

# Laporan Penelitian Fundamental Tahun Anggaran 2011



**MEDIA ALTERNATIF PENGEMBANG-BIAKAN BAKTERI  
SELULOLITIK (*Actinobacillus sp.*) UNTUK PRODUKSI ENZIM  
PENDEGRADASI SERAT SECARA MASSAL**

**Penanggung Jawab Program :**

**Mohammad Anam Al-Arif, MP., drh.  
Dr. Mirni Lamid, MP., Drh**

Dibiayai oleh DIPA Universitas Airlangga, sesuai dengan Surat Keputusan  
Rektor Tentang Kegiatan Penelitian Multi Tahun, Pengabdian kepada Masyarakat  
Mono Tahun, dan Pengabdian kepada Masyarakat Multi Tahun Universitas Airlangga  
Tahun Anggaran 2011 Nomor : 844/H3/KR/2011, Tanggal 20 April 2011

**Universitas Airlangga  
2011**

**HALAMAN PENGESAHAN**

1. **Judul** : Media Alternatif Pengembang-biakan Bakteri Selulolitik (*Actinobacillus sp.*) untuk Produksi Enzim Pendegradasi Serat secara Massal

**2. Ketua Peneliti**

- a. Nama Lengkap : Mohammad Anam Al-Arif, MP., drh  
 b. Jenis Kelamin : Laki-laki  
 c. NIP : 19620926 198903 1 004  
 d. Pangkat/Golongan : Pembina/IV-a  
 e. Jabatan Fungsional : Lektor Kepala  
 f. Bidang Keahlian : Makanan Ternak  
 g. Fakultas/Jurusan : Kedokteran Hewan Universitas Airlangga  
 h. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

**Tim Peneliti**

NO	NAMA	BIDANG KEAHLIAN	FAKULTAS/JURUSAN	PERGURUAN TINGGI
1	Dr. Mirni Lamid, MP.,Drh	Pakan Ruminansia	FKH	Unair

**3. Pendanaan dan jangka waktu penelitian**

- a. Jangka waktu penelitian yang diusulkan : 2 (dua) tahun  
 b. Biaya yang diusulkan : Rp 40.000.000,00  
 c. Biaya yang disetujui tahun ini : Rp 32.500.000,00

Surabaya, 18 OCT 2011  
 Ketua Peneliti,

Mengetahui,  
 Dekan FKH-Unair,

Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph.D., Drh  
 NIP. 19531216 197806 2 001

M. Anam Al-Arif, MP., Drh.  
 NIP. 19620926 198903 1 004

Mengetahui,  
 Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Unair,

Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt., M.S  
 NIP. 19590805 198701 1 001

## RINGKASAN

Limbah pertanian mempunyai potensi yang besar sebagai pakan ternak ruminansia karena produksinya yang tinggi, namun perlu diolah terlebih dahulu karena mempunyai kandungan protein yang rendah serta kandungan serat kasar yang tinggi. Pengolahan secara biologis menggunakan mikroba atau enzim merupakan cara pengolahan yang aman, namun untuk memproduksi enzim membutuhkan biaya yang relatif mahal.

Penelitian ini dimaksudkan untuk mendapatkan komposisi media alternatif yang sesuai untuk pertumbuhan bakteri selulolitik (*Actinobacillus sp.*), mendapatkan produksi enzim selulase dengan aktivitas yang tinggi atau sebanding dengan media kontrol serta mengetahui karakter enzim selulase yang dihasilkan.

Dibuat sebuah media pertumbuhan bakteri selulolitik yang terdiri dari bahan-bahan kimia pro-analisa (M-0); serta tiga macam media alternatif yang menggunakan jerami padi sebagai sumber karbon serta bahan-bahan kimia teknis. Sumber protein menggunakan urea (M-1), susu bubuk (M-2) serta hati ayam (M-3). Sebanyak 1% bakteri selulolitik (*Actinobacillus sp.*) ditanam pada masing-masing media kemudian diinkubasi pada suhu 40°C selama 33 jam dengan kecepatan 140 rpm. Dilakukan pengukuran kurva pertumbuhan dan produksi enzim selulase setiap interval waktu 3 jam, serta pengukuran aktivitas enzim dan karakterisasi enzim.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa bakteri yang ditanam pada media alternatif membutuhkan waktu adaptasi lebih lama sebelum memasuki fase log (pertumbuhan); namun media alternatif menggunakan hati ayam (M3) dan susu bubuk (M2) mempunyai puncak pertumbuhan yang hampir sama dengan kontrol. Produksi dan aktivitas enzim selulase paling tinggi didapatkan dari media alternatif menggunakan susu bubuk pada jam ke-24. Suhu dan pH optimum enzim selulase pada 50°C dan 8.

**Kata kunci: Bakteri selulolitik, Media pertumbuhan, Produksi masal, Karakterisasi enzim.**

## SUMMARY

Agricultural waste has a great potential as ruminant feed because of its high production, but it needs to be processed at first because of its low protein and high crude fiber content. Biological treatment using microbes or enzymes is the safe way of agricultural waste processing, but for enzyme production there is a relatively expensive cost.

The aim of this study is to obtain a suitable alternative media composition for cellulolytic bacterial growth, get a cellulase enzyme production with high activity comparable to control medium, and to know the character of cellulase enzyme product.

There was made of cellulolytic bacterial growth medium consisting of pro-analysis chemicals (M-0); and three kinds of alternative media that use pro-technical chemicals and rice straw as carbon source. There were used urea (M-1), milk powder (M-2) and chicken liver (M-3) as protein sources. A total of 1% cellulolytic bacteria (*Actinobacillus* sp.) were cultured in every medium and then incubated in 40°C for 33 hours and 140 rpm shake, and then measured the growth curve and cellulase production every 3 hours, and enzyme activity and enzyme character.

The results showed that the bacteria which were grown in alternative media take much longer adaptation time before entering the log (growth) phase, but the alternative media that use chicken liver (M3) or milk powder (M2) have a peak of growth similar to control media. Cellulase production and the highest enzyme activity obtained from the alternative media using powdered milk at 24<sup>th</sup> hours. Optimum temperature and pH of cellulases are 50°C and 8 respectively.

**Key words: Cellulolytic bacteria, Growth media, Mass production, Enzyme characterization.**

## PRAKATA

Alhamdulillah, puji syukur kami panjatkan ke hadirat Allah s.w.t. atas segala Rahmat dan KaruniaNya sehingga laporan penelitian Tahap I dengan judul : “Media Alternatif Pengembang-biakan Bakteri Selulolitik (*Actinobacillus sp.*) untuk Produksi Enzim Pendegradasi Serat secara Massal” ini dapat diselesaikan.

Indonesia merupakan negara agraris yang banyak menghasilkan limbah pertanian yang seringkali tidak dimanfaatkan, sedangkan di sisi lain ternak membutuhkan bahan pakan yang seringkali tidak tercukupi terutama pada musim kemarau. Pemanfaatan limbah pertanian sebagai bahan pakan ternak merupakan pilihan yang bijaksana, namun masih ada kendala karena limbah pertanian kualitasnya rendah karena hanya mengandung sedikit protein serta tinggi kandungan serat kasar sehingga sulit untuk dicerna ternak.

Enzim selulase dibutuhkan untuk mengolah bahan pakan yang banyak mengandung serat kasar dan berkualitas rendah menjadi bahan pakan yang lebih berkualitas sehingga memungkinkan untuk digunakan sebagai pakan ternak yang berkualitas. Produksi enzim membutuhkan biaya yang relatif mahal, apalagi jika dimaksudkan untuk memproduksi dalam skala besar. Biaya yang mahal lebih disebabkan oleh penggunaan bahan-bahan untuk kebutuhan Laboratoris, sedangkan mikroba penghasil enzim sebenarnya dapat memanfaatkan sumber nutrisi dari berbagai variasi bahan, oleh sebab itu perlu dicoba penggunaan bahan-bahan sumber nutrisi lain yang lebih murah sehingga enzim pengolah serat dapat diproduksi dengan biaya yang murah.

Kami menyadari bahwa tulisan ini masih belum sempurna, oleh sebab itu kami mengharapkan masukan yang sangat berharga dari semua pihak, demi kesempurnaan laporan ini dan semoga bermanfaat bagi para pembaca.

Surabaya, Oktober 2011

Penulis,

**DAFTAR ISI**

	<b>Halaman</b>
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN .....	i
 <b>A. LAPORAN HASIL PENELITIAN</b>	
RINGKASAN DAN SUMMARY .....	ii
PRAKATA .....	iv
DAFTAR ISI .....	vi
DAFTAR TABEL .....	vii
DAFTAR GAMBAR .....	viii
DAFTAR LAMPIRAN .....	ix
I. PENDAHULUAN .....	1
II. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN TAHUN KE I .....	5
III. TINJAUAN PUSTAKA .....	6
IV. METODE PENELITIAN .....	27
V. HASIL DAN PEMBAHASAN .....	31
VI. KESIMPULAN DAN SARAN .....	58
VII. RENCANA/ PENELITIAN TAHAP SELANJUTNYA .....	59
DAFTAR PUSTAKA .....	61
LAMPIRAN .....	67

**DAFTAR TABEL**

<b>Tabel</b>		<b>Halaman</b>
5.1	Data Pengukuran Pertumbuhan Bakteri Setiap Interval Waktu Tiga Jam ...	31
5.2	Produksi Enzim Selulase pada berbagai media .....	40
5.3	Aktivitas Enzim Endoglukanase pada berbagai media ( $\mu$ /ml) .....	45
5.4	Aktivitas Enzim Selulase Selama Optimasi Suhu .....	50
5.5	Aktivitas Enzim Selulase Selama Optimasi pH .....	51
5.6	Aktivitas Residu Enzim Selulase pada Suhu 37°C .....	54
5.7	Aktivitas Residu Enzim Selulase pada Berbagai pH .....	56

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
3.1 Susunan Lambung Ruminansia .....	11
3.2 Selulosa Kristal .....	18
5.1 Grafik pertumbuhan bakteri selulolitik ( <i>Actinobacillus</i> sp.) pada media kontrol .....	32
5.2 Grafik pertumbuhan bakteri selulolitik ( <i>Actinobacillus</i> sp.) pada media yang menggunakan urea sebagai sumber protein .....	33
5.3 Grafik pertumbuhan bakteri selulolitik ( <i>Actinobacillus</i> sp.) pada media yang menggunakan susu bubuk sebagai sumber protein .....	34
5.4 Grafik pertumbuhan bakteri selulolitik ( <i>Actinobacillus</i> sp.) pada media yang menggunakan hati ayam sebagai sumber protein .....	35
5.5 Grafik pertumbuhan bakteri selulolitik ( <i>Actinobacillus</i> sp.) pada beberapa macam media pertumbuhan .....	37
5.6 Kurva produksi enzim selulase pada media Kontrol .....	40
5.7 Kurva produksi enzim selulase pada media Urea .....	41
5.8 Kurva produksi enzim selulase pada media Susu .....	42
5.9 Kurva produksi enzim selulase pada media Hati .....	43
5.10 Kurva aktivitas enzim endoglukanase pada media Kontrol .....	46
5.11 Kurva aktivitas enzim endoglukanase pada media Urea .....	46
5.12 Kurva aktivitas enzim endoglukanase pada media Susu bubuk .....	47
5.13 Kurva aktivitas enzim endoglukanase pada media Hati .....	48
5.14 Kurva optimasi suhu enzim selulase .....	50
5.15 Kurva optimasi pH enzim selulase .....	52
5.16 Kurva stabilitas suhu enzim selulase .....	55
5.17 Kurva stabilitas pH enzim selulase .....	56

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Data Pengukuran Pertumbuhan Bakteri pada Media Kontrol .....	68
2. Data Pengukuran Pertumbuhan Bakteri pada Media Alternatif Menggunakan Urea sebagai Sumber Protein .....	68
3. Data Pengukuran Pertumbuhan Bakteri pada Media Alternatif Menggunakan Susu Bubuk sebagai Sumber Protein.....	69
4. Data Pengukuran Pertumbuhan Bakteri pada Media Alternatif Menggunakan Hati Ayam sebagai Sumber Protein .....	69
5. Data Produksi Enzim Selulase pada Media Kontrol .....	70
6. Data Produksi Enzim Selulase pada Media Alternatif Menggunakan Urea sebagai Sumber Protein .....	71
7. Data Produksi Enzim Selulase pada Media Alternatif Menggunakan Susu Bubuk sebagai Sumber Protein .....	72
8. Data Produksi Enzim Selulase pada Media Alternatif Menggunakan Hati Ayam sebagai Sumber Protein .....	73
9. Data Standar Glukosa .....	74
10. Data Aktivitas Enzim Selulase pada Media Kontrol .....	75
11. Data Aktivitas Enzim Selulase pada Media Alternatif Menggunakan Urea sebagai Sumber Protein .....	75
12. Data Aktivitas Enzim Selulase pada Media Alternatif Menggunakan Susu Bubuk sebagai Sumber Protein .....	76
13. Data Aktivitas Enzim Selulase pada Media Alternatif Menggunakan Hati Ayam sebagai Sumber Protein .....	76
14. Data Optimasi Suhu Enzim Selulase .....	77
15. Data Optimasi pH Enzim Selulase .....	77
16. Data Stabilitas pH Enzim Selulase .....	78
17. Data Stabilitas Suhu Enzim Selulase .....	78

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang Permasalahan

Kebutuhan bahan pangan asal hewani semakin hari semakin meningkat. Hal ini seiring peningkatan jumlah penduduk, tingkat pendapatan, kesadaran gizi dan kualitas hidup masyarakat. Jumlah penduduk yang meningkat merupakan pangsa pasar yang besar karena kebutuhan bahan pangan asal hewan (daging, susu dan telur) merupakan kebutuhan primer yang harus dipenuhi. Program kecukupan daging tahun 2010 yang dirancang Direktorat Jenderal Peternakan, menyebutkan peran produksi daging sapi dalam negeri harus memberikan kontribusi sebesar 90-95% dari kebutuhan nasional (Kompas, 2006).

Program swasembada daging sapi tahun 2010 mengalami kegagalan setelah sebelumnya pemerintah menargetkan swasembada daging sapi tercapai pada tahun 2005. Pemerintah kemudian mengoreksi program tersebut dengan mencanangkan swasembada daging sapi pada tahun 2014 (Republika, 2010<sup>a</sup>). Melalui program swasembada daging sapi, penyediaan daging sapi dari dalam negeri diproyeksikan meningkat dari 67 persen pada tahun 2010 menjadi 90 persen pada tahun 2014 (Business Review, 2010).

Peningkatan jumlah ternak akan membutuhkan hijauan pakan ternak dalam jumlah yang besar pula. Untuk mensinergikan program swasembada ternak, Pemerintah harus menyiapkan lahan dan ketersediaan pakan bagi sapi berskala besar (Republika, 2010<sup>b</sup>). Pada sisi lain ketersediaan pakan hijauan sangat tergantung adanya ketersediaan lahan dan musim. Terbatasnya ketersediaan hijauan yang dapat dimanfaatkan sebagai pakan ternak akan menurunkan tingkat produktivitas ternak. Hal ini merupakan problem yang masih sulit diatasi,

sehingga memberi peluang pada penggunaan limbah pertanian (jerami padi, bekatul, tongkol jagung, tumpi jagung, kulit coklat, kulit kopi dan lain-lain) sebagai pakan ternak alternatif (Ardian, 2004).

Potensi produksi limbah pertanian cukup tinggi, namun permasalahan yang ada berupa nilai nutrisi yang rendah, ditandai dengan kandungan serat kasar (selulosa, hemiselulosa) yang tinggi serta protein kasar yang rendah. Molekul selulosa dan hemiselulosa merupakan polisakarida dengan ikatan  $\beta$ -1-4 glikosidik yang sulit dicerna oleh bakteri rumen ternak ruminansia, sehingga pencernaan limbah pertanian menjadi rendah. Oleh sebab itu dibutuhkan pemrosesan terlebih dahulu sebelum dikonsumsi ternak. Pemrosesan dengan bahan kimia menimbulkan pencemaran lingkungan, sedangkan secara biologis keamanannya lebih terjamin. Penggunaan bakteri dan kelompok enzim selulolitik maupun hemiselulolitik akan mampu meningkatkan nilai nutrisi limbah pertanian. Pemrosesan menggunakan bakteri membutuhkan waktu untuk beradaptasi, sedangkan enzim dapat langsung beraktivitas untuk memproses bahan pakan. Hewan ruminansia yang pakannya ditambah dengan enzim terutama selulase dan hemiselulase berpotensi untuk meningkatkan penggunaan pakan serta penampilan. Hal ini disebabkan enzim berperan dalam meningkatkan pencernaan serat sehingga *intake* energi tercerna meningkat.

Enzim umumnya diproduksi oleh mikroba, baik bakteri, protozoa maupun jamur. Mirni dkk. (2006) telah melakukan isolasi dan identifikasi terhadap bakteri yang mampu memproduksi enzim hemiselulase mesofilik berasal dari rumen sapi potong. Bakteri tersebut terbukti dapat meningkatkan kualitas jerami padi serta meningkatkan pencernaan pada domba. Mirni dkk. (2009) juga menemukan bahwa isolat bakteri *Actinobacillus* mampu memproduksi

enzim hemiselulase serta enzim selulase. Aktivitas selulase (endoglukanase) sebesar 0,28  $\mu$ /ml sedangkan aktivitas hemiselulase (endoxilanase) sebesar 22,63  $\mu$ /ml.

Memproduksi enzim selulase membutuhkan biaya yang relatif mahal, oleh sebab itu penghematan dalam biaya produksi sangat penting dalam penggunaannya secara komersial (Zhang *et al.*, 2006). Untuk memproduksi enzim pencerna serat (selulolitik dan hemiselulolitik) tanpa membutuhkan biaya yang mahal, diperlukan suatu upaya pembuatan medium pertumbuhan bakteri selulolitik dan hemiselulolitik alternatif yang murah, namun tetap bisa menjaga aktivitas enzim tersebut. Jika biaya produksi enzim bisa ditekan maka biaya pemrosesan limbah pertanian menjadi murah, yang akhirnya berdampak pada biaya produksi peternakan menjadi murah pula. Dengan demikian rencana Pemerintah untuk mencanangkan swasembada daging sapi akan bisa dicapai.

## **1.2 Obyek Penelitian**

Penelitian ini menggunakan media alternatif untuk menumbuhkan bakteri penghasil enzim selulolitik. Media tersebut dibuat dengan menggunakan bahan-bahan yang murah, namun tetap menghasilkan enzim dengan aktivitas yang tinggi. Bahan kimia yang digunakan merupakan bahan kimia teknis, sedangkan sumber karbon dan protein menggunakan bahan yang banyak di pasaran.

## **1.3 Lokasi Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Proteomik ITD – Unair serta Laboratorium Makanan Ternak – Bagian Ilmu Peternakan FKH Unair.

#### 1.4 Hasil yang ditargetkan

Hasil yang ditargetkan dalam penelitian ini adalah: 1). Mendapatkan formula media pertumbuhan bakteri selulolitik (*Actinobacillus sp.*) yang murah untuk produk massal namun berkualitas; 2). Menemukan waktu optimum untuk memproduksi enzim selulase, serta 3). Menemukan dosis dan waktu optimum dalam pendegradasian limbah pertanian menggunakan enzim selulolitik.

## **BAB II**

### **TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN TAHAP I**

#### **2.1 Tujuan penelitian**

##### **2.1.1 Tujuan penelitian jangka pendek**

Penelitian ini pada tahun pertama bertujuan untuk :

1. Mendapatkan gambaran pertumbuhan bakteri selulolitik (*Actinobacillus sp.*) pada beberapa macam media alternatif.
2. Mendapatkan gambaran produksi enzim selulase pada beberapa macam media alternatif.
3. Mengetahui karakter enzim selulase yang diproduksi menggunakan media alternatif unggulan.

##### **2.1.2 Tujuan khusus jangka panjang**

Penelitian ini terdiri dari dua (2) tahap, secara keseluruhan bertujuan untuk membakukan media alternatif untuk memproduksi enzim selulase secara massal yang berharga murah namun mempunyai aktivitas yang tinggi.

#### **2.2 Manfaat Penelitian**

Diharapkan dari penelitian ini dapat memecahkan masalah daya cerna hewan ruminansia yang rendah terhadap serat kasar terutama yang berasal dari limbah pertanian dengan menghasilkan enzim selulase yang berharga murah karena telah ditemukan komposisi media alternatif pertumbuhan bakteri selulolitik.

### BAB III

## TINJAUAN PUSTAKA

### 3.1 Hewan ruminansia

Kebutuhan bahan pangan asal hewani semakin hari semakin meningkat. Hal ini seiring peningkatan jumlah penduduk, tingkat pendapatan, kesadaran gizi dan kualitas hidup masyarakat. Jumlah penduduk yang meningkat merupakan pangsa pasar yang besar karena kebutuhan bahan pangan asal hewan (daging, susu dan telur) merupakan kebutuhan primer yang harus dipenuhi.

Menurut Dirjen Bina Produksi Peternakan, masyarakat Indonesia baru mampu mengonsumsi daging sapi sekitar 1,7 kg/orang/tahun. Jika penduduk Indonesia sekitar 220 juta orang, maka dibutuhkan 1,5 juta ekor sapi lokal dan 350.000 ekor sapi bakalan serta 30.000 ton daging. Jika terjadi peningkatan jumlah penduduk 2% per-tahun dan populasi sapi 14% per-tahun dengan kemampuan mengonsumsi daging naik 1 gram/kapita/hari, maka dibutuhkan 1.265,8 ton/hari yang identik dengan 10.548 ekor/hari atau 3,85 juta ekor/tahun (Tawaf, 2004).

Program kecukupan daging tahun 2010 yang dirancang Direktorat Jenderal Peternakan menyebutkan peran produksi daging sapi dalam negeri harus memberikan kontribusi sebesar 90-95% dari kebutuhan nasional (Kompas, 2006). Program swasembada daging sapi tersebut mengalami kegagalan kembali setelah sebelumnya pemerintah menargetkan swasembada daging sapi tercapai pada tahun 2005. Pemerintah kemudian mengoreksi program tersebut dengan mencanangkan swasembada daging sapi pada tahun 2014 (Republika, 2010<sup>a</sup>). Melalui program

swasembada daging sapi, penyediaan daging sapi dari dalam negeri diproyeksikan meningkat dari 67 persen pada tahun 2010 menjadi 90 persen pada tahun 2014 (Business Review, 2010).

### 3.1.1 Sistem Pencernaan Ruminansia

Sistem pencernaan hewan ruminansia (sapi, kerbau, kambing, domba, antelop, kijang dan sebagainya) membentuk empat bagian yang berbeda, terdiri dari rumen, retikulum, omasum dan abomasum. Setiap bagian mempunyai fungsi spesifik dalam mencerna pakan (Moran, 2005). Retikulo-rumen dan omasum merupakan sistem pencernaan sebelum lambung (*pre-stomach*) atau juga disebut usus depan (*foregut*), sedangkan abomasum merupakan lambung sebenarnya. Usus depan tidak memperlihatkan aktivitas enzim yang berasal dari hewan, namun semata-mata mengandalkan aktivitas enzim yang berasal dari mikroba (Jans, 2005).

Mikroba rumen, terutama bakteri, protozoa dan fungi anaerob bergantung kepada hewan ruminansia untuk penyediaan kondisi fisiologis yang dibutuhkan untuk eksistensi mikroba. Sebaliknya mikroba tersebut penting untuk pencernaan dan fermentasi sejumlah besar hijauan pakan yang dikonsumsi oleh hewan ruminansia namun tidak bisa segera dimanfaatkan. Penyediaan habitat yang sesuai bagi mikroba dapat menguntungkan hewan ruminansia karena dapat menggunakan produk akhir fermentasi mikroba serta aktivitas biosintesis sesuai nutrisi yang dibutuhkan (Yokoyama and Johnson, 1993). Sistem pencernaan pada hewan ruminansia beradaptasi dengan sangat baik terhadap pakan basal berupa hijauan (Moran, 2005), oleh sebab itu hewan ruminansia bersimbiosis dengan mikroba yang

terletak dalam pencernaan untuk membantu mencerna tumbuhan dengan kandungan serat yang tinggi yang nantinya akan dimanfaatkan oleh hewan tersebut (Walker, 2007).

Kondisi dalam rumen benar-benar anaerob, meskipun mungkin terdapat sedikit oksigen terutama di bagian dinding rumen serta dalam gas rumen. Suhu rumen dipertahankan antara 38-42°C yang merupakan suhu optimum bagi mikroba untuk hidup. Jika hewan mengkonsumsi pakan secara seimbang antara hijauan dan bijian maka pH rumen berkisar 5,8-6,4 yang merupakan kondisi yang nyaman bagi bermacam-macam mikroba dengan perbedaan yang luas (Yokoyama and Johnson, 1993; Moran, 2005; Walker, 2007). Rounds and Herd (2000) menyebutkan bahwa suhu rumen sekitar 37-40°C dengan pH 5,5-7,0, sedangkan Jans (2005) menyatakan bahwa suhu rumen sekitar 39°C dengan pH 6-6,8.

Rumen merupakan organ pencernaan utama dengan kapasitas tampung yang besar ( $\pm$  50 galon). Rumen dan retikulum mempunyai kapasitas di atas 50% dari seluruh kapasitas saluran pencernaan ruminansia (Rounds and Herd, 2000). Bagian dalam dilapisi oleh papila-papila yang menambah luas permukaan rumen dan memungkinkan terjadinya absorpsi nutrisi pakan. Kapasitas rumen yang besar memungkinkan terjadinya fermentasi dalam jumlah besar karena mengandung bermacam-macam mikroba yang beraktivitas secara sinergis mencerna pakan bagi hewan.

Proses fermentasi dalam rumen dilakukan oleh mikroba, produk fermentasi terutama VFA serta protein mikroba dapat digunakan oleh hewan. Lebih dari 80%

kebutuhan energi hewan ruminansia dapat dipenuhi dari VFA yang diproduksi dalam rumen, serta tergantung dari pakan yang dikonsumsi. Protein mikroba yang keluar dari rumen dapat mencapai 50-90% protein yang masuk ke dalam usus halus hewan dan dapat digunakan oleh hewan tersebut (Moran, 2005; Walker, 2007). Degradasi protein dapat menghasilkan  $\text{NH}_3$  yang merupakan sumber nitrogen utama bagi mikroba untuk sintesis protein. Mikroba tersebut selanjutnya dicerna di usus halus dan dengan demikian dapat meningkatkan suplai protein bagi hewan ruminansia (Jans, 2005). Bakteri mengandung 60% protein, sehingga bisa digunakan sebagai sumber protein bagi hewan ruminansia (Moran, 2005). Rounds and Herd (2000) menyebutkan bahwa mikroba mengandung protein 40-50% (berdasarkan Bahan Kering) dengan pencernaan lebih dari 75%.

Mikroba rumen memfermentasi seluruh karbohidrat, namun karbohidrat tak-terstruktur lebih cepat difermentasi dibandingkan dengan yang terstruktur. Karbohidrat terlarut dapat dicerna 100 kali lebih cepat, sedangkan karbohidrat tersimpan dicerna lima kali lebih cepat oleh mikroba rumen dibandingkan dengan karbohidrat terstruktur. Pati difermentasi secara cepat, sedangkan asam laktat dan asam propionat yang dihasilkan menyebabkan keasaman meningkat (Moran, 2005).

Umumnya pakan tinggi kandungan karbohidrat terstruktur (serat kasar) dapat meningkatkan produksi asam asetat, sedangkan pakan tinggi kandungan karbohidrat tak-terstruktur (konsentrat) dapat menyebabkan konsentrasi asam propionat sedikit lebih tinggi. Umumnya penurunan asam asetat dan asam butirat serta peningkatan asam propionat lebih efisien untuk produksi sapi potong,

sedangkan kandungan asam asetat yang tinggi dibutuhkan untuk produksi lemak susu (Rounds and Herd, 2000).

Serat kasar merupakan komplek karbohidrat yang terdiri dari lignin, selulosa dan hemiselulosa. Lignin sangat resisten terhadap serangan mikroba, sehingga hanya sebagian kecil yang dapat dicerna. Selulosa lebih mudah dicerna dibandingkan dengan lignin, sedangkan hemiselulosa paling mudah dicerna di antara ketiga serat tersebut (Rounds and Herd, 2000).

Retikulum merupakan organ yang lebih kecil dan merupakan *holding area* setelah pakan keluar dari rumen. Retikulum terpisah dari rumen oleh suatu jaringan yang landai. Bagian dalamnya terdapat lapisan-lapisan yang menyerupai sarang lebah, serta sedikit papila. Suhu retikulum tidak berbeda dengan rumen dengan pH 6-7, namun dapat turun jika banyak mengkonsumsi butiran (Moran, 2005).

Omasum berada di antara retikulum dan abomasum. Suatu lembaran mirip lipatan disebut lamina menjulur dari dinding-dinding omasum, seperti lembaran-lembaran kertas dalam sebuah buku (Moran, 2005) dengan kapasitas 6-8% total kapasitas saluran pencernaan (Rounds and Herd, 2000). Material yang masuk ke dalam omasum mengandung 90-95% air. Fungsi utama omasum adalah untuk menyerap sebagian besar air serta meneruskan pengolahan pakan sebelum digesta masuk ke dalam abomasum yang merupakan lambung sebenarnya bagi ruminansia (Hamilton, 2003; Moran, 2005). Berikut ini adalah gambaran organ pencernaan ruminansia.

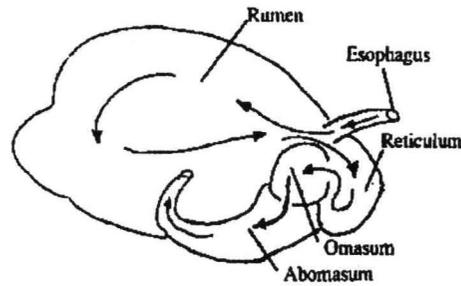


Figure 1. Ruminant Stomach  
 → Flow of Digesta

### Gambar 3.1. Susunan Lambung Ruminansia (Hamilton, 2003).

Abomasum menghubungkan omasum dengan usus halus. Pencernaan pada kondisi asam terjadi dalam abomasum seperti halnya lambung manusia (Moran, 2005) dengan kapasitas 6-8% total kapasitas saluran pencernaan ruminansia (Rounds and Herd, 2000). Permukaan abomasum berlipat-lipat dan memproduksi cairan lambung berupa asam klorida dan enzim pepsin. pH cairan lambung berkisar 1-1,3 yang menyebabkan abomasum sangat asam, dengan pH sekitar 2. Keasaman abomasum dapat membunuh mikroba asal rumen, sedangkan pepsin mengawali pencernaan mikroba serta protein pakan dalam abomasum (Moran, 2005).

Pakan yang dicerna dalam abomasum selanjutnya menuju usus halus. Sekresi empedu dengan pH yang sangat tinggi mengubah digesta dari asam menjadi basa, memungkinkan terjadinya pencernaan nutrisi pakan lain. Enzim melanjutkan pencernaan pakan dan mikroba dalam usus halus (Moran, 2005). Protein, vitamin, karbohidrat sederhana, lemak dan asam amino diabsorpsi dalam usus halus, sedangkan material yang tidak tercerna dan tidak terabsorpsi dikeluarkan ke dalam usus besar (Rounds and Herd, 2000).

Usus besar terutama sekum dan kolon merupakan tempat fermentasi sekunder, terutama serat. Sekitar 10-15% energi yang digunakan oleh hewan ruminansia berasal dari usus besar. Absorpsi air, mineral dan amonia juga terjadi dalam usus besar. Komponen pakan yang tidak tercerna di usus besar selanjutnya dibuang lewat rektum sebagai feses (Moran, 2005). Waktu yang dibutuhkan pakan untuk melewati saluran pencernaan ruminansia berkisar 1-3 hari tergantung karakteristik pakan serta nutrien yang terkandung dalam pakan tersebut (Rounds and Herd, 2000).

### **3.1.2 Mikroba dalam Pencernaan Ruminansia**

Semua hewan tingkat tinggi sebetulnya tidak bisa mencerna serat kasar, namun hewan ruminansia mampu memanfaatkan serat kasar karena dalam saluran pencernaan terdapat mikroba pencerna serat kasar. Mikroba yang ada dalam saluran pencernaan hewan ruminansia bisa berupa protozoa, bakteri maupun fungi. Enzim yang dihasilkan oleh mikroba tersebut antara lain bersifat proteolitik, selulolitik, hemiselulolitik, lipolitik, amilolitik, metanogenik dan sebagainya. Perubahan jenis-jenis mikroba yang ada dalam rumen dapat mempengaruhi kecernaan pakan yang dikonsumsi hewan, sehingga bisa mempengaruhi konsumsi pakan, penambahan berat badan maupun produksi susu (Beauchemin *et al.*, 2003; Krehbiel *et al.*, 2003).

Rumen merupakan ekosistem yang sangat kompleks, berisi mikroba dengan spesies yang berbeda-beda dengan potensi yang besar. Ekosistem mikroba terdiri dari sekitar 30 spesies bakteri ( $10^{10}$ - $10^{11}$ /ml cairan rumen), 40 spesies protozoa ( $10^5$ -

$10^7$ /ml cairan rumen) dan 5 spesies fungi ( $<10^5$ /ml cairan rumen) (Perez, 2004; Jans, 2005) serta archaea, bakteriofaga (virus) dan mikoplasma (Walker, 2007).

Bakteri dan protozoa merupakan mikroba yang penting karena mampu mencerna 70-80% Bahan Kering mudah dicerna dalam rumen. Spesies bakteri dan protozoa yang berbeda menunjukkan kinerja yang berbeda pula. Beberapa spesies berfungsi untuk mencerna pati dan gula, sedangkan spesies lain bertugas mencerna serat kasar (Moran, 2005). Spesies bakteri lebih penting daripada protozoa dan fungi dalam menentukan luas dan level degradasi serta penggunaan pakan untuk memproduksi protein mikroba dan VFA (Perez, 2004).

Populasi mikroba membutuhkan energi dan protein untuk tumbuh dan berkembang biak. Keterbatasan nutrien tersebut dapat menyebabkan terhambatnya pertumbuhan mikroba yang bisa berdampak pada pencernaan pakan (Moran, 2005). Keterbatasan nutrien dalam rumen dapat terjadi secara periodik, baik dalam waktu pendek (misalnya jarak waktu antar pemberian pakan) atau dalam waktu panjang (misalnya saat kelaparan). Pada kondisi kelaparan, mikroba rumen menunjukkan perbedaan dalam bertahan hidup. Beberapa mikroba dapat mati dalam waktu cepat terutama protozoa, dan mungkin dapat hilang dari populasi mikroba rumen. Kekurangan energi pada biakan kontinyu dapat menyebabkan *Selenomonas ruminantium* mempunyai  $ST_{50}$  (*Survival time* 50%) hanya 2,5 jam, sedangkan *Megasphaera elsdenii* mempunyai  $ST_{50}$  selama 3-5 jam. Saat energi terbatas, *Selenomonas ruminantium* akan mengubah metabolisme untuk menghasilkan energi dalam jumlah lebih tinggi dengan menghasilkan sedikit laktat dan propionat serta memproduksi asetat lebih banyak (Yokoyama and Johnson, 1993).

Jumlah genus protozoa memang sedikit namun mempunyai peran yang penting dalam pencernaan dinding sel tanaman, protozoa tersebut dapat mencerna 5-21% material selulosa tergantung pakan yang dikonsumsi (Dijkstra and Tamminga, 1995). Beberapa penelitian menunjukkan tingginya pencernaan serta cepatnya peningkatan berat badan hewan jika terdapat protozoa dalam rumen. Konsentrasi amonia yang tinggi serta total VFA juga terjadi jika terdapat protozoa, yang menunjukkan tingginya pencernaan pakan. Suatu penelitian menunjukkan bahwa hewan yang mengalami defaunasi tidak menimbulkan efek yang buruk. Hal ini menunjukkan bahwa protozoa tidak mempunyai fungsi spesifik yang penting bagi hewan ruminansia (Yokoyama and Johnson, 1993).

Peran utama protozoa adalah sebagai predator terhadap mikroba lain, yang berdampak pada daur ulang nitrogen, meskipun beberapa protozoa mampu mencerna pati dan partikel tanaman (Walker, 2007). Protozoa aktif mencerna bakteri sebagai sumber protein serta berkompetisi memperebutkan substrat sehingga jumlah bakteri rumen bisa menurun hingga tinggal setengah atau lebih. Protozoa rumen tidak mempunyai aktivitas urease, sedangkan amonia merupakan sumber Nitrogen yang jelek bagi pertumbuhan protozoa. Protozoa berperan dalam hidrogenasi dan penjenuhan asam lemak dalam rumen (Yokoyama and Johnson, 1993).

Protozoa mampu mendegradasi bermacam-macam substrat (polimer tanaman, protein, bahan terlarut) serta mengkonsumsi bakteri dan fungi. Hal ini dapat menjaga keseimbangan mikroba dalam rumen (Jans, 2005). Siliata mempunyai kemampuan yang tinggi dalam mendegradasi serta memfermentasi

bermacam-macam substrat. Mereka mencerna partikel pakan serta menyerang semua konstituen utama tanaman yaitu selulosa, gula terlarut dan lipid. Terdapat perbedaan di antara genus dalam spesifitas substrat. *Isotricha* memanfaatkan pati dan beberapa gula namun bukan maltosa, sedangkan *Dasytricha* dapat memanfaatkan bermacam-macam gula termasuk maltosa namun tidak memanfaatkan pati. Jumlah protozoa rumen umumnya meningkat jika pakan banyak mengandung bahan yang mudah dicerna, namun perbedaan pakan juga berpengaruh terhadap macam genus protozoa. Jumlah *Isotricha* meningkat jika pakan banyak mengandung gula terlarut, sedangkan jumlah *Entodonium* dapat meningkat jika pakan banyak mengandung pati (Yokoyama and Johnson, 1993).

Seperti halnya bakteri, jumlah dan genus protozoa juga dapat dipengaruhi oleh kondisi fisiologis hewan yang dapat mempengaruhi lingkungan rumen. Suatu perbedaan, terutama pH dan kecepatan asupan pakan sangat berpengaruh terhadap jumlah dan jenis protozoa dalam rumen. Faktor lain yang juga dapat berpengaruh adalah antagonisme alamiah di antara spesies protozoa serta predasi (konsumsi) protozoa oleh protozoa lain (Yokoyama and Johnson, 1993).

Beberapa fungi anaerob misalnya *Neocallimastix frontalis*, *Sphaeromonas communis* dan *Piromonas communis* telah teridentifikasi keberadaannya dalam rumen. Sejumlah besar fungi tersebut terdapat dalam rumen domba dan sapi dan menyerang fragmen tanaman. Pada hewan yang mengkonsumsi pakan mengandung serat yang tinggi, jumlah fungi bisa mencapai 8% massa mikroba. Fungsi fungi secara signifikan dalam rumen belum jelas, namun telah diketahui mendegradasi selulosa dan xilan yang mengindikasikan pencernaan serat

(Yokoyama and Johnson, 1993). Rakotoarivonina *et al.* (2002) juga menyebutkan bahwa fungi berperan dalam mendegradasi selulosa dalam rumen hewan herbivora. Mikroba tersebut biasanya melekat pada selulosa dan memproduksi enzim selulolitik dan xilanolitik sehingga mampu mendegradasi polisakarida dinding sel tanaman secara efisien.

### 3.2 Limbah pertanian

Peningkatan jumlah ternak akan membutuhkan hijauan pakan ternak dalam jumlah yang besar pula. Pada sisi lain ketersediaan pakan hijauan sangat tergantung adanya ketersediaan lahan dan musim. Terbatasnya ketersediaan hijauan yang dapat dimanfaatkan sebagai pakan ternak akan menurunkan tingkat produktivitas ternak. Hal ini merupakan problem yang masih sulit diatasi, sehingga memberi peluang pada penggunaan limbah pertanian (jerami padi, bekatul, tongkol jagung, tumpi jagung, kulit coklat, kulit kopi dan lain-lain) sebagai pakan ternak alternatif (Ardian, 2004). Shiddieqy (2005) menyatakan bahwa setiap tahun dihasilkan hasil samping dan limbah pertanian hingga mencapai jutaan ton. Limbah pertanian ini terdiri atas jerami padi, daun jagung, batang jagung, daun kedelai, daun kacang tanah dan daun ubi kayu.

Pemanfaatan limbah sebagai bahan pakan ternak merupakan suatu alternatif yang bijaksana dalam upaya memenuhi kebutuhan nutrisi bagi ternak. Dua aspek yang terkait dengan pemanfaatan limbah sebagai pakan ternak adalah ketersediaan bahan baku pakan penyusun ransum bagi ternak dengan nilai ekonomis yang tinggi, serta membantu mengurangi pencemaran lingkungan (Murni dkk., 2008).

Ardian (2004) menyatakan bahwa meskipun penggunaan limbah pertanian selalu dikaitkan dengan harganya yang murah, namun masih ada beberapa hal yang perlu dipertimbangkan dalam pemanfaatannya. Faktor tersebut adalah kontinuitas ketersediaan, kandungan gizi, kemungkinan adanya faktor pembatas misalnya anti-nutrisi serta perlu tidaknya bahan tersebut diolah sebelum dapat digunakan sebagai bahan pakan ternak.

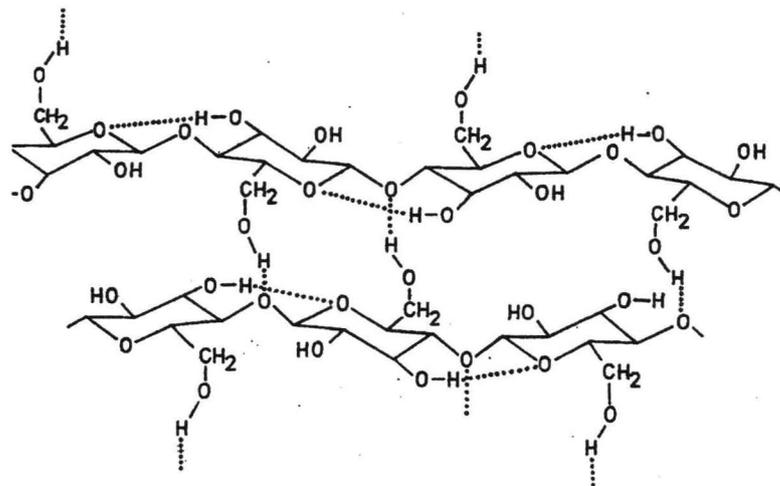
Beberapa peneliti menyebutkan bahwa selulosa merupakan komponen utama penyusun dinding sel tanaman. Kandungan selulosa pada dinding sel tanaman tingkat tinggi sekitar 35-50% dari berat kering tanaman (Lynd *et al.*, 2002); umumnya dinding sel tanaman terdiri dari 40-45% selulosa, 30-35% hemiselulosa dan 20-23% lignin (Bedford and Partridge, 2001); terdiri dari 15-40% selulosa, 30-40% hemiselulosa dan pektin, serta 20% lignin (Doi and Kosugi, 2004); selulosa 35-50%, hemiselulosa 20-35%, serta lignin 10-25% (Saha, 2004).

### 3.3 Selulosa

Komposisi kimia selulosa sangat sederhana, hanya berupa rangkaian glukosa yang panjangnya bisa mencapai 10.000 molekul D-glukosa (Staudenbauer and Schwarz, 2004). Molekul selulosa dan hemiselulosa merupakan polisakarida dengan ikatan  $\beta$ -1-4 glikosidik yang sulit dicerna sehingga pencernaan limbah pertanian menjadi rendah (Doi and Kosugi, 2004). Molekul selulosa alami tersusun secara paralel dalam bentuk serat yang terdiri dari beberapa molekul selulosa, dan sebagian serat tersebut dalam bentuk kristal. Ada dua tipe ikatan hidrogen pada molekul selulosa yaitu antara C<sub>3</sub>OH dengan oksigen pada cincin piranosa pada

molekul yang sama, serta antara C<sub>6</sub>OH pada molekul yang satu dengan oksigen pada ikatan glikosida molekul lainnya (Wang, 2004).

Pada umumnya ikatan  $\beta$ -1,4-glikosida tidaklah terlalu sulit untuk didegradasi, namun dengan adanya ikatan hidrogen maka selulosa dapat membentuk kristal yang sangat kuat (Wang, 2004). Untuk mendegradasi kristal selulosa menjadi glukosa dibutuhkan enzim selulase yang terdiri dari tiga enzim yang bekerja secara sinergis yaitu endoglukanase, eksoglukanase dan selobiase (Murashima *et al.*, 2002). Irwin *et al.*, (2000) menyatakan bahwa di samping endoselulase juga dibutuhkan dua tipe eksoselulase untuk menghidrolisis selulosa secara maksimum. Salah satu enzim memutus rangkaian selulosa dari ujung non-reduksi, sedangkan yang lain memutus dari ujung reduksi. Komponen-komponen selulosa akan didegradasi secara enzimatik menghasilkan oligomer yang lebih kecil dan akan diubah menjadi glukosa, pentosa serta struktur karbon kecil lain kemudian dimetabolisme menjadi CO<sub>2</sub>. Berikut adalah gambaran selulosa kristal.



**Gambar 3.2. Selulosa Kristal (Wang, 2004)**

Enzim selulase terdiri dari tiga kelompok besar, yaitu endoglukanase (CMCase = karboksi metil selulase/ Cx/ selulase EC 3.2.1.4 / endo-1,4- $\beta$ -glukanase/ 1,4- $\beta$ -D-glukan glukanohidrolase), eksoglukanase (selobiohidrolase/ C1/ avicelase/ selulase EC 3.2.1.91/ ekso-1,4- $\beta$ -glukanase/ 1,4- $\beta$ -D-glukan selobiohidrolase/ 1,4- $\beta$ -sellobiosidase) dan selobiase ( $\beta$ -glukosidase/  $\beta$ -D-glukosida glukohidrolase/ selulase EC 3.2.1.21 ) (Bhat and Bhat, 1997; Miyamoto, 1997; Bedford and Partridge, 2001). Endoglukanase dapat diklasifikasikan menjadi 13 famili glikosil hidrolase, eksoglukanase menjadi 5 famili dan selobiase menjadi 2 famili (Murashima *et al.*, 2002).

Substrat untuk endoglukanase adalah CMC serta derivat selulosa terlarut lain. Enzim endoglukanase berperan untuk memutus ikatan internal  $\beta$ -1,4-glikosida amorf pada selulosa alami menjadi unit yang lebih kecil menghasilkan selulo-oligosakarida/ selulodekstrin, namun tidak aktif terhadap kristal selulosa (Akhtar, 1998; Bedford and Partridge, 2001; Wang, 2004).

Eksoglukanase terdiri dari dua bagian yaitu  $\beta$ -1,4-glukano glukanohidrolase yang melepas unit glukosa dari kutub non-reduksi ( $\beta$ -glukan), serta  $\beta$ -1,4-glukan selobiohidrolase yang melepas unit selobiosa dari kutub non-reduksi (Staudenbauer and Schwarz, 2004). Eksoglukanase juga sangat aktif terhadap selulosa amorf, tetapi tidak begitu bagus dalam mendegradasi selulosa kristal dan selu-oligosakarida (Bedford and Partridge, 2001). Enzim ini beraktivitas secara sinergis dengan enzim lain. Selulosa dengan polimerisasi rendah, misalnya avicel atau selulosa yang mengembang bisa digunakan sebagai substrat (Akhtar, 1998).

Selobiase menghidrolisis selobiosa dan oligosakarida pendek menjadi glukosa (Miyamoto, 1997; Akhtar, 1998). Selobiase juga memecah unit glukosil dari kutub non-reduksi dari selulo-oligosakarida (Wang, 2004). Substrat untuk selobiase adalah selobiosa, glukosa dimer ikatan  $\beta$  dan selulodekstrin, sedangkan untuk aril- $\beta$ -glukosidase adalah salisin dan p-nitrofenil- $\beta$ -glukosida (Akhtar, 1998).

Mekanisme hidrolisis selulosa secara enzimatik dimulai dengan serangan endoglukanase pada ikatan glikosida menghasilkan rangkaian pendek, kemudian diikuti dengan serangan secara sinergis oleh endo dan eksoglukanase menghasilkan oligosakarida, selobiosa dan glukosa (Akhtar, 1998).

### **3.4 Enzim untuk Pakan Hewan**

Degradasi limbah pertanian untuk pakan hewan bisa dilakukan dengan menggunakan bakteri selulolitik maupun dengan menggunakan enzim selulase. Bakteri membutuhkan waktu untuk beradaptasi terlebih dahulu sebelum aktif mendegradasi bahan pakan, sedangkan penggunaan enzim dirasa lebih praktis karena bisa langsung beraktivitas mendegradasi limbah pertanian tanpa membutuhkan waktu untuk beradaptasi.

Penggunaan enzim asal mikroba banyak digunakan untuk meningkatkan kualitas pakan, serta penggunaan lain, misalnya : menghilangkan faktor anti-nutrisi dan toksin; meningkatkan pencernaan nutrisi tersedia; meningkatkan pencernaan polisakarida non-pati; serta suplementasi enzim endogen (Bonneau and Laarveld, 1999). Enzim pakan harus mempunyai target spesifik terhadap komponen pakan yang mungkin merugikan atau mempunyai nilai nutrisi yang rendah agar dapat

memberikan keuntungan bagi ternak. Bahan baku pakan yang semakin beragam mungkin digunakan dalam formulasi pakan tanpa memperhatikan penampilan ternak, oleh sebab itu kesesuaian antara aktivitas enzim dan komponen pakan dirasa penting. Sebagai contoh, enzim pakan digunakan untuk meningkatkan kandungan nutrisi tersedia dari protein tumbuhan sehingga dapat digunakan untuk substitusi tepung ikan serta sumber protein hewani lain yang mempunyai kualitas tinggi dan berharga mahal. Enzim pakan juga dapat digunakan untuk substitusi sumber energi yang semula tidak sesuai menjadi sesuai (Officer, 2000).

Peningkatan efisiensi pakan oleh suplementasi enzim dalam pakan juga terjadi berupa pengurangan kandungan nutrisi feses sehingga tidak terlalu mencemari tanah. Penggunaan enzim dalam akuakultur juga dapat meningkatkan kualitas air setelah pakan tersebut dikonsumsi oleh ikan. Enzim pakan juga dapat digunakan sebagai alternatif pengganti hormon dan antibiotik sebagai pemacu pertumbuhan yang ramah lingkungan, hal ini disebabkan enzim dipandang sebagai produk yang lebih alami dibandingkan produk kimiawi lain. Penggunaan antibiotik dapat menimbulkan resistensi bakteri, serta di beberapa negara Eropa sudah ada larangan untuk memasarkan daging yang diproduksi dengan menggunakan hormon pemacu pertumbuhan (Officer, 2000). Perlakuan enzim pada rumput segera sebelum diinkubasi dapat meningkatkan pencernaan Bahan Kering dan NDF, yang menunjukkan bahwa pemakaian enzim pencernaan serat pada pakan dapat meningkatkan pencernaan pada ruminansia (Nowak *et al.*, 2003).

Terdapat dua cara pemberian enzim ke dalam pakan. Cara pertama adalah pakan di perlakukan dengan enzim sampai didapatkan hasil yang baik, baru

kemudian diberikan pada ternak. Cara kedua adalah enzim ditambahkan pada pakan kurang lebih satu jam sebelum diberikan pada ternak, cara kedua ini dirasa lebih fleksibel serta menghemat waktu. Aplikasi enzim menjelang dikonsumsi disebut aplikasi langsung. Enzim dapat ditambahkan pada hijauan menjelang dikonsumsi, dan jika berhasil meningkatkan konsumsi dan pencernaan maka biaya pakan dapat ditekan (Officer, 2000).

Penambahan enzim selulase dalam ransum hewan ruminansia dapat meningkatkan pertumbuhan meskipun dalam saluran pencernaan hewan tersebut sebetulnya sudah terdapat mikroba pencerna serat kasar. Beauchemin *et al.*, (2003) menyatakan bahwa pemberian *feed additive* berupa enzim terutama selulase dan xilanase dapat meningkatkan efisiensi pakan serta penampilan ternak, baik pada sapi perah maupun sapi potong. Enzim pencernaan serat juga ada yang diaplikasikan pada pakan berserat menjelang dikonsumsi hewan, sehingga hewan yang mengkonsumsinya lebih mudah untuk mencerna.

Penambahan enzim pencernaan serat, baik yang diaplikasikan pada pakan maupun diberikan secara langsung dapat meningkatkan produktivitas ternak (Beauchemin *et al.*, 2004; Adesogan, 2005). Krehbiel *et al.* (2003) menyatakan bahwa pemberian mikroba langsung pada hewan ruminansia dapat menurunkan asidosis rumen, meningkatkan konsentrasi propionat, jumlah protozoa serta respon kekebalan.

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa suplementasi enzim selulase dan xilanase pada pakan sapi dapat meningkatkan pencernaan dalam rumen serta meningkatkan produksi susu (Yang *et al.*, 1999). Aplikasi campuran enzim selulase

dan xilanase pada hijauan yang terdiri dari hay rumput dan barley (70:30) dapat meningkatkan kecernaan NDF yang juga berpengaruh pada produksi (Lewis *et al.*, 1996). Terdapat peningkatan produksi susu 10,8%, lemak susu meningkat 20% dan protein susu meningkat 13% sebagai hasil penambahan enzim selulase dan xilanase pada pakan. Suplementasi enzim dapat meningkatkan produksi susu pada 100 hari pertama masa laktasi, namun tidak pada pertengahan laktasi. Peningkatan produksi susu dapat terjadi jika pakan tersedia berupa hijauan dan konsentrat (45% : 55%) yang berbeda nyata dibandingkan pakan kontrol berupa hijauan dan konsentrat (55% : 45%) (Schingoethe *et al.*, 1999). Nakashima and Orskov (1989) mendapatkan peningkatan kecernaan jerami sampai 10% dengan penambahan selulase dan xilanase pada silase jerami, sedangkan Beauchemin *et al.* (1995) mencatat peningkatan pertambahan berat badan sampai 30% serta peningkatan konsumsi Bahan Kering sampai 10% pada sapi jantan yang diberi hay rumput yang sudah diberi enzim saat pengepakan.

Beberapa faktor yang dapat mempengaruhi efektivitas enzim pakan antara lain komposisi pakan, sumber mikroba, aktivitas enzim campuran, stabilitas suhu, suhu lingkungan saat mengkonsumsi pakan serta kelas hewan. Bahan pakan penyusun ransum sangat mempengaruhi aktivitas enzim untuk bisa beraktivitas maksimal dalam pencernaan. Beauchemin *et al.* (1997) mencatat tentang efek dua macam enzim terhadap pertumbuhan sapi yang diberi pakan berupa butiran jagung dan silase jagung atau butiran barley dan silase barley. Enzim dengan aktivitas xilanase yang tinggi dapat meningkatkan FCR (*Feed Conversion Ratio*) pada sapi yang diberi ransum barley, sedangkan yang diberi ransum jagung tidak terpengaruh.

### 3.4.1 Sumber Enzim

Secara umum enzim selulase hanya diproduksi oleh mikroba, baik bakteri, protozoa maupun jamur. Selulase dan xilanase diproduksi oleh banyak bakteri dan jamur, baik yang aerob, anaerob, mesofil, termofil maupun ekstremofil. Bakteri dan jamur aerob umumnya memproduksi selulase dan hemiselulase ekstraseluler. Bakteri anaerob (*Clostridium thermocellum*, *C. cellulovorans*, *Rumicoccus albus*, *R. flavefaciens*, *Fibrobacter succinogenes*, *Acetivibrio cellulolyticus*) dan jamur anaerob (*Neocallimastix frontalis*, *N. patriciarum* dan *Piromyces aquii*) memproduksi selulase dalam bentuk multienzim kompleks (Bedford and Partridge, 2001).

*Clostridium cellulovorans* bisa memproduksi enzim selulase kompleks, yang disebut sebagai selulosam. Selulosam terdiri dari endoglukanase, eksoglukanase dan  $\beta$ -glukosidase. Endoglukanase dapat diklasifikasikan menjadi 13 famili glikosil hidrolase, eksoglukanase menjadi 5 famili, sedangkan  $\beta$ -glukosidase menjadi 2 famili. Masing-masing famili mempunyai aktivitas yang berbeda dalam mendegradasi selulosa. Campuran selulosam EngH dan ExgS mempunyai aktivitas yang paling tinggi dalam mendegradasi kristal selulosa dibandingkan dengan enzim selulase lainnya. Jika EngE atau EngH digunakan sebagai pereaksi pertama kemudian diikuti dengan ExgS, akan terjadi efek sinergis. Namun ExgS tidak bisa digunakan sebagai pereaksi awal (Murashima *et al.*, 2002).

Mirni dkk. (2006) telah melakukan isolasi dan identifikasi bakteri hemiselulolitik mesofilik yang berasal dari rumen sapi potong. Bakteri tersebut telah diaplikasikan dengan dosis 15 % dan terbukti dapat meningkatkan kualitas jerami padi serta meningkatkan pencernaan pada domba. Mirni dkk. (2009) menemukan

bahwa isolat bakteri *Actinobacillus* di samping memproduksi enzim hemiselulase ternyata juga mampu memproduksi enzim selulase. Aktivitas selulase (endoglukanase) sebesar 0,28  $\mu$ /ml sedangkan aktivitas hemiselulase (endoxilanase) sebesar 22,63  $\mu$ /ml.

Zhang *et al.* (2006) menyatakan bahwa untuk memproduksi enzim selulase dibutuhkan biaya yang relatif mahal, oleh sebab itu penghematan dalam biaya produksi sangat penting dalam penggunaannya secara komersial. Pemrosesan menggunakan enzim selulase bisa berjalan dengan lebih ekonomis jika berhasil meningkatkan volume produksi enzim komersial, memproduksi enzim menggunakan substrat paling murah, preparasi enzim dengan stabilitas tinggi, serta memproduksi enzim dengan aktivitas spesifik yang tinggi.

Atlas (2005) menyebutkan bahwa media untuk menumbuhkan mikroorganisme mengandung substrat yang penting untuk mendukung pertumbuhan mikroorganisme. Karena begitu beragamnya mikroorganisme serta beragam pula alur metabolisme, sehingga banyak pula macam media. Perbedaan dalam komposisi medium dapat berakibat pada perbedaan karakteristik pertumbuhan suatu mikroorganisme. Media untuk pertumbuhan mikroorganisme harus mengandung sumber karbon, nitrogen, fosfat, logam, serta *growth factor*.

Mishra *et al.* (2007) memproduksi enzim lignoselulase menggunakan lima strain bakteri selulolitik dan empat strain fungi dengan jerami padi sebagai substrat. Singh *et al* (2009) berhasil memproduksi enzim selulase secara massal dengan harga murah menggunakan substrat jerami padi serta inokulan berupa fungi *Aspergillus heteromorphus*.

Todar (2000) menyebutkan bahwa nutrisi yang dibutuhkan oleh bakteri adalah sesuai dengan komposisi sel, yaitu terdiri dari C, H, O, N, S, P, K, Mg, Fe, Ca, Mn dan trace mineral meliputi Zn, Co, Cu dan Mo. Elemen-elemen tersebut bisa berupa air, molekul mikro dan molekul makro. Media cair umumnya digunakan untuk pengembangbiakan isolat murni, sedangkan media padat digunakan untuk mengisolasi serta memurnikan bakteri.

Qi *et al.* (2008) memproduksi enzim selulase menggunakan fungus *Trichoderma viride* pada medium mengandung  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  dan  $\text{CaCl}_2$  serta substrat campuran jerami padi dan dedak gandum. Otajevwo and Aluyi (2011) memproduksi enzim selulase menggunakan bubuk selulosa (CMC), Agar,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , Yeast extract, Cysteine,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ , serta Resazurin. Mishra *et al.* (2007) memproduksi selulase menggunakan *Beef extract* dengan inokulan bakteri, serta menggunakan *Malt extract* dengan inokulan fungi.

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

Penelitian ini secara keseluruhan akan dilaksanakan dalam dua tahap. Pada tahun pertama membuat media pertumbuhan bakteri *Actinobacillus* sp. untuk memproduksi enzim secara komersial. Pada tahun kedua membuat media pertumbuhan terbaik dalam jumlah besar, kemudian dilakukan optimasi waktu produksi, serta dosis dan waktu optimum dalam degradasi limbah pertanian.

#### 4.1. Metode Penelitian Tahap I (Tahun Pertama)

Metode penelitian tahap I meliputi pembuatan beberapa media pertumbuhan bakteri *Actinobacillus*, kemudian dilakukan pengamatan terhadap kurva pertumbuhan bakteri, uji aktivitas enzim, karakterisasi enzim selulase pada berbagai suhu maupun pH serta stabilitas enzim.

##### 4.1.1 Media Pertumbuhan Bakteri Selulolitik

Dibuat sebuah media pertumbuhan bakteri selulolitik sebanyak 100 ml yang mengandung CMC sebagai sumber karbon. Media selektif terdiri dari  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,05 g/100ml,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,5 g/100ml,  $\text{NH}_2\text{SO}_4$  0,2 g/100ml,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,16 g/100ml, NaCl 0,23 g/100ml, Yeast extract 0,5 g/100ml, CMC 2 g/100ml. Media ini selanjutnya disebut sebagai media kontrol (M-0).

Dibuat juga 3 (tiga) buah media alternatif dengan volume sama. Bahan-bahan mineral dibuat sama, namun menggunakan bahan teknis, sumber serat (CMC) diganti dengan jerami yang digiling halus, sedangkan sumber nitrogen (yeast extract) diganti

dengan urea, susu bubuk atau hati ayam. Secara lengkap media penelitian adalah sebagai berikut :

- M-0 : Media kontrol, merupakan media yang menggunakan bahan-bahan pro-analisa
- M-1 : Media menggunakan bahan-bahan teknis. Sumber Nitrogen menggunakan urea
- M-2 : Media menggunakan bahan-bahan teknis. Sumber Nitrogen menggunakan susu bubuk
- M-3 : Media menggunakan bahan-bahan teknis. Sumber Nitrogen menggunakan hati ayam

Keempat macam media tersebut selanjutnya disterilkan. Inokulum dibuat dengan menginokulasikan satu lup biakan bakteri selulolitik ke dalam 50 ml media inokulum. Biakan diinkubasi pada suhu 40<sup>0</sup> C selama 24 jam dengan kecepatan 150 rpm. Sebanyak 1% inokulum dimasukkan ke dalam 100 ml masing-masing media produksi. Biakan selanjutnya diinkubasi dengan kondisi yang sama seperti di atas.

#### **4.1.2 Pengukuran kurva pertumbuhan bakteri selulolitik**

Dilakukan pengukuran OD (*Optical Density*) dengan mengambil sampling sebanyak 1 ml setiap selang waktu 3 jam selama 24 jam atau lebih. Sampling pertama dilakukan pada jam ke-3 dilanjutkan sampai nilai OD menunjukkan penurunan yang jelas. Densitas optik diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada  $\lambda$  600 nm. Kurva pertumbuhan diperoleh dari hasil pengukuran densitas optik terhadap waktu.

#### **4.1.3 Produksi Enzim Selulase**

Sel dipanen dengan mengambil sampling sebanyak 1 ml setiap selang waktu 3 jam kemudian disentrifugasi pada suhu 4<sup>0</sup>C selama 15 menit dengan kecepatan 6000 rpm. Pelet dibuang, sedangkan supernatan yang mengandung enzim selulase diambil untuk digunakan pada analisis selanjutnya.

#### 4.1.4 Uji Aktivitas Endo- $\beta$ -glucanase

Pengukuran aktivitas enzim *endo- $\beta$ -1,4-glucanase* dilakukan dengan memasukkan 100  $\mu$ l enzim dan substrat CMC dalam bufer asetat (pH 7) ke dalam tabung Eppendorf kemudian diinkubasi pada suhu 35<sup>0</sup>C dalam penangas air selama 30 menit. Sebagai kontrol ditambahkan DNS ke dalam larutan enzim, kemudian ditambahkan substrat. Pada sampel ditambahkan 600  $\mu$ l DNS, selanjutnya sampel dan kontrol dipanaskan dalam air mendidih selama 15 menit, lalu diinkubasi dalam *icebath* selama 20 menit. Absorbansi dibaca pada panjang gelombang 550 nm. 1 Unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menghasilkan 1  $\mu$ mol glukosa per menit untuk setiap ml enzim (Miller, 1959).

#### 4.1.5 Penentuan suhu optimum

Penentuan suhu optimum enzim selulase dilakukan dengan menentukan aktivitas enzim selulase pada berbagai variasi suhu inkubasi yaitu pada suhu 35, 40, 45, 50, 55 dan 60 °C .

#### 4.1.6 Penentuan pH optimum

Penentuan pH optimum enzim selulase ditentukan dengan esei aktivitas enzim pada pH 5 sampai 10 (buffer fosfat sitrat untuk pH 5, 6; buffer fospat untuk pH 6, 7, 8; buffer Tris-HCl untuk pH 8 dan 9 serta buffer Glisin-NaOH untuk pH 9 dan 10) pada suhu optimum enzim.

#### 4.1.7 Uji Stabilitas pH

Stabilitas pH ditentukan dengan mengatur enzim pada pH 5 sampai 10 dengan menggunakan pH meter. Selanjutnya enzim diinkubasi dalam *waterbath* pada suhu optimum enzim selama 1 jam, kemudian masing-masing enzim diatur ke pH optimumnya dan diukur aktivitas residunya.

#### 4.1.8 Uji Stabilitas suhu

Stabilitas suhu ditentukan dengan menginkubasi enzim tanpa substrat dalam *water bath* pada suhu optimum enzim selama 18 jam dan disampling setiap 2 jam untuk diukur aktivitasnya.

## BAB V

### HASIL DAN PEMBAHASAN

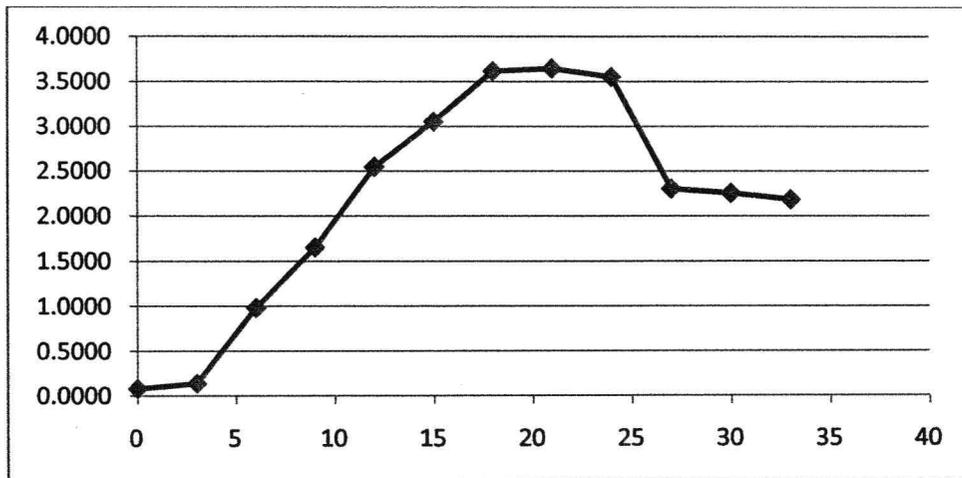
#### 5.1 Pertumbuhan Bakteri Selulolitik

Pertumbuhan bakteri selulolitik (*Actinobacillus* sp.) yang ditumbuhkan pada beberapa macam media cair pertumbuhan dapat dilihat pada Tabel 5.1 berikut.

**Tabel 5.1 Data Pengukuran Pertumbuhan Bakteri Setiap Interval Waktu Tiga Jam**

Waktu (Jam)	KONTROL (M0)	UREA (M1)	SUSU (M2)	HATI (M3)
0	0.0825	0.6657	0.8766	1.1739
3	0.1390	0.9171	1.0778	1.4810
6	0.9836	0.9628	1.7425	2.0367
9	1.6512	0.9106	1.9023	1.4605
12	2.5468	0.8560	1.6587	1.7102
15	3.0525	1.0034	1.4213	1.7170
18	3.6154	1.1831	1.6665	2.0113
21	<b>3.6431</b>	1.3919	2.1407	2.4473
24	3.5501	1.6156	2.7290	2.9670
27	2.3021	1.8293	<b>3.2421</b>	3.4240
30	2.2545	<b>1.9256</b>	3.1813	<b>3.4352</b>
33	2.1836	1.7148	3.1796	3.2977

Grafik pertumbuhan bakteri selulolitik yang ditumbuhkan pada media kontrol, yaitu media yang menggunakan bahan-bahan kimia pro-analisa dapat dilihat pada Gambar 5.1 berikut.

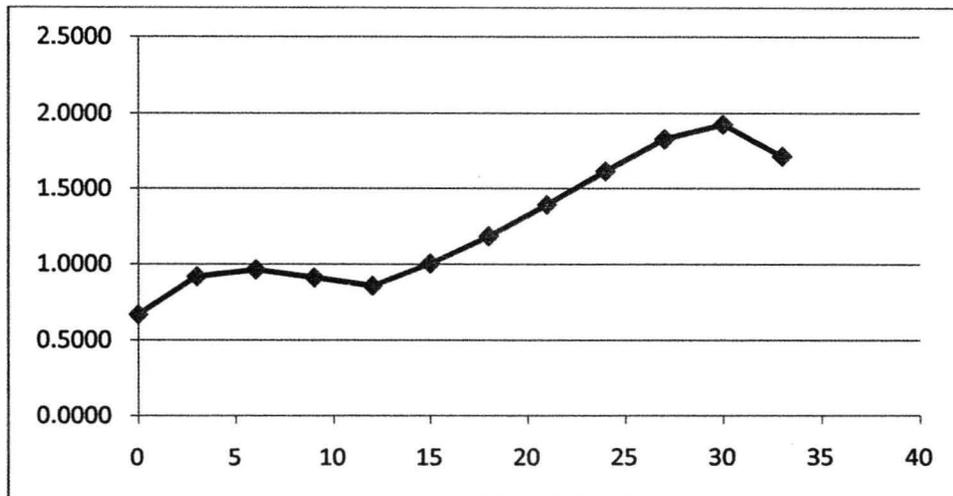


**Gambar 5.1. Grafik pertumbuhan bakteri selulolitik (*Actinobacillus* sp.) pada media kontrol.**

Pada Gambar 5.1 terlihat bahwa fase lag atau fase adaptasi terjadi pada tiga jam pertama, selanjutnya masuk ke dalam fase log sampai jam ke-18, kemudian mengalami fase stasioner sampai jam ke-24 yang selanjutnya masuk ke dalam fase kematian.

Pada media kontrol digunakan CMC sebagai substrat sumber karbon. Xu (2002) menyatakan bahwa CMC merupakan turunan selulosa rantai panjang yang disubstitusi dengan kelompok *carboxymethyl*, bersifat larut dalam air, serta umum digunakan sebagai model substrat untuk mendeteksi  $\beta$ -1,4-*endoglucanase*. Bakteri *Actinobacillus* sp. hanya membutuhkan waktu yang singkat untuk beradaptasi terhadap lingkungan yang baru, selanjutnya dapat tumbuh sesuai kapasitas yang dimiliki karena nutrisi yang dibutuhkan sudah tersedia.

Grafik pertumbuhan bakteri selulolitik yang ditumbuhkan pada media alternatif menggunakan bahan kimia teknis serta sumber protein berupa urea dapat dilihat pada Gambar 5.2.



**Gambar 5.2. Grafik pertumbuhan bakteri selulolitik (*Actinobacillus* sp.) pada media yang menggunakan urea sebagai sumber protein.**

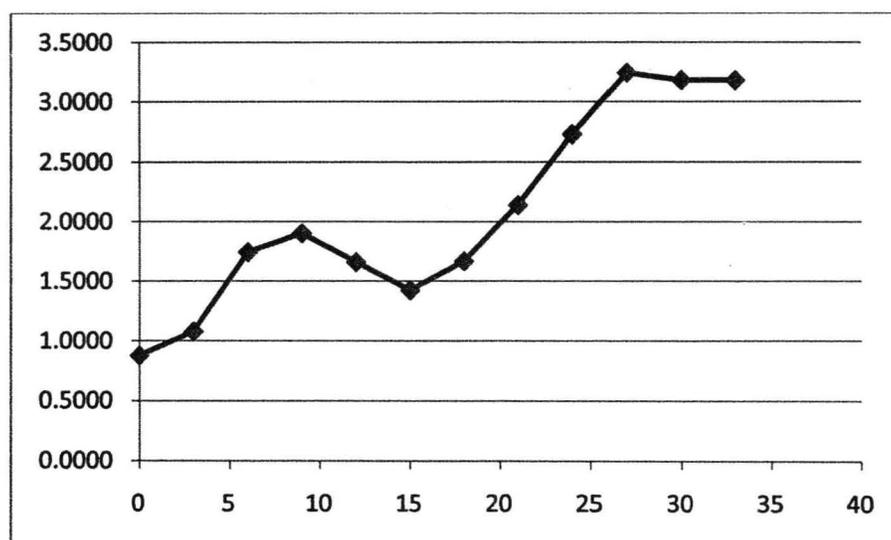
Pada Gambar 5.2 terlihat bahwa fase lag atau fase adaptasi terjadi sampai jam ke-12, selanjutnya masuk ke dalam fase log sampai jam ke-27, kemudian mengalami fase stasioner sampai jam ke-30 yang selanjutnya masuk ke dalam fase kematian.

Pada media alternatif, CMC sebagai sumber karbon diganti dengan jerami padi sehingga bakteri membutuhkan waktu adaptasi beberapa lama untuk mengolah terlebih dahulu sebelum masuk ke dalam fase log. Bisa jadi sebenarnya waktu adaptasi pada media alternatif hampir sama dengan kontrol, namun terlebih dulu mengolah jerami padi sebagai sumber karbon sebelum tumbuh dengan kecepatan normal sesuai dengan kandungan nutrisi yang tersedia.

Pertumbuhan bakteri dengan menggunakan urea sebagai sumber nitrogen tidak bisa maksimal, hal ini kemungkinan disebabkan perbandingan C:N yang tidak seimbang. Sumber karbon sulit didapat karena harus mengolah jerami padi terlebih dahulu, sedangkan kandungan nitrogen terlalu tinggi. Mitchell (2008) dan James (2010) menyebutkan bahwa kandungan N pada urea sebesar 46%.

Alden *et al* (2001) menyebutkan bahwa penambahan glukosa dapat menyebabkan peningkatan respirasi pada bakteri tanah. Meskipun hal tersebut tidak secara langsung menunjukkan terjadinya pertumbuhan, namun mikroba memanfaatkan sumber karbon sebagai energi.

Grafik pertumbuhan bakteri selulolitik yang ditumbuhkan pada media alternatif menggunakan bahan kimia teknis serta sumber protein berupa susu dapat dilihat pada Gambar 5.3 berikut.

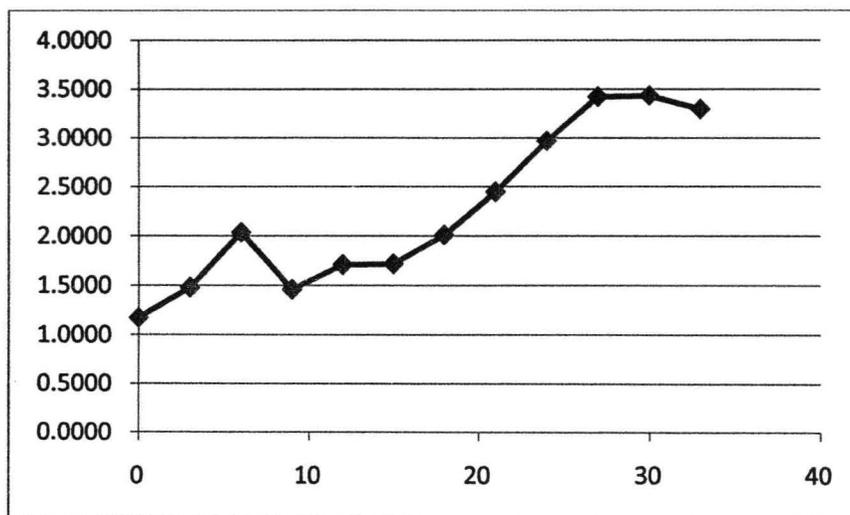


**Gambar 5.3. Grafik pertumbuhan bakteri selulolitik (*Actinobacillus* sp.) pada media yang menggunakan susu bubuk sebagai sumber protein.**

Pada Gambar 5.3 terlihat bahwa fase lag atau fase adaptasi terjadi sampai jam ke-18, selanjutnya masuk ke dalam fase log sampai jam ke-27, kemudian mengalami fase stasioner sampai jam ke-33.

Lamanya waktu adaptasi kemungkinan disebabkan karena bakteri perlu mengolah jerami padi sebagai sumber karbon. Pada fase log bakteri tumbuh dengan normal, namun karena banyak waktu yang hilang untuk mengolah jerami, sehingga fase stasioner berjalan cukup singkat. Kandungan nutrisi susu cukup seimbang untuk pertumbuhan bakteri secara normal. El-Khier and Yagoub (2009) menyebutkan kandungan protein pada susu bubuk sekitar 27%, lemak 27-28% serta laktosa 37.15-38.98%.

Grafik pertumbuhan bakteri selulolitik yang ditumbuhkan pada media alternatif menggunakan bahan kimia teknis serta sumber protein berupa hati ayam dapat dilihat pada Gambar 5.4 berikut.

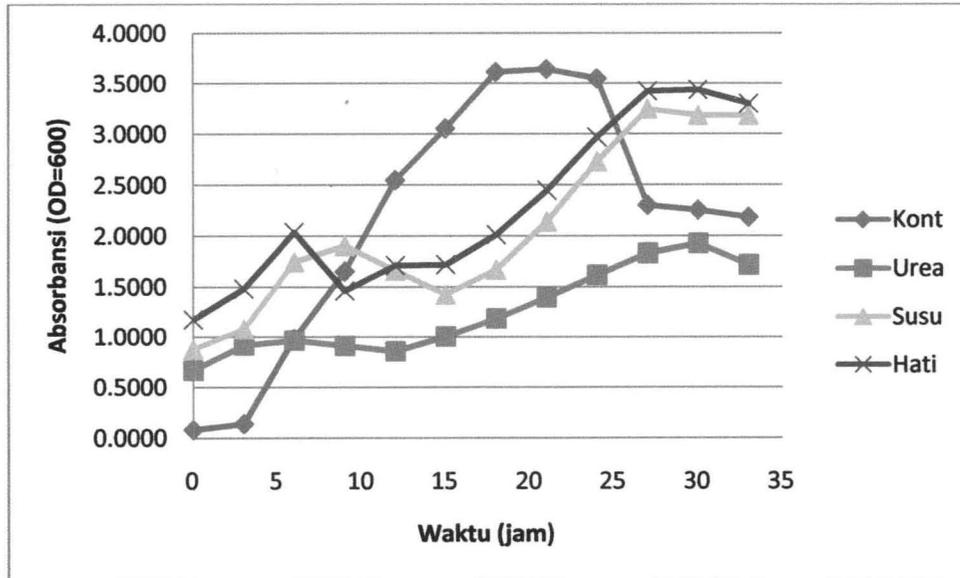


**Gambar 5.4. Grafik pertumbuhan bakteri selulolitik (*Actinobacillus* sp.) pada media yang menggunakan hati ayam sebagai sumber protein.**

Pada Gambar 5.4 terlihat bahwa fase lag atau fase adaptasi terjadi sampai jam ke-15, selanjutnya masuk ke dalam fase log sampai jam ke-27, kemudian mengalami fase stasioner sampai jam ke-30 yang selanjutnya masuk ke dalam fase kematian.

Lamanya waktu adaptasi kemungkinan disebabkan karena bakteri perlu mengolah jerami padi sebagai sumber karbon. Pada fase log bakteri tumbuh dengan normal, namun karena banyak waktu yang hilang untuk mengolah jerami, sehingga fase stasioner berjalan cukup singkat. Kandungan nutrisi hati juga cukup seimbang untuk pertumbuhan bakteri secara normal. Dust *et al.* (2005) menyebutkan bahwa hati ayam mengandung protein 69% berdasarkan Bahan Kering, serta asam amino esensial yang cukup seimbang, sedangkan Gebhardt and Thomas (2002) menyebutkan bahwa hati ayam segar mengandung protein 25% serta lemak 5%, vitamin B6, vitamin D dan asam folat serta PUFA (*Poly Unsaturated Fatty Acid*).

Gabungan grafik pertumbuhan bakteri selulolitik yang ditumbuhkan pada beberapa media dapat dilihat pada Gambar 5.5 berikut.



**Gambar 5.5. Grafik pertumbuhan bakteri selulolitik (*Actinobacillus* sp.) pada beberapa macam media pertumbuhan.**

Gambar 5.5 menunjukkan bahwa puncak pertumbuhan bakteri pada media alternatif menggunakan sumber protein berupa hati dan susu hampir sama dengan media kontrol, namun membutuhkan waktu lebih lama, hal ini berkaitan dengan waktu adaptasinya yang lebih lama. Waktu adaptasi yang dibutuhkan oleh ketiga media alternatif sekitar 12-18 jam.

Waktu adaptasi merupakan fase penyesuaian bagi bakteri terhadap lingkungan yang baru. Pada fase ini belum terjadi pertumbuhan meskipun ada peningkatan ukuran sel (Fardiaz, 1992), namun mulai ada persiapan reproduksi berupa sintesis DNA serta enzim (Garbutt, 1997). Pada ketiga media alternatif, sumber karbon belum tersedia sehingga dibutuhkan waktu untuk mengolah terlebih dahulu sebelum bisa tumbuh secara normal. Bisa jadi sebenarnya waktu adaptasi pada ketiga media alternatif hampir sama dengan kontrol, namun bakteri yang tumbuh di dalamnya terlebih dulu mengolah jerami padi sebagai sumber

karbon sebelum tumbuh dengan kecepatan normal sesuai dengan kandungan nutrisi yang tersedia.

Alden *et al* (2001) menyebutkan bahwa karbon merupakan faktor pembatas bagi pertumbuhan mikroba yang hidup di tanah, meskipun nitrogen dan fosfor juga merupakan faktor pembatas pada tanah lain. Hal ini menunjukkan bahwa pada tanah yang berbeda maka faktor pembatasnya juga bisa berbeda. Ketersediaan karbon, nitrogen dan fosfor juga merupakan faktor pembatas bagi mikroba yang hidup di perairan.

Fase logaritmik pada penggunaan media kontrol terjadi sejak jam ketiga sampai jam ke-18, sedangkan pada media alternatif terjadi rata-rata pada jam ke 12-18 sampai jam ke-27. Pada fase logaritmik (eksponensial) ini terjadi peningkatan jumlah sel karena nutrisi dalam medium masih banyak sehingga sel membelah dengan cepat dan konstan (Fardiaz, 1992). Pada fase ini terjadi penambahan sel dua kali lipat setiap satuan waktu tertentu, saat nutrisi masih dapat mendukung pertumbuhan bakteri. Pertumbuhan bakteri berjalan dengan konstan karena rata-rata komposisi sel dan properti bakteri (protein dan DNA) meningkat secara bersamaan (Akerlund *et al.*, 1995).

Fase stasioner pada media kontrol terjadi setelah jam ke-18 sampai jam ke-24, sedangkan pada media alternatif waktunya rata-rata lebih singkat, yaitu pada jam ke-27 sampai jam ke-30. Pada fase ini jumlah populasi sel tetap karena jumlah sel yang tumbuh sama dengan jumlah sel yang mati. Ukuran sel pada fase ini menjadi lebih kecil karena sel tetap membelah meskipun nutrisi mulai habis. Pertumbuhan

bakteri terhambat karena nutrisi yang dibutuhkan telah sulit dipenuhi serta terjadi akumulasi hasil samping yang dapat menghambat metabolisme (Garbutt, 1997).

Fase stasioner yang singkat pada ketiga media alternatif kemungkinan disebabkan nutrisi yang tersedia sudah habis karena banyak digunakan pada awal pertumbuhan bakteri, atau kemungkinan karena banyak terjadi akumulasi hasil samping fermentasi yang berakibat negatif terhadap pertumbuhan bakteri.

Setelah fase stasioner berakhir, pertumbuhan mikroorganisme mengalami penurunan karena kandungan nutrisi sudah habis dan terjadi pengurangan sel atau sel telah mati. Moran (2005) menyebutkan bahwa populasi mikroba membutuhkan energi dan protein untuk tumbuh dan berkembang biak. Keterbatasan nutrisi tersebut dapat menyebabkan terhambatnya pertumbuhan mikroba. Garbutt (1997) menyebutkan bahwa pada fase kematian, sel bakteri mengalami penurunan (sel lisis) karena akumulasi hasil samping yang bersifat menghambat semakin meningkat, energi sel habis, serta adanya perubahan pH.

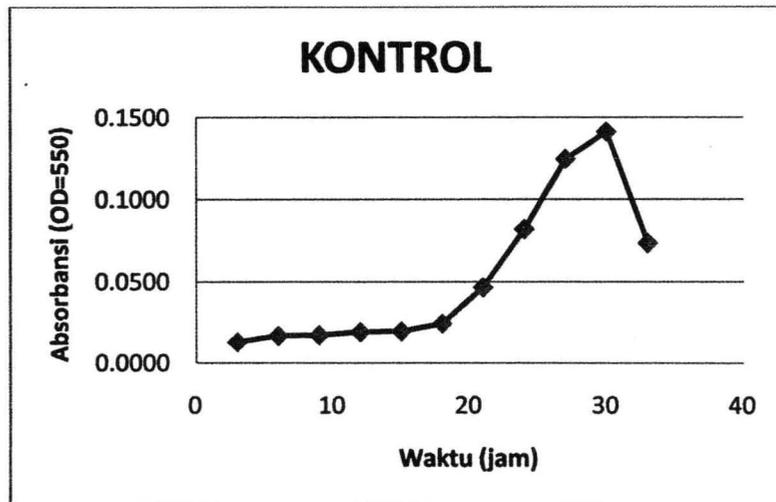
## **5.2 Optimasi Produksi Enzim Selulase**

Optimasi produksi enzim selulase digunakan untuk mengetahui waktu yang dibutuhkan untuk mendapatkan jumlah enzim yang optimum dari proses produksi. Produksi enzim selulase pada berbagai media pertumbuhan ditampilkan pada Tabel 5.2 berikut.

**Tabel 5.2. Produksi Enzim Selulase pada berbagai media**

Waktu (Jam)	KONTROL (M0)	UREA (M1)	SUSU (M2)	HATI (M3)
3	0.0131	0.0339	0.6335	0.0209
6	0.0170	0.0228	0.4387	0.0194
9	0.0175	0.0145	0.3427	0.0180
12	0.0194	0.0136	0.3400	0.0075
15	0.0199	0.0143	0.4198	0.0064
18	0.0246	0.0270	0.5288	0.0218
21	0.0468	0.0316	1.8058	0.0414
24	0.0820	0.0514	<b>1.9318</b>	0.0596
27	0.1243	0.0690	0.6800	0.0811
30	<b>0.1410</b>	<b>0.1710</b>	0.5150	<b>0.0865</b>
33	0.0736	0.0472	0.2043	0.0594

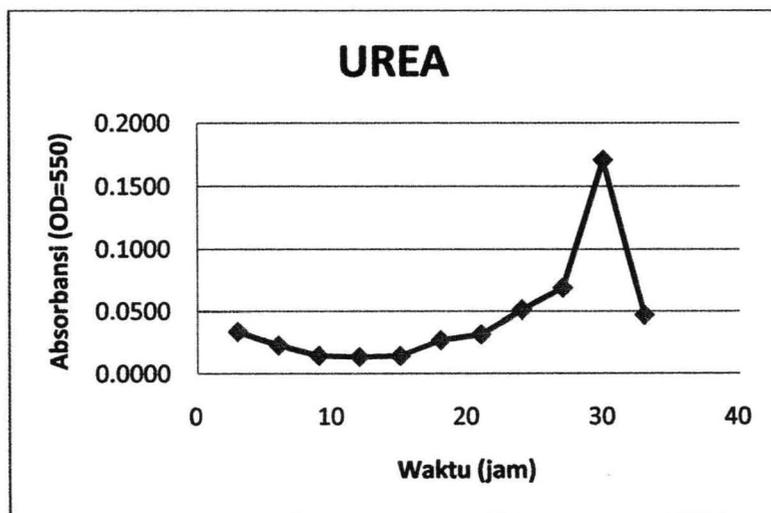
Kurva produksi enzim selulase pada media kontrol ditampilkan pada Gambar 5.6 berikut.

**Gambar 5.6. Kurva produksi enzim selulase pada media Kontrol.**

Gambar 5.6 menunjukkan bahwa puncak produksi enzim selulase pada media kontrol dicapai pada jam ke-30 dengan produksi sebesar 0.1410. Dalam gambar tersebut terlihat bahwa peningkatan produksi enzim mulai terjadi pada jam

ke-21 sampai jam ke-27, sedangkan puncak produksi dicapai pada jam ke-30 selanjutnya mengalami penurunan. Hal ini menunjukkan bahwa selama masa stasioner ternyata enzim masih diproduksi.

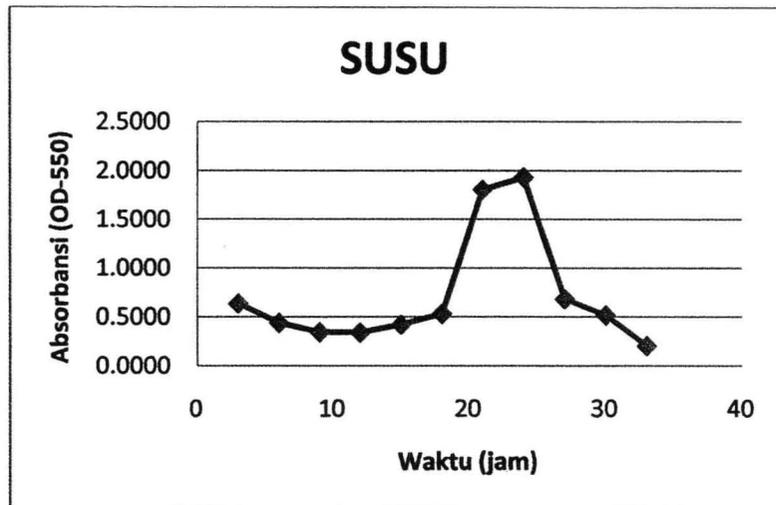
Kurva produksi enzim selulase pada media urea ditampilkan pada Gambar 5.7 berikut.



Gambar 5.7. Kurva produksi enzim selulase pada media Urea.

Gambar 5.7 menunjukkan bahwa puncak produksi enzim selulase pada media urea dicapai pada jam ke-30 dengan produksi sebesar 0.1710. Seperti halnya media yang menggunakan bahan-bahan kimia pro-analisa, produksi enzim yang menggunakan urea menghasilkan enzim selulase dengan kuantitas yang hampir sama. Hal ini menunjukkan bahwa untuk memproduksi enzim selulase bisa menggunakan bahan kimia teknis serta sumber nitrogen bukan berasal dari protein.

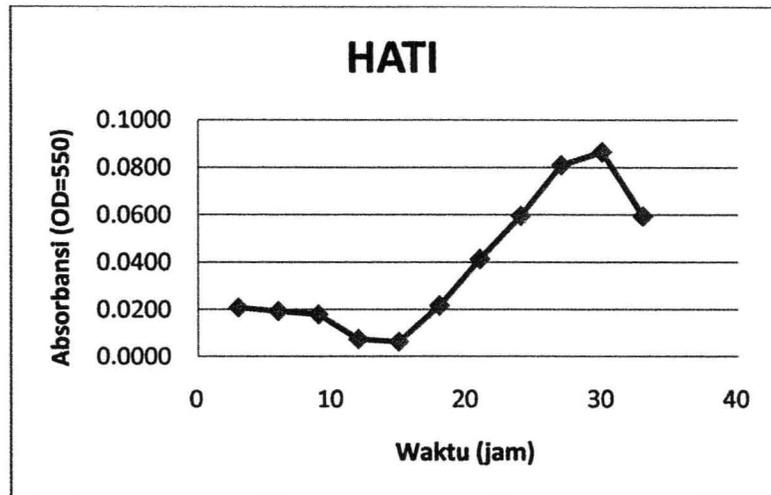
Kurva produksi enzim selulase pada media susu ditampilkan pada Gambar 5.8 berikut.



**Gambar 5.8. Kurva produksi enzim selulase pada media Susu.**

Gambar 5.8 menunjukkan bahwa puncak produksi enzim selulase pada media susu dicapai pada jam ke-24 dengan produksi sebesar 1.9318. Penggunaan susu bubuk ternyata dapat memperpendek waktu yang dibutuhkan untuk memproduksi enzim selulase serta menghasilkan enzim lebih banyak dibandingkan dengan kontrol. Hal ini kemungkinan disebabkan susu mengandung nutrisi yang lebih lengkap antara berupa protein, lemak dan laktosa sehingga bakteri dapat tumbuh lebih baik serta memproduksi enzim lebih banyak.

Kurva produksi enzim selulase pada media hati ditampilkan pada Gambar 5.9 berikut.



**Gambar 5.9. Kurva produksi enzim selulase pada media Hati.**

Gambar 5.9 menunjukkan bahwa puncak produksi enzim selulase pada media hati dicapai pada jam ke-30 dengan produksi sebesar 0.0865. Seperti halnya pada media kontrol, media yang menggunakan hati sebagai sumber protein terlihat bahwa grafik produksi enzim berjalan secara signifikan, sedangkan peningkatan produksi enzim mulai terjadi pada jam ke-18 sampai jam ke-27, dan puncak produksi dicapai pada jam ke-30 selanjutnya mengalami penurunan. Hati juga mengandung nutrisi yang lengkap seperti halnya susu bubuk.

Produksi enzim selulase tertinggi umumnya dicapai pada jam ke-30, baik pada media kontrol maupun pada media alternatif kecuali yang menggunakan susu. Rata-rata produksi enzim selulase pada ketiga perlakuan juga tidak begitu tinggi, berkisar 0.08-0.17.

Pada media alternatif yang menggunakan susu sebagai sumber protein, produksi puncak dicapai pada jam ke-24 dengan produksi sebesar 1.9318. Hal ini kemungkinan disebabkan susu mengandung nutrisi yang lebih lengkap

dibandingkan dengan sumber protein yang lain sehingga penampilan produksi enzim juga bisa berjalan secara optimal. Susu mengandung protein yang tinggi, serta dilengkapi juga dengan mineral makro maupun mikro serta gula susu (laktosa) yang berfungsi sebagai sumber energi.

Elisashvili *et al* (2008) menyatakan bahwa fungi *Pleurotus ostreatus* yang ditumbuhkan pada media mengandung substrat jerami gandum atau daun akan mengalami peningkatan protein dibandingkan dengan kontrol jika dalam media ditambahkan pepton atau  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , sebagai sumber protein.

### 5.3 Standar Glukosa

Standar glukosa digunakan untuk mendapatkan persamaan regresi linier yang nantinya bias digunakan untuk menghitung aktivitas enzim endoglukanase. Berdasarkan data yang diperoleh, maka persamaan regresi standar glukosa yang digunakan adalah sebagai berikut:

$$Y = 0.822 X - 0.697$$

### 5.4 Aktivitas Enzim Endoglukanase

Uji aktivitas enzim endo- $\beta$ -1,4-glucanase dilakukan dengan metode DNS yang bertujuan untuk mengetahui adanya gugus aldehid pada gula reduksi yang selanjutnya dioksidasi menjadi karboksil. Asam 3,5-dinitrosalisilat direduksi menjadi asam 3-amino-5-nitrosalisilat dalam kondisi basa. Perubahan warna kuning asam 3,5-dinitrosalisilat menjadi kecoklatan berasal dari asam 3-amino-5-nitrosalisilat. Adanya gugus aldehid ditandai dengan perubahan warna kuning

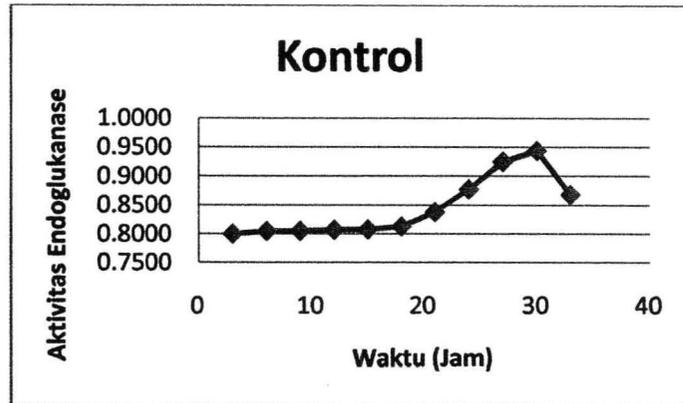
menjadi kecoklatan. Gugus aldehid ini berasal dari glukosa hasil hidrolisis selulosa oleh enzim endo- $\beta$ -1,4-glucanase (Miller, 1959).

Aktivitas enzim endoglukanase digunakan untuk mengetahui media yang paling baik untuk memproduksi enzim selulase serta waktu optimum untuk memproduksi enzim. Aktivitas enzim endoglukanase pada berbagai media pertumbuhan ditampilkan pada Tabel 5.3 berikut.

**Tabel 5.3. Aktivitas Enzim Endoglukanase pada berbagai media ( $\mu$ /ml)**

<b>Waktu (Jam)</b>	<b>KONTROL (M0)</b>	<b>UREA (M1)</b>	<b>SUSU (M2)</b>	<b>HATI (M3)</b>
3	0.7999	0.8233	1.4987	0.8087
6	0.8043	0.8108	1.2793	0.8069
9	0.8048	0.8014	1.1711	0.8054
12	0.8070	0.8004	1.1681	0.7936
15	0.8075	0.8012	1.2580	0.7923
18	0.8128	0.8155	1.3808	0.8097
21	0.8378	0.8207	2.8192	0.8318
24	0.8775	0.8431	<b>2.9612</b>	0.8523
27	0.9251	0.8629	1.5511	0.8764
30	<b>0.9439</b>	<b>0.9777</b>	1.3652	<b>0.8826</b>
33	0.8680	0.8382	1.0152	0.8521

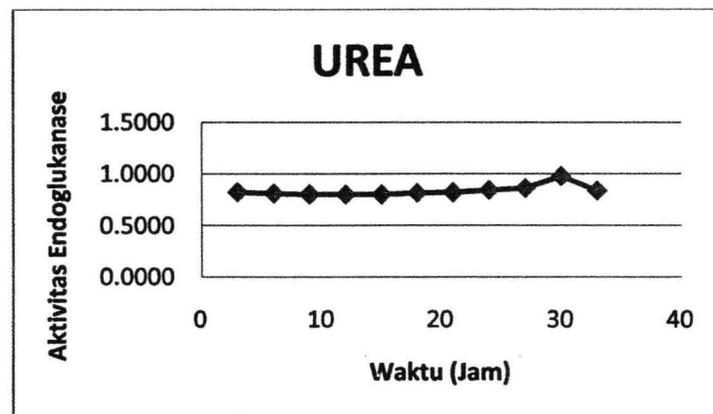
Aktivitas enzim endoglukanase pada media kontrol ditampilkan pada Gambar 5.10 berikut.



**Gambar 5.10. Kurva aktivitas enzim endoglukanase pada media Kontrol.**

Gambar 5.10 menunjukkan bahwa pada penggunaan media kontrol, aktivitas endoglukanase tertinggi dicapai pada inkubasi 30 jam dengan aktivitas sebesar 0.9439.

Aktivitas enzim endoglukanase pada media yang menggunakan urea sebagai sumber protein ditampilkan pada Gambar 5.11 berikut.

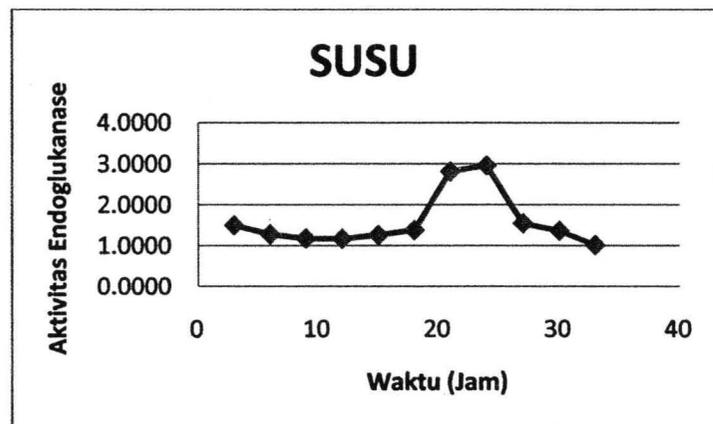


**Gambar 5.11. Kurva aktivitas enzim endoglukanase pada media Urea.**

Gambar 5.11 menunjukkan bahwa pada penggunaan media mengandung urea, aktivitas endoglukanase tertinggi dicapai pada inkubasi 30 jam seperti halnya

pada penggunaan media kontrol dengan aktivitas sebesar 0.9777 atau hampir setara dengan media kontrol.

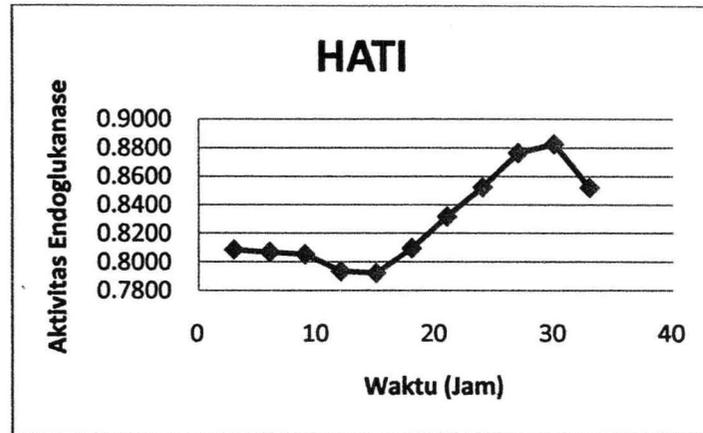
Aktivitas enzim endoglukanase pada media yang menggunakan susu bubuk sebagai sumber protein ditampilkan pada Gambar 5.12 berikut.



**Gambar 5.12.** Kurva aktivitas enzim endoglukanase pada media Susu bubuk.

Gambar 5.12 menunjukkan bahwa pada penggunaan media mengandung susu bubuk, aktivitas endoglukanase tertinggi dicapai pada inkubasi 24 jam dengan aktivitas sebesar 2.9612 yang jauh lebih tinggi dibandingkan dengan media kontrol serta membutuhkan waktu lebih pendek.

Aktivitas enzim endoglukanase pada media yang menggunakan hati ayam sebagai sumber protein ditampilkan pada Gambar 5.13 berikut.



**Gambar 5.13. Kurva aktivitas enzim endoglukanase pada media Hati.**

Gambar 5.13 menunjukkan bahwa pada penggunaan media mengandung hati ayam, aktivitas endoglukanase tertinggi dicapai pada inkubasi 30 jam seperti halnya pada penggunaan media kontrol dengan aktivitas sebesar 0.8826 atau hampir setara dengan media kontrol.

Elisashvili *et al* (2008) menyatakan bahwa beberapa fungi berpotensi untuk memproduksi enzim selulase, xilanase, laksase dan mangan peroksidase. Jumlah enzim yang diproduksi serta rasio di antara keempat enzim dipengaruhi oleh spesies fungi, substrat lignoselulosa serta metode kultivasi. *Pleurotus ostreatus* yang ditumbuhkan pada media mengandung substrat jerami gandum atau daun akan mengalami peningkatan aktivitas enzim endoglukanase dan xilanase jika dalam media ditambahkan pepton atau  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  sebagai sumber protein.

Misra *et al* (2007) menyebutkan bahwa di antara empat strain *Phanerochaete chrysosporium* terdapat dua strain (NCIM 1073 dan MTCC 787) yang mempunyai aktivitas selulase tertinggi, yaitu endoglukanase (0.36-0.42 IU/ml), eksoglukanase (0.55-0.88 IU/ml) serta selobiase (1.07-1.18 IU/ml) setelah proses fermentasi pada

jerami padi selama 15 hari. Bakteri *Cellulomonas cellulans* MTCC 23 menunjukkan aktivitas eksoglukanase (0.72 IU/ml) dan selobiase (1.05 IU/ml) tertinggi, sedangkan endoglukanase tertinggi (0.38 IU/ml) berasal dari *Cellulomonas uda*.

Kashem *et al* (2004) melaporkan aktivitas endoglukanase (13.78-82.68 µg/ml) pada *Cellulomonas cellulosa* menggunakan beberapa sumber karbon yang berbeda. Aktivitas endoglukanase tertinggi dicapai jika menggunakan galaktosa, sedangkan eksoglukanase dan selobiase tertinggi dicapai jika menggunakan laktosa sebagai sumber karbon.

## 5.5 Karakterisasi Enzim Selulase

Berdasarkan aktivitas enzim yang didapat, maka enzim selulase yang digunakan dalam penelitian lanjut adalah enzim selulase yang diproduksi menggunakan susu bubuk sebagai sumber protein media pertumbuhan bakteri. Inokulum bakteri *Actinobacillus* sp ditumbuhkan pada media alternatif menggunakan suhu 40°C serta waktu inkubasi 24 jam.

### 5.5.1 Optimasi Suhu Enzim Selulase

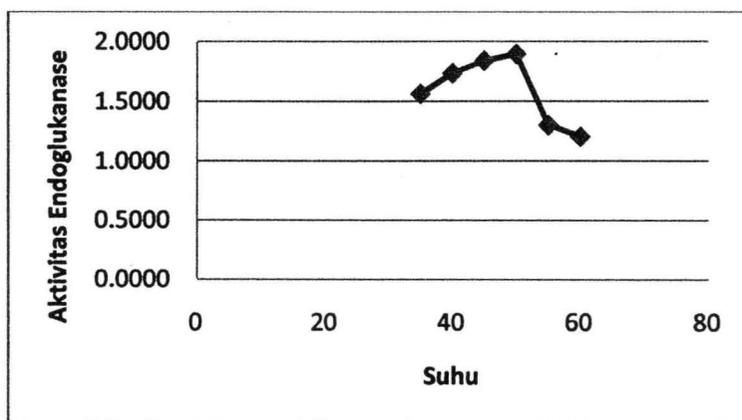
Aktivitas enzim selulase isolat bakteri *Actinobacillus* sp yang ditumbuhkan dalam medium mengandung jerami padi sebagai sumber karbon serta susu bubuk sebagai sumber protein yang diinkubasi pada berbagai suhu disajikan pada Tabel 5.4 dan Gambar 5.14.

Kondisi suhu inkubasi dalam penentuan aktivitas enzim selulase yang diproduksi menggunakan susu bubuk sebagai sumber protein media pertumbuhan

bakteri ditentukan antara suhu 35 – 60°C. Tabel 5.4 menunjukkan bahwa aktivitas enzim selulase paling tinggi diperoleh pada suhu 50°C dengan aktivitas sebesar 1,8952 U/ml, namun pada suhu 35, 40 dan 45°C enzim selulase masih mempunyai aktivitas yang baik, sedangkan pada suhu 55°C sudah terjadi penurunan aktivitas enzim selulase secara signifikan.

**Tabel 5.4 Aktivitas Enzim Selulase Selama Optimasi Suhu**

Suhu (°C)	Aktivitas enzim selulase (μ/ml)
35	1.5618
40	1.7336
45	1.8389
50	<b>1.8952</b>
55	1.3010
60	1.2047



**Gambar 5.14 Kurva optimasi suhu enzim selulase.**

Kondisi suhu berkaitan erat dengan faktor-faktor yang mempengaruhi mekanisme kerja suatu enzim, yaitu energi aktivasi dan stabilitas enzim (Pelczar and Chan, 1986). Energi aktivasi mutlak diperlukan karena merupakan kebutuhan energi suatu molekul untuk memulai suatu reaksi. Bila suhu rendah maka energi yang

diperoleh tidak cukup untuk memulai suatu reaksi sehingga reaksi tidak dapat berjalan dengan baik, sedangkan pada suhu optimum energi yang diperoleh enzim sama dengan energi yang diperlukan untuk memulai suatu reaksi, sehingga reaksi dapat berjalan dengan optimum, sedangkan pada suhu diatas suhu optimum dapat menyebabkan enzim mengalami denaturasi (Champe and Harvey, 1994).

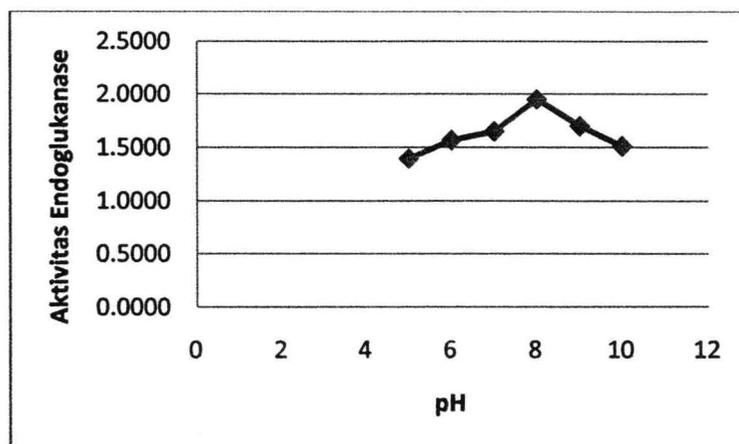
Pada suhu 50°C enzim endoglukanase telah memiliki energi yang cukup untuk memulai suatu reaksi hidrolisis sehingga reaksi dapat berlangsung secara optimum, atau energi yang diperoleh enzim endoglukanase sama dengan energi aktivasi yang dibutuhkan untuk menghidrolisis jerami padi. Aktivitas enzim selulase diatas suhu 50°C dapat menyebabkan ketidakstabilan enzim, karena telah terjadi denaturasi serta hilangnya aktivitas katalitik.

### 5.5.2 Optimasi pH Enzim Selulase

Aktivitas enzim selulase pada berbagai pH disajikan pada Tabel 5.5 dan Gambar 5.15. Kondisi pH inkubasi dalam penentuan aktivitas enzim selulase dibuat pada kisaran pH antara 5 – 10. Kondisi pH optimum enzim selulase dicapai pada pH 8 dengan aktivitas sebesar 1,9499 U/ml.

**Tabel 5.5 Aktivitas Enzim Selulase Selama Optimasi pH**

pH	Aktivitas enzim selulase ( $\mu$ /ml)
5	1.3968
6	1.5680
7	1.6480
8	<b>1.9499</b>
9	1.6981
10	1.5111



Gambar 5.15 Kurva optimasi pH enzim selulase.

pH berhubungan dengan struktur enzim yang terdiri dari asam-asam amino. Perubahan pH suatu larutan mempengaruhi ionisasi gugus-gugus fungsi pada asam amino. Adanya perubahan ionisasi pada gugus-gugus fungsi dari asam amino enzim akan mempengaruhi ikatan hidrogen yang terdapat pada enzim tersebut yang menyebabkan terjadinya perubahan konformasi enzim. Tingginya aktivitas enzim disebabkan karena terjadinya kesesuaian antara konformasi enzim dengan substrat yaitu pada saat gugus-gugus fungsi yang penting pada sisi katalitik enzim berada pada tingkat ionisasi yang diinginkan (Nelson and Cox, 2000). Terjadinya perubahan konformasi enzim akibat perubahan pH dapat menyebabkan turunnya aktivitas enzim, karena konformasi enzim tidak lagi sama dengan konformasi substrat.

Nilai aktivitas enzim mempengaruhi kadar gula reduksi yang dihasilkan selama aktivitas enzim berlangsung, semakin tinggi aktivitas enzim maka semakin tinggi pula gula reduksi yang dihasilkan (Henrissat, 1991). Adanya aktivitas enzim

endoglukanase dapat menyebabkan terjadinya perubahan pH dalam lingkungan media (Pometto and Crawford, 1986). Selama proses inkubasi, pH media cenderung berubah menjadi basa, hal ini kemungkinan disebabkan karena akumulasi produk yang berupa gula reduksi sederhana yang dihasilkan dari hidrolisis selulosa secara acak pada ikatan *1,4-D-glycosidic*. Terjadinya perubahan nilai pH selama proses inkubasi sangat mempengaruhi kerja enzim karena perubahan pH menyebabkan terjadinya perubahan pada daerah katalitik dan konformasi enzim. Sifat ionik dari gugus karboksil dan gugus amino enzim sangat mudah dipengaruhi oleh pH. Perubahan pH dapat menyebabkan denaturasi enzim sehingga dapat menimbulkan hilangnya fungsi katalitik enzim (Dick *et al.*, 2000). pH merupakan salah satu faktor yang memiliki potensi untuk mempengaruhi aktivitas enzim, serta sangat erat kaitannya dengan fungsi aktif enzim, kelarutan substrat, dan ikatan enzim-substrat (Pelczar and Chan, 1986).

Wang *et al* (2008) menyebutkan bahwa enzim selulase yang dihasilkan oleh *Paenibacillus spp* mempunyai aktivitas endoglukanase maksimum pada suhu 60°C dan pH 6,5. Enzim tersebut tahan terhadap suhu tinggi dan tahan asam sehingga berpotensi untuk digunakan dalam industri sebagai pengolah selulosa. Ko *et al* (2007) menyebutkan bahwa bakteri *Paenibacillus campinasensis* BLII merupakan bakteri thermofile yang dapat tumbuh pada suhu 25-60°C dengan kisaran pH yang luas. Bakteri tersebut tumbuh optimal pd pH netral serta suhu 55°C.

Zaldivar *et al.* (2001) menyebutkan bahwa enzim selulase yang diproduksi oleh *Trichoderma aureoviridae* mempunyai aktivitas yang bagus jika pH di atas 3,5 dan suhu optimum pada 28°C. Pei-Jun *et al.* (2004) melaporkan bahwa pH 6,5

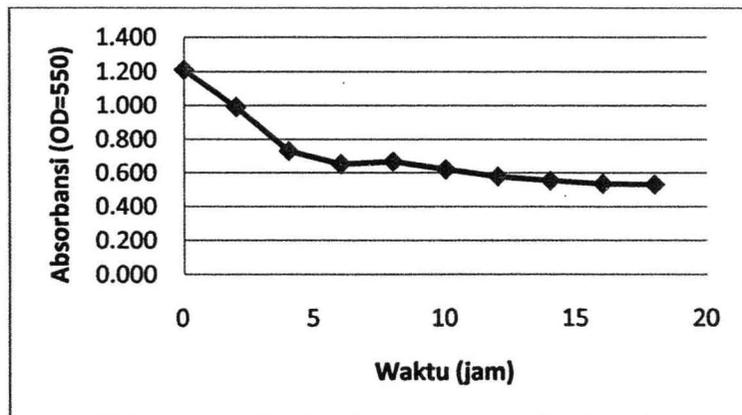
merupakan kondisi optimum untuk produksi enzim bagi *Trichoderma koningii*. Kalra and Banta (2008) melaporkan bahwa pH 5 dan suhu 30°C merupakan kondisi optimum bagi enzim selulase, sedangkan Immanuel *et al.* (2006) menyebutkan bahwa aktivitas optimum enzim endoglukanase yang diproduksi oleh *Cellulomonas* spp, *Bacillus* spp dan *Micrococcus* spp yang ditumbuhkan pada media sabut adalah pada pH 7 dan suhu 40°C. Solomon *et al.* (1999) menyatakan bahwa lignoselulosa limbah pertanian banyak digunakan sebagai sumber karbohidrat untuk memproduksi etanol, glukosa serta Protein Sel Tunggal.

### 5.5.3 Stabilitas Suhu Enzim Selulase

Stabilitas suhu enzim selulase yang dihasilkan oleh bakteri yang ditumbuhkan pada media mengandung susu bubuk masih relatif stabil pada suhu 50°C selama 10 jam. Aktivitas residu enzim selulase sampai jam ke 10 masih di atas 50%. Hasil penelitian stabilitas suhu enzim selulase disajikan pada Tabel 5.6 dan Gambar 5.16.

**Tabel 5.6 Aktivitas Residu Enzim Selulase pada Suhu 37°C**

Jam	Aktivitas residu enzim selulase (%)
0	100.0000
2	81.9686
4	60.4218
6	53.9702
8	55.2109
10	51.3648
12	47.9322
14	45.8644
16	44.3342
18	44.0033



Gambar 5.16 Kurva stabilitas suhu enzim selulase.

Stabilitas suhu sangat penting terutama bila enzim selulase digunakan untuk mendegradasi bahan pakan, karena pada umumnya pada proses fermentasi dihasilkan panas yang bisa mencapai 37-40°C. Suhu juga penting jika enzim tersebut diberikan pada ternak ruminansia yang mempunyai suhu rumen 38-40 °C.

Aktivitas residu enzim sampai 10 jam masih dapat membantu aktivitas mikroorganisme rumen untuk mendegradasi pakan berserat lebih optimal, sehingga dapat meningkatkan pencernaan serat dan menghasilkan produk-produk fermentasi yaitu *Volatile Fatty Acid* (VFA) sebagai sumber energi bagi ternak ruminansia serta sebagai sumber karbon untuk sintesis protein mikroba.

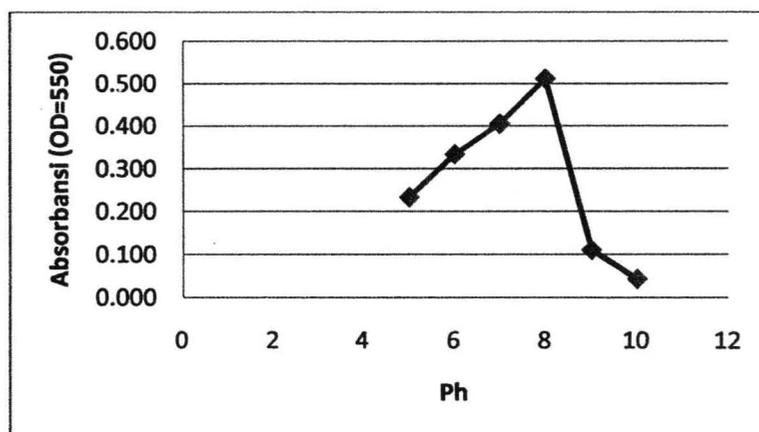
*Bacillus subtilis* berpotensi menghasilkan enzim yang stabil terhadap panas untuk kebutuhan industry karena sangat toleran terhadap suhu tinggi (Li et al., 2008).

### 5.5.4 Stabilitas pH Enzim Selulase

Stabilitas pH enzim selulase cukup baik karena mempunyai kisaran pH yang cukup lebar. Inkubasi enzim selama satu jam pada pH 8 dapat memberikan aktivitas residu terbaik, sedangkan pada pH 6 - 7 aktivitas residu enzim cukup besar (di atas 65%). Hasil penelitian stabilitas pH enzim selulase disajikan pada Tabel 5.7 dan Gambar 5.17.

**Tabel 5.7 Aktivitas Residu Enzim Selulase pada Berbagai pH**

pH	Aktivitas residu enzim selulase (%)
5	45.6500
6	65.2981
7	79.2766
8	100.0000
9	21.7009
10	8.5044



**Gambar 5.17 Kurva stabilitas pH enzim selulase.**

Kisaran pH yang cukup lebar penting dalam aplikasi di bidang pakan ternak yang membutuhkan kondisi pH tersebut. pH basa biasa digunakan untuk mendegradasi pakan berserat, misalnya pada proses hidrolisis basa, sedangkan

Orskov and Ryle (1990) menyatakan bahwa konsentrasi VFA dalam rumen ditentukan oleh pH rumen sesuai dengan pakan yang dikonsumsi. pH 6,2 - 7 sangat dibutuhkan oleh bakteri selulolitik dan hemiselulolitik untuk mendegradasi pakan berserat, sedangkan pH 5 - 6 untuk mendegradasi pakan konsentrat oleh bakteri amilolitik.

*Bacillus agaradhaerens* mempunyai stabilitas enzim antara 50-60°C serta pH optimum 7-9,4 (Hirasawa *et al.*, 2006), sedangkan enzim yang diproduksi oleh *Cellulomonas flavigena* mempunyai aktivitas selulase dan xilanase optimum pada pH 6 serta suhu optimum 50°C (Perez-Avalos *et al.*, 2008).

## **BAB VI**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **6.1 Kesimpulan**

Dari penelitian ini dapat disimpulkan, bahwa :

1. Penggunaan media alternatif membutuhkan waktu adaptasi yang lebih lama bagi bakteri selulolitik sebelum memasuki fase log (pertumbuhan)
2. Media alternatif menggunakan hati (M3) dan susu (M2) mempunyai puncak pertumbuhan yang hampir sama dengan kontrol
3. Produksi enzim paling tinggi dicapai pada media alternatif menggunakan susu (M2) sebagai sumber protein.
4. Enzim selulase yang dihasilkan mempunyai aktivitas optimum pada suhu 50°C dan pH 8. Pada suhu tersebut sampai 10 jam masih mempunyai aktivitas di atas 50%, sedangkan pada pH 6-7 mempunyai aktivitas di atas 65%.

#### **6.2 Saran**

Berdasarkan hasil penelitian yang didapatkan, maka disarankan:

1. Produksi enzim secara massal (komersial) bisa menggunakan susu sebagai sumber protein.
2. Jerami padi sebagai sumber serat sebaiknya diolah terlebih dahulu sebelum digunakan sebagai bahan media pertumbuhan.
3. Memberikan mineral lebih banyak pada media alternatif.

## BAB VII

### RENCANA/PENELITIAN TAHAP SELANJUTNYA

#### 7.1. Tujuan Khusus

Tujuan khusus penelitian tahap lanjut adalah membuat media pertumbuhan terbaik dalam jumlah besar, kemudian melakukan optimasi waktu produksi, serta dosis dan waktu optimum dalam degradasi limbah pertanian.

#### 7.2. Metode Penelitian

Pada tahap (tahun) kedua media pertumbuhan terbaik dalam penelitian tahap I dibuat dalam jumlah besar. Media pertumbuhan dibuat dalam dua buah drum masing-masing berukuran 0,5 m<sup>3</sup> yang dilengkapi dengan pemanas dan pengaduk elektrik. Drum diisi dengan media dengan komposisi sama dengan penelitian pertama. Diinokulasi dengan bakteri *Actinobacillus* dengan suhu 40°C selama 24 jam dan diaduk secara kontinyu. Setelah masa inkubasi selesai, selanjutnya dipanen untuk diekstrak enzimnya dan digunakan pada penelitian selanjutnya.

##### 7.2.1 Preparasi pakan

Disusun sebanyak 250 kg ransum ruminansia yang terdiri dari campuran beberapa macam limbah pertanian antara lain berupa dedak padi, jagung, batang kangkung, tumpi jagung, bungkil kelapa dan bungkil biji kapuk. Ransum disusun

dengan kandungan protein kasar  $\pm 14\%$ . Ransum selanjutnya dibagi menjadi 24 sampel penelitian.

Perlakuan yang diberikan pada ransum ruminansia terdiri dari 2 faktor. Faktor I berupa dosis enzim, terdiri dari 3 dosis (2%; 3,5% dan 5%), sedangkan faktor II berupa lama waktu inkubasi enzim pada sampel, terdiri dari 2 waktu (3 hari dan 7 hari). Masing-masing perlakuan diulang 4 kali. Setelah masa inkubasi selesai, sampel dibuka kemudian dianalisis kandungan nutriennya. Parameter pengamatan berupa kandungan Bahan Kering, Kadar Bahan Organik, Kandungan Protein Kasar serta Kandungan Serat Kasar.

### **7.2.2 Analisis Data**

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan Analisis Varian sistem Rancangan Acak Lengkap pola Faktorial (2 faktor) dengan 4 ulangan. Jika terdapat perbedaan yang nyata antar perlakuan selanjutnya diuji dengan Duncan's Multiple Range Test menggunakan  $\alpha 5\%$ .

## DAFTAR PUSTAKA

- Adesogan AT. 2005. Improving Forage Quality and Animal Performance with Fibrolytic Enzymes. Florida Ruminant Nutrition Symposium.
- Akerlund T, Nordstrom K and Bernander R. 1995. Analysis of cell size and DNA content in exponentially growing and stationary phase batch cultures of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 177: 6791-6797.
- Akhtar MS. 1998. Bioconversion of Cellulosic Materials by The Action of Microbial Cellulases. A Thesis. Institute of Chemistry, University of The Punjab, Lahore, Pakistan.
- Alden L, Demoling F and Baath E. 2001. Rapid method of determining factors limiting bacterial growth in soil. Applied and Environmental Microbiology, 67(4): 1830-1838.
- Ardian. 2004. Pemanfaatan bahan pakan inkonvensional untuk ternak. Balai Penelitian Ternak, Indonesian Research Institute for Animal Production. Publikasi Wartazoa, 17 Oktober.
- Atlas RM. 2005. Hand book of Media for Environmental Microbiology. 2<sup>nd</sup> ed. Taylor & Francis Group. CRC Press. Broken Sound Parkway, NW.
- Balitnak. 2003. Jerami Padi Fermentasi sebagai Ransum Dasar Ternak Ruminansia. Balai Penelitian Ternak Ciawi - Bogor. Warta Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Vol. 25 (3) : 1-2.
- Beauchemin KA, Rode LM and Sewalt VJH. 1995. Fibrolytic enzyme increase fiber digestibility and growth rate of steers fed dry forage. Canadian J. of Anim. Sci. 75: 641-644
- Beauchemin KA, Jones SDM, Rode LM and Sewalt VJH. 1997. Effect of fibrolytic enzymes in corn or barley diets on performance and carcass characteristics of feedlot cattle. Canadian J. of Anim. Sci., 77: 645-653
- Beauchemin KA, Colombatto D, Morgavit DP and Yang WZ. 2003. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminant. J. Anim. Sci. 81(E.Suppl.2): E37-E47
- Beauchemin KA, Colombatto D and Morgavit DP. 2004. A Rationale for The Development of Feed Enzyme Products for Ruminants. Canadian J. Anim. Sci. 84 : 23-36
- Bedford MR and Partridge GG. 2001. Enzymes in Farm Animal Nutrition. CABI Publ. Wallingford, Oxon, UK.
- Bhat MK and Bhat S. 1997. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial application. Biotechnology Advances, 15(3): 583-620.

- Bonneau M and Laarveld B. 1999. Biotechnology in animal nutrition, physiology and health. *Livestock Production Science*, 59: 223-241
- Business Review. 2010. Menelisik prospek bisnis peternakan. 25 September. <http://www.businessreview.co.id/kebijakan-bisnis-ekonomi-920.html> Unduh: 6-10-2010.
- Champe PC and Harvey RA. 1994. *Biochemistry*. Second Edition. Lippincott Company, Philadelphia.
- Dick WA, Cheng L and Wang P. 2000. Soil acid and alkaline phosphatase activity as pH adjustment indicators. *Journal of Soil Biology and Biochemistry* 32: 1915-1919.
- Dijkstra J and Tamminga S. 1995. Simulation of the effects of diet on the contribution of rumen protozoa to degradation of fiber in the rumen. *British J. of Nutrition* 74:617-634
- Doi RH and Kosugi A. 2004. Cellulosomes : Plant-cell-wall degrading enzyme complexes. *Microbiology*, Vol.2 : 541-551
- Dust JM, Grieshop CM, Parsons CM, Karr-Lilienthal LK, Schasteen CS, Quigley III JD, Merchen NR and Fahey Jr. GC. 2005. Chemical composition, protein quality, palatability, and digestibility of alternative protein sources for dogs. *J Anim Sci*, 83: 2414-2422.
- Elisashvili V, E Kachlishvili E and Penninckx M. 2008. Effect of growth substrate, method of fermentation, and nitrogen source on lignocellulose-degrading enzymes production by white-rot basidiomycetes. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35:1531-1538
- El-Khier MKS and Yagoub AEG. 2009. Quality assessment of milk powders packed in Sudan. *Pakistan J of Nutr* 8(4): 388-391.
- Fardiaz S. 1992. *Mikrobiologi Pangan*. PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Garbutt J. 1997. *Essentials of Food Microbiology*, 1<sup>st</sup> Ed., Arnold, London. pp. 29-37.
- Gebhardt SE and Thomas RG. 2002. Nutritive Value of Foods. Home and Garden Bulletin, Number 72. United States Department of Agriculture.
- Hamilton T. 2003. *Basic Beef Cattle Nutrition*. Factsheet, Ontario.
- Henrissat B. 1991. A Classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Journal of Biochemistry* 280: 309-316.
- Hirasawa K, Uchimura K, Kashima M, Grant WD, Ito S, Kobayashi T and Horikoshi K. 2006. Salt activated endoglucanase of a strain of alkaliphilic *Bacillus agaradhaerens*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 89 (2): 211- 219.

- Immanuel G, Dhanusa R, Prema P and Palavesa A. 2006. Effects of different growth parameters on endoglucanase enzyme activity by bacteria isolated from coir retting effluents of estuarine environment. *Int. J. Envir. Sci. Techn.* 3(1): 25 - 34.
- Irwin DC, Zhang S and Wilson DB. 2000. Cloning, expression and characterization of a family 48 exocellulase, Cel48A, from *Thermobifida fusca*. *Eur.J.Biochem.* 267: 4988-4997
- Jans D. 2005. Probiotics in Animal Nutrition. Editgraph, Goussainville, France.
- Kalra KL, Kocher G and Banta G. 2008. Optimization of cellulose production by submerged fermentation of rice straw by *Trichoderma harzianum* RUT-C. 8230. *The Internet Journal of Microbiology.* 5(2): 1 - 7.
- Kashem MA, Manchur MA, Rahman MS and Anwar MN. 2004. Effect of carbon and nitrogen sources on the production of reducing sugars, extra-cellular protein and cellulolytic enzymes by two cellulolytic bacterial isolates. *Pak J Biol Sci* 7:1660-1663.
- Ko CH, Chen WL, Tsai CH, Jane WN, Liu CC and Tu J. 2007. *Paenibacillus campinasensis* BL11: a wood material-utilizing bacterial strain isolated from black liquor. *Bioresource Technol.* 14: 2727 - 2733.
- Kompas. 2006. Kendala Membangun Peternakan Sapi Potong. Kamis, 10 Agustus.
- Krehbiel CR, Rust SR, Zang G and Gilliland SE. 2003. Bacterial Direct-fed Microbials in Ruminant Diets: Performance Response and Mode of Action. *Jour.Animal Sci.* 81: E120-E132.
- Li W, Zhang WW, Yang MM and Chen YL. 2008. Cloning of the thermostable cellulase gene from newly isolated *Bacillus subtilis* and its expression in *Escherichia coli*. *Mol. Biotechnol.* 2: 195 - 201.
- Lynd LR, Weimer PJ, van Zyl WH and Pretorius IS. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66: 506-577.
- Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytic Chem* , 31(3) : 426-428.
- Mirni L, Puspaningsih NNT dan Lokapirnasari WP. 2006. Penggunaan bakteri xilanolitik asal rumen sebagai inokulum pada jerami padi sebagai upaya peningkatan mutu pakan ternak ruminansia. Lembaga Penelitian. Universitas Airlangga, Surabaya.
- Mirni, L., Puspaningsih NNT dan Lokapirnasari WP, 2009. Pemetaan biodiversity bahan limbah agroindustri untuk formulasi pakan komplit menggunakan enzim lignosellulolitik dalam meningkatkan ketahanan pangan. Lembaga Penelitian. Universitas Airlangga, Surabaya.

- Mishra BK, Pandey AK and Lata. 2007. Lignocellulolytic Enzyme production from submerged fermentation of paddy straw. *Indian J. Microbiology*, 47: 176-179.
- Mitchell CC. 2008. Nutrient Content of Fertilizer Materials. ANR-174. Alabama Cooperative Extension System. [www.aces.edu](http://www.aces.edu) . Unduh:28-9-2011.
- Miyamoto K. 1997. Cellulase Production. In : Renewable Biological Systems for Alternative Sustainable Energy Production. Food and Agriculture Organization of The United Nation. Osaka, Japan.
- Moran J. 2005. Tropical Dairy Farming: Feeding Management for Small Holder Dairy Farmers in the Humid Tropics. Landlinks Press.
- Murashima K, Kosugi A and Doy RH. 2002. Synergistic Effects on Crystalline Cellulose Degradation between Cellulosomal Cellulases from *Clostridium cellulovorans*. *J. Bacteriol.* 184(18): 5088-5095
- Murni R, Suparjo, Akmal dan Ginting BL. 2008. Buku Ajar Teknologi Pemanfaatan Limbah untuk Pakan. Laboratorium Makanan Ternak - Fakultas Peternakan Universitas Jambi.
- Nakashima Y and Orskov ER. 1989. Rumen degradation of straw -7. Effect of chemical pre-treatment and addition of propionic acid on degradation characteristics of botanical fractions of barley straw treated with cellulase preparation. *Animal Production* 48: 543-551.
- Nelson DL and Cox MM. 2000. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Worth Publisher Inc, New York.
- Nowak W, Kruczynska H and Grochowska S. 2003. The effect of fibrolytic enzymes on dry matter, ADF and NDF ruminal disappearance and intestinal digestibility. *Czech. J Anim. Sci.* 48(3): 191-196
- Officer, DI. 2000. Feed Enzymes. In: *Farm Animal Metabolism and Nutrition*. (ed. D'Mello, J.P.F). CABI Publishing, Wallingford, Oxon, UK.
- Ørskov ER and Ryle M. 1990. *Energy Nutrition in Ruminants*. Elsevier, Amsterdam.
- Otajevwo FD and Aluyi HSA. 2011. Cultural conditions necessary for optimal cellulase yield by cellulolytic bacterial organisms as they relate to residual sugars released in broth medium. *Modern Applied Science*. 5(3): 141-151.
- Pei-Jun LI, De-Bing Z, Qui-xing and Chun-gui Z. 2004. Optimization of solid fermentation of cellulose from *Trichoderma koningii*. *L. Environ. Sci.* 6: 816-820.
- Perez CF. 2004. Improving Performance of Sheep Using Fibrolytic Enzymes in Dairy Ewes and Malate in Fattening Lambs. Tesis Doctoral. Departament de Ciencia Animal I Dels Aliments Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra, Barcelona.

- Perez-Avalos O, Sanchez-Herrera LM and Ponce-Noyola T. 2008. A bifunctional endoglucanase/endoxylanase from *Cellulomonas flavigena* with potential use in industrial processes at different pH. *Curr. Microbiol.* 57 (1): 39 - 44.
- Pelczar MJ and Chan ECS. 1986. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Penerjemah: Hadi, R.S. Jakarta: UI Press.
- Pometto III AL and Crawford DL. 1986. Effects of pH on lignin and cellulose degradation by *Streptomyces viridosporus*. *Journal of Applied and Environmental Microbiology* 52 (2): 246-250.
- Qi B, Yao R, Yu Y and Chen Y. 2008. Influence of different ratios of rice straw to wheat bran on production of cellulolytic enzymes by *Trichoderma viride* ZY-01 in solid state fermentation. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 7(9): 3239-3247.
- Rakotoarivonina H, Jubelin G, Hebraud M, Gaillard-Martinie B, Forano E and Mosoni P. 2002. Adhesion to cellulose of the gram-positive bacterium *Ruminococcus albus* involves type IV Pili. *Microbiology* 148: 1871-1880
- Republika. 2010<sup>a</sup>. Australia cemas swasembada sapi RI. Rabu, 17 Februari.
- Republika. 2010<sup>b</sup>. Menanti janji investor sapi Australia. Selasa, 6 April.
- Rounds W and Herd DB. 2002. *Beef Cattle Nutrition. The Cow's Digestive System*. The Texas A&M University System. College Station. Texas.
- Saha BC. 2004. Lignocellulose Biodegradation and Applications in Biotechnology. In: *Lignocellulose Biodegradation*, American Chemical Society, Washington, D.C.
- Schingoethe DJ, Stageman GA and Treacher RJ. 1999. Response of dairy cows to a cellulase and xylanase enzyme mixture applied to forages at the time of feeding. *Journal of Dairy Sci.* 82: 996-1003
- Shiddieqy, MI. 2005. Pakan ternak jerami olahan. *Cakrawala*, 24 Maret.
- Singh R, Kumar R, Bishnoi K, Bhatia D and Bishnoi NR. 2009. Rice straw (Lignocellulosic biomass) a novel substrat for cellulase production. *Proceeding of International Conference on Energy and Environment*. March 19-21.
- Solomon BO, Amigun B, Betikue TUV, Ojumu T and Layokun SK. 1999. Optimization of cellulose production by *Aspergillus flavus* Linn. Isolates NSPR 101 grown on baggase. *JNSCHE*. 18: 61 - 68.
- Staudenbauer WL and Schwarz WH. 2004. Hydrolysis of Crystalline Cellulose by Bacterial Enzyme Systems. In: *Fachgebiet Mikrobielle Biotechnologie*.

- Tawaf R. 2004. Menggagas peternakan sapi potong rakyat. *Pikiran Rakyat*, 24 April.
- Todar K. 2000. Nutrition and Growth of Bacteria. <http://textbookofbacteriology.net/nutgro.html>. Unduh: 27-08-2011.
- Walker. 2007. Nutrient requirements and metabolism of rumen microorganisms. [http://www.rumen-health.com/PDF/Nutrient Requirements Metabolism Rumen.pdf](http://www.rumen-health.com/PDF/Nutrient_Requirements_Metabolism_Rumen.pdf) Unduh: 09-08-2011.
- Wang NS. 2004. Cellulose Degradation. Biochemical Engineering Laboratory (ENCH 485), University of Maryland.
- Wang CM, Shyu CL and Ho SP. 2008. Characterization of a novel thermophilic cellulose degrading bacterium - *Paenibacillus* spp strain B39. *Lett. Appl. Microbiol.* 47: 46 - 53.
- Xu B. 2002. Endoglucanase and Mannanase from Blue Mussel, *Mytilus edulis* Purification, Characterization, Gene and Three Dimensional Structure. Uppsala Universitet.
- Yang WZ, Beauchemin KA and Rode LM. 1999. Effect of an enzyme feed additive on extent of digestion and milk production of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Sci.*, 82: 391-403
- Yokoyama MT and Johnson KA. 1993. Microbiology of the Rumen and Intestine. In: *The Ruminant Animal, Digestive Physiology and Nutrition*. (ed. Church, D.C). Waveland Press. Inc., Illinois.
- Zaldivar M, Velasquez JC and Contreras - Perez LM. 2001. *Trichoderma aureovi aureoviride* 7 - 121, a mutant with enhanced production of lytic enzymes: its potential use in waste cellulose degradation. *Journal of Biotech.* 4(3): pp1 - 6.
- Zhang YHP, Himmel ME and Mielenz JR. 2006. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*, 24: 452-481

# LAMPIRAN

**Lampiran 1. Data Pengukuran Pertumbuhan Bakteri pada Media Kontrol**

<b>Waktu Inkubasi (Jam)</b>	<b>Ulangan 1</b>	<b>Ulangan 2</b>	<b>Ulangan 3</b>	<b>Rerata</b>
0	0.0805	0.0886	0.0783	0.0825
3	0.1401	0.1302	0.1466	0.1390
6	0.9908	0.9936	0.9665	0.9836
9	1.6407	1.6553	1.6577	1.6512
12	2.6166	2.5078	2.5160	2.5468
15	3.1182	2.9296	3.1096	3.0525
18	3.6024	3.6414	3.6024	3.6154
21	3.6600	3.6880	3.5812	3.6431
24	3.4424	3.5794	3.6286	3.5501
27	2.3056	2.3168	2.2840	2.3021
30	2.2523	2.2625	2.2487	2.2545
33	2.1911	2.1785	2.1811	2.1836

**Lampiran 2. Data Pengukuran Pertumbuhan Bakteri pada Media Alternatif Menggunakan Urea sebagai Sumber Protein**

<b>Waktu Inkubasi (Jam)</b>	<b>Ulangan 1</b>	<b>Ulangan 2</b>	<b>Ulangan 3</b>	<b>Rerata</b>
0	0.6724	0.6591	0.6656	0.6657
3	0.9249	0.9140	0.9123	0.9171
6	0.9796	0.9654	0.9434	0.9628
9	0.9534	0.9714	0.8070	0.9106
12	0.8100	0.8178	0.9402	0.8560
15	0.9843	1.0435	0.9824	1.0034
18	1.2531	1.2596	1.0366	1.1831
21	1.3881	1.3960	1.3916	1.3919
24	1.6509	1.6330	1.5630	1.6156
27	1.8576	1.8116	1.8187	1.8293
30	1.8911	1.9437	1.9419	1.9256
33	1.7429	1.7417	1.6598	1.7148

**Lampiran 3. Data Pengukuran Pertumbuhan Bakteri pada Media Alternatif Menggunakan Susu Bubuk sebagai Sumber Protein**

<b>Waktu Inkubasi (Jam)</b>	<b>Ulangan 1</b>	<b>Ulangan 2</b>	<b>Ulangan 3</b>	<b>Rerata</b>
0	0.8246	0.9317	0.8735	0.8766
3	1.0948	1.0546	1.0841	1.0778
6	1.7338	1.7460	1.7478	1.7425
9	1.9090	1.9350	1.8628	1.9023
12	1.7956	1.4448	1.7358	1.6587
15	1.3969	1.4054	1.4616	1.4213
18	1.6732	1.6675	1.6589	1.6665
21	2.2990	2.1988	1.9244	2.1407
24	2.7373	2.7474	2.7023	2.7290
27	3.2313	3.2315	3.2636	3.2421
30	3.2491	3.1079	3.1870	3.1813
33	3.1890	3.1609	3.1888	3.1796

**Lampiran 4. Data Pengukuran Pertumbuhan Bakteri pada Media Alternatif Menggunakan Hati Ayam sebagai Sumber Protein**

<b>Waktu Inkubasi (Jam)</b>	<b>Ulangan 1</b>	<b>Ulangan 2</b>	<b>Ulangan 3</b>	<b>Rerata</b>
0	1.2265	1.2016	1.0937	1.1739
3	1.4521	1.4990	1.4918	1.4810
6	2.1688	1.9426	1.9986	2.0367
9	1.4674	1.4620	1.4522	1.4605
12	1.6418	1.7366	1.7522	1.7102
15	1.7680	1.6722	1.7108	1.7170
18	2.0263	2.0086	1.9991	2.0113
21	2.4369	2.4577	2.4472	2.4473
24	2.9558	2.9726	2.9727	2.9670
27	3.3363	3.5995	3.3362	3.4240
30	3.3238	3.4619	3.5200	3.4352
33	3.3219	3.2493	3.3219	3.2977

**Lampiran 5. Data Produksi Enzim Selulase pada Media Kontrol**

<b>Waktu Inkubasi (Jam)</b>	<b>Ulangan 1</b>	<b>Ulangan 2</b>	<b>Ulangan 3</b>	<b>Rerata</b>	<b>Kontrol 1</b>	<b>Kontrol 2</b>	<b>Rerata</b>	<b>Netto</b>
3	0.0900	0.0985	0.0880	0.0922	0.0806	0.0775	0.0791	0.0131
6	0.1230	0.0953	0.0945	0.1043	0.0890	0.0855	0.0873	0.0170
9	0.0921	0.0982	0.0868	0.0924	0.0759	0.0739	0.0749	0.0175
12	0.0972	0.0964	0.1143	0.1026	0.0874	0.0791	0.0833	0.0194
15	0.1054	0.0997	0.1035	0.1029	0.0841	0.0819	0.0830	0.0199
18	0.1279	0.1056	0.0944	0.1093	0.0887	0.0807	0.0847	0.0246
21	0.1464	0.1463	0.1558	0.1495	0.1030	0.1025	0.1028	0.0468
24	0.1957	0.1864	0.1815	0.1879	0.1053	0.1065	0.1059	0.0820
27	0.2023	0.2669	0.2488	0.2393	0.1150	0.1151	0.1151	0.1243
30	0.2450	0.2708	0.2534	0.2564	0.1181	0.1127	0.1154	0.1410
33	0.1931	0.1918	0.1863	0.1904	0.1186	0.1151	0.1169	0.0736

**Lampiran 6. Data Produksi Enzim Selulase pada Media Alternatif Menggunakan Urea sebagai Sumber Protein**

<b>Waktu Inkubasi (Jam)</b>	<b>Ulangan 1</b>	<b>Ulangan 2</b>	<b>Ulangan 3</b>	<b>Rerata</b>	<b>Kontrol 1</b>	<b>Kontrol 2</b>	<b>Rerata</b>	<b>Netto</b>
3	0.1425	0.1488	0.1455	0.1456	0.1178	0.1057	0.1118	0.0339
6	0.1334	0.1275	0.1311	0.1307	0.1084	0.1073	0.1079	0.0228
9	0.1253	0.1124	0.1100	0.1159	0.1016	0.1013	0.1015	0.0145
12	0.1284	0.1189	0.1029	0.1167	0.1029	0.1034	0.1032	0.0136
15	0.1150	0.1261	0.1249	0.1220	0.1031	0.1124	0.1078	0.0143
18	0.1396	0.1256	0.1583	0.1412	0.1138	0.1146	0.1142	0.0270
21	0.1405	0.1553	0.1409	0.1456	0.1156	0.1123	0.1140	0.0316
24	0.1681	0.1786	0.1604	0.1690	0.1215	0.1137	0.1176	0.0514
27	0.1799	0.1803	0.2166	0.1923	0.1244	0.1221	0.1233	0.0690
30	0.3162	0.2725	0.3100	0.2996	0.1288	0.1284	0.1286	0.1710
33	0.1751	0.1740	0.1765	0.1752	0.1279	0.1282	0.1281	0.0472

**Lampiran 7. Data Produksi Enzim Selulase pada Media Alternatif Menggunakan Susu Bubuk sebagai Sumber Protein**

<b>Waktu Inkubasi (Jam)</b>	<b>Ulangan 1</b>	<b>Ulangan 2</b>	<b>Ulangan 3</b>	<b>Rerata</b>	<b>Kontrol 1</b>	<b>Kontrol 2</b>	<b>Rerata</b>	<b>Netto</b>
3	2.9506	2.5764	2.7383	2.7551	2.1254	2.1178	2.1216	0.6335
6	2.5160	2.6214	2.5312	2.5562	2.1137	2.1213	2.1175	0.4387
9	2.4199	2.5517	2.3815	2.4510	2.1102	2.1065	2.1084	0.3427
12	2.3454	2.4270	2.5734	2.4486	2.1016	2.1156	2.1086	0.3400
15	2.1074	2.1009	2.2477	2.1520	1.7983	1.6661	1.7322	0.4198
18	2.3315	2.1626	2.2756	2.2566	1.6773	1.7782	1.7278	0.5288
21	2.1926	2.2377	2.2762	2.2355	0.4286	0.4308	0.4297	1.8058
24	2.5250	2.3685	2.4898	2.4611	0.5348	0.5238	0.5293	1.9318
27	2.3532	2.2731	2.3063	2.3109	1.6675	1.5942	1.6309	0.6800
30	1.8533	2.3705	2.4520	2.2253	1.7167	1.7039	1.7103	0.5150
33	1.9297	1.8962	1.9179	1.9146	1.7035	1.7172	1.7104	0.2043

**Lampiran 8. Data Produksi Enzim Selulase pada Media Alternatif Menggunakan Hati Ayam sebagai Sumber Protein**

Waktu Inkubasi (Jam)	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Rerata	Kontrol 1	Kontrol 2	Rerata	Netto
3	0.1250	0.1119	0.1279	0.1216	0.0988	0.1026	0.1007	0.0209
6	0.1195	0.1212	0.1216	0.1208	0.1010	0.1018	0.1014	0.0194
9	0.1159	0.1331	0.1105	0.1198	0.1013	0.1024	0.1019	0.0180
12	0.0968	0.1040	0.0900	0.0969	0.0890	0.0899	0.0895	0.0075
15	0.0983	0.0933	0.0909	0.0942	0.0882	0.0874	0.0878	0.0064
18	0.1109	0.1095	0.1198	0.1134	0.0921	0.0911	0.0916	0.0218
21	0.1467	0.1389	0.1428	0.1428	0.1078	0.0950	0.1014	0.0414
24	0.1694	0.1681	0.1795	0.1723	0.1130	0.1124	0.1127	0.0596
27	0.2474	0.2202	0.1792	0.2156	0.1318	0.1373	0.1346	0.0811
30	0.2224	0.2293	0.2229	0.2249	0.1372	0.1395	0.1384	0.0865
33	0.2030	0.1813	0.1970	0.1938	0.1334	0.1353	0.1344	0.0594

**Lampiran 9. Data Standar Glukosa**

<b>Kadar Glukosa (mg/ml)</b>	<b>Ulangan 1</b>	<b>Ulangan 2</b>	<b>Rerata</b>	<b>Kontrol</b>	<b>Netto</b>
1	0.2330	0.2800	0.2565	0.0595	0.1970
2	0.9760	0.8850	0.9305	0.0595	0.8710
3	1.7760	1.8740	1.8250	0.0595	1.7655
4	2.5920	2.5940	2.5930	0.0595	2.5335
5	3.5470	3.5250	3.5360	0.0595	3.4765

Berdasarkan data tersebut, dapat diketahui rumus regresi standar glukosa :

$$Y = 0.822 X - 0.697$$

Aktivitas endoglukanase dihitung dengan rumus :

$$\text{Aktivitas endoglukanase} = \frac{X \times P \times 10 \times 1000}{\text{Ink} \times \text{BM Glukosa}}$$

Keterangan:

Y = absorbansi

X = konsentrasi produk

P = Pengenceran

Ink = Waktu inkubasi = 60 menit

BM Glukosa = 180

**Lampiran 10. Data Aktivitas Enzim Selulase pada Media Kontrol**

<b>Waktu Inkubasi (Jam)</b>	<b>Produksi Enzim (Y)</b>	<b>Konstanta (X)</b>	<b>Aktivitas (<math>\mu</math>/ml)</b>
3	0.0131	0.8639	0.7999
6	0.0170	0.8686	0.8043
9	0.0175	0.8692	0.8048
12	0.0194	0.8715	0.8070
15	0.0199	0.8721	0.8075
18	0.0246	0.8779	0.8128
21	0.0468	0.9048	0.8378
24	0.0820	0.9476	0.8775
27	0.1243	0.9991	0.9251
30	0.1410	1.0195	0.9439
33	0.0736	0.9374	0.8680

**Lampiran 11. Data Aktivitas Enzim Selulase pada Media Alternatif Menggunakan Urea sebagai Sumber Protein**

<b>Waktu Inkubasi (Jam)</b>	<b>Produksi Enzim (Y)</b>	<b>Konstanta (X)</b>	<b>Aktivitas (<math>\mu</math>/ml)</b>
3	0.0339	0.8891	0.8233
6	0.0228	0.8757	0.8108
9	0.0145	0.8655	0.8014
12	0.0136	0.8645	0.8004
15	0.0143	0.8653	0.8012
18	0.0270	0.8807	0.8155
21	0.0316	0.8864	0.8207
24	0.0514	0.9105	0.8431
27	0.0690	0.9319	0.8629
30	0.1710	1.0559	0.9777
33	0.0472	0.9053	0.8382

**Lampiran 12. Data Aktivitas Enzim Selulase pada Media Alternatif Menggunakan Susu Bubuk sebagai Sumber Protein**

Waktu Inkubasi (Jam)	Produksi Enzim (Y)	Konstanta (X)	Aktivitas ( $\mu$ /ml)
3	0.6335	1.6186	1.4987
6	0.4387	1.3816	1.2793
9	0.3427	1.2648	1.1711
12	0.3400	1.2616	1.1681
15	0.4198	1.3586	1.2580
18	0.5288	1.4913	1.3808
21	1.8058	3.0448	2.8192
24	1.9318	3.1981	2.9612
27	0.6800	1.6752	1.5511
30	0.5150	1.4744	1.3652
33	0.2043	1.0964	1.0152

**Lampiran 13. Data Aktivitas Enzim Selulase pada Media Alternatif Menggunakan Hati Ayam sebagai Sumber Protein**

Waktu Inkubasi (Jam)	Produksi Enzim (Y)	Konstanta (X)	Aktivitas ( $\mu$ /ml)
3	0.0209	0.8734	0.8087
6	0.0194	0.8715	0.8069
9	0.0180	0.8698	0.8054
12	0.0075	0.8570	0.7936
15	0.0064	0.8557	0.7923
18	0.0218	0.8745	0.8097
21	0.0414	0.8983	0.8318
24	0.0596	0.9205	0.8523
27	0.0811	0.9465	0.8764
30	0.0865	0.9532	0.8826
33	0.0594	0.9202	0.8521

**Lampiran 14. Data Optimasi Suhu Enzim Selulase**

<b>Suhu</b>	<b>Ulangan 1</b>	<b>Ulangan 2</b>	<b>Rerata</b>	<b>Kontrol</b>	<b>Netto</b>
35	2.0080	2.3450	2.1765	1.4870	0.6895
40	2.4600	2.1980	2.3290	1.4870	0.8420
45	2.4340	2.4110	2.4225	1.4870	0.9355
50	2.3860	2.5590	2.4725	1.4870	0.9855
55	1.9260	1.9640	1.9450	1.4870	0.4580
60	1.8250	1.8940	1.8595	1.4870	0.3725

**Lampiran 15. Data Optimasi pH Enzim Selulase**

<b>pH</b>	<b>Ulangan 1</b>	<b>Ulangan 2</b>	<b>Rerata</b>	<b>Kontrol</b>	<b>Netto</b>
5	1.8790	2.0110	1.9450	1.4020	0.5430
6	2.0440	2.1800	2.1120	1.4170	0.6950
7	2.1680	2.2200	2.1940	1.4280	0.7660
8	2.6140	2.4820	2.5480	1.5140	1.0340
9	2.2330	2.3540	2.2935	1.4830	0.8105
10	2.1070	2.1140	2.1105	1.4660	0.6445

**Lampiran 15. Data Stabilitas pH Enzim Selulase**

<b>pH</b>	<b>Ulangan 1</b>	<b>Ulangan 2</b>	<b>Rerata</b>	<b>Kontrol</b>	<b>Netto</b>
5	0.5320	0.4370	0.4845	0.2510	0.2335
6	0.7810	0.7770	0.7790	0.4450	0.3340
7	1.7830	1.7640	1.7735	1.3680	0.4055
8	1.4440	1.4230	1.4335	0.9220	0.5115
9	1.2510	1.2150	1.2330	1.1220	0.1110
10	0.8080	0.7970	0.8025	0.7590	0.0435

**Lampiran 16. Data Stabilitas Suhu Enzim Selulase**

<b>Waktu Inkubasi (Jam)</b>	<b>Ulangan 1</b>	<b>Ulangan 2</b>	<b>Rerata</b>	<b>Kontrol</b>	<b>Netto</b>
0	2.3650	2.3470	2.3560	1.1470	1.2090
2	2.1650	2.1110	2.1380	1.1470	0.9910
4	1.8830	1.8720	1.8775	1.1470	0.7305
6	1.8440	1.7550	1.7995	1.1470	0.6525
8	1.8120	1.8170	1.8145	1.1470	0.6675
10	1.7610	1.7750	1.7680	1.1470	0.6210
12	1.7290	1.7240	1.7265	1.1470	0.5795
14	1.7010	1.7020	1.7015	1.1470	0.5545
16	1.6820	1.6840	1.6830	1.1470	0.5360
18	1.6610	1.6970	1.6790	1.1470	0.5320