA AMILSE .....	7
1. pH .....	7
2. Suhu .....	9
3. Substrat .....	9
C. MIKROBA PENGHASIL AMILASE .....	9
D. PRODUKSI AMILASE .....	10
1. Komposisi media .....	10
2. Suhu .....	13
3. pH .....	13



4. Aerasi dan agitasi .....	14
E. Pati .....	15
<b>III. METODOLOGI PENELITIAN .....</b>	<b>17</b>
A. BAHAN DAN ALAT .....	17
B. METODE PENELITIAN .....	17
1. Penelitian pendahuluan .....	17
2. Penelitian utama .....	18
2.1. Kinetika Fermentasi .....	18
2.2. Tata Laksana Penelitian .....	22
1. Penyegaran isolat .....	22
2. Propagasi .....	23
3. Persiapan media dan penentuan konsentrasi pati terbaik .....	23
4. Perlakuan kombinasi aerasi dan agitasi .....	25
<b>IV. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>27</b>
A. PENELITIAN PENDAHULUAN (OPTIMASI KONSENTRASI SUBSTRAT PATI TAPIOKA) .....	27
1. Bobot Sel Kering.....	27
2. Kadar Protein Terlarut .....	29
3. Aktivitas Enzim .....	31
B. PENELITIAN UTAMA (OPTIMASI AGITASI DAN AERASI) .....	32
1. Penentuan Lama Waktu Inkubasi .....	32
2. Penentuan Kombinasi Aerasi dan Agitasi Optimum.....	34
2.1. Pertumbuhan Mikrobal .....	34
2.2. Pembentukan Protein Terlarut .....	37
2.3. Aktivitas Enzim .....	39
2.4. Bobot Sel Kering.....	44
2.5. Kadar Pati Sisa.....	45
2.6. Penentuan Parameter Kinetika Fermentasi.....	46



V. KESIMPULAN DAN SARAN .....	48
A. KESIMPULAN .....	48
B. SARAN .....	49

## DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 1. Struktur Pati dan Skematik Hidrolisis oleh Enzim Amilolitik .....	4
Gambar 2. Prosedur penyegaran isolat TVII <sub>6</sub> .....	22
Gambar 3. Prosedur pelaksanaan propagasi .....	23
Gambar 4. Prosedur pembuatan media kultivasi dan penentuan konsentrasi pati terbaik .....	24
Gambar 5. Prosedur pelaksanaan optimasi aerasi dan agitasi .....	25
Gambar 6. Histogram pengaruh konsentrasi pati terhadap bobot sel kering ....	28
Gambar 7. Histogram pengaruh konsentrasi pati terhadap kadar protein terlarut.....	30
Gambar 8. Histogram pengaruh konsentrasi pati terhadap aktivitas enzim .....	31
Gambar 9. Pola pertumbuhan mikrobial pada suhu 50°C dan pH 6.0.....	33
Gambar 10. Kinetika pertumbuhan <i>Candida lipolitika</i> pada n-alkana dalam fermentor teraduk dengan laju agitasi berbeda (Wang, 1979) .....	69
Gambar 11. Pola pertumbuhan mikrobial pada aerasi 1 vvm dengan kombinasi kecepatan agitasi .....	35
Gambar 12. Pola pertumbuhan mikrobial pada aerasi 0.4 vvm dan tiga kecepatan agitasi .....	35
Gambar 13. Kurva pertumbuhan bakteri (Frobisher, 1961) .....	69
Gambar 14. Pola pertumbuhan mikrobial pada berbagai kombinasi laju aerasi dan kecepatan agitasi .....	37
Gambar 15. Pola pembentukan protein pada aerasi 1.0 vvm dan tiga kombinasi kecepatan agitasi .....	38
Gambar 16. Pola pembentukan protein pada aerasi 0.4 vvm dan tiga kombinasi kecepatan agitasi .....	39
Gambar 17. Aktivitas enzim pada aerasi 1. 0 vvm dan tiga perlakuan kecepatan agitasi.....	40
Gambar 18. Aktivitas enzim pada aerasi 0.4 vvm dan tiga perlakuan kecepatan agitasi .....	41
Gambar 19. Hubungan aktivitas enzim dengan pembentukan protein .....	43



Gambar 20. Hubungan pembentukan protein dengan pertumbuhan mikroba .....	43
Gambar 21. Hubungan penurunan kadar pati dengan aktivitas enzim .....	45

**DAFTAR TABEL**

	Halaman
Tabel 1. Sumber karbon dan nitrogen dalam media pertumbuhan .....	12
Tabel 2. Komposisi kimia media (larutan A) .....	23
Tabel 3. Data kultivasi $TVII_6$ dalam media dengan berbagai tingkat konsentrasi pati.....	28
Tabel 4. Nilai konstanta laju pertumbuhan spesifik pada perlakuan aerasi dan agitasi berbeda .....	45
Tabel 5. Nilai parameter kinetika kultivasi dalam bioreaktor Biostat-B 2 liter dengan laju aerasi 1.0 vvm dan kecepatan agitasi 250 rpm.....	47

**DAFTAR LAMPIRAN**

Halaman

Lampiran 1.	Prosedur Analisis Hasil Panen .....	53
Lampiran 2.	Prosedur Pembuatan Pereaksi .....	56
Lampiran 3.	Data hasil penelitian optimasi konsentrasi substrat pati .....	57
Lampiran 4.	Data hasil pengujian pertumbuhan sel berdasarkan kerapatan optik (OD) pada penelitian optimasi agitasi dan aerasi .....	58
Lampiran 5.	Data hasil pengujian kadar protein terlarut pada penelitian optimasi agitasi dan aerasi (g/l) .....	59
Lampiran 6.	Data hasil pengujian aktivitas amilase pada penelitian optimasi agitasi dan aerasi (U/ml) .....	60
Lampiran 7.	Data dan grafik perhitungan konversi pembentukan produk berdasarkan pertumbuhan biomassa (Y <sub>p</sub> /x) .....	61
Lampiran 8.	Data dan grafik perhitungan konversi pembentukan produk berdasarkan penggunaan substrat (Y <sub>p</sub> /s) .....	62
Lampiran 9.	Data dan grafik perhitungan konversi pertumbuhan biomassa berdasarkan penggunaan substrat (Y <sub>x</sub> /s) .....	63
Lampiran 10.	Data dan grafik perhitungan laju pertumbuhan spesifik ( $\mu$ ) .....	64
Lampiran 11.	Hubungan aktivitas enzim dengan pembentukan protein terlarut...	66
Lampiran 12.	Hubungan pertumbuhan mikroba dengan pembentukan protein terlarut.....	67
Lampiran 13.	Data pertambahan bobot massa kering sel pada berbagai kombinasi aerasi dan agitasi .....	68
Lampiran 14.	.....	69



tersedianya strain mikroba unggul panghasil amilase, padahal Indonesia merupakan salah satu negara yang kaya dengan sumber biodiversitas mikroba. Oleh karena itu, perlu adanya penelitian tentang produksi enzim yang nantinya akan mengarah pada skala komersial guna memenuhi kebutuhan dalam negeri dan bahkan terdapat peluang untuk ekspor.

Enzim mikrobial lebih banyak digunakan untuk industri dibanding enzim yang berasal dari tanaman atau hewan. Mikroba dapat berkembang biak dengan cepat, pertumbuhannya relatif mudah diatur, enzim yang dihasilkan tinggi, dan lebih stabil dibanding enzim sejenis yang berasal dari tanaman atau hewan.

Untuk memproduksi enzim dapat digunakan dua macam media pertumbuhan, yaitu media padat dan cair, tetapi umumnya produksi enzim dilakukan di dalam media cair daripada di dalam media padat. Fermentasi menggunakan media cair banyak dipilih untuk memproduksi enzim dikarenakan banyak keuntungan yang dapat diperoleh, seperti kemudahan dalam pengontrolan kondisi lingkungan, biaya operasi rendah dan tidak memerlukan tempat yang terlalu luas. Produksi enzim dengan cara tersebut dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu seleksi mikroba, komposisi media fermentasi dan faktor lingkungan yang meliputi pH, suhu, agitasi dan aerasi (Whitaker, 1972).

Mikroba antara lain memerlukan karbon dan oksigen untuk melakukan proses kultivasi. Sumber karbon yang biasa digunakan dalam medium adalah pati yang telah mengalami proses gelatinisasi. Penggunaan pati sebagai sumber karbon dalam produksi amilase akan meningkatkan produktivitas enzim. Dengan menentukan konsentrasi optimal pati yang digunakan diharapkan akan diperoleh enzim sebanyak-banyaknya dengan aktivitas yang setinggi-tingginya. Bakteri termofil TVII<sub>6</sub> bersifat aerob, sehingga dengan aerasi dan agitasi yang optimal dapat meningkatkan produktivitas enzim. Aerasi dan agitasi berfungsi untuk memasok oksigen bagi pertumbuhan mikroba, meningkatkan berlangsungnya pertukaran panas sehingga distribusi suhu menjadi homogen serta nutrien tersebar merata.





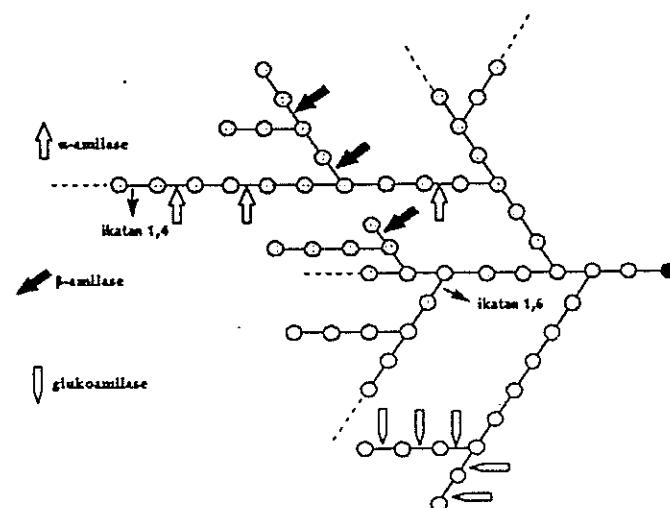
## B. TUJUAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui produksi amilase dengan menggunakan konsentrasi pati tapioka yang berbeda, pengaruh kombinasi aerasi dan agitasi terhadap produktivitas enzim, serta untuk menentukan parameter kinetika fermentasi bakteri termofil isolat lokal (TVII<sub>6</sub>). Diharapkan parameter kinetika yang diperoleh dapat digunakan untuk optimasi produksi amilase dan penggandaan skala produksinya.



## A. AMILASE

Menurut Atlas (1984), amilase adalah enzim yang berperan dalam mengkatalisis proses hidrolisis ikatan 1,4-glikosidik pada senyawa polimer  $\alpha$ -D-glikopiranosa. Whitaker (1972) menyatakan bahwa amilase terdiri dari tiga golongan, yaitu  $\alpha$ -amilase ( $\alpha$ -1,4-glukan glukanohidrolase, EC 3.2.1.1);  $\beta$ -amilase ( $\alpha$ -1,4-glukan maltohidrolase, EC 3.2.1.2); serta yang ketiga adalah glukoamilase ( $\alpha$ -1,4 D-glukan glukanohidrolase, EC 3.2.1.3) yang mampu mengkonversi seluruh pati menjadi glukosa.



Gambar 1. Struktur Pati dan Skematik Hidrolisis oleh Enzim Amilolitik (Vihinen dan Manstala, 1989)

### 1. $\alpha$ -amilase

Alfa amilase adalah enzim yang menghidrolisis ikatan  $\alpha$ -1,4-glikosidik pada polisakarida secara acak mulai dari tengah bagian dalam molekul (endoamilase) (Whitaker, 1972).

Fogarty (1983) menjelaskan bahwa enzim ini dapat digolongkan menjadi enzim yang tahan terhadap suhu tinggi, disebut termostabil serta ada yang bersifat labil pada suhu tinggi, disebut termolabil. Amilase yang tahan terhadap panas biasanya berasal dari bakteri, sedangkan yang tidak tahan panas (labil) berasal dari kapang.

Enzim ini biasanya terdapat dalam jaringan tanaman, mamalia, maupun mikroba. Menurut Michelena dan Castillo (1984) mikroba *Aspergillus foetidus* ATCC 10254 mempunyai aktifitas amilolitik yang tinggi dan mampu memproduksi enzim  $\alpha$ -amilase ekstraseluler dalam konsentrasi tinggi pada substrat pati beras. Galur ini mampu menghasilkan enzim dengan efisiensi tinggi pada substrat pati yang tersedia, yaitu dengan aktivitas amilolitik 44.6 unit/ml. Setelah inokulasi dan diinkubasi selama 30 jam pada medium yang sama,  $\alpha$ -amilase dari *Aspergillus oryzae* ATCC 1011 menunjukkan aktivitas amilolitik sebesar 43.6 unit/ml, sedangkan  $\alpha$ -amilase yang dihasilkan *A. oryzae* ATCC 11601 setelah inkubasi selama 18 jam diperoleh aktivitas enzim sebesar 30.2 unit/ml. Galur bakteri yang mampu menghasilkan enzim ini adalah *Bacillus subtilis*.

Saat ini  $\alpha$ -amilase yang dihasilkan oleh *Bacillus subtilis* dan *Bacillus licheniformis* lebih banyak digunakan untuk proses hidrolisis (likuifikasi) secara komersial karena enzim ini tahan terhadap pemanasan hingga 90° C, bahkan ada yang sampai mencapai suhu 110° C, sedangkan enzim  $\alpha$ -amilase yang termolabil digunakan dalam proses sakarifikasi (Triwiyono, 1996).

Alfa amilase umumnya stabil pada kisaran pH 5.5 - 8.0. Aktivitas optimum dicapai dalam kisaran pH 4.8 - 6.5 (Fogarty, 1983). Winarno (1983) menjelaskan bahwa aktivitas  $\alpha$ -amilase ditentukan dengan mengukur hasil degradasi pati berupa penurunan kadar pati yang larut



atau dari kadar maltosa yang dihasilkan atau dapat juga dengan mengukur viskositas dan jumlah gula pereduksi yang terbentuk.

Aktivitas  $\alpha$ -amilase dapat dinyatakan dalam jumlah gula pereduksi. Menurut Rick dan Stegbauer (1968), salah satu cara pengukuran gugus pereduksi suatu senyawa yaitu menggunakan kalorimeter. Daya reduksinya dapat diukur melalui spektrofotometer setelah direaksikan dengan 3,5-asam dinitrosalisolat dan NaOH yang bebas  $\text{CO}_2$  serta garam Rochele.

## 2. $\beta$ -amilase

Beta amilase atau  $\alpha$ -1,4-glukan maltohidrolase, EC 3.2.1.2 menghidrolisis molekul pati dengan memecah ikatan  $\alpha$ -1,4-glikosidik mulai dari ujung molekul non-pereduksi serta menghasilkan unit-unit maltosa dan dekstrin. Enzim ini umumnya terdapat dalam sel tanaman, tetapi ada beberapa mikroba yang dapat menghasilkan enzim ini, yaitu genus *Bacillus*, *Pseudomonas* dan kapang (Crueger dan Crueger, 1984).

Aktivitas enzim  $\beta$ -amilase yang dihasilkan oleh beberapa genus *Bacillus* dapat optimal pada kisaran pH 6.5 - 7.5, serta pada kisaran suhu antara 45 - 50° C (Nanmori, 1988).

Menurut Hairita (1987), enzim  $\beta$ -amilase yang dihasilkan oleh kapang mempunyai suhu optimum 15 - 25° C dan pH optimum 4.5 - 5.0.

## 3. Glukoamilase

Glukoamilase ( $\alpha$ -1,4 D-glukan glukanohidrolase, EC 3.2.1.3) dapat menghasilkan produk akhir glukosa dari ujung non reduktif polimer pati atau glikogen (Kulp, 1975). Glukoamilase termasuk ke dalam eksoenzim yang menghasilkan  $\beta$ -D-glukosa dari rantai terminal non-pereduksi pada amilosa, amilopektin dan glikogen dengan menghidrolisis ikatan  $\alpha$ -1,4-glikosidik secara berurutan serta mampu juga untuk memecah ikatan  $\alpha$ -



1,6-glikosidik pada glikogen dan pati, tetapi umumnya reaksi yang terjadi berjalan lambat.

Menurut Fogarty (1983) glukoamilase dengan kemurnian yang tinggi menunjukkan aktivitas yang nyata pada rantai yang relatif lebih panjang, serta menghidrolisis ikatan  $\alpha$ -1,6 dan  $\alpha$ -1,3, meskipun lebih lambat dibandingkan hidrolisis pada ikatan  $\alpha$ -1,4. Oleh karena itu, enzim tersebut mampu mengkonversi seluruh pati menjadi glukosa.

Kondisi aktivitas optimum enzim ini berkisar pada nilai pH 4.5 - 5.0, tetapi hal tersebut tergantung juga pada sumber enzimnya. Suhu optimum berkisar antara 40 - 50° C. Pada umumnya, mikroba termofil akan menghasilkan aktivitas glukoamilase yang relatif lebih tahan terhadap panas. Beberapa teori menyebutkan bahwa sifat tahan panas ini disebabkan adanya faktor pelindung dalam sel dan adanya protein yang bersifat hidrofilik yang tinggi di dalam sel. Menurut Rao *et. al.* (1981), sifat tahan panas ini erat hubungannya dengan struktur karbohidrat dalam enzim.

## B. KONDISI KERJA AMILASE

Aktivitas enzim sangat dipengaruhi oleh pH, substrat, dan suhu. Suatu enzim dapat bekerja dengan optimal pada suhu dan pH tertentu dan aktivitasnya akan berkurang apabila terdapat perubahan baik pada pH maupun suhu (Kimball, 1989).

### 1. pH

Wiseman (1985) berpendapat, bahwa pH berpengaruh terhadap aktivitas enzim dalam pembentukan kompleks enzim dengan substrat, stabilitas enzim, kapasitas bufer, nilai  $K_m$  dan  $V_{maks}$ .



Adanya perubahan pH lingkungan menyebabkan kelarutan, tekanan osmotik dan elektrisitas enzim berubah, sehingga aktivitas enzim turut berubah. Hal ini disebabkan karena adanya perubahan ionisasi enzim dan substrat atau antara kompleks enzim dengan substrat (Reed, 1975).

Lay dan Hastowo (1992) menjelaskan bahwa perubahan pH dapat terjadi akibat adanya aktivitas dari mikroba. Perubahan pH yang cepat dalam lingkungan tertutup dapat menghambat pertumbuhan mikroba. Untuk mencegah perubahan pH ditambahkan larutan penyangga (bufer) ke dalam media seperti  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  dan  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Kedua garam ini dapat mengikat  $\text{OH}^-$  dari basa atau  $\text{H}^+$  dari asam untuk menjaga agar kondisi pH tetap mendekati pH optimum.

Perubahan nilai pH dapat juga disebabkan oleh sumber nitrogen yang digunakan. Bila sumber nitrogennya adalah amonia, maka kecenderungan pH akan menurun. Amonia dalam larutan (di bawah pH 9) berwujud sebagai  $\text{NH}_4^+$  : mikroba menggabungkannya ke dalam sel sebagai  $\text{R-NH}_3^+$ , dengan R sebagai kerangka karbon. Dalam proses,  $\text{H}^+$  ditinggalkan dalam medium. Bila sumber nitrogennya adalah nitrat, maka ion hidrogen disingkirkan dari medium untuk mereduksi  $\text{NO}_3^-$  menjadi  $\text{R-NH}_3^+$  sehingga pH cenderung meningkat. Bila bahan-bahan organik digunakan untuk pertumbuhan, maka pH cenderung meningkat karena bahan-bahan tersebut akan terdeaminasi. Keadaan lain yang menyebabkan perubahan pH adalah bila terbentuk asam-asam organik seperti asam laktat, asam asetat atau piruvat (Muljono *et. al.*, 1990)

Amilase umumnya stabil pada kisaran pH 5.5 - 8.0. Aktivitas optimum pada umumnya terjadi pada kisaran pH 4.8 - 6.5 dan tergantung dari sumber penghasil enzimnya (mikroba).



## 2. Suhu

Menurut Kimbal (1989), suhu merupakan faktor yang berpengaruh pada kecepatan pertumbuhan mikroba, sintesis enzim, dan inaktivasi enzim. Suhu yang terlalu tinggi akan mengakibatkan proses denaturasi dan pengeringan protein sel, yang akan mengakibatkan kematian sel mikroba. Suhu yang terlalu rendah akan mengurangi aktivitas enzim hingga pertumbuhan mikroba terganggu.

Aktivitas enzim akan terus meningkat mulai dari suhu rendah sampai pada suatu titik dimana struktur tersier enzim akan mencapai titik optimumnya dan pada saat itulah suhu aktivitas enzim disebut suhu optimum. Pada saat suhu optimum, kecepatan reaksi sama dengan penurunan reaksi, hal ini terjadi akibat kerusakan struktur tersier enzim mulai terjadi (Wiseman, 1985).

## 3. Substrat

Pemecahan pati oleh enzim tergantung dari sumber enzim dan atau jenis granula patinya. Molekul substrat harus cocok dengan permukaan komplementer molekul enzim. Adanya substrat tertentu dalam medium produksi dapat memacu mikroba untuk mensekresikan metabolit selnya. Menurut Kimbal (1989), persyaratan komplementaritas dalam konfigurasi substrat dan enzim dapat menunjukkan sifat kekhususan enzim yang hanya mampu menjadi katalisator dalam sebuah atau beberapa reaksi kimia dimana substratnya mempunyai struktur umum yang sama.

## C. MIKROBA PENGHASIL AMILASE

Menurut Jay (1978), berdasarkan suhu pertumbuhan, bakteri termofil dikarakterisasikan sebagai mikroba yang dapat hidup pada suhu minimum 30° C, suhu maksimum antara 70 - 80° C serta memiliki suhu optimum



pertumbuhan antara 50 - 60° C. Isolasi bakteri termofil yang diperoleh dari sumber tanah geothermal umumnya berasal dari genus *Clostridium sp* dan *Bacillus sp*. *Bacillus stearothermophilus* dapat hidup pada kisaran suhu 40 - 99° C. *B. stearothermophilus* dapat memproduksi  $\alpha$ -amilase yang stabil pada suhu 70° C dan waktu inkubasi 24 jam.

Bakteri Termofil TVII<sub>6</sub> merupakan bakteri isolat lokal yang diperoleh dari tanah geothermal kawah gunung Dieng. Bakteri ini mempunyai kemampuan optimum untuk memproduksi enzim pada suhu 50° C dan pH 6.0 (Yusri, 1997)

#### D. PRODUKSI AMILASE

Menurut Blevins dan Davis (1979), produksi enzim dapat dilakukan dengan menggunakan teknik kultivasi media padat dan media cair, akan tetapi penggunaan media cair lebih menguntungkan dibandingkan dengan media padat. Hal ini disebabkan karena 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 kontaminasi kecil.

Seperti halnya enzim, mikroba juga membutuhkan kondisi khusus (spesifik) agar pertumbuhannya tidak terganggu. Kondisi-kondisi khusus itu antara lain komposisi media, pH, suhu, agitasi, dan aerasi.

##### 1. Komposisi Media

Sa'id (1987) menjelaskan bahwa pertumbuhan mikroba dipengaruhi oleh konsentrasi komponen penyusun media pertumbuhannya. Pasokan sumber karbon merupakan faktor yang sangat berpengaruh pada pertumbuhan optimal, tetapi pada kenyataannya konsentrasi sumber karbon mempunyai batas maksimum. Jika konsentrasi sumber karbon



melampaui batas ini, maka laju pertumbuhan akan terhambat. Penghambatan ini timbul karena adanya perbedaan tekanan osmotik yang menyebabkan plasmolisis dan terjadinya penghambatan sintesis enzim pada rantai respirasi. Dengan menggunakan karbohidrat yang dihidrolisis menjadi glukosa sebagai sumber karbon, penghambatan akan dimulai pada konsentrasi diatas 50 g/l (Rehm dan Reed, 1981).

Inhibisi dapat timbul disebabkan adanya efek inhibitor zat-zat tertentu seperti senyawa fenol, formaldehid dan metanol dalam konsentrasi 1 g/l pada enzim kunci atau komponen struktural, meskipun zat-zat tersebut dapat digunakan oleh beberapa mikroba bila konsentrasi cukup rendah (Judoamidjojo *et al.*, 1990).

Seperti halnya sumber karbon, garam-garam nutrien dapat juga menghambat laju pertumbuhan mikroba pada konsentrasi tertentu. Bila yang digunakan sebagai sumber nitrogen adalah garam ammonium, penghambatan dimulai pada konsentrasi 10 g/l (Wang *et al.*, 1979).

Komposisi nutrien untuk setiap mikroba berbeda satu sama lain. Zat makanan utama bagi pertumbuhan mikroba adalah sumber karbon, nitrogen, dan komponen mineral terutama fosfat (Suhartono, 1989).

Menurut Arima (1964), perbandingan sumber nutrien bagi pertumbuhan mikroba merupakan faktor penting dalam menghasilkan amilase. Tabel 1. merupakan contoh perbandingan antara karbon dan nitrogen dalam suatu media pertumbuhan.

Komposisi penggunaan ekstrak khamir (sebagai sumber nitrogen), yang tepat sangat diperlukan dalam proses kultivasi. Hal tersebut disebabkan penggunaan jumlah ekstrak khamir yang cukup tinggi akan menyebabkan timbulnya buih pada media kultivasi jika diaduk, karena pengadukan akan menyebabkan protein dalam media kontak dengan udara (Suhartono, 1989). Lagipula sumber nitrogen hanya dipergunakan sebagai nutrisi cadangan apabila sumber karbon dalam media mulai menipis.



Tabel 1. Sumber karbon dan nitrogen dalam media pertumbuhan

Sumber C	Sumber N	Ratio C:N	Garam	
			Jenis	Konsentrasi (%)
Pati, dekstrin	Pepton, khamir	7 : 1	PO <sub>4</sub> <sup>=</sup>	0,05 – 0,07
Maltosa, isomaltosa	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	-
Panosa	Asam glutamat	10 : 1	PO <sub>4</sub> <sup>=</sup>	0,02 – 0,05
Saforosa	Peptida dari pepton	-	-	-
Selobiosa	Protein dari gandum	-	-	-
Koji	Peptida dari pepton	-	-	-

Sumber : Arima (1964)

Selain karbon dan nitrogen, mikroba juga memerlukan vitamin dan mineral dalam jumlah yang sangat sedikit. Pada umumnya mikroba membutuhkan satu atau lebih vitamin B untuk pertumbuhannya. Salah satu sumber yang kaya akan vitamin B adalah ekstrak khamir. Fungsi vitamin B ini adalah sebagai bahan pembentuk koenzim. Enzim dan koenzim berikatan tetapi tidak begitu kuat. Satu koenzim dapat berikatan dengan beberapa enzim pada kurun waktu yang berlainan selama pertumbuhan bakteri. Koenzim diubah secara kimia oleh daya kerja apoenzim, sehingga dapat dianggap sebagai substrat khusus, karena pada akhir reaksi koenzim diubah kembali menjadi bentuknya semula (Moat, 1979).

Reaksi enzimatis pembentukan produk dari substratnya tidak dapat berlangsung bila tidak terdapat koenzim meskipun ada apoenzimnya.

Oleh karena koenzim disintesis dari vitamin, maka kekurangan vitamin yang nantinya terpakai sebagai koenzim akan menyebabkan berbagai enzim tidak berfungsi (Lay dan Hastowo, 1992)

Mineral yang dibutuhkan untuk pertumbuhan umumnya adalah magnesium, fosfor, kalium, kalsium, sulfur dan klor. Unsur-unsur ini ditambahkan berupa garamnya dengan konsentrasi yang tepat (Stanbury dan Whitaker, 1984)

## 2. Suhu

Laju pertumbuhan mikroba merupakan fungsi dari suhu. Hal ini disebabkan pertumbuhan merupakan hasil dari serangkaian reaksi kimia yang sangat dipengaruhi oleh suhu (Wang *et al.*, 1979).

Dalam suatu proses kultivasi, apabila suhu dinaikkan, maka hasil sel akan menurun karena media sebagian akan digunakan untuk mempertahankan hidup atau kebutuhan untuk mempertahankan diri meningkat. Sebagai konsekuensi, apabila suhu untuk pertumbuhan naik, maka penggunaan sumber karbon energi untuk pertahanan akan meningkat pula (Judoamidjojo *et al.*, 1990).

Kisaran suhu untuk aktivitas enzim menentukan sifat pertumbuhan mikroba dan sifat fisik membran sel. Peningkatan 5 - 10° C di atas suhu optimum dapat menyebabkan proses lisis dan kematian mikroba (Lay, 1994).

Setiap mikroba mempunyai suhu optimum untuk pertumbuhannya, dimana pada suhu ini pertumbuhan bakteri berlangsung dengan cepat. Di luar kisaran suhu optimum, pertumbuhan bakteri menjadi lambat, bahkan dapat sama sekali tidak terjadi.

## 3. pH

Laju pertumbuhan tergantung pada nilai pH karena pH mempengaruhi fungsi membran, enzim dan komponen lainnya (Rehm

dan Reed, 1981). Selain itu, pH menunjukkan aktivitas ion  $H^+$  dalam suatu larutan dan pada proses kultivasi, pH media sangat berpengaruh terhadap laju pertumbuhan mikrobial ( Sa'id, 1987).

Menurut Moat (1979), pH medium memberikan pengaruh langsung pada permeabilitas sel dan aktivitas fisiologi lainnya. Selama pertumbuhan mikroba, pH dalam media mempengaruhi protein yang terdapat dalam membran sel. Struktur protein akan berubah bila pH dalam media berubah.

Mikroba yang melakukan proses kultivasi akan menghasilkan asam sehingga pH akan menurun, sedangkan bila mikroba melakukan metabolisme protein dan asam amino, ion amonium dilepaskan sehingga pH menjadi basa (Lay, 1994)

#### 4. Aerasi dan Agitasi

Faktor lain yang besar pengaruhnya pada laju pertumbuhan mikroba adalah konsentrasi oksigen. Oksigen adalah gas yang sedikit larut dalam air, sehingga perlu dipasok terus menerus ke dalam medium kultur dengan cara memasukkan gelembung udara atau dengan memperluas permukaan media. Ketergantungan laju pertumbuhan pada konsentrasi oksigen terlarut mengikuti pola seperti pola ketergantungan kejenuhan Monod yaitu di bawah tingkat kritis kelarutan oksigen. Penurunan oksigen terlarut menyebabkan penurunan laju pertumbuhan spesifik (Judoamidjojo *et. al.*, 1990).

Dalam sistem kultivasi media cair aerobik, kebutuhan mikroba akan oksigen dapat disediakan dengan dilakukan aerasi dan agitasi. Fungsi aerasi dan agitasi adalah untuk memasok kebutuhan oksigen dan menjaga mikroba dalam suspensi tetap dapat melakukan metabolismenya (Wang *et al.*, 1979). Lebih lanjut Suhartono (1989) menyebutkan bahwa adanya agitasi, maka oksigen, pH, nutrien, dan faktor-faktor lain yang terdapat dalam lingkungan dapat tersebar lebih merata. Peningkatan konsentrasi



oksidigen terlarut dalam medium dapat dilakukan dengan cara meningkatkan laju alir udara atau menambah kecepatan agitasi.

Aerasi diperlukan karena kebutuhan akan oksigen cukup tinggi, sedangkan kelarutan oksigen dalam media cair rendah, yaitu sekitar 0.9 mg/100 ml pada suhu 25° C dan kelarutan menurun dengan naiknya suhu (Gray dan Berry, 1980).

Dengan menggunakan sistem kultivasi media cair pada bioreaktor untuk memproduksi  $\alpha$ -amilase dalam kondisi basa, digunakan suhu 50°C dengan kecepatan agitasi 200 rpm dan laju aerasi 1.5 vvm (volume udara per volume media setiap menit) (Kim *et al.*, 1995).

## E. PATI

Pati merupakan homopolimer glukosa dengan ikatan  $\alpha$ -glikosidik dan merupakan rantai gula yang panjang. Berbagai macam pati tidak sama sifatnya, tergantung dari panjang rantai C-nya serta apakah lurus atau bercabang rantai molekulnya (Winarno, 1988).

Pati dapat difraksinasi menjadi amilosa dan amilopektin melalui gelatinisasi pada temperatur dan tekanan tertentu. Bila suspensi pati dipanaskan, maka granula pati akan membengkak sampai maksimal dan tidak dapat kembali pada kondisi semula. Keadaan ini disebut gelatinisasi. Dalam keadaan ini, granula akan terus mengembang menjadi jaringan yang membengkak namun masih terikat oleh misela yang belum rusak. Sebagian amilosa akan keluar dari granula dan melarut dalam larutan sehingga akan memudahkan mikroba untuk menghidrolisanya (Winarno, 1984).

Untuk menganalisa adanya pati dapat digunakan iodin, karena pati yang berikatan dengan iodin akan menghasilkan warna biru. Menurut Winarno (1984), pati akan mereflesikan warna biru bila berupa polimer-polimer glukosa yang lebih besar dari 20, misalnya molekul amilosa. Bila



polimernya kurang dari 20, misalnya amilopektin, maka akan dihasilkan warna merah. Dekstrin dengan polimer enam, tujuh dan delapan akan membentuk warna coklat.

Proporsi pati relatif dari amilosa dan amilopektin berbeda-beda antara satu pati dengan pati lainnya. Biasanya pati lebih banyak mengandung amilopektin daripada amilosa. Menurut Charley (1982), butiran pati terdiri dari  $\frac{1}{4}$  bagian amilosa dan  $\frac{3}{4}$  bagian amilopektin.

Amilosa memiliki struktur linier yang terdiri dari 250 - 2 000 unit D-glukosa yang dihubungkan dengan ikatan hidrogen. Bobot molekul sekitar 40 000 - 340 000.

Amilopektin merupakan polisakarida yang banyak cabangnya yang terdiri dari beberapa unit glukosa berantai lurus (30 unit) yang dihubungkan oleh ikatan  $\alpha$ -1,4-glikosidik. Rantai-rantai demikian mempunyai percabangan melalui ikatan  $\alpha$ -1,6-glikosidik (Girindra, 1986).





## A. BAHAN DAN ALAT

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat bakteri termofil indigenous TVII<sub>6</sub>, sedangkan bahan-bahan yang digunakan sebagai media penyegaran isolat bakteri termofil, yaitu agar bakto, tripton, ekstrak khamir, NaCl dan akuades. Nutrien untuk kultivasi media cair terdiri ekstrak khamir, bakto tripton,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaCl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> dan sebagai substrat sumber karbon adalah pati tapioka.

Bahan yang digunakan untuk analisa produk adalah 3,5 – *Dinitro Salicylic Acid* (DNS), bufer fosfat sitrat (BFS), maltosa standar, natrium karbonat anhidrat, larutan NaOH 0.1 N, CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, HCl 0.1 N, natrium, K-tartrat, Folin Ciocalteau, standar protein *Bovine Serum albumin* (BSA), Iodin, HCl 25 %, NaOH 45 % dan *silicon antifoaming agent* serta bahan kimia lainnya.

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah peralatan gelas, pipet, termometer, timbangan analitik, sentrifus Biofuge 15 R, refrigerator, *laminar air flow* beserta perlengkapannya, pH-meter CG 840 B, inkubator, autoklaf, *orbital incubator (shaker)*, *waterbath shaker*, ruang dingin, *magnetic stirrer*, spektrofotometer Spectronic 20 dan bioreaktor Biostat-B 2 liter

## B. METODE PENELITIAN

### 1. Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan ini dimaksudkan untuk melihat sampai sejauh mana efek konsentrasi substrat pati terhadap kemampuan mikroba untuk menghasilkan amilase. Dalam penelitian ini, parameter yang digunakan



sebagai dasar pemilihan media kultivasi dengan konsentrasi terbaik adalah bobot sel kering, kadar protein terlarut dan aktivitas enzim.

Sebelum penelitian utama, dilakukan terlebih dahulu percobaan untuk mengetahui kecenderungan pertumbuhan mikrobial selama 72 jam dengan pengambilan contoh setiap 2 jam agar diketahui pada jam keberapa pertumbuhan mikrobial tersebut mencapai fase stasioner. Setiap contoh diuji kerapatan optisnya menggunakan spektrofotometer.

## 2. Penelitian Utama

Pada penelitian ini dilakukan serangkaian percobaan untuk memproduksi amilase secara optimum pada bioreaktor Biostat-B 2 liter dengan volume kerja 1 liter dalam kondisi terkontrol dengan variasi antara laju aerasi dan kecepatan agitasi. Laju aerasi yang digunakan adalah 0.4 vvm dan 1 vvm. Sedangkan kecepatan agitasi yang digunakan adalah 150 rpm, 200 rpm, dan 250 rpm.

Parameter yang digunakan untuk pemilihan kombinasi aerasi dan agitasi tersebut adalah pertumbuhan mikroba (Optical Density =OD), kandungan protein terlarut, aktivitas enzim, bobot sel kering dan kadar pati sisa.

### 2.1. Kinetika Fermentasi

Kinetika merupakan hal yang sangat penting dikaji untuk mendapatkan model matematis dalam industri. Pada umumnya, kinetika proses mikrobial dapat dikaji berdasarkan pada laju pertumbuhan mikrobial, laju penggunaan substrat, dan laju produksi metabolit.

Pertumbuhan mikrobial 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 dalam jumlah sel. Namun demikian, bila pada suatu lingkungan tertentu interval antara massa sel atau

penggandaan jumlah adalah konstan dengan waktu, maka organisme itu tumbuh pada kecepatan eksponensial. Pada keadaan seperti itu, maka pertumbuhan dinyatakan sebagai :

atau

keterangan :  $X$  = konsentrasi sel dalam g/

$N$  = konsentrasi sel dalam keseluruhan sel/

T = waktu

$\mu$  = laju pertumbuhan spesifik dalam  $\text{jam}^{-1}$  (massa)

$\mu_n$  = 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  $\mu$  dapat digunakan. Nilai besaran  $\mu$  X adalah laju pertumbuhan volumetrik (produktivitas volumetrik) dalam g/l.jam.

Pengintegralan kesetimbangan (1) memberikan

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

$$\ln X_2 = \ln X_1 + \mu \Delta t. \quad \dots \quad (5)$$

Kesetimbangan (4) dapat diselesaikan untuk kasus dimana  $\Delta t = t_d$  yakni waktu yang dibutuhkan untuk menggandakan dua kali biomassa semula :

$X_2 = 2X_1$ , maka

Dari kesetimbangan (4) terlihat bahwa laju pertumbuhan diperoleh dari kemiringan (slope) plot  $\ln X$  dengan waktu. Selama fase eksponensial, mikroba tumbuh dengan laju pertumbuhan spesifik maksimum.

Kajian tentang pengaruh substrat terhadap pertumbuhan mikroba telah dikembangkan oleh Monod. Jika  $X_0$  dan  $S_0$  adalah konsentrasi biomassa dan substrat awal dan  $X_t$  dan  $S_t$  adalah konsentrasi biomassa dan substrat selama pertumbuhan, maka jumlah biomassa yang dihasilkan terhadap jumlah substrat yang dikonsumsi dapat dinyatakan dalam persamaan berikut:

Menurut Scragg (1991), koefisien pembentukan bimassa terhadap substrat dapat dinyatakan dalam :

atau

sehingga plot linear antara  $\frac{dX}{dt}$  dan  $\frac{dS}{dt}$  memberikan kemiringan sebagai nilai  $Yx/s$ . Koefisien pembentukan produk terhadap substrat

dinyatakan dalam

atau

Plot linear antara  $\frac{dP}{dt}$  dan  $\frac{dS}{dt}$  dapat memberikan nilai Yp/s.

Sedangkan koefisien jumlah produk (enzim) yang dihasilkan per jumlah sel yang tumbuh, dapat dinyatakan dalam :

atau

Sehingga plot linear antara  $\frac{dP}{dt}$  dan  $\frac{dX}{dt}$  dapat memberikan nilai  $\frac{dP}{dX}$ .

Amilase merupakan enzim yang disintesa sel dan merupakan kebutuhan pokok sel mikroba untuk hidup dan tumbuh serta produk tersebut merupakan hasil langsung suatu jalur katabolik atau metabolit primer (Mangunwidjaja dan Suryani, 1994). Dalam pola ini, laju pembentukan produk berbanding secara proporsional dengan laju pertumbuhan dan mengikuti persamaan sebagai berikut :

atau

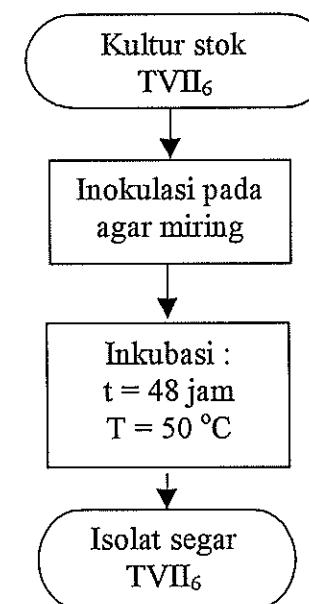
Dengan  $\alpha$  adalah tetapan pembentukan produk yang berasosiasi dengan pertumbuhan atau pembentukan produk dan  $Y_p/x$  adalah rendemen produk yang dihasilkan per bimassa terbentuk (g/g)

## 2.2. Tata Laksana Penelitian

Langkah kegiatan yang akan dilakukan dalam penelitian ini adalah :

## 1. Penyegaran Isola

Untuk penyegaran isolat digunakan media agar miring dengan komposisi agar 2 persen, tripton 1 persen, ekstrak khamir 0.5 persen, NaCl 0.5 persen yang dilarutkan dalam akuades. Prosedur penyegaran isolat tersebut adalah sebagai berikut (Gambar 2):

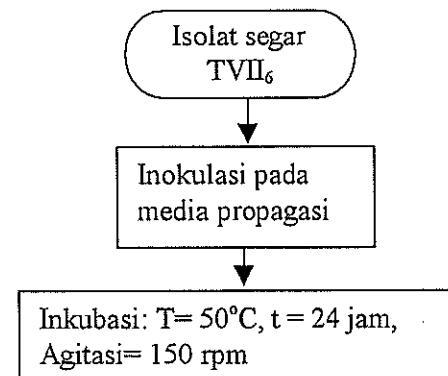


Gambar 2. Prosedur penyegaran isolat TVII<sub>6</sub>



## 2. Propagasi

Propagasi ditujukan agar inokulum dapat melakukan penyesuaian (adaptasi) secara cepat terhadap lingkungan baru yang ditempatinya sehingga sel dapat mencapai fase eksponensial. Prosedur pelaksanaan propagasi dapat dilihat dalam Gambar 3 berikut :



Gambar 3. Prosedur pelaksanaan propagasi

## 3. Persiapan media dan penentuan konsentrasi pati terbaik

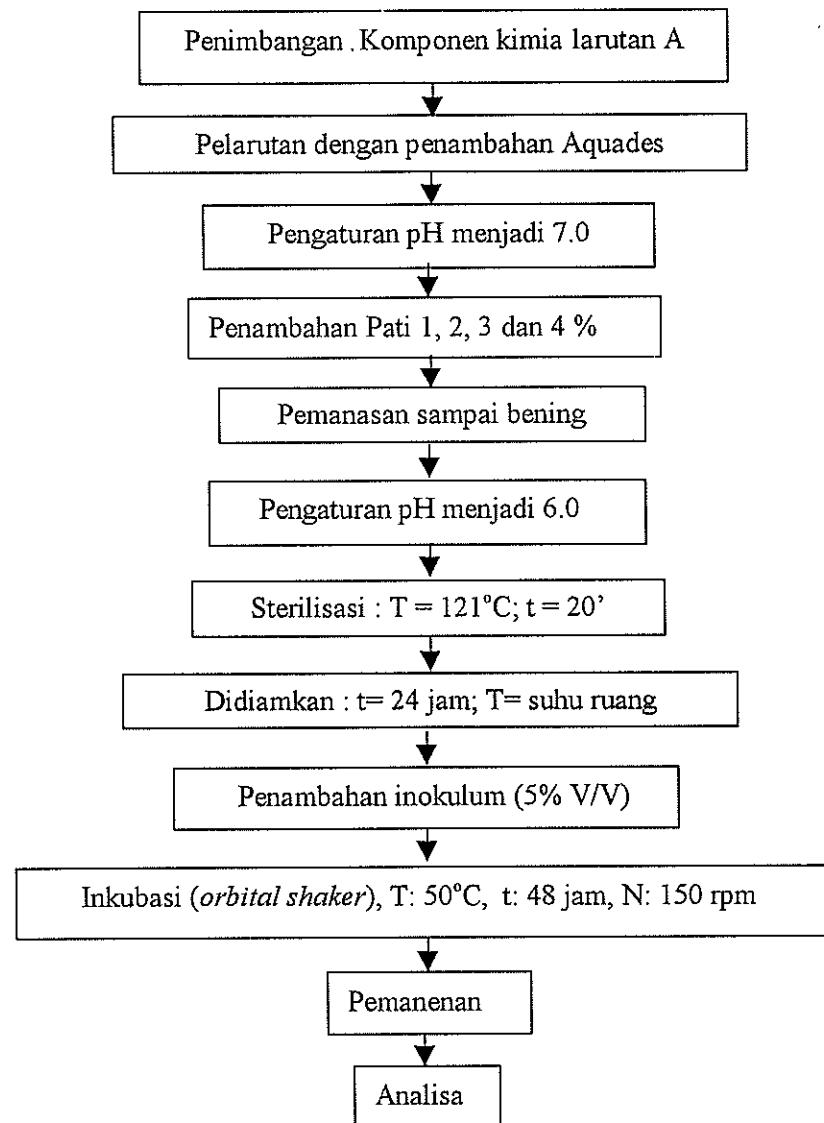
Media yang digunakan untuk kultivasi adalah media cair yang terdiri dari larutan A dengan komposisi yang tertera dalam Tabel 2. Sedangkan larutan B adalah larutan pati dengan konsentrasi divariasikan 1, 2, 3 dan 4 persen.

Tabel 2. Komposisi Kimia Media (larutan A)

Komponen (g/l)	Jumlah (%)
Ekstrak khamir	0.5
Bakto tripton	0.5
MgCl <sub>2</sub>	0.2
CaCl <sub>2</sub>	0.2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.4
NaCl	0.2
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5



Prosedur pembuatan media bagi pertumbuhan mikroba adalah sebagai berikut (Gambar 4):



Gambar 4. Prosedur pembuatan media kultivasi dan penentuan konsentrasi pati terbaik

Penelitian mengenai penentuan konsentrasi pati terbaik dilakukan dengan menggunakan labu Erlenmeyer 250 ml dengan volume kerja 100 ml. Ulangan dilakukan sebanyak dua kali.

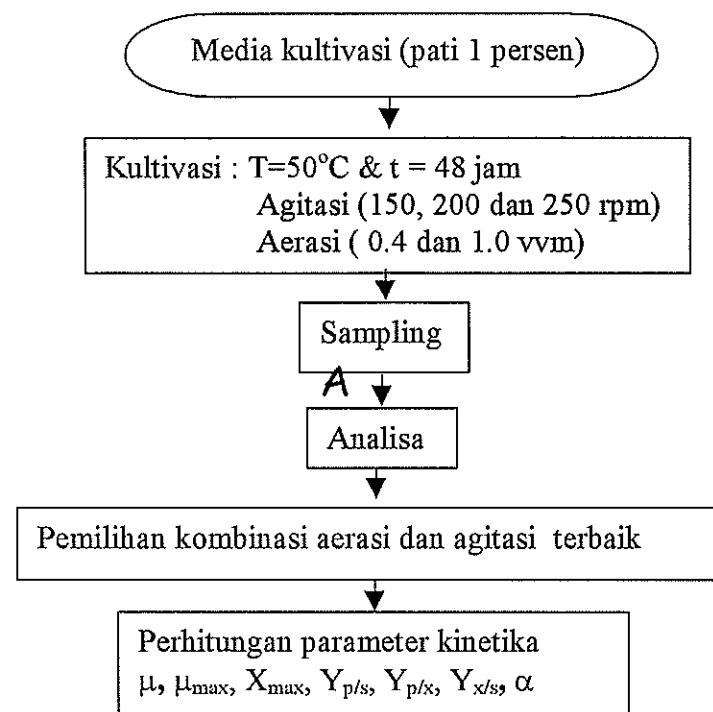
Penentuan media kultivasi terbaik didasarkan atas hasil analisis yang meliputi analisis terhadap kandungan protein terlarut dan aktivitas enzim.



#### 4. Perlakuan kombinasi aerasi dan agitasi

Produksi amilse pada bioreaktor Biostat B dengan volume kerja 1 liter dilakukan pada kondisi proses, yaitu pH 6.0, suhu 50°C dengan komposisi substrat pati terpilih menggunakan perlakuan kombinasi aerasi dan agitasi.

Aerasi yang digunakan adalah 0.4 vvm dan 1.0 vvm. Agitasi yang digunakan adalah 150 rpm, 200 rpm, dan 250 rpm. Prosedur pelaksanaan penelitian ini dapat dilihat dalam Gambar 5 berikut :



Gambar 5. Prosedur pelaksanaan optimasi aerasi dan agitasi

Pengambilan contoh dilakukan setiap 2 jam sampai jam ke-24, selanjutnya dilakukan setiap 4 jam sampai dengan jam ke-48. Parameter yang dianalisa meliputi pertumbuhan mikroba berdasarkan analisa kerapatan optis (OD), kandungan protein terlarut, aktivitas enzim, bobot sel kering dan kadar pati sisa. Prosedur analisa dapat dilihat dalam Lampiran 1.



Kombinasi aerasi dan agitasi yang paling baik dipilih berdasarkan parameter analisis hasil panen.

Perhitungan parameter kinetika fermentasi hanya dilakukan untuk media kultivasi dengan perlakuan agitasi dan aerasi terbaik. Parameter kinetika yang dihitung dalam kajian ini adalah  $\mu$ = laju pertumbuhan spesifik,  $\alpha$ = tetapan pembentukan produk berdasarkan biomassa yang terbentuk,  $Yx/s$  = rendemen biomassa yang didasarkan pada substrat yang dikonsumsi,  $Yp/s$  = rendemen produk yang didasarkan pada substrat yang dikonsumsi dan  $Yp/x$  = rendemen produk yang didasarkan pada rendemen biomassa.



## IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

### A. PENELITIAN PENDAHULUAN (OPTIMASI KONSENTRASI SUBSTRAT PATI TAPIOKA)

Keberhasilan kultivasi menggunakan kultur mikroba sangat ditentukan oleh kemampuan hidup mikroba dalam menyesuaikan diri dengan lingkungan/media yang ditempatinya. Media kultivasi merupakan faktor penting dalam produksi metabolit maupun biomassa. Menurut Stanbury dan Whitaker (1987), dalam suatu media kultivasi, komponen media tersebut minimal harus dapat memenuhi kebutuhan dasar untuk menghasilkan sel atau metabolit serta mampu memberikan energi bagi proses bioseintesa dan pemeliharaan sel. Adanya substrat tertentu dalam media produksi dapat memacu mikroba untuk mensekresikan metabolit selnya.

Pada penelitian ini, komponen nutrien dalam media telah diformulasikan khusus bagi pertumbuhan bakteri termofil TVII<sub>6</sub>. Penambahan pati ke dalam media kultivasi yang berfungsi sebagai induser dan sebagai sumber karbon pengganti glukosa dilakukan dengan konsentrasi yang berbeda untuk melihat pengaruhnya terhadap pertumbuhan mikroba yang dibiakan serta untuk melihat produk enzim yang diselekresikannya.

#### 1. Bobot Sel Kering

Isolat mikroba di dalam media propagasi diinokulasikan ke dalam media kultivasi secara aseptis. Selanjutnya diinkubasikan dalam *orbital shaker incubator* dengan suhu 50°C, kecepatan agitasi 150 rpm selama 48 jam waktu inkubasi. Diharapkan dengan kecepatan agitasi tersebut, oksigen dapat dipasok secara terus menerus ke dalam media, sehingga kebutuhan mikroba aerob terhadap oksigen dapat terpenuhi.

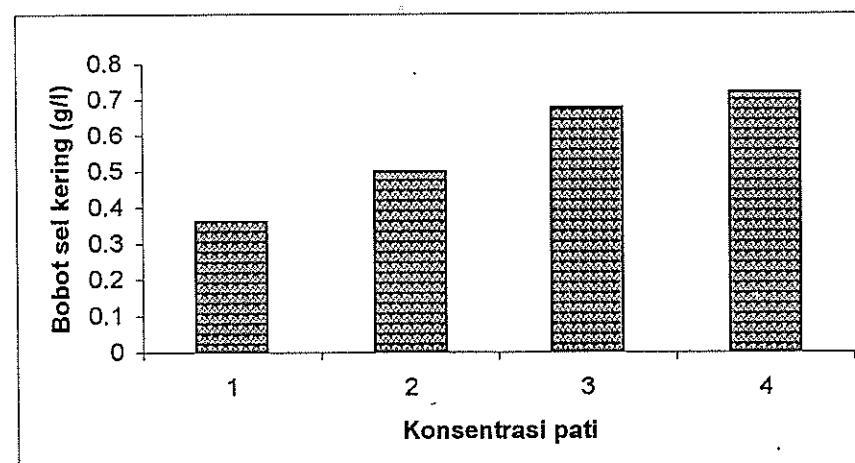


Setelah 48 jam waktu inkubasi diperoleh hasil seperti yang tertera dalam Tabel 3. berikut ini.

Tabel 3. Data kultivasi  $TVII_6$  dalam media dengan berbagai tingkat konsentrasi pati

Analisis Hasil Panen	Pati 1%	Pati 2%	Pati 3%	Pati 4%
Bobot sel kering	0.36	0.498	0.678	0.719
Protein terlarut (mg/ml)	0.206	0.230	0.276	0.291
Aktivitas enzim (U/ml)	431	427.25	434.7	430.25

Secara umum, terlihat bahwa dengan semakin meningkatkan konsentrasi pati dalam media kultivasi, bobot sel kering semakin bertambah. Hal ini dapat dilihat dalam Gambar 6.



Gambar 6. Histogram pengaruh konsentrasi pati terhadap bobot sel kering

Bobot sel rata-rata paling rendah diperoleh dari media kultivasi dengan kadar pati 1 persen, sedangkan bobot sel tertinggi diperoleh dari media kultivasi dengan kadar pati 4 persen, yaitu masing-masing sebesar 0.360 g/l



dan 0.719 g/l (Tabel 3). Pengukuran konsentrasi biomassa dilakukan untuk mengetahui pertumbuhan mikroba dalam biakan karena pertumbuhan mikroba dapat dianggap sebagai peningkatan jumlah materi sel yang dinyatakan dengan satuan massa atau jumlah sel. Peningkatan materi sel merupakan hasil serangkaian proses metabolisme yang terkoordinasi dan dikatalisis secara biologi oleh enzim. Pada penelitian ini, biomassa sel diukur berdasarkan pada bobot massa sel kering.

Peningkatan biomassa berbanding lurus dengan ditingkatkannya konsentrasi pati dalam media. Hal ini diduga disebabkan oleh adanya endapan pati yang ikut terukur dalam pengukuran bobot sel kering. Hal ini diperjelas oleh pendapat Swinkels (1985) yang menyatakan bahwa jika larutan pati yang cukup pekat didinginkan akan terbentuk gel. Fenomena ini disebut sebagai *setback* atau *retrogradasi* (perubahan dari keadaan terlarut, terdispersi, amorf menjadi tidak larut, agregasi dan mengkristal).

Bila pasta pati didinginkan, energi kinetik tidak lagi cukup tinggi untuk menahan molekul-molekul amilosa yang berikatan kembali satu sama lain serta berikatan dengan cabang amilopektin pada pinggir-pinggir luar granula, sehingga terjadi semacam jaring-jaring yang membentuk mikrokristal dan mengendap (Winarno, 1984). Sehingga dengan semakin tinggi konsentrasi pati yang ditambahkan akan semakin banyak pati yang ikut terendapkan.

## 2. Kadar Protein Terlarut

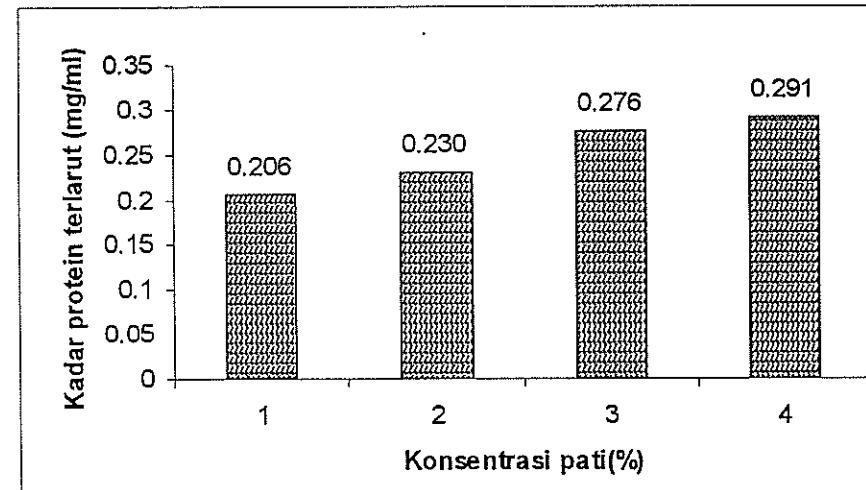
Hal yang sama juga terjadi dalam reaksi pembentukan protein terlarut. Pembentukan protein terlarut dalam media dengan kadar protein 1 persen adalah 0.206 mg/ml (terendah), sedangkan medium dengan konsentrasi pati 4 persen menghasilkan protein terlarut paling tinggi, yaitu 0.291 mg/ml (Tabel 3).

Hal ini dapat terjadi karena jumlah protein terlarut yang terukur tidak hanya protein amilase yang diharapkan, melainkan ada senyawa protein dari enzim lain yang ikut terukur. Stredansky *et al.* (1992) menjelaskan bahwa



pada jam ke-20 inkubasi *Bacillus licheniformis* untuk memproduksi  $\alpha$ -amilase terbentuk enzim lain, yaitu protease. Pada penelitian ini diduga akan terbentuk juga protease serta turut terukur dalam penentuan kadar/kandungan protein terlarut media kultivasi.

Selain itu peningkatan kadar protein terlarut yang dipengaruhi oleh semakin tingginya konsentrasi pati yang digunakan dapat juga disebabkan oleh jenis patinya itu sendiri. Menurut Greenwood (1956), pemecahan pati oleh enzim tergantung pada sumber enzim dan jenis granula patinya. Dalam penelitian ini pati yang digunakan adalah pati komersial yang memiliki tingkat kemurnian rendah, dimana pati tersebut masih mengandung senyawa protein dan lemak dalam kadar yang cukup tinggi yang dapat menghambat kerja enzim. Sehingga apabila konsentrasi pati yang ditambahkan semakin tinggi, akan semakin tinggi pula senyawa protein dan lemak dalam media kultivasi tersebut dan pada akhirnya akan mempengaruhi peningkatan protease atau senyawa lain yang terbentuk selama inkubasi.

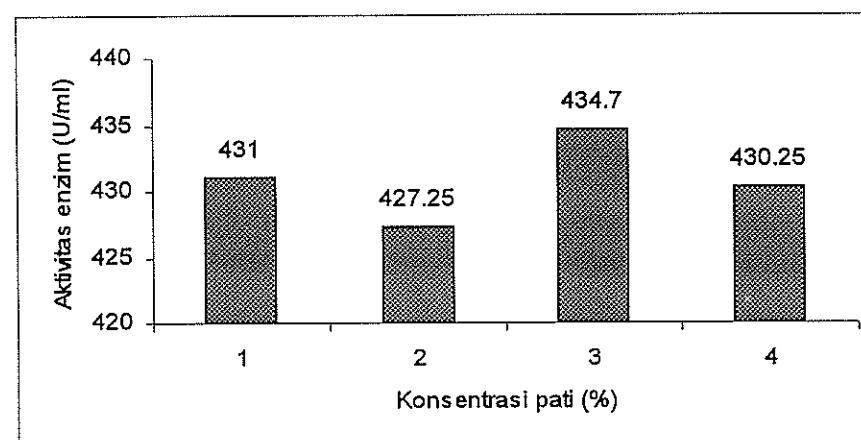


Gambar 7. Histogram pengaruh konsentrasi pati terhadap kandungan protein terlarut



### 3. Aktivitas Enzim

Dalam Gambar 8 terlihat bahwa aktivitas enzim tidak selaras dengan peningkatan konsentrasi pati dalam media kultivasi, dimana dengan meningkatnya konsentrasi pati tidak meningkatkan aktivitas enzim. Perbedaan aktivitas enzim tiap media kultivasi tidak terlalu jauh berbeda, rata-rata hanya 3.4 U/ml. Hal ini disebabkan aktivitas amilase terhambat oleh adanya senyawa lain yang terbentuk selama inkubasi dalam media kultivasi.



Gambar 8. Histogram pengaruh konsentrasi pati terhadap aktivitas enzim

Seperti dikemukakan sebelumnya, Stredansky *et al.* (1992) menjelaskan bahwa pada jam ke-20 inkubasi *Bacillus licheniformis* untuk menghasilkan  $\alpha$ -amilase terbentuk enzim lain, yaitu protease. Dalam penelitian ini diduga sintesa protease dari isolat TVII<sub>6</sub> turut menghambat aktivitas amilase yang diharapkan, sehingga dari tiga media kultivasi yang tertera dalam Gambar 8, yaitu media dengan konsentrasi pati 1, 2 dan 4 persen, aktivitas tertinggi diperoleh dari media kultivasi dengan konsentrasi pati 1 persen. Hal ini disebabkan dengan semakin tingginya konsentrasi pati (pati tapiroka komersial) akan semakin tinggi kandungan protein dan lemak dalam media



kultivasi yang pada akhirnya akan meningkatkan sintesis protease oleh sel mikroba sehingga aktivitas amilase terhambat.

Pati yang baik digunakan untuk melihat kemampuan amilase dalam menghidrolisis pati adalah pati terlarut. Pati terlarut adalah pati yang telah mengalami isolasi, fraksionasi serta pengolahan lebih lanjut sehingga memiliki tingkat kemurnian lebih tinggi dibandingkan dengan pati komersial.

Selanjutnya untuk memilih media kultivasi yang akan digunakan dalam penelitian selanjutnya, parameter yang dapat dijadikan sebagai patokan adalah kandungan protein terlarut dan aktivitas enzim, mengingat maksud penelitian ini adalah untuk memproduksi amilase sebanyak-banyaknya dengan aktivitas yang setinggi-tingginya serta dengan biaya seekonomis mungkin.

Dari data yang tertera dalam Tabel 3 dapat dilihat bahwa perbedaan kandungan protein terlarut dan aktivitas amilase dalam masing-masing media kultivasi rata-rata hanya 0.028 mg/ml dan 3.4 U/ml. Dengan perbedaan yang kecil ini maka dipilih media kultivasi dengan konsentrasi pati 1 persen. Pemilihan ini didasarkan pada pertimbangan teknis dan ekonomis.

Media kultivasi dengan konsentrasi pati yang tinggi mengakibatkan kekentalannya (viskositas) meningkat. Dengan semakin kentalnya larutan media kultivasi, energi yang diperlukan untuk menghomogenkan larutan menjadi lebih besar. Sehingga proses operasi tidak efisien. Selain itu apabila menggunakan medium dengan konsentrasi pati rendah daripada medium dengan konsentrasi pati tinggi untuk suatu hasil yang tidak berbeda jauh tentu akan lebih menghemat biaya produksi.

## B. PENELITIAN UTAMA (OPTIMASI AERASI DAN AGITASI)

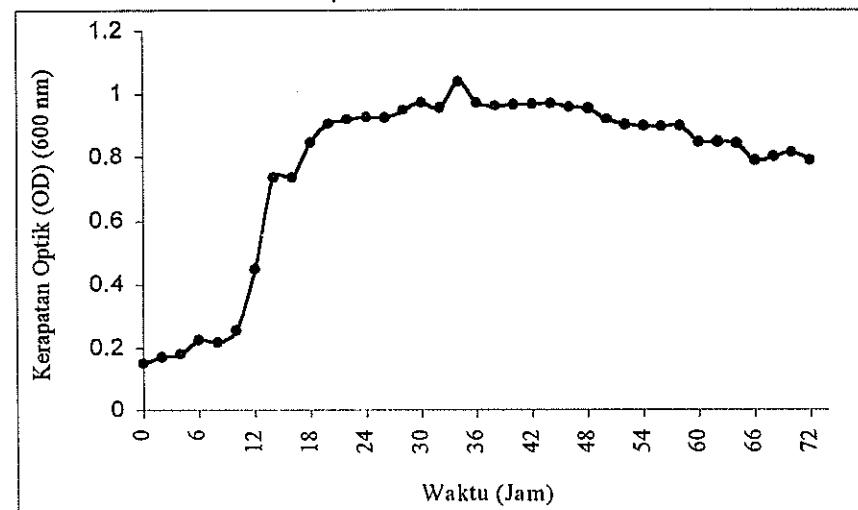
### 1. Penentuan Lama Waktu Inkubasi

Pengamatan terhadap kecenderungan pertumbuhan mikrobial dilakukan selama 72 jam waktu inkubasi. Pengamatan pola pertumbuhan didasarkan atas perubahan kekeruhan media kultivasi yang diasumsikan sebagai

penambahan jumlah dan massa sel.

Inokulum dalam media propagasi yang berumur 24 jam diinokulasikan ke dalam media steril yang terdapat di dalam tabung bioreaktor. Inokulasi dilakukan secara aseptis. Selanjutnya kondisi operasi disesuaikan dengan kondisi operasi optimum bagi pertumbuhan isolat bakteri termofil TVII<sub>6</sub> yang dibiakan, yaitu suhu 50°C dan pH 6.0.

Gambar 9 menunjukkan pola pertumbuhan bakteri termofil TVII<sub>6</sub> yang mengalami fasa lag selama rentang waktu 0 - 12 jam setelah inokulasi dilakukan. Selanjutnya pada jam ke-12, sel mencapai fase eksponensial yang ditandai dengan meningkatnya kekeruhan sampai jam ke-20. Pertumbuhan sel mencapai fase stasioner pada jam ke-22 dan setelah jam tersebut pertumbuhan berjalan lambat dan berangsur-angsur mengalami penurunan.



Gambar 9. Pola Pertumbuhan Mikrobial pada suhu 50°C dan pH 6.0

Berdasarkan hal tersebut, waktu inkubasi yang sebaiknya dipakai bagi sel mikroba (bakteri termofil TVII<sub>6</sub>) adalah selama 48 jam, karena setelah itu sel mengalami fase stasioner. Hal ini berarti pada fase tersebut tidak akan dihasilkan lagi produk metabolit primer yang diharapkan (amilase), karena amilase hanya dihasilkan pada fase eksponensial.



## 2. Penentuan Kombinasi Aerasi dan Agitasi Optimum

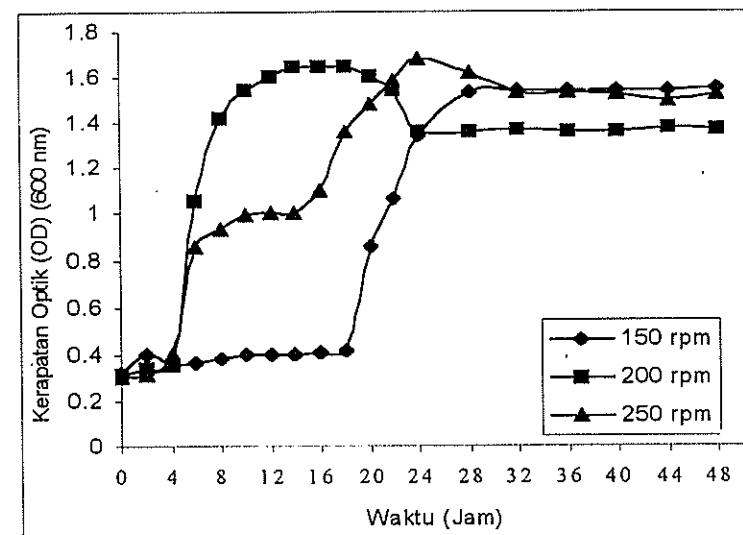
Laju aerasi yang digunakan adalah 0.4 vvm dan 1.0 vvm dengan kombinasi agitasi sebesar 150, 200 dan 250 rpm. Dengan menggunakan asumsi tersebut ingin diketahui sampai seberapa jauh kecepatan agitasi dan aerasi mempengaruhi pertumbuhan mikrobial dan metabolit selnya (enzim). Gambaran mengenai pertumbuhan sel pada laju agitasi yang berbeda disajikan pada Gambar 10 dalam Lampiran.

### 2.1. Pertumbuhan Mikrobial

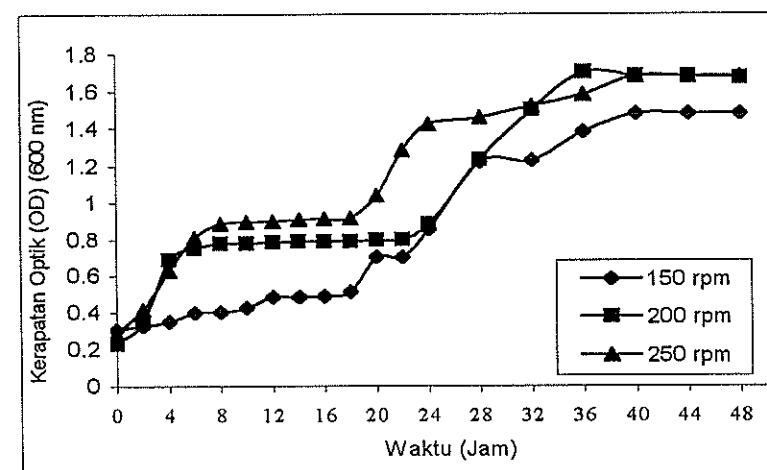
Pertumbuhan mikrobial ditandai dengan peningkatan jumlah dan massa sel (Rehm dan Reed, 1981 ; Wang et al., 1979). Pada penelitian ini, pertumbuhan mikrobial ditandai dengan meningkatnya kekeruhan media kultivasi dalam bioreaktor.

Hasil pengamatan yang tertera dalam Gambar 11 dan 12 memperlihatkan pola pertumbuhan mikrobial pada kecepatan agitasi dan aerasi yang berbeda terjadi kecenderungan peningkatan jumlah dan massa sel sebanding dengan semakin tingginya kecepatan agitasi dan aerasi yang digunakan. Fenomena ini membuktikan bahwa semakin tinggi kecepatan agitasi dan aerasi, maka metabolisme sel semakin baik karena transfer  $O_2$  dan kontak antara nutrien dengan mikroba dalam medium semakin besar sehingga sel dapat menggandakan dirinya secara cepat.

Secara umum, pertumbuhan sel mempunyai pola pertumbuhan mikrobial yang hampir sama. Pertumbuhan mula-mula berlangsung lambat, kemudian pertumbuhan sel meningkat dan pada rentang waktu tertentu relatif tetap (stasioner) dengan satu titik maksimal, kemudian akhirnya menurun.



Gambar 11. Pola pertumbuhan mikroba pada aerasi 1.0 vvm dengan kombinasi kecepatan agitasi



Gambar 12. Pola pertumbuhan mikroba pada aerasi 0.4 vvm dengan kombinasi kecepatan agitasi

Menurut Wang *et al.* (1979), berdasarkan pada laju pertumbuhan, maka pola pertumbuhan mikroba dapat dibagi menjadi tiga fase, yaitu fase pertumbuhan lambat (fase lag), fase pertumbuhan cepat (fase eksponensial) dan fase stasioner. Pada Gambar 13 dalam Lampiran

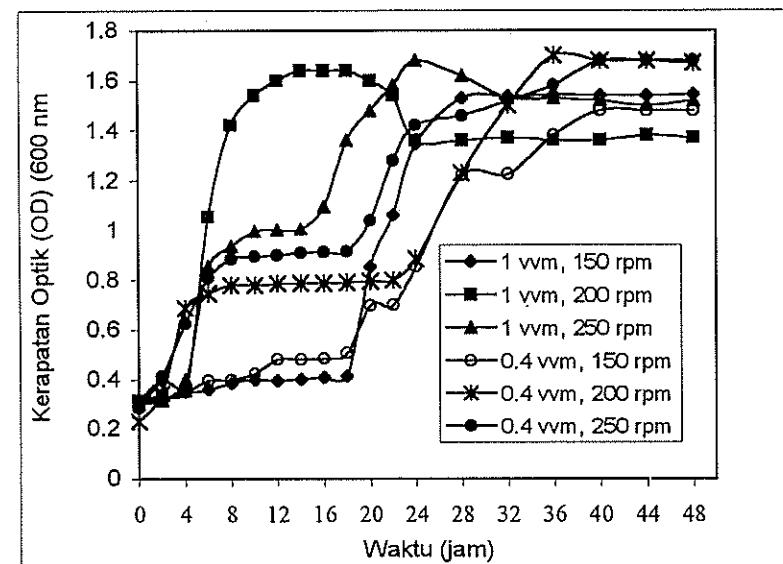


disajikan pola pertumbuhan mikrobial pada masing-masing fase tersebut.

Dalam media kultivasi dengan agitasi 150 rpm dan aerasi 0.4 vvm, fase lag berlangsung relatif lebih lama dibandingkan media kultivasi lainnya. Fase ini berlangsung pada rentang waktu 0 – 22 jam. Pada fase ini, pertumbuhan berlangsung lambat dimana semua aktivitas metabolismik dan fisiologik adalah untuk mempersiapkan pembelahan sel. Lama fase adaptasi sulit ditentukan dengan tepat karena tidak hanya tergantung pada jumlah sel yang diinokulasikan, tetapi dipengaruhi juga oleh karakteristik metabolismiknya, seperti umur dan keadaan fisiologisnya serta media kultivasi yang dibutuhkan (Scragg, 1991).

Pada media kultivasi dengan kecepatan agitasi yang sama (150 rpm) tetapi laju aerasinya ditingkatkan menjadi 1.0 vvm, terlihat adanya perubahan. Pertumbuhan sel terlihat lebih cepat yang ditandai dengan pendeknya fase adaptasi (lag). Fase lag hanya berlangsung selama rentang waktu 0 – 18 jam. Artinya, fase eksponensial mulai dicapai setelah jam ke-18. Hal ini membuktikan bahwa dengan menambah laju aerasi, maka pertumbuhan sel semakin cepat karena ketersediaan  $O_2$  dalam media kultivasi tercukupi sehingga metabolisme sel berlangsung sempurna.

Pengamatan terhadap pola pertumbuhan mikrobial dilakukan juga terhadap media kultivasi dengan perlakuan agitasi dan aerasi yang lebih besar. Dalam Gambar 14 terlihat, bahwa aerasi dan agitasi dapat mempengaruhi kecepatan pertumbuhan mikroba dalam media kultivasi. Mikroba dengan perlakuan aerasi dan agitasi paling tinggi, yaitu 1.0 vvm dan 250 rpm menunjukkan pertumbuhan yang cepat.



Gambar 14. Pola pertumbuhan mikroba pada berbagai kombinasi laju aerasi dan kecepatan agitasi

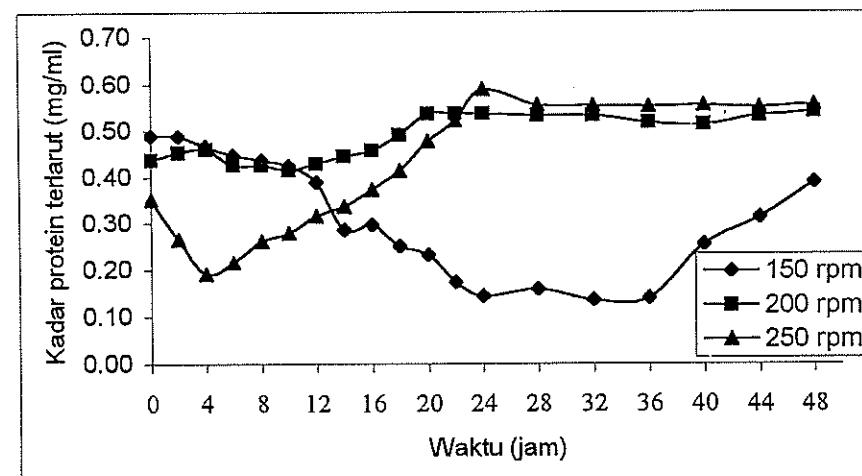
## 2.2. Pembentukan Protein Terlarut

Pengamatan terhadap kandungan protein terlarut pada tingkat aerasi dan agitasi yang berbeda memberikan hasil bahwa keenam media kultivasi dengan perlakuan berbeda mempunyai pola pembentukan protein yang hampir sama. Pada awal fermentasi, terlihat kandungan awal protein pada semua media mengalami penurunan akibat dikonsumsi oleh mikroba untuk melangsungkan kehidupannya.

Dalam suatu reaksi biokimia, sumber karbon adalah senyawa yang lebih dulu dikonsumsi. Jika sumber karbon habis, suplai nutrisi diperoleh dari sumber nitrogen. Fenomena yang terjadi (Gambar 15) memperlihatkan bahwa sumber nitrogen dikonsumsi lebih dulu daripada sumber karbon. Hal ini diduga terjadi karena media kultivasi dengan sumber karbon dari glukosa akan lebih mudah dikonsumsi oleh mikroba dibanding media kultivasi dengan sumber karbon dari pati. Hal tersebut dikarenakan mikroba harus lebih dulu



mengkonversi molekul pati yang kompleks menjadi komponen-komponen gula yang lebih sederhana. Oleh karena itu, mikroba dalam media kultivasi yang bersumber karbon dari pati akan terlebih dulu mengkonsumsi sumber N yang telah tersedia dan relatif lebih mudah dikonsumsi dibanding dengan pati.



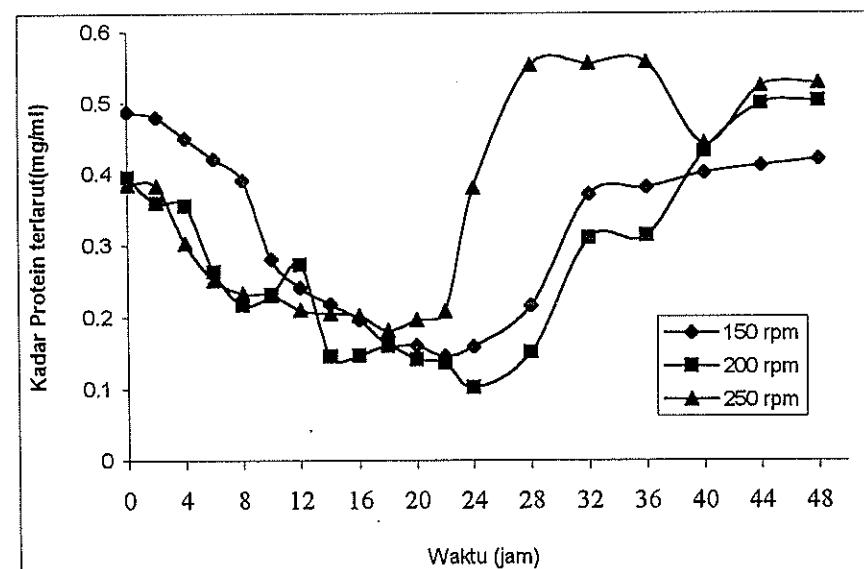
Gambar 15. Pola pembentukan protein pada aerasi 1.0 vvm dan tiga kombinasi kecepatan agitasi

Gambar 15 memperlihatkan bahwa kandungan protein terlarut tertinggi diperoleh dari media kultivasi dengan kondisi agitasi 250 rpm dan aerasi 1.0 vvm, yaitu sebesar 0.399 mg/ml, sedangkan yang terendah diperoleh dari media kultivasi beragitasi 150 rpm dan aerasi 0.4 vvm, yaitu sebesar 0.212 mg/ml. Hal ini dapat dibuktikan dengan melihat selisih antara titik puncak tertinggi dengan titik yang paling bawah yang merupakan awal pembentukan protein yang diasumsikan sebagai awal pensemkesian enzim amilase.

Pada media kultivasi beragitasi 250 rpm dan aerasi 1.0 vvm, pensemkesian enzim dimulai setelah jam ke-4 yang merupakan awal fase eksponensial sel dan berakhir pada jam ke-24 yang merupakan akhir dari fase tersebut. Selanjutnya pada jam ke-28 dan seterusnya



terjadi penurunan yang berfluktuasi. Hal tersebut diduga akibat adanya senyawa lain yang dihasilkan oleh mikroba yang dapat menghambat sintesa enzim amilase. Menurut Stredansky *et al.* (1992), dalam media kultivasi dengan substrat pati *Bacillus licheniformis* penghasil  $\alpha$ -amilase, sejak jam ke-20 inkubasi terbentuk enzim lain, yaitu protease yang akan menghambat aktivitas amilase dalam memecah pati. Sebagai konsekuensi dari hal tersebut, maka kebutuhan sel mikroba akan sumber karbon tidak terpenuhi, sehingga metabolisme sel untuk menggandakan massa dan jumlah serta untuk menghasilkan protein (amilase) terganggu.



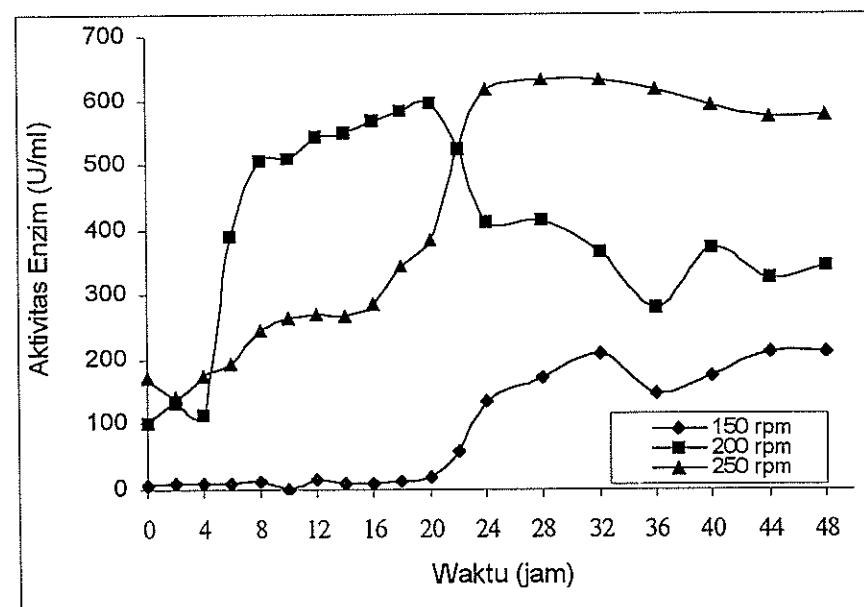
Gambar 16. Pola pembentukan protein pada aerasi 0.4 vvm dan tiga kombinasi kecepatan agitasi

### 2.3. Aktivitas Enzim

Aktivitas enzim dinyatakan dalam unit/ml didefinisikan sebagai sejumlah enzim yang dapat menghasilkan sejumlah  $\mu$  mol gula pereduksi per menit pada kondisi reaksi 50°C dan pH7.0 (Bernfeld,



1951). Hasil pengamatan (Gambar 17.) menunjukan bahwa aktivitas enzim tertinggi diperoleh dari media kultivasi beragitasi 250 rpm dan beraerasi 1.0 vvm, yaitu sebesar 631.1 U/ml yang dicapai pada jam ke-28. Pada awal kultivasi, yaitu pada fase lag, tidak terlihat adanya peningkatan aktivitas enzim yang begitu nyata. Aktivitas amilase meningkat secara bertahap. Peningkatan aktivitas dimulai setelah jam ke-4 dan jam ke-16 dimana pada saat itu diduga persediaan komponen utama sumber N mulai menipis sedangkan jumlah sel bertambah banyak.



Gambar 17. Aktivitas enzim pada aerasi 1. 0 vvm dan tiga perlakuan kecepatan agitasi

Untuk mempertahankan aktivitas hidupnya, sel mulai memecah pati dengan bantuan enzim amilase yang disekresikannya menjadi komponen yang lebih sederhana sebagai sumber karbon.

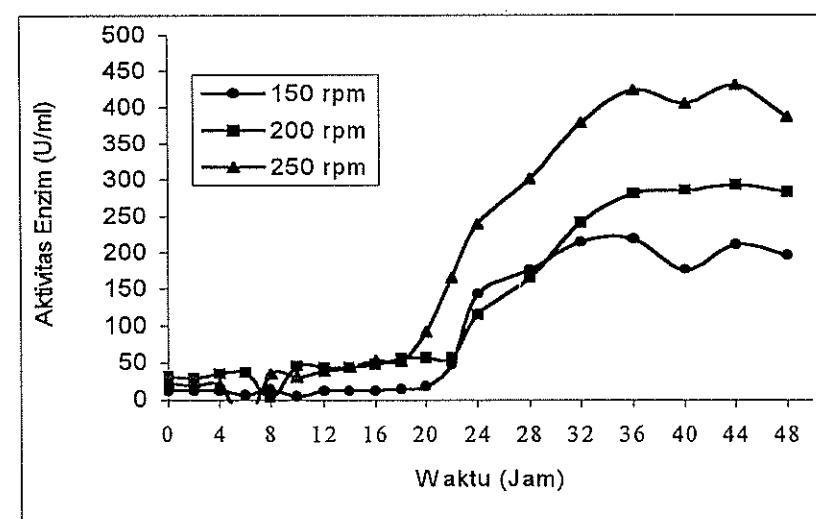
Peningkatan aktivitas mencapai puncaknya pada jam ke- 28 dan setelah itu aktivitas enzim mengalami penurunan. Pada saat yang sama terjadi pula penurunan kecepatan pertumbuhan sel dan pembentukan



protein. Hubungan pembentukan protein, aktivitas enzim dan pertumbuhan mikroba dapat dilihat dalam Gambar 19 dan 20.

Selanjutnya aktivitas mengalami penurunan yang berfluktuasi sampai akhir fermentasi, yaitu jam ke-48. Penurunan aktivitas ini disebabkan selama fermentasi berlangsung, komposisi kimia cairan kultivasi mengalami perubahan karena nutrien terus menerus dikonsumsi (Said, 1987). Akibatnya kondisi lingkungan tidak berada dalam keadaan mantap sehingga pertumbuhan mulai menurun. Penurunan pertumbuhan ini diduga berakibat terhadap penurunan kuantitas enzim yang disekresikan dan akhirnya berpengaruh juga terhadap penurunan aktivitas secara keseluruhan.

Selain itu, penurunan aktivitas enzim ini dipengaruhi juga oleh senyawa tertentu (produk penghambat) yang disintesa oleh mikroba selama pertumbuhannya. Pensintesaan senyawa penghambat ini diduga karena kondisi lingkungan hidupnya mengalami perubahan sehingga mendukung bagi mikroba untuk mensintesa metabolit lainnya yang ternyata dapat menghambat Aktivitas amilase. Menurut Stredansky *et al.*, (1992) metabolit ini adalah protease.



Gambar 17. Aktivitas enzim pada aerasi 0.4 vvm dan tiga perlakuan kecepatan agitasi



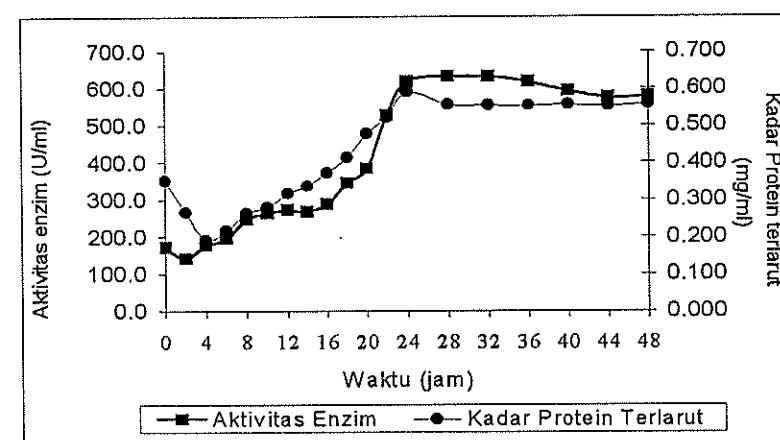
Aktivitas enzim paling rendah diperoleh dari media kultivasi beragitasi 150 rpm dan aerasi 0.4 vvm, yaitu sebesar 218 U/ml yang diperoleh pada jam ke-36 waktu inkubasi (Gambar 17). Rendahnya aktivitas ini diduga karena pengaruh pasokan atau transfer oksigen ke dalam cairan kultivasi dan kontak antara substrat dengan mikroba yang minimum. Sedikitnya jumlah oksigen yang larut dalam cairan kultivasi diduga berhubungan erat dengan rendahnya agitasi dan aerasi yang digunakan sehingga kemampuan sel untuk tumbuh dan berkembang menjadi terhambat. Dengan terhambatnya perkembangan sel (baik massa maupun jumlah) tersebut menyebabkan jumlah enzim yang disekresikan sedikit. Sebagai konsekuensi dari hal tersebut, aktivitas enzim menjadi rendah. Dalam hal ini Aktivitas enzim dianggap setara dengan jumlah amilase yang dihasilkan.

Wang *et al.* (1979) membagi pola kinetika pertumbuhan dan pembentukan produk menjadi tiga, yaitu pola pembentukan yang berasosiasi dengan pertumbuhan, pola pembentukan produk yang tidak berasosiasi dengan pertumbuhan dan pola pembentukan produk yang merupakan campuran antara pola yang berasosiasi dan tak berasosiasi.

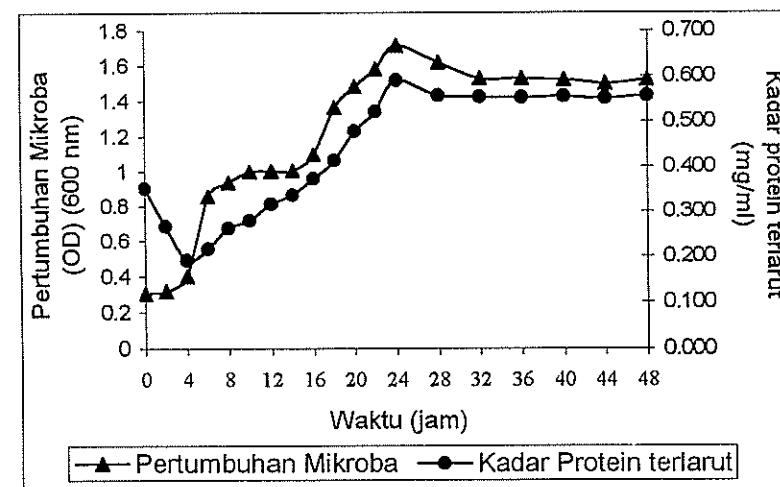
Aktivitas enzim ini dapat dianggap setara dengan jumlah amilase yang dihasilkan. Pengamatan terhadap pola pembentukan produk dapat dilihat dalam Gambar 19. Dalam Gambar 19 terlihat pembentukan amilase selama fermentasi menunjukkan pola pembentukan produk yang berasosiasi dengan pertumbuhan sel mikroba TVII<sub>6</sub>. Karena amilase terbentuk pada awal metabolisme sel, maka produk yang terbentuk merupakan metabolit primer sebagai hasil langsung dari jalur metabolisme katalitik sel. Pensintesaan metabolit primer dimulai saat menipisnya beberapa zat gizi dalam media pertumbuhannya (misal, menurunnya ketersediaan zat gizi esensial sumber N).

Secara umum, hasil kultivasi menggunakan fermentor dengan kondisi terkontrol dibandingkan dengan hasil kultivasi menggunakan

labu Erlenmeyer dengan kondisi tidak terkontrol, semua parameter yang diukur menunjukkan bahwa hasil kultivasi dengan kondisi tidak terkontrol adalah lebih buruk. Hal ini diduga disebabkan keadaan lingkungan cairan kultivasi seperti pH dapat berubah tanpa terkontrol secara ekstrim menjadi sangat asam atau basa. Dengan keadaan lingkungan pertumbuhan yang melewati batas toleransinya tersebut memungkinkan proses metabolisme sel terhambat bahkan terhenti sama sekali.



Gambar 19. Hubungan aktivitas enzim dengan pembentukan protein



Gambar 20. Hubungan pembentukan protein dengan pertumbuhan mikroba

Moat (1979) menjelaskan bahwa nilai pH yang tidak relevan akan berpengaruh langsung terhadap permeabilitas sel dan aktivitas fisiologis lainnya. Di dalam cairan kultivasi, pH mempengaruhi senyawa protein, baik enzim maupun sistem transpor yang terdapat dalam sel. Struktur protein akan berubah apabila pH media yang ditempatinya mengalami perubahan. Akibatnya seluruh proses metabolisme sel terhambat.

Pengamatan terhadap proses fermentasi yang dilakukan memberikan hasil bahwa kombinasi aerasi dan agitasi yang sesuai dapat mengoptimalkan proses produksi enzim. Dalam penelitian ini, kombinasi aerasi 1.0 vvm dengan agitasi 250 rpm merupakan kombinasi yang dapat mengoptimalkan proses metabolisme mikroba dan akan digunakan untuk perhitungan penentuan parameter kinetika selanjutnya.

## 2.4. Bobot Sel Kering

Banyak cara dapat digunakan untuk menduga pengukuran pertumbuhan mikrobial, baik untuk pengukuran jumlah sel maupun untuk mengukur massa sel. Untuk mengukur jumlah sel, dapat dilakukan perhitungan mikroskopik, *viable plate count*, kultur slide, *coulter counter* dan nefolometri. Sedangkan untuk mengukur massa sel dapat digunakan parameter kekeruhan maupun dari bobot kering selnya (Said, 1987).

Said (1987) menyatakan bahwa, metode yang paling umum untuk mengukur massa sel total adalah dengan cara memperoleh bobot sel kering. Dari pengukuran bobot sel kering dapat ditentukan laju pertumbuhan spesifik mikroba yaitu dengan memplotkan  $\ln X$  (bobot sel kering) terhadap waktu ( $t$ ).

Hasil perhitungan laju pertumbuhan spesifik ( $\mu$ ) dengan perlakuan agitasi dan aerasi yang berbeda dapat dilihat dalam Tabel 4. berikut.



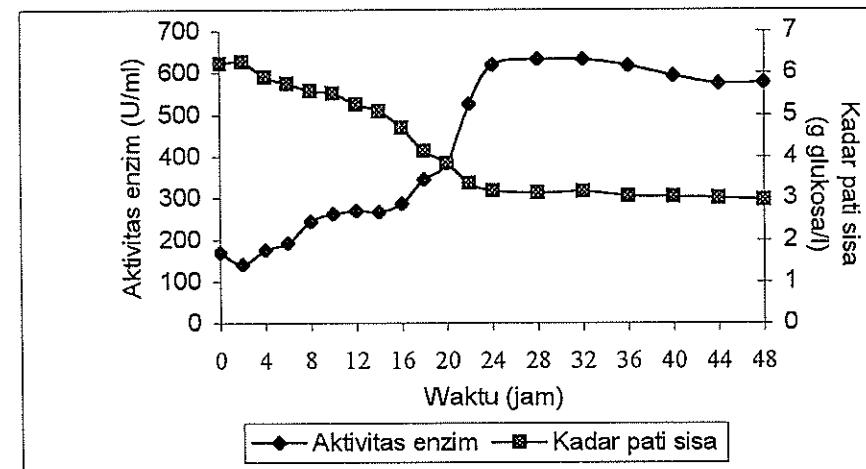
Tabel 4. Nilai konstanta laju pertumbuhan spesifik,  $\mu$  (g/l), pada perlakuan aerasi dan agitasi berbeda

0.4 vvm			1.0 vvm		
150 rpm	200 rpm	250 rpm	150 rpm	200 rpm	250 rpm
$\mu=0.068$	$\mu=0.08$	$\mu=0.106$	$\mu=0.12$	$\mu=0.127$	$\mu=0.147$

Dari Tabel 4. ini terlihat bahwa dengan meningkatkan laju aerasi dan kecepatan agitasi dapat meningkatkan laju pertumbuhan sel mikroba. Hal ini sesuai dengan pernyataan Judoamidjojo *et al.* (1990) bahwa suatu penurunan oksigen terlarut menyebabkan penurunan dalam laju pertumbuhan spesifik.

## 2.5. Kadar Pati Sisa

Gambar 20 menunjukkan hubungan antara penurunan kadar pati akibat hidrolisis oleh amilase.



Gambar 21. Hubungan penurunan kadar pati dengan aktivitas enzim

Pada Gambar 21 diatas terlihat penurunan kadar pati berlangsung sejak jam ke-0 sedangkan aktivitas enzim baru mengalami peningkatan sekitar jam ke-2. Hal ini disebabkan bahwa amilase sudah terbentuk saat



perlakuan propagasi, sehingga saat diinokulasikan pada media kultivasi yang baru, sifat katalitik enzimnya sudah bekerja menghidrolisis substrat pati.

Menjelang jam ke-24 penurunan kadar pati relatif tidak terlalu nyata, hal ini diduga diakibatkan aktivitas enzim sudah berkurang akibat adanya penzintesaan metabolit lain yang menghambat aktivitasnya, sehingga pati tidak terhidrolisis dengan sempurna.

## 2.6. Penentuan Parameter Kinetika Fermentasi

Kinetika fermentasi dikaji berdasarkan laju pembentukan biomassa ( $dX/dt$ ), laju pembentukan produk ( $dP/dt$ ) dan laju penggunaan substrat ( $dS/dt$ ). Parameter-parameter yang dihitung dalam kajian kinetika adalah laju pertumbuhan spesifik ( $\mu = \text{jam}^{-1}$ ), dan tetapan pembentukan produk yang berasosiasi dengan pertumbuhan ( $\alpha$ ).

Dari hasil perhitungan parameter kinetika untuk media kultivasi dengan aerasi 1.0 vvm dan agitasi 250 rpm, diperoleh nilai  $\mu$  sebesar  $0.147 \text{ jam}^{-1}$ . Nilai  $Y_p/s$  merupakan koefisien hasil yang menggambarkan efisiensi konversi nutrien menjadi produk (enzim). Dari hasil pengukuran, diperoleh nilai  $Y_p/s$  sebesar  $0.129 \text{ (g/g)}$ .

Jika dilihat dari jumlah produk (enzim) yang dihasilkan per jumlah sel yang tumbuh, maka diperoleh nilai  $Y_p/x$  sebesar  $0.37 \text{ (g/g)}$ . Sedangkan nilai  $Y_x/s$  yang merupakan efisiensi konversi nutrien dalam substrat menjadi biomassa adalah sebesar  $0.315 \text{ (g/g)}$ .

Enzim amilase, jika dilihat dari pola pembentukannya merupakan produk yang berasosiasi dengan pertumbuhan sel atau pembentukan produknya terjadi pada saat fase pertumbuhan. Oleh karena itu, nilai  $\alpha$  dapat disetarakan dengan nilai konversi pembentukan produk berdasarkan pertumbuhan biomassa ( $Y_p/x$ ) yaitu  $0.37$ .



Tabel 5. Nilai parameter kinetika kultivasi dalam bioreaktor Biostat-B 2 liter dengan laju aerasi 1.0 vvm dan kecepatan agitasi 250 rpm

Parameter kinetika	Nilai Parameter kinetika
$\mu$	0.147 jam <sup>-1</sup>
$\mu_{max}$	0.147 jam <sup>-1</sup>
$X_{max}$	1.230 (g/l)
$Y_{p/s}$	0.129 (g/g)
$Y_{p/x}$	0.370 (g/g)
$Y_{x/s}$	0.315 (g/g)
$\alpha$	0.37

## V. KESIMPULAN DAN SARAN

## A. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil percobaan, maka dapat ditarik suatu kesimpulan bahwa media kultivasi dengan konsentrasi pati berbeda hanya menghasilkan produk (protein terlarut) dan aktivitas enzim yang tidak berbeda jauh, yaitu hanya berkisar 0.028 mg/ml dan 3.4 U/ml. Sehingga media kultivasi dengan konsentrasi pati paling rendah (1 persen) dipilih sebagai media untuk kultivasi selanjutnya.

Perlakuan agitasi dan aerasi pada media kultivasi dapat meningkatkan laju pertumbuhan spesifik, produk, aktivitas enzim, serta memperpendek waktu adaptasi sel. Media kultivasi dengan aerasi 0.4 vvm dan agitasi 150 rpm merupakan media kultivasi dengan nilai laju pertumbuhan spesifik terendah, yaitu  $0.068 \text{ jam}^{-1}$ , sedangkan media kultivasi dengan aerasi 1.0 vvm dan agitasi 250 rpm merupakan media kultivasi dengan nilai laju pertumbuhan spesifik paling tinggi, yaitu  $0.147 \text{ jam}^{-1}$ .

Media kultivasi dengan aerasi 0.4 vvm dan agitasi 150 rpm menghasilkan kandungan protein terlarut paling rendah sebesar 0.212, sedangkan media kultivasi dengan aerasi 1.0 vvm dan agitasi 250 rpm menghasilkan kandungan protein terlarut paling tinggi, yaitu 0.399 mg/ml.

Aktivitas enzim tertinggi diperoleh dari media kultivasi dengan aerasi 1.0 vvm dan agitasi 250 rpm, yaitu sebesar 631.1 U/ml dan yang terendah diperoleh dari media kultivasi beraerasi 0.4 vvm dan agitasi 150 rpm, yaitu sebesar 218 U/ml.

Fase adaptasi pada media kultivasi dengan aerasi 1.0 vvm dan agitasi 250 rpm hanya berlangsung sampai jam ke-4 sedangkan pada media kultivasi dengan aerasi 0.4 vvm dan agitasi 150 rpm, fase adaptasi berlangsung paling lama yaitu sampai jam ke-24.

Perhitungan parameter kinetika pada media kultivasi dengan laju aerasi 1.0 vvm dan agitasi 250 rpm menghasilkan nilai sebagai berikut : laju pertumbuhan spesifik ( $\mu$ ) = 0.147 jam<sup>-1</sup>,  $\mu_{max}$  = 0.147 jam<sup>-1</sup>,  $X_{max}$  = 0.123 g/l,  $Y_p/s$  = 0.129 g/g,  $Y_p/x$  = 0.37 g/g,  $Y_{xs}$  = 0.315 g/g dan  $\alpha$  = 0.37.

## B. SARAN

Saran yang dapat penulis berikan untuk kelanjutan dan perbaikan penelitian ini adalah :

1. Dilakukan penelitian mengenai optimasi konsentrasi penambahan *antifoam* dari jenis yang lain agar proses pembusaan dapat diatasi dengan mengurangi resiko sekecil mungkin berkurangnya kelarutan oksigen dalam media kultivasi.
2. Dilakukan penelitian mengenai optimasi konsentrasi ekstrak khamir
3. Dilakukan penelitian mengenai penetapan konstanta laju kelarutan oksigen untuk mengetahui sampai sejauh mana oksigen dapat melarut dalam media dengan konsentrasi pati yang sudah optimum ini.



## DAFTAR PUSTAKA

- Apriyantono, A., D. Fardiaz, N.L. Puspitasari, Sedarwati, S. Budiyanto. 1989. Analisa Pangan. Depdikbud, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, PAU Pangan dan Gizi, IPB, Bogor.
- Arima, K. 1964. Microbial Enzyme Production in Industrial and Chemical Microbiology. John Wiley and Sons, New York.
- Atlas, R.M. 1984. Microbiology Fundamentals and Applications. Mac Milan Publishing Company, New York.
- Bernfeld, P. 1955. Amylases  $\alpha$  and  $\beta$ . In Method in Enzymology. Vol. I : 149 - 158.
- Biro Pusat Statistika. 1995. Statistik Industri Besar dan Sedang Indonesia. Klui 31. Statistical Year Book of Indonesia, Jakarta.
- Biro Pusat Statistika. 1997. Statistik Indonesia. Statistical Year Book of Indonesia, Jakarta.
- Blevins, W.T. and N.D. Davis. 1979. Methods for Laboratory Fermentation. In. H.J. Peppler and D. Perlman (eds). Microbial Technology ; Microbial Process. Vol I. Academic Press, New York.
- Charley, H. 1982. Food Science. John Wiley & Sons., New York.
- Crueger, W.M. and A. Crueger. 1984. Biotechnology a Textbook of Industrial Microbiology. Scient. Tech. Inc., London.
- Fogarty, W.M. 1983. Microbial Enzymes and Biotechnology. Appl. Sci. Pub., London.
- Girindra, A. 1986. Biokimia. Departemen Biokimia. IPB, Bogor.
- Greenwood, C.T. 1956. Aspect of Physical Chemistry of Starch. Di dalam M.L. Wolfrom (Ed). Adv. Of Cereal Chemist. Inc. St. Paul, Minnesota.
- Hairita, I. 1987. Produksi Enzim  $\beta$ -amilase dari *Aspergillus niger* L-5i/ NRRL A-11, 264. Tesis. Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Bogor.



- Jay, M.J. 1978. *Modern Food Microbiology*. Van Nostrand Company, New York.
- Judoamidjojo, M., A.A. Darwis, dan E. Gumbira S., 1990. *Teknologi Fermentasi*. Rajawali Pers, Jakarta.
- Judoamidjojo, R. M., E. G. Sa'id dan L. Hartoto. 1989. *Biokonversi*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan-Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi- Pusat Antar Universitas-IPB, Bogor.
- Kim, T.U., B.G. gu, J.Y., Jeong, S.M., Byun dan Y.C. Shin. 1995. Purification and Characterization of A Maltotetraose-Forming Alkaline  $\alpha$ -amilase from an Alkalophilic *Bacillus* Strain GM8901. *J. Appl. and Environ. Microbiol.* 1995 : 3105 – 3112.
- Kimbal, J.W. 1989. *Biologi*. Jilid I. Edisi V. Erlangga, Jakarta.
- Kulp, K. 1975. *Carbohydrates*. In G. Reed (eds). *Enzymes in Food Processing*, Academic Press.
- Lay, B.W. 1994. *Analisis Mikroba di Laboratorium*. PT Raja Grafindo Persada, Jakarta.
- Lay, B.W. dan Hastowo. 1992. *Mikrobiologi*. Rajawali Pers, Jakarta.
- Lowry, O.H., NP. Rosebrough, A.L. Farr dan R.J. Randall. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biochem.* 193 : 265 – 275.
- Mangunwidjaja, D. dan A. Suryani. 1994. *Teknologi Bioproses*. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Michelena, V. dan F.J. Castillo. 1984. Di dalam Ansori Rahman. 1992. *Teknologi Fermentasi*. Arcan, Jakarta.
- Moat, G.A. 1979. *Microbial Physiology*. John Wiley and Sons, New York.
- Nanmori, T. 1988. *Bacterial  $\alpha$ -amylases*. In The Amylase Research Society of Japan, ed. *Handbook of Amylases and Related Enzymes*. Pergamon Press, Oxford.
- Rao, V.B., N.V.S. Sastri and P.V.S. Rao. 1981. Purification and Characterisation of Thermostable Glucoamylase from Thermophilic Fungus *Thermomyces lanuginosus*. *J. Biochemistry*, London.
- Reed, G. (eds). 1975. *Enzymes in Food Processing*. Academic Press, New York.



- Rehm, H.J. dan G. Reed. 1981. *Di dalam* E.G. Said. 1987. Bioindustri. PT Mediyatama Sarana Perkasa, Jakarta.
- Rick, W. dan H.P. Stegbauer. 1968.  $\alpha$ -amylases. Measurement of Reducing Groups. In. H.U. Bergmeyer (ed). Method of Enzymatic Analysis.
- Sa'id, E.G. 1987. Bioindustri. PT. Mediyatama Sartana Perkasa, Jakarta.
- Scragg, A. 1985. Bioreactor for The Mass Cultivation of Plant Cells. *J. Biotechnol.* 15:41-50.
- Stanbury, P.F. dan J.R. Whitaker (eds). 1984. Principles of Fermentation Technology. Academic Press, New York.
- Stredansky, M., R. Svore, E. Sturdik dan K. Dercova. 1992. Repeated Batch  $\alpha$ -amylase Production in Aqueous Two-Phase System With *Bacillus* Strain. *J. Biotechnol.* 27: 181-190. Elsevier Science Publishers, Lomdon.
- Suhartono, M.T. 1989. Enzim dan Bioteknologi. PAU Bioteknologi IPB, Bogor.
- Triwiyono, B. 1996. Produksi Enzim Amilolitik Penghidrolisis Pati Mentah oleh *Aspergillus* B-04. Tesis. Fakultas Pasca Sarjana IPB, Bogor.
- Vihinen, M. dan P. Manstala. 1989. Critical Review in Biochemistry and Molecular Biology. *Di dalam* Ahmadi, M.D. 1998. Karakterisasi Amilase Dari Isolat Bakteri Lokal MII<sub>10</sub>. Skripsi.
- Wang, D.I.C., C.L. Cooney., A.L. Demain, P. Dunhill, A.E. Humphrey dan M.D. Lilly. 1979. Fermentation and Enzyme Technology. John Wiley and Sons, New York.
- Whitaker, J.R. 1972. Principle of Enzymology for The Food Science. Marcel Dekker Inc., New York.
- Winarno, F.G. 1984. Enzim Pangan. Gramedia, Jakarta.
- Winarno, F.G. 1988. Kimia Pangan dan Gizi. Gramedia, Jakarta.
- Wiseman, A. (ed). 1985. Handbook of Enzyme Biotechnology. John Wiley and Sons, New York.
- Yusri, N. 1997. Penentuan Kondisi Optimum Produksi Enzim Amilase dari Bakteri Termofilik Indegenous. Skripsi. Fateta, IPB, Bogor.

## LAMPIRAN



## Lampiran 1. Prosedur Analisis Hasil Panen

### 1. Biomassa

#### a. Kerapatan Optik

Kerapatan optik sampel-sampel hasil panen ditentukan dengan menggunakan alat *spektrofotometri double beam*. Setelah dipanen, sampel-sampel disentrifus dengan kecepatan 4 000 rpm, suhu 4°C selama 30 menit sehingga terpisah biomassa dan supernatannya. Biomassa yang mengendap di dasar tabung sentrifus dilarutkan kembali dengan media steril (divortex) lalu diukur langsung dengan cara menuangkan sampel berupa cairan tersebut ke dalam kuvet. Lalu kerapatan optiknya diukur dengan panjang gelombang 600 nm. Blanko yang digunakan adalah media steril.

Setelah pengukuran kerapatan optik, hasil panen disentrifus kembali dengan kecepatan 4000 rpm selama 30 menit dan suhu 4°C sehingga diperoleh endapan yang merupakan biomassa dan media steril yang digunakan sebagai pelarut.

Supernatan yang diperoleh dari hasil sentrifuse pertama kali selanjutnya digunakan untuk menghitung aktifitas enzim, protein dan gula pereduksi.

#### b. Bobot massa kering (Pons *et. al.*, 1990)

Endapan yang diperoleh dari hasil sentrifus dikeluarkan dari tabung-tabung sentrifus dan dimasukkan ke dalam wadah-wadah aluminium foil yang telah ditimbang berat kosongnya terlebih dahulu. Endapan tersebut kemudian dikeringkan di dalam oven bersuhu 70°C selama 48 jam. Setelah itu ditimbang berat keringnya sampai mencapai berat konstan dan diperoleh bobot massa kering dalam satuan g/l.



## 2. Aktifitas Enzim

### Metode DNS (Bernfeld, 1955)

Aktifitas enzim diukur dengan menggunakan metode DNS. Dalam suasana alkali gula pereduksi akan mereduksi asam 3,5 – dinitrosalisolat (DNS) membentuk senyawa yang dapat diukur absorbansinya pada panjang gelombang 550 nm. Sebanyak 0.1 ml supernatan dan 0.9 ml bufer fosfat sitrat pH 7.0 dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Lalu diinkubasikan pada suhu 50°C selama 5 menit. Setelah itu ditambahkan 2 ml substrat, yaitu 2 persen *soluble starch* dalam bufer fosfat sitrat pH 7. Selanjutnya diinkubasikan lagi pada suhu 50°C selama 30 menit. Setelah itu ditambahkan 3 ml DNS dan dimasukkan ke dalam air mendidih selama 5 menit. Kemudian didinginkan selama  $\pm$  15 menit. Lalu 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, dan 8 000 ppm. Blanko yang digunakan adalah akuades.

Aktivitas enzim amilase ditentukan dengan perhitungan sebagai berikut :

$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{\text{ppm} \times 1\,000}{360.32} \text{ unit ml}$$

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

Sebanyak 1 ml supernatan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Lalu ditambahkan 5 ml larutan alkalin cooper dan didiamkan selama 10 menit. Kemudian ditambahkan 0.5 ml Folin Ciocalteu dan divortex. Lalu didiamkan selama 30 menit. Selanjutnya absorbansi diukur pada panjang gelombang 650 nm.



Hal yang sama dilakukan pada standar dan blanko. Sebagai standar digunakan standar protein *Bovine Serum Albumin* (BSA) dengan konsentrasi 100, 200, 300, 400, 600 dan 1 000 ppm. Blanko yang digunakan adalah akuades. Protein yang diperoleh dinyatakan dalam satuan mg/ml.

#### 4. Gula Reduksi (Miller, 1959)

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

#### 5. Kadar Pati Sisa (Modifikasi Metode Hidrolisis Asam) (Priyantono *et al.*, 1989)

Sebanyak 1 ml sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 0.1 ml HCl 25 %. Selanjutnya mulut tabung ditutup aluminium foil rapat-rapat. Tabung reaksi dipanaskan dalam penangas air selama 2.5 jam. Setelah itu dibiarkan dingin dan dinetralkan dengan menambahkan 0.085 ml NaOH 45 %. Penentuan kadar gula yang dinyatakan sebagai glukosa dilakukan seperti pada penentuan gula pereduksi. Sebagai standar digunakan larutan glukosa 500, 1 000, 2 000, 4 000, 6 000, 8 000, 10 000, dan 15 000 ppm dan blanko yang digunakan adalah akuades.

## Lampiran 2. Prosedur Pembuatan Perekusi

a. Prosedur Pembuatan Preaksi DNS (Bernfeld, 1955)

Sebanyak 5 gr DNS dilarutkan dalam 100 ml NaOH 2 N sambil diaduk. Lalu ditambahkan 200 ml akuades sambil diaduk sampai semua DNS terlarut. Setelah itu ditambahkan 150 gr Na, K- Tartrat, diaduk, lalu ditepatkan sampai 500 ml dengan menambahkan akuades.

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

Perekusi A : 2 persen natrium bikarbonat anhidrat dalam larutan NaOH 0.1 N

Pereaksi B : 0.5 persen  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  dalam larutan Na, K-Tartarat 1 persen  
(larutan ini dibuat pada saat akan digunakan)

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

Perekasi D : Folin Ciocalteau (dengan perbandingan 1 : 1) (Merck)



### Lampiran 3. Data hasil penelitian optimasi konsentrasi substrat pati

Data protein terlarut (g/l)

	Konsentrasi Pati			
	1%	2%	3%	4%
Ulangan 1	0.205	0.227	0.272	0.296
Ulangan 2	0.207	0.232	0.279	0.286

Data Aktivitas enzim amilase (U/ml)

	Konsentrasi Pati			
	1%	2%	3%	4%
Ulangan 1	439.1	455.2	440.6	443.5
Ulangan 2	422.9	399.3	428.8	417

Data bobot sel kering (g/l)

	Konsentrasi Pati			
	1%	2%	3%	4%
Ulangan 1	0.358	0.497	0.68	0.715
Ulangan 2	0.362	0.499	0.675	0.723

**Lampiran 4. Data hasil pengujian pertumbuhan sel berdasarkan kerapatan optik (OD) pada penelitian optimasi agitasi dan aerasi**

Rekapitulasi data pertumbuhan mikroba pada berbagai kombinasi laju aerasi dan agitasi

Waktu (jam)	1 vvm			0.4 vvm		
	150 rpm	200 rpm	250 rpm	150 rpm	200 rpm	250 rpm
0	0.316	0.315	0.3	0.305	0.230	0.285
2	0.396	0.337	0.315	0.325	0.345	0.414
4	0.351	0.355	0.400	0.350	0.688	0.626
6	0.360	1.055	0.855	0.395	0.748	0.808
8	0.385	1.420	0.935	0.400	0.778	0.885
10	0.400	1.540	0.995	0.424	0.780	0.895
12	0.398	1.600	1.000	0.482	0.786	0.900
14	0.401	1.640	1.005	0.482	0.789	0.909
16	0.408	1.640	1.095	0.486	0.789	0.912
18	0.413	1.640	1.360	0.508	0.790	0.915
20	0.855	1.600	1.480	0.700	0.795	1.040
22	1.063	1.540	1.580	0.701	0.800	1.280
24	1.345	1.360	1.713	0.855	0.885	1.420
28	1.530	1.360	1.620	1.220	1.230	1.460
32	1.538	1.370	1.530	1.225	1.500	1.520
36	1.543	1.360	1.530	1.380	1.682	1.580
40	1.540	1.360	1.520	1.480	1.680	1.680
44	1.540	1.380	1.500	1.480	1.680	1.680
48	1.545	1.370	1.520	1.480	1.673	1.680



**Lampiran 5. Data hasil pengujian kadar protein terlarut pada penelitian optimasi agitasi dan aerasi (g/l)**

Rekapitulasi data protein terlarut pada berbagai kombinasi laju aerasi dan agitasi

Waktu (jam)	1 vvm			0.4 vvm		
	150 rpm	200 rpm	250 rpm	150 rpm	200 rpm	250 rpm
0	0.489	0.436	0.351	0.447	0.375	0.385
2	0.488	0.452	0.266	0.439	0.337	0.383
4	0.466	0.460	0.190	0.410	0.335	0.303
6	0.447	0.425	0.216	0.381	0.242	0.251
8	0.435	0.425	0.262	0.351	0.196	0.233
10	0.424	0.414	0.279	0.241	0.210	0.230
12	0.389	0.428	0.316	0.201	0.252	0.210
14	0.285	0.444	0.336	0.177	0.125	0.205
16	0.297	0.456	0.372	0.156	0.126	0.201
18	0.251	0.490	0.413	0.122	0.139	0.181
20	0.231	0.536	0.477	0.121	0.120	0.196
22	0.174	0.536	0.521	0.106	0.116	0.208
24	0.143	0.536	0.590	0.119	0.082	0.380
28	0.158	0.533	0.556	0.176	0.130	0.553
32	0.135	0.533	0.554	0.331	0.289	0.555
36	0.139	0.517	0.553	0.341	0.292	0.557
40	0.255	0.513	0.555	0.361	0.410	0.443
44	0.312	0.533	0.551	0.372	0.464	0.524
48	0.389	0.540	0.556	0.381	0.467	0.528



**Lampiran 6. Data hasil pengujian aktivitas amilase pada penelitian optimasi agitasi dan aerasi (U/ml)**

Rekapitulasi data aktivitas enzim pada aerasi 0.4 vvm, 1.0 vvm dan tiga kecepatan agitasi

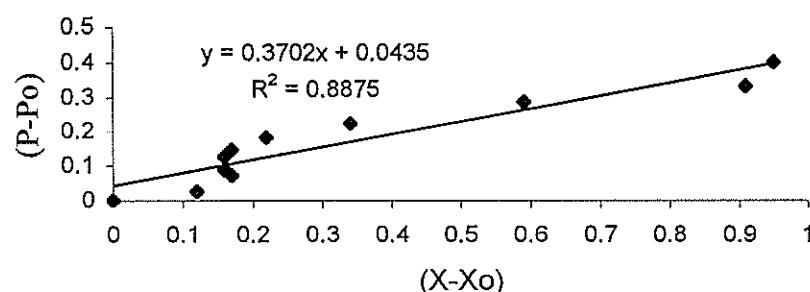
Waktu (jam)	0.4 vvm			1.0 vvm		
	150 rpm	200 rpm	250 rpm	150 rpm	200 rpm	250 rpm
0	12.58	31.27	22.02	5.92	102.13	170.40
2	12.58	0.00	18.32	9.62	131.73	140.80
4	12.58	34.97	20.17	7.77	115.08	175.95
6	7.03	36.82	0.00	7.77	388.91	192.61
8	14.43	35.15	34.97	11.47	507.33	244.41
10	5.18	46.07	31.27	0.37	511.03	262.91
12	12.58	44.22	38.67	15.17	542.48	270.32
14	12.58	44.22	44.22	7.77	549.88	266.61
16	12.58	47.92	53.47	9.62	568.38	286.97
18	14.43	55.32	51.62	11.47	583.19	344.32
20	18.13	57.17	92.33	18.87	594.29	383.18
22	47.74	57.17	164.48	57.73	523.98	525.64
24	142.10	114.53	238.49	135.44	411.12	618.15
28	175.40	164.48	301.40	170.59	412.97	631.11
32	214.25	240.34	379.11	209.44	366.71	631.11
36	217.95	281.05	423.51	148.39	279.75	616.30
40	175.40	284.75	405.01	174.29	372.26	592.25
44	210.55	292.15	430.91	211.29	326.01	573.75
48	195.75	282.90	386.51	211.29	344.51	577.45

**Lampiran 7. Data dan grafik perhitungan konversi pembentukan produk berdasarkan pertumbuhan biomassa (Yp/x)**

Data hubungan antara pembentukan produk dan pertumbuhan biomassa (g/g)

Waktu (jam)	Produk (P) (g/l)	Biomassa (X) (g/l)	P-Po	X-Xo
4	0.19	0.28	0	0
6	0.216	0.4	0.026	0.12
8	0.262	0.45	0.072	0.17
10	0.279	0.44	0.089	0.16
12	0.316	0.44	0.126	0.16
14	0.336	0.45	0.146	0.17
16	0.372	0.5	0.182	0.22
18	0.413	0.62	0.223	0.34
20	0.477	0.87	0.287	0.59
22	0.521	1.19	0.331	0.91
24	0.59	1.23	0.4	0.95

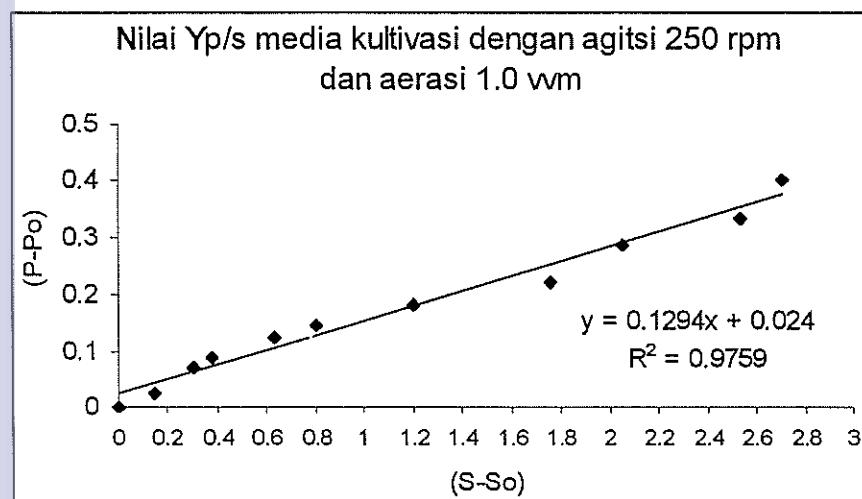
Nilai Yp/x media kultivasi dengan agitsi 250 rpm dan 1.0 rpm



Lampiran 8. Data dan grafik perhitungan konversi pembentukan produk berdasarkan penggunaan substrat (Yp/s)

Data hubungan antara pembentukan produk dan penggunaan substrat (g/g)

Waktu (jam)	Substrat (S) (g/l)	Produk (P) (g/l)	S-S <sub>0</sub>	P-P <sub>0</sub>
4	5.885	0.19	0	0
6	5.735	0.216	0.15	0.026
8	5.58	0.262	0.305	0.072
10	5.51	0.279	0.375	0.089
12	5.255	0.316	0.63	0.126
14	5.085	0.336	0.8	0.146
16	4.685	0.372	1.2	0.182
18	4.125	0.413	1.76	0.223
20	3.835	0.477	2.05	0.287
22	3.35	0.521	2.535	0.331
24	3.18	0.59	2.705	0.4

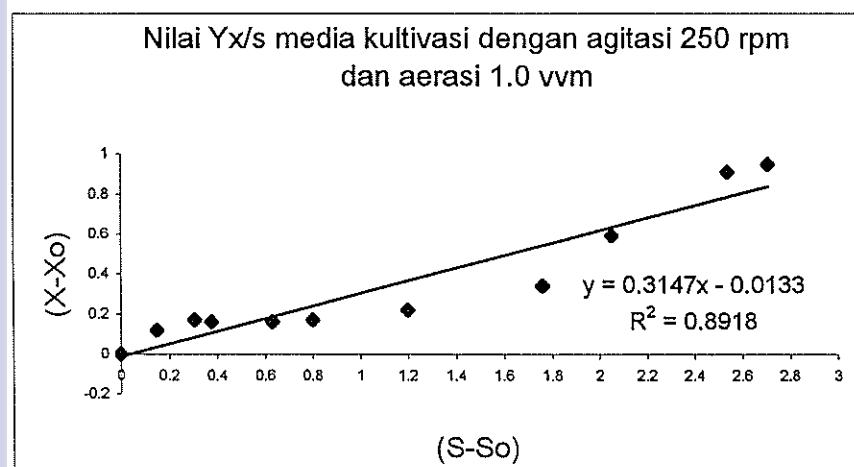




**Lampiran 9. Data dan grafik perhitungan konversi pertumbuhan biomassa berdasarkan penggunaan substrat (Yx/s)**

**Tabel 15. Data hubungan antara pertumbuhan biomassa dan penggunaan substrat (g/g)**

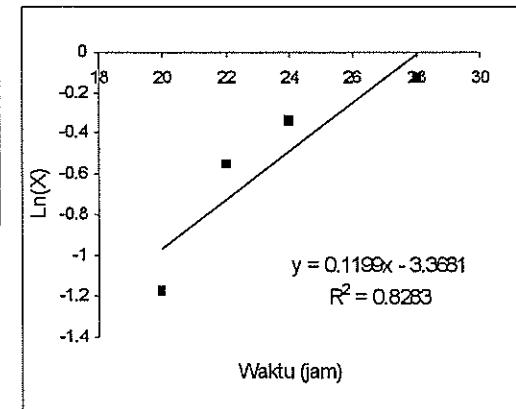
Waktu (jam)	Substrat (S) (g/l)	Biomassa (X) (g/l)	S-So	X-Xo
4	5.885	0.28	0	0
6	5.735	0.4	0.15	0.12
8	5.58	0.45	0.305	0.17
10	5.51	0.44	0.375	0.16
12	5.255	0.44	0.63	0.16
14	5.085	0.45	0.8	0.17
16	4.685	0.5	1.2	0.22
18	4.125	0.62	1.76	0.34
20	3.835	0.87	2.05	0.59
22	3.35	1.19	2.535	0.91
24	3.18	1.23	2.705	0.95



**Lampiran 10. Data dan grafik perhitungan laju pertumbuhan spesifik ( $\mu$ )**

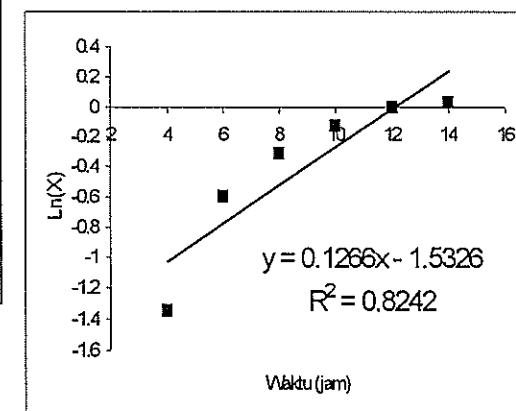
Data Bobot Sel Kering (g/l) pada aerasi 1 vvm dan agitasi 150 rpm

Waktu (jam)	Robot Set (X)	Ln (X)
20	0.31	-1.171183
22	0.57	-0.562119
24	0.71	-0.34249
28	0.88	-0.127833



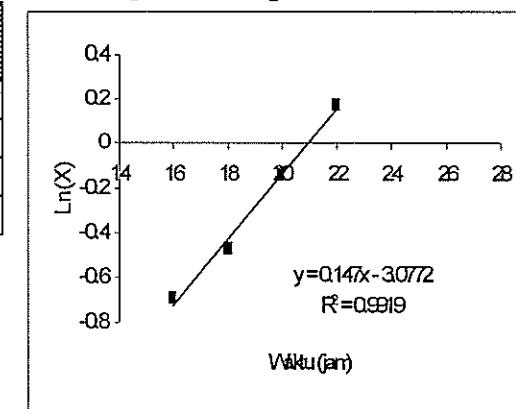
Data Bobot Sel Kering (g/l) pada aerasi 1 vvm dan agitasi 200 rpm

Waktu (jam)	Bobot Sel (X)	Ln (X)
4	0.26	-1.347074
6	0.55	-0.597837
8	0.73	-0.314711
10	0.88	-0.127833
12	1	0
14	1.03	0.029559



Data Bobot Sel Kering (g/l) pada aerasi 1 vvm dan agitasi 250 rpm

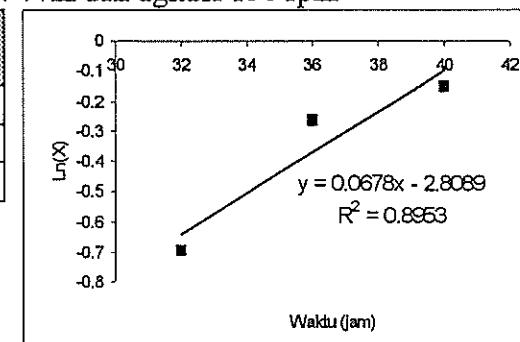
Waktu (jam)	Bobot Sel (X) Tayangan 250 rpm	Ln (X)
16	0.5	-0.693
18	0.62	-0.478
20	0.87	-0.1393
22	1.19	0.17393





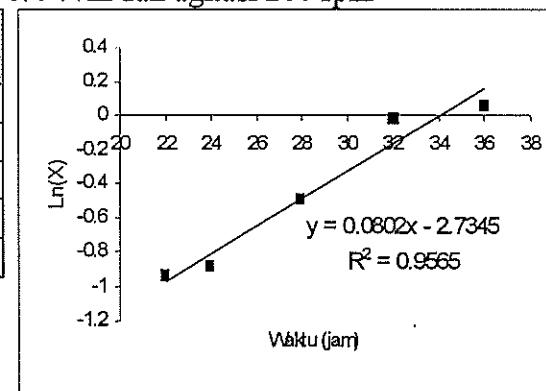
Data Bobot Sel Kering (g/l) pada aerasi 0.4 vvm dan agitasi 150 rpm

Waktu (jam)	Bobot Sel (X)		Ln (X)
	0.4 vvm, 150 rpm		
32	0.5		-0.693147
36	0.77		-0.261365
40	0.86		-0.150823



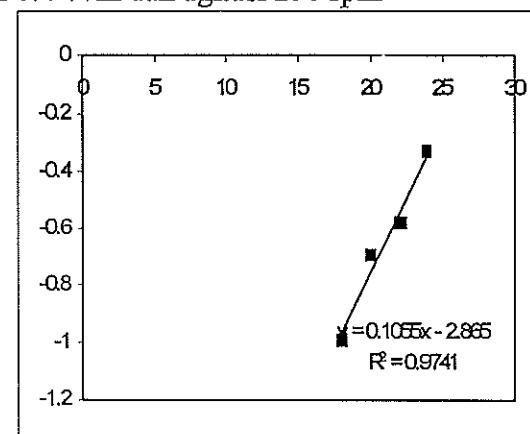
Data Bobot Sel Kering (g/l) pada aerasi 0.4 vvm dan agitasi 200 rpm

Waktu (jam)	Bobot Sel (X)		Ln (X)
	0.4 vvm, 200 rpm		
22	0.39		-0.941609
24	0.41		-0.891598
28	0.61		-0.494296
32	0.98		-0.020203
36	1.06		0.058269



Data Bobot Sel Kering (g/l) pada aerasi 0.4 vvm dan agitasi 250 rpm

Waktu (jam)	Bobot Sel (X)		Ln (X)
	0.4 vvm, 250 rpm		
18	0.37		-0.994252
20	0.5		-0.693147
22	0.56		-0.579818
24	0.72		-0.328504



**Lampiran 11. Hubungan aktivitas enzim dengan pembentukan protein terlarut**

Data hubungan aktivitas enzim dengan pembentukan protein terlarut

Waktu (jam)	Protein (g/l)	Aktivitas enzim (U/ml)
0	0.351	170.4
2	0.266	140.8
4	0.190	176
6	0.216	192.6
8	0.262	244.4
10	0.279	262.9
12	0.316	270.3
14	0.336	266.6
16	0.372	287
18	0.413	344.3
20	0.477	383.2
22	0.521	525.6
24	0.590	618.2
28	0.556	631.1
32	0.554	631.1
36	0.553	616.3
40	0.555	592.3
44	0.551	573.7
48	0.556	577.4



**Lampiran 12. Hubungan pertumbuhan mikroba dengan pembentukan protein terlarut**

Data Hubungan pertumbuhan mikroba dengan pembentukan produk (protein)

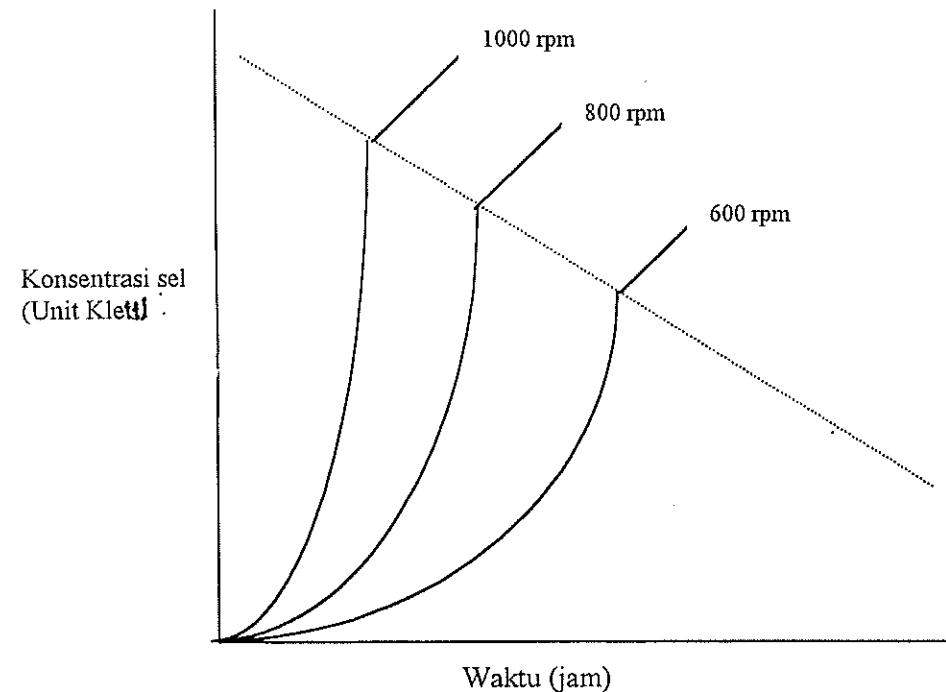
Waktu (jam)	Protein (g/l)	Kerapatan Optik (OD)
0	0.351	0.3
2	0.266	0.315
4	0.190	0.4
6	0.216	0.855
8	0.262	0.935
10	0.279	0.995
12	0.316	1
14	0.336	1.005
16	0.372	1.095
18	0.413	1.36
20	0.477	1.48
22	0.521	1.58
24	0.590	1.713
28	0.556	1.62
32	0.554	1.53
36	0.553	1.53
40	0.555	1.52
44	0.551	1.5
48	0.556	1.52

**Lampiran 13.** Data pertambahan bobot massa kering sel pada berbagai kombinasi aerasi dan agitasi

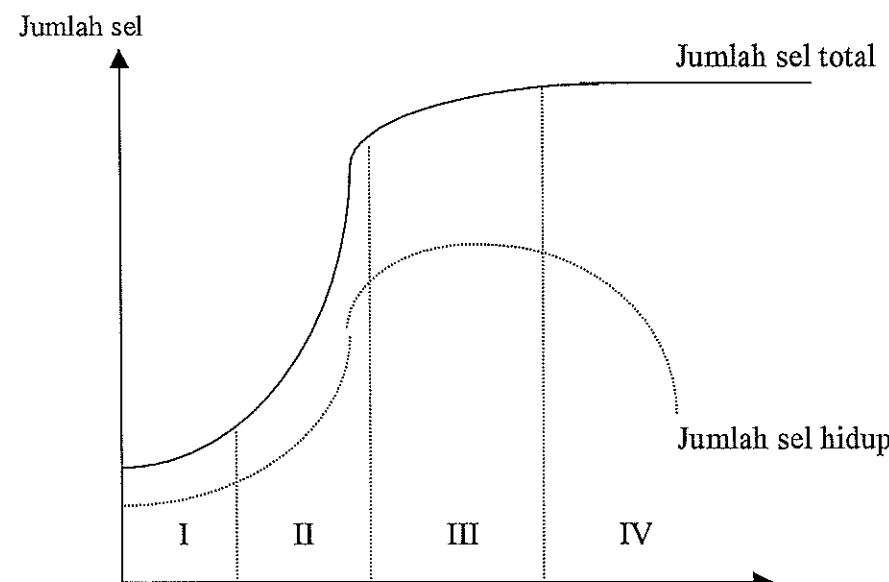
Data Bobot Massa Kering (g/l) Total

Waktu (jam)	1 vvm			0.4 vvm		
	150 rpm	200 rpm	250 rpm	150 rpm	200 rpm	250 rpm
0	0.15	0.17	0.15	0.15	0.14	0.15
2	0.19	0.24	0.14	0.16	0.18	0.2
4	0.15	0.26	0.28	0.18	0.33	0.31
6	0.18	0.55	0.4	0.22	0.38	0.35
8	0.19	0.73	0.45	0.28	0.35	0.34
10	0.21	0.88	0.44	0.29	0.38	0.36
12	0.21	1	0.44	0.29	0.38	0.36
14	0.23	1.03	0.45	0.29	0.37	0.36
16	0.23	1.03	0.5	0.26	0.4	0.37
18	0.26	1.04	0.62	0.3	0.4	0.37
20	0.31	0.91	0.87	0.33	0.39	0.5
22	0.57	0.82	1.19	0.33	0.39	0.56
24	0.71	0.79	1.23	0.4	0.41	0.72
28	0.88	0.7	1.22	0.49	0.61	0.76
32	0.88	0.7	1.18	0.5	0.98	0.87
36	0.8	0.7	1.16	0.77	1.06	0.95
40	0.88	0.68	1.18	0.86	1.06	1.07
44	0.86	0.68	1.2	0.86	1.05	1.06
48	0.85	0.68	1.1	0.88	1.05	1.06

## Lampiran 14.



Gambar 10. Kurva pertumbuhan *Candida lipolitika* pada n-alkana dalam fermentor teraduk dengan laju agitasi berbeda (Wang, 1979)



Keterangan : I = Fase pertumbuhan lambat  
II = Fase pertumbuhan eksponensial  
III = Fase pertumbuhan menurun  
IV = Fase stasioner

Gambar 13. Kurva pertumbuhan bakteri (Frobisher, 1961)