



**LEMBAR PERSETUJUAN DOSEN PEMBIMBING**  
**SKRIPSI**

Mahasiswa /NIM : Sidiq Wijayatin / 1611010  
Robby Muhamad Fauzi / 1611013

Judul Penelitian : Optimasi Produksi PHB (*Poly 3-hydroxy butyrat*) dari Bakteri *Bacillus Cereus* menggunakan metode Respon Permukaan dengan variabel rasio C/N dan Temperatur Fermentasi.

Tempat Penelitian : Universitas Muhamadiyah Jakarta

Mulai Penelitian : 28 Februari 2015

Selesai Penelitian : 28 Mei 2015

Telah diperiksa dan disetujui untuk diajukan serta dipertahankan  
Dalam sidang Tugas Akhir  
Program Studi Teknologi Kimia Industri  
Sekolah Tinggi Manajemen Industri  
Kementrian Perindustrian RI

Dosen Pembimbing

Pembimbing Penelitian

(Bpk. DR. Ir. Gatot Ibnusantosa, DEA)  
NIP. 195105021980031003

(Ibu. Yustinah., ST. MT)

## LEMBAR PENGESAHAN

Judul Penelitian : Optimasi Produksi PHB (*Poly 3-hydroxy butyrat*) dari Bakteri *Bacillus Cereus* menggunakan metode Respon Permukaan dengan variabel rasio C/N dan Temperatur Fermentasi.

Disusun Oleh :

Nama / NIM : Sidiq Wijayatin / 1611010  
Robby Muhamad Fauzi / 1611013

Program Studi : Teknologi Kimia Industri

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains Terapan pada program Studi Teknologi Kimia Industri, Sekolah Tinggi Manajemen Industri Kementerian Perindustrian RI.

### DEWAN PENGUJI

Pembimbing : DR. Ir. Gatot Ibnusantosa, DEA ( )  
Penguji : Ir. Parulian Leonard Marpaung, MM ( )  
Penguji : DR. Ir. Agus Mundiyo ( )

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : 07 Juli 2015

## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur kami panjatkan kehadirat Allah SWT atas rahmat dan hidayah-Nya lah kami dapat menyelesaikan penulisan skripsi ini. Makalah skripsi yang berjudul “Optimasi Produksi PHB ( *Poly 3-hydroxy butyrat* ) dari Bakteri *Bacillus Cereus* Menggunakan metode respon permukaan dengan variabel Rasio C/N dan Temperatur Fermentasi” dibuat untuk memenuhi syarat guna mencapai gelar Sarjana Sains Terapan pada Program Studi Teknologi Kimia Industri, Sekolah Tinggi Manajemen Industri Kementerian Perindustrian RI .

Penulis menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan skripsi ini, sangatlah sulit bagi penulis untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Bapak Achmad Zawawi, M.A., M.M selaku Ketua Sekolah Tinggi Manajemen Industri, Kementerian Perindustrian.
2. Bapak Dr. Ir. Gatot Ibnusantosa, DEA selaku Dosen Pembimbing dan Ketua Jurusan Teknologi Kimia Industri, Sekolah Tinggi Manajemen Industri Kementerian Perindustrian, yang telah membimbing dan mengarahkan kami dalam penyusunan skripsi ini.
3. Ibu Yustinah ST. MT, Selaku Pembimbing Penelitian dan Kepala Laboratorium Universitas Muhamadiyah Jakarta yang telah memberikan kesempatan, waktu, saran, wawasan dan pengalaman untuk mengajarkan banyak hal dalam pelaksanaan penelitian ini.
4. Para Dosen Program Studi Teknologi Kimia Industri yang telah memberikan banyak ilmu, wawasan, dan pengalamannya selama mengajar.
5. Keluarga, Orang tua dan adik kami yang telah memberikan bantuan baik moral maupun materil pada saat kami melakukan Penelitian dan menyusun laporan skripsi ini.



6. Rekan Penelitian : Miqdad Bachmid dan Abdul rahman (Mahasiswa UMJ) yang ada dan selalu mendukung satu sama lain selama proses penelitian dan juga sudah membantu dalam berbagi pengetahuan dan informasi serta pengalaman dalam pelaksanaan penelitian.
7. Teman-teman seperjuangan mahasiswa/i Program Studi Teknologi Kimia Industri angkatan 2011 dan Seluruh pihak yang secara langsung ataupun tidak langsung telah membantu dalam pelaksanaan hingga penyusunan skripsi penelitian ini yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Kami sebagai penyusun menyadari bahwa laporan skripsi ini masih cukup jauh dari sempurna, oleh karena itu kami mengharapkan saran dan kritik yang membangun agar lebih baik lagi untuk kedepannya. Akhir kata, penyusun mengharapkan agar laporan skripsi yang telah dibuat ini dapat bermanfaat bagi penyusun pada khususnya dan semua yang membutuhkan pada umumnya serta dapat memberikan informasi yang berkualitas mengenai optimasi produksi PHB (*poly 3-hydroxy butyrat*) dimana PHB ini merupakan bahan baku plastik *biodegradable*.

Jakarta, 12 Juni 2015

Penyusun

## ABSTRAK

Plastik merupakan salah satu polimer yang pernah ditemukan di bidang kimia yang menjadikan hidup manusia lebih mudah. Namun, kelebihan ini pula yang menjadikan plastik sebagai salah satu polutan yang sangat besar pengaruhnya dalam mencemari lingkungan. *Biodegradable plastic* merupakan plastik yang dapat terdegradasi secara alamiah sehingga tidak mencemari lingkungan. Penggunaan bahan baku yang murah dan melimpah dapat menurunkan biaya produksi *biodegradable plastic* yang selama ini terkenal mahal. Penelitian ini telah mencari optimasi produksi PHB dari Glukosa melalui fermentasi bakteri *Bacillus cereus* dengan cara mencari nilai kondisi proses yang optimum pada skala laboratorium. Optimasi dilakukan dengan menggunakan *response surface methodology*. Kondisi yang dioptimasi adalah rasio C/N dan temperatur fermentasi. Hasil Proses optimasi produksi PHB dari *Bacillus Cereus* yang optimal didapatkan pada kondisi temperatur 36<sup>0</sup>C dengan rasio C/N adalah 1,5 gr / 0,5 gr. Pengaruh dan interaksi variabel yang diuji terhadap produksi pembentukan PHB dilaporkan pada penelitan ini. Model yang dihasilkan berbentuk persamaan matematis.

Kata kunci : PHB (*Poly 3-Hydroxy Butyrat*), *Bacillus cereus*, substrat glukosa dan Nitrogen, rasio C/N dan temperatur optimum, metode permukaan respons

## DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR .....	1
ABSTRAK .....	IV
DAFTAR ISI.....	V
DAFTAR GAMBAR .....	VII
DAFTAR KURVA, DIAGRAM & GRAFIK .....	VII
DAFTAR TABEL.....	VIII
BAB I PENDAHULUAN .....	1
1.1 LATAR BELAKANG .....	1
1.2 RUMUSAN MASALAH .....	3
1.3 TUJUAN PENELITIAN .....	4
1.4 MANFAAT PENELITIAN.....	4
1.5 RUANG LINGKUP PENELITIAN .....	4
1.6 SISTEMATIKA PENULISAN .....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1. PHB ( <i>POLY-3-HYDROXY-BUTYRATE</i> ).....	5
2.2. BACILLUS CEREUS .....	7
2.3. PENGARUH SUHU DAN NUTRISI DALAM PERTUMBUHAN BAKTERI9	
2.3.1. Pengaruh Temperatur .....	9
2.3.2. Pengaruh Nutrisi .....	10
2.4. METODE RESPON PERMUKAAN ( <i>RESPONSE SURFACE</i> <i>METHODOLOGY</i> ) .....	12
2.5. PROSES FERMENTASI.....	14
2.6. ALTERNATIF PROSES EKSTRAKSI .....	15
2.7. GULA REDUKSI .....	16
2.8. PERTUMBUHAN BAKTERI .....	18
BAB III METODE PENELITIAN.....	21
3.1 DIAGRAM ALIR PENELITIAN .....	21
3.2 VARIABEL PENELITIAN .....	22
3.3 ALAT DAN BAHAN BAKU .....	23

3.3.1	Alat.....	23
3.3.2	Bahan Baku .....	23
3.4	PROSEDUR PENELITIAN .....	24
3.4.1	Persiapan Media dan Nutrisi .....	24
3.4.2	Tahap Pra Culture Mikroba.....	24
3.4.3	Fermentasi (Produksi PHB) .....	25
3.4.4	Ekstraksi PHB .....	25
3.5	RANCANGAN PERCOBAAN.....	26
3.6	METODE ANALISIS .....	27
3.6.1	Analisis Gula Reduksi.....	27
3.6.2	Analisis Berat Kering (CDW).....	29
3.6.3	Analisa kualitatif terhadap PHB .....	29
3.7	WAKTU DAN TEMPAT PENELITIAN.....	29
BAB IV	HASIL DAN PEMBAHASAN .....	30
4.1.	OPTIMASI PRODUKSI PHB MENGGUNAKAN RSM .....	30
4.2.	UJI STATISTIKA CALON MODEL .....	31
4.2.1.	<i>Uji Sum of Squares</i> .....	31
4.2.2.	<i>Uji Lack of Fit</i> .....	33
4.2.3.	<i>Uji R-Squared</i> .....	34
4.3.	INTERAKSI RESPONS ANTAR VARIABEL.....	35
4.4.	PERMUKAAN RESPONS OPTIMUM YANG DIHASILKAN .....	37
4.5.	HASIL LAJU PERTUMBUHAN BAKTERI .....	41
4.6.	HASIL PENGUJIAN SAMPEL PHB DENGAN TEMPERATURE FERMENTASI 36 <sup>0</sup> C.....	42
4.7.	HASIL ANALISA FTIR SAMPEL PHB.....	43
BAB V	KESIMPULAN DAN SARAN.....	47
5.1	KESIMPULAN.....	47
5.2.	SARAN.....	47
DAFTAR	PUSTAKA .....	48
LAMPIRAN	.....	50

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Struktur <i>Poly Hydroxy Butyrate</i> .....	6
Gambar 2.2. Biosintesis PHB .....	13
Gambar 3.1. Pembuatan Larutan Glukosa Standar .....	27
Gambar 4.1. Plot kontur Glukosa Terpakai terhadap C/N dan Temperatur Fermentasi .....	37
Gambar 4.2. Plot kontur Bobot Kering sel terhadap C/N dan Temperatur Fermentasi .....	37

## DAFTAR KURVA, DIAGRAM & GRAFIK

Kurva 2.1. Pertumbuhan Mikroorganisme .....	19
Diagram 3.1. Diagram Alir Garis Besar Penelitian .....	20
Grafik 4.1. Grafik permukaan respons Glukosa Terpakai terhadap C/N dan Temperatur Fermentasi .....	38
Grafik 4.2. Grafik permukaan respons Bobot Kering Sel terhadap C/N dan Temperatur Fermentasi .....	38
Grafik 4.3. Grafik Hasil Pertumbuhan Bakteri berdasarkan Bobot Kering Sel .....	39
Grafik 4.4. Grafik Hasil Pertumbuhan Bakteri berdasarkan Reduksi Glukosa .....	40
Grafik 4.5. Grafik Hasil Optimasi Produksi PHB Berdasarkan Glukosa Terpakai .....	43
Grafik 4.6. Grafik Hasil Optimasi Produksi PHB Berdasarkan Bobot Kering Sel .....	43
Grafik 4.7. Hasil FTIR Standar PHB .....	42
Grafik 4.8. Hasil FTIR Sampel Basah PHB .....	43
Grafik 4.9. Hasil FTIR Sampel Kering PHB .....	43
Grafik 4.10. Hasil FTIR Perbandingan Sampel dan Standar PHB .....	43

## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. Sifat PHB dan Propilena .....	6
Tabel 2.2. Klasifikasi <i>Bacillus Cereus</i> .....	7
Tabel 2.3. Kondisi yang Diperlukan bagi Pertumbuhan <i>Bacillus cereus</i> .....	8
Tabel 3.1. Matriks eksperimen RSM .....	25
Tabel 4.1. Uji <i>Sum Of Squares</i> Glukosa yang terpakai .....	30
Tabel 4.2. Uji <i>Sum Of Squares</i> Bobot Kering Sel .....	31
Tabel 4.3. Uji <i>Lack of Fit</i> Glukosa Terpakai .....	32
Tabel 4.4. Uji <i>Lack of Fit</i> Bobot Kering Sel .....	32
Tabel 4.5. Uji <i>R-Squared</i> Glukosa Terpakai .....	33
Tabel 4.6. Uji <i>R-Squared</i> Bobot Kering Sel .....	33
Tabel 4.7. ANOVA model RSM Glukosa terpakai .....	34
Tabel 4.8. ANOVA model RSM Bobot Kering Sel .....	35
Tabel 4.9. Hasil Identifikasi FTIR sampel dan standar PHB .....	44

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Plastik merupakan salah satu polimer yang pernah ditemukan dibidang kimia yang menjadikan hidup manusia lebih mudah. Penggunaan plastik yang semakin meluas disebabkan oleh kelebihan yang dimilikinya, yaitu plastik mudah dibuat dalam berbagai bentuk dan ukuran, mempunyai ketahanan kimia yang tinggi, dapat diatur keelastisannya, murah dan dapat bertahan untuk waktu yang lama. Namun, kelebihan ini pula yang menjadikan plastik sebagai salah satu polutan yang sangat besar pengaruhnya. Karena murah, orang membuang plastik dengan mudah dan menjadikannya tumpukan sampah yang sulit dihancurkan oleh alam (Damajanti,*et al.*, 2010).

Menurut Delvia (2006), kebutuhan yang tinggi akan plastik menjadikan para pelaku industri memproduksi plastik dalam jumlah yang tak terbatas sehingga barang yang berlaku hanya untuk sekali pemakaian akan terbuang begitu saja kemudian menumpuk menjadi sampah yang tidak dapat didegradasi atau dihancurkan oleh mikroorganisme. Permasalahan sampah ini telah merambah dihampir seluruh belahan dunia.

Dampak yang terlihat nyata oleh penggunaan plastik tersebut memberikan satu solusi yang tepat untuk menangani menumpuknya limbah plastik tersebut yaitu dengan membuat material plastik dari bahan-bahan yang mudah diurai oleh mikroorganisme. (Damajanti, *et al.*, 2010). Plastik semacam ini dikenal dengan biodegradabel.

Polihidroksialkanoat (PHA) merupakan poliester yang tersusun atas monomer-monomer hidroksikarboksilat yang berpotensi menggantikan polimer dari minyak bumi. Terdapat lebih dari 90 monomer berbeda dari polihidroksialkanoat yang telah ditemukan sebagai bahan dasar biosintetis (Lee, 1996).

Salah satu contoh polihidroksialkanoat yang sudah diproduksi secara komersial ialah homopolimer Poli- $\beta$ -hidroksialbutirat atau PHB. Poli- $\beta$ -hidroksialbutirat (PHB) merupakan salah satu turunan dari PHA yang bersifat termostabil, tidak larut air, dan dapat didegradasi secara biologis (*biodegradable*) sehingga sangat berpotensi untuk menggantikan plastik konvensional (Yanti, *et al.*, 2010).

Tanah merupakan tempat tumbuh berbagai jenis mikroorganisme termasuk bakteri, terlebih jika tanah tersebut berada di lingkungan pabrik gula sehingga memiliki jumlah karbon yang cukup untuk pertumbuhan bakteri. Limbah dari pabrik gula diasumsikan sebagai salah satu substrat yang kaya akan kandungan sumber karbon yang tepat dijadikan tempat pertumbuhan bakteri penghasil PHB. Bakteri pengakumulasi PHB sangat bergantung pada ketersediaan substrat atau nutrisi sebagai media pertumbuhannya dalam hal ini sumber karbon. Beberapa sumber karbon yang dapat digunakan sebagai nutrisi seperti Senyawa organik meliputi karbohidrat, lemak, protein, asam amino, asam organik, garam asam organik, polialkohol, dan sebagainya. Senyawa anorganik misalnya karbonat dan gas CO<sub>2</sub> yang merupakan sumber karbon utama. Selain itu diperlukan juga nitrogen dalam tahapan pembentukan PHB, mikroba dapat menggunakan nitrogen dalam bentuk amonium, nitrat, asam amino, protein, dan sebagainya. Jenis senyawa nitrogen yang digunakan tergantung pada jenis jasadnya. Beberapa mikroba dapat menggunakan nitrogen dalam bentuk gas N<sub>2</sub> (zat lemas) udara. Mikroba ini disebut mikrobia penambat nitrogen.

Pada tahapan pembentukan PHB dengan *Bacillus cereus* beberapa sumber karbon dapat digunakan seperti dari gula / glukosa dan juga sumber nitrogen dari beberapa senyawa ammonium. Karena pada jenis bakteri *Bacillus cereus* ini kondisi terbentuknya PHB adalah dengan suplai nutrisi yaitu berupa sumber

karbon yang cukup serta terdapat kondisi kelebihan nitrogen pada komposisi tertentu.

Pada jenis bakteri jenis *Bacillus* lainnya seperti *Bacillus amiloquefaciens*, *Alcaligenes*, *Azotobacter* memiliki kemampuan dalam mengurai pati (amilum) menjadi glukosa yang selanjutnya dapat glukosa dimetabolisme oleh bakteri tersebut menjadi bahan dasar pembuatan plastik terdegradasi seperti poli laktat, poli hidroksialkanoat dan poli hidroksibutirat (Margino, 2009).

Hasil penelitian Nur Haedar, *et al.* (2014) yang menggunakan limbah molases dan tanah pabrik gula diperoleh beberapa jenis isolat bakteri yang ditumbuhkan dalam substrat glukosa mampu menghasilkan PHB. Dengan hasil tersebut maka dipilih glukosa murni sebagai sumber karbonnya dan ammonium sulfat sebagai sumber nitrogennya.

Berdasarkan uraian tersebut di atas maka perlu dilakukan penelitian tentang optimalisasi produksi poli- $\beta$ -hidroksi butirat (PHB) dengan variabel karbon dari glukosa dan nitrogen dari ammonium sulfat. Selain itu digunakan juga software *Design Expert 9* dari *Stat-Ease* sebagai media untuk menentukan komposisi variabel dan pengolah datanya, sehingga dapat mengetahui kondisi optimum yang dapat dicapai.

Pada penggunaan *Design expert* digunakan *Response surface methodology* (RSM). Penggunaan RSM ini difungsikan untuk mengeksplorasi ruang dari variabel bebas x untuk mendapatkan hasil maksimum dan menentukan sifat dasar dari nilai maksimum itu sendiri, sehingga hasil optimal yang diinginkan bisa tercapai.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Bagaimana kondisi dan parameter produksi (Rasio C/N dan Temperatur Fermentasi) ketika jumlah PHB yang dihasilkan mencapai optimum?

### **1.3 Tujuan Penelitian**

Menemukan nilai optimum rasio C/N dan Temperatur Fermentasi yang menghasilkan produksi PHB optimum.

### **1.4 Manfaat Penelitian**

Manfaat dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan hasil yang paling optimal pada proses pembuatan PHB dengan *Bacillus Cereus* dengan Menemukan nilai optimum rasio C/N dan Temperatur Fermentasi.

### **1.5 Ruang Lingkup Penelitian**

Penelitian ini dilakukan dalam skala laboratorium, dengan bahan-bahan yang digunakan antara lain bahan baku utama *Bacillus cereus*, bahan lain yang digunakan seperti Glukosa dan Nitrogen dari Ammonia.

### **1.6 Sistematika Penulisan**

Sistematika penulisan yang digunakan adalah sebagai berikut:

#### Bab I Pendahuluan

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

#### Bab II Tinjauan Pustaka

Tinjauan pustaka berisikan ulasan mengenai PHB, bakteri *Bacillus Cereus*, metode respon permukaan.

#### Bab III Metode Penelitian

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

#### Bab IV Hasil dan Pembahasan

Pada bab ini berisi penjelasan hasil eksperimen dan analisis hasil eksperimen.

Bab V Kesimpulan dan Saran

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

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

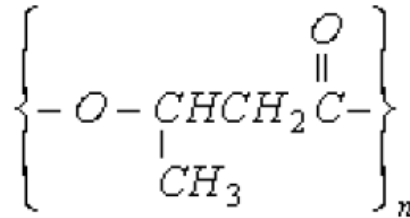
#### **2.1. PHB (*Poly-3-Hydroxy-Butyrate*)**

Polyhydroxyalkanoate (PHA) adalah poliester 3-, 4-, 5-, dan 6-asam hidroksialkanoat yang diproduksi oleh berbagai spesies bakteri dan digolongkan sebagai poliester biodegradabel dan biokompatibel (Chen dan Wu, 2005). Bakteri biasanya mensintesis PHA pada fase pertumbuhan dalam keadaan substrat karbon berlebihan dan keterbatasan nutrisi esensial (N, P, S, O, atau Mg) (Lee dkk., 1999). Diantara berbagai jenis PHA yang telah dikenal, polyhydroxybutyrate (PHB) merupakan poliester yang paling umum dikenal dan diproduksi oleh berbagai macam bakteri. Polimer plastik ini maupun komposisinya banyak digunakan dalam bidang pengemasan, kedokteran, farmasi, pertanian, industri makanan, dan industri cat (Anderson dan Dawes, 1990).

*Poly-3-hydroxybutyrate* (PHB) sebagai salah satu jenis PHA adalah suatu polimer linier dan di bawah kondisi normal merupakan komponen yang relatif tidak reaktif. PHB dengan kopolimer *Poly-3-hydroxybutyrate* dengan *Poly-3-hydroxyvalerate* (PHB-co-PHV) memiliki sifat-sifat termoplastik yang baik. PHB sering dibandingkan dengan polipropilen karena sifat fisiknya yang serupa. Perbedaannya ialah bahwa PHB sangat rapuh untuk beberapa penggunaan, dengan rasio elastisitas hampir dua kelas lebih rendah dibandingkan dengan polipropilen.

Polihidroksibutirat (PHB) merupakan salah satu jenis polihidroksialkanoat yang paling umum ditemukan pada bakteri. PHB pertama kali ditemukan dan dipelajari oleh Lemoigne pada tahun 1920. PHB mempunyai titik leleh yang tinggi ( $T_m = 180^\circ\text{C}$ ), tetapi karena kristalinitasnya yang tinggi menyebabkan sifat mekanik dari PHB kurang baik. Kopolimer poli (b-hidroksi butirat-ko-

valerat) (PHB/ V) merupakan kopolimer hasil usaha perbaikan sifat kristalinitas dari PHB.



Gambar 2.1. Struktur *Polyhydroxybutyrate*

Karakteristik	Polihidroksibutirat	Polipropilena
Titik Leleh (0C)	175-182	171-186
Suhu <i>Glass-transition</i> (0C)	4	-10
Berat Molekul	5 x 10 <sup>5</sup> -1 x 10 <sup>6</sup>	2 x 10 <sup>5</sup>
Distribusi berat molekul	2.2 – 3	5 – 12
Densitas (g/cm <sup>3</sup> )	1.25	0.92
<i>Crystallinity</i> (%)	65-80	65-70
Modulus Young (GPa)	3.5 – 4	1.7
<i>Tensile Strength</i> (MPa)	40	38
<i>Extension to Break</i> (%)	6 – 8	400

Tabel 2.1. sifat PHB dan Propilena

PHB dihasilkan oleh bakteri secara intraseluler yang berfungsi sebagai sumber karbon dan cadangan energi. Sumber karbon adalah substrat yang diperlukan dalam metabolisme bakteri. Sumber karbon yang dapat digunakan untuk sintesa PHB ialah glukosa, pati, molasses, asam sitrat, asam asetat, alkohol, sukrosa, dan lain-lain. Glukosa merupakan substrat yang paling banyak digunakan dalam produksi PHB, glukosa dipilih karena mudah dimetabolisme oleh bakteri (Rahayu, 2007; Yuli *et al.*, 2008).

Sejumlah bakteri amilolitik *Bacillus amiloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amilolyticus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus polymixa*, *Agrobacterium*

*tumefaciens*, dan genera yang lain mampu mengkonversi pati menjadi glukosa. Beberapa genera bakteri *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Micrococcus*, dan *Pseudomonas* mampu memetabolisme glukosa menjadi bahan dasar plastik terdegradasi seperti poli laktat, poli hidroksialkanoat, dan poli hidroksibutirat. PHB yang dihasilkan bakteri sebagai bioplastik menarik, karena plastik ini dapat terdegradasi secara alami pada kondisi aerobik dan anaerobik (Madison dan Huisman, 1999).

## 2.2. *Bacillus Cereus*

*Bacillus cereus* telah dikenali sebagai salah satu penyebab keracunan pada makanan sejak tahun 1955, sejak saat itu mikroorganismenya ini telah menarik banyak perhatian dan menjadi salah satu penyebab keracunan pada pangan yang termasuk sering ditemukan. Sekitar 5% dari semua kasus keracunan pangan di Eropa tahun 1990 yang telah dilaporkan ke *World Health Organization Surveillance Programme* disebabkan oleh *Bacillus cereus* (WHO, 1990). Menurut data kasus jumlah minimal *Bacillus cereus* yang dapat menimbulkan keracunan pada pangan adalah sekitar  $10^5$  sel / gram pangan (CDCP, 1979).

Berikut ini merupakan Tabel klasifikasi dari *Bacillus cereus*:

Kingdom	Bacteria
Phylum	Firmicutes
Class	Bacilli
Order	Bacillales
Family	Bacillaceae
Genus	Bacillus
Spesies	<i>Bacillus cereus</i>

Tabel 2.2. Klasifikasi *Bacillus Cereus*

*Bacillus cereus* merupakan golongan bakteri Gram-positif (bakteri yang mempertahankan zat warna kristal violet sewaktu proses pewarnaan Gram), aerob fakultatif (dapat menggunakan oksigen tetapi dapat juga menghasilkan energi secara anaerobik), dan dapat membentuk spora (endospora). Spora *Bacillus cereus*

lebih tahan pada panas kering daripada pada panas lembab dan dapat bertahan lama pada produk yang kering. Selnya berbentuk batang besar (*Bacillus*) dan sporanya tidak membengkakkan sporangiumnya.

Sifat-sifat dan karakteristik-karakteristik lainnya, termasuk sifat-sifat biokimia, digunakan untuk membedakan dan menentukan keberadaan *Bacillus cereus*, walaupun sifat-sifat ini juga dimiliki oleh *Bacillus cereus* var. *mycoides*, *Bacillus thuringiensis* dan *Bacillus anthracis*. Organisme-organisme ini dapat dibedakan berdasarkan pada motilitas / gerakan (kebanyakan *Bacillus cereus* motil / dapat bergerak), keberadaan kristal racun (pada *Bacillus thuringiensis* ), kemampuan untuk menghancurkan sel darah merah (aktivitas *hemolytic*) (*Bacillus cereus* dan lainnya bersifat *beta haemolytic* sementara *Bacillus anthracis* tidak bersifat *hemolytic*), dan pertumbuhan *rhizoid* (struktur seperti akar), yang merupakan sifat khas dari *Bacillus cereus* var. *mycoides*.

Parameter	Kondisi yang diperlukan
Suhu	< 4 °C (4 – 50 °C)
pH	< 4,4 (4,4 – 9,3)
a <sub>w</sub>	< 0,91
Jumlah <i>Bacillus cereus</i> yang ditemukan dalam susu segar pasteurisasi	< 10 organisme / 100 ml
Jumlah indikasi <i>Bacillus cereus</i> yang menyebabkan <i>foodborne disease</i>	> 10 <sup>5</sup> cfu g <sup>-1</sup> atau ml <sup>-1</sup>
Konsentrasi pada makanan yang terkait dengan racun makanan <i>Bacillus cereus</i>	10 <sup>5</sup> to > 10 <sup>9</sup> cfu ml <sup>-1</sup> atau g <sup>-1</sup>

Tabel 2.3. Kondisi yang Diperlukan bagi Pertumbuhan *Bacillus cereus*

*Bacillus cereus* juga termasuk dalam bakteri penghasil PHB. *Bacillus cereus* mempunyai sifat racun jika dalam kategori makanan dan minuman, akan tetapi jika dimanfaatkan dalam proses pembuatan PHB akan sangat menguntungkan. *Bacillus cereus* dapat menghasilkan PHB dengan syarat

mendapat suplai karbon yang cukup sebagai nutrisi dan mengalami kelebihan suplai nitrogen, maka dari itu akan sangat mudah dalam pemberian nutrisi untuk menghasilkan PHB pada jenis bakteri ini.

### **2.3. Pengaruh Suhu dan Nutrisi dalam Pertumbuhan Bakteri**

Pertumbuhan bakteri dipengaruhi oleh berbagai faktor, diantaranya substrat yang diberikan, temperatur, pH, oksigen, karbon dioksida, tekanan osmotik dan intensitas cahaya (Hogg 2005). Berikut ini adalah uraian beberapa faktor yang ditinjau dalam penelitian ini

#### **2.3.1. Pengaruh Temperatur**

Temperatur atau suhu merupakan salah satu faktor lingkungan yang berpengaruh terhadap pertumbuhan mikroba. Setiap mikroba mempunyai kisaran suhu dan suhu optimum tertentu untuk pertumbuhannya.

Berdasarkan kisaran suhu pertumbuhan, mikroba dibedakan atas tiga kelompok sebagai berikut:

- Psikrofil, yaitu mikroba yang mempunyai kisaran suhu pertumbuhan 0 - 20°C.
- Mesofil, yaitu mikroba yang mempunyai kisaran suhu pertumbuhan 20 - 45°C.
- Termofil, yaitu mikroba yang mempunyai suhu pertumbuhannya di atas 45°C.

Kebanyakan mikroba perusak pangan merupakan mikroba mesofil, yaitu tumbuh baik pada suhu ruangan atau suhu kamar. Bakteri patogen umumnya mempunyai suhu optimum pertumbuhan sekitar 37 derajat C, yang juga adalah suhu tubuh manusia. Oleh karena itu suhu tubuh manusia merupakan suhu yang baik untuk pertumbuhan beberapa bakteri patogen.

Mikroba perusak dan patogen umumnya dapat tumbuh pada kisaran suhu 4-66 derajat C. Oleh karena kisaran suhu tersebut merupakan

suhu yang kritis untuk penyimpanan pangan, maka pangan tidak boleh disimpan terlalu lama pada kisaran suhu tersebut.

Pangan harus disimpan pada suhu di bawah 4 derajat C atau di atas 66 derajat C. Pada suhu di bawah 4°C, mikroba tidak akan mati tetapi kebanyakan mikroba akan terhambat pertumbuhannya, kecuali mikroba yang tergolong psikrofil. Pada suhu di atas 66 derajat C, kebanyakan mikroba juga terhambat pertumbuhannya meskipun beberapa bakteri yang tergolong termofil mungkin tidak mati.

### **2.3.2. Pengaruh Nutrisi**

Semua bentuk kehidupan mempunyai persamaan dalam hal persyaratan nutrisi berupa zat-zat kimiawi yang diperlukan untuk pertumbuhan dan aktivitas lainnya. Nutrisi bagi pertumbuhan bakteri, seperti halnya nutrisi untuk organisme lain mempunyai kebutuhan akan sumber nutrisi, yaitu:

1. Bakteri membutuhkan sumber energi yang berasal dari energi cahaya (fototrof) dan senyawa kimia(kemotrof).
2. Bakteri membutuhkan sumber karbon berupa karbon anorganik (karbon dioksida) dan karbon organik (seperti karbohidrat).
3. Bakteri membutuhkan sumber nitrogen dalam bentuk garam nitrogen anorganik (seperti kalium nitrat) dan nitrogen organik (berupa protein dan asam amino).
4. Bakteri membutuhkan beberapa unsur logam (seperti kalium, natrium, magnesium, besi, tembaga dsb).
5. Bakteri membutuhkan air untuk fungsi – fungsi metabolik dan pertumbuhannya.

Bakteri dapat tumbuh dalam medium yang mengandung satu atau lebih persyaratan nutrisi seperti di atas. Keragaman yang luas dalam tipe nutrisi bakteri, memerlukan penyiapan medium yang beragam untuk

menumbuhkannya. Medium pertumbuhan bakteri dapat dikelompokkan berdasarkan kriteria, seperti berdasarkan sumbernya, tujuan kultivasi, status fisik dsb.

#### 2.4. Metode Respon Permukaan (*Response Surface Methodology*)

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

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

1. Menunjukkan bagaimana variabel respon  $y$  dipengaruhi oleh variabel bebas  $x$  di wilayah yang secara tertentu diperhatikan.
2. Menentukan pengaturan variabel bebas yang paling tepat dimana akan memberikan hasil yang memenuhi spesifikasi dari respon yang berupa hasil, kekotoran, warna, tekstur dan lain sebagainya.
3. Mengeksplorasi ruang dari variabel bebas  $x$  untuk mendapatkan hasil maksimum dan menentukan sifat dasar dari nilai maksimum

Salah satu pertimbangan penting yang muncul dalam RSM adalah bagaimana menentukan faktor dan level yang dapat cocok dengan model yang akan dikembangkan. Jika faktor atau level yang dipilih dalam suatu eksperimen tidak tepat maka kemungkinan terjadinya ketidakcocokan model akan sangat besar dan jika itu terjadi maka penelitian yang dilakukan bersifat *bias*. *Response surface methodology* (RSM) erat kaitannya dengan desain eksperimen karena dalam pelaksanaannya data yang dikumpulkan adalah melalui desain eksperimen.

Beberapa alasan mengapa desain eksperimen sangat diperlukan, antara lain

:

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

Tahapan dalam metode respon permukaan antara lain.

1. *Screening*:

Dalam tahap ini, berbagai faktor yang diduga berpengaruh, diuji untuk diseleksi faktor mana saja yang benar-benar memberikan dampak besar terhadap sistem, sementara faktor lain yang hanya memberikan dampak kecil dapat diabaikan.

2. *Improvisasi*:

Dalam tahap ini dilakukan perubahan nilai faktor-faktor secara berulang-ulang sehingga mendapatkan sekumpulan variasi data yang dapat diolah secara statistik untuk kemudian dicari nilai optimumnya. Proses ini dapat dilakukan dengan metode Box atau *Central Composite Design*.

3. *Penentuan titik optimum*:

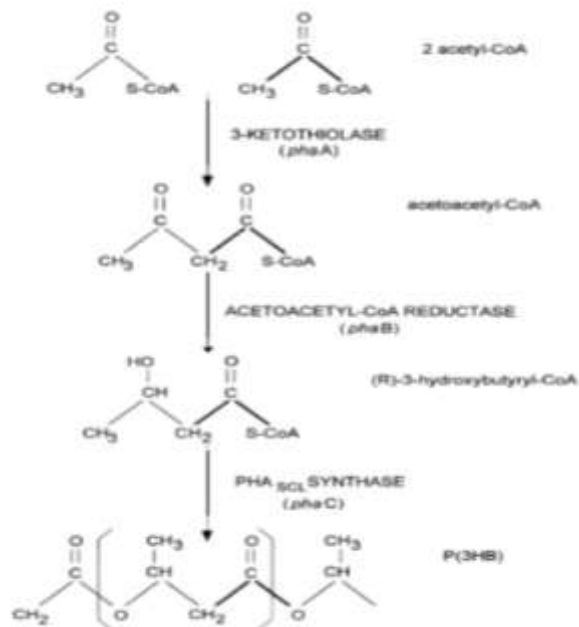
Merupakan proses pencarian titik optimum menggunakan metode regresi orde dua

## 2.5. Proses Fermentasi

Alternatif Proses Fermentasi Proses pembuatan PHA secara umum ialah dengan proses fermentasi untuk memperoleh kandungan PHA pada sel bakteri dan dilanjutkan dengan proses pemisahan PHA dari sel. Pada proses fermentasi terjadi sintesa substrat menjadi PHA. Jenis PHA yang dihasilkan dipengaruhi oleh jenis mikroba, sumber karbon dan substrat pembatas. PHA diperoleh dari hasil akumulasi karbon dengan kondisi pembatas N, P, Mg atau O<sub>2</sub> (Anderson dkk, 1990). Saat ini telah diketahui banyak bakteri yang dapat mengakumulasi sumber karbon menjadi PHA. Terdapat 2 alternatif fermentasi yang umum digunakan untuk memproduksi PHA yaitu :

1. Fed-Batch Fermentor  
di isi dengan nutrisi secukupnya untuk pertumbuhan sel.
2. Multi-stage Continuous Cultivation

Pada proses fermentasi ini, nutrisi dimasukkan secara kontinyu pada masing – masing fermentor. Fermentor yang pertama merupakan tempat pertumbuhan sel. Sedangkan fermentor yang kedua digunakan untuk proses akumulasi PHA.



Gambar 2.2. Biosintesis PHB

## 2.6. Alternatif Proses Ekstraksi

Pada proses pemisahan PHA dari sel bakteri diketahui beberapa metode yang intinya adalah untuk memecahkan dinding sel bakteri dan memisahkan kandungan PHA yang terdapat pada bakteri tersebut. Beberapa metode yang dapat digunakan dalam proses pemisahan ialah sebagai berikut :

### 1. Solvent Extraction

Metode ini adalah salah satu metode tertua dalam pemisahan PHA. Biasanya menggunakan pelarut seperti: kloroform, 1,2 – dikloroetana dan metilene klorida. Dalam beberapa percobaan ekstraksi menggunakan pelarut, diketahui dapat menghancurkan dinding sel. Kemurnian PHA dengan menggunakan pelarut ini dapat mencapai 98%. Salah satu yang menjadi masalah penggunaan method ini ialah limbah cair yang dihasilkan. Sehingga diperlukan solvent recovery untuk mengurangi pencemaran lingkungan.

### 2. Digestion Method

Metode ini memiliki prinsip yang sama dengan metode solvent extraction. Namun pada metode ini menggunakan pelarut seperti: surfaktan, chelate dan enzim.

### 3. Mechanical Treatment

Metode ini sering digunakan untuk memisahkan intraseluler protein (Timer, dkk. 1998). Contoh metode ini antara lain: Bead Mill Disruption dan High Pressure Homogenization.

### 4. Supercritical CO<sub>2</sub>

Sedangkan pada metode pemisahan dengan Supercritical CO<sub>2</sub> memerlukan tekanan yang tinggi untuk proses ekstraksi dan kemurnian hanya mencapai 89%

### 5. Using cells fragility

Pada metode Using cells fragility tidak bisa digunakan untuk setiap mikroba. Pada metode ini bakteri yang digunakan ialah E. Coli dan A. Vineandi sehingga jarang dipergunakan pada saat ekstraksi ( Choi, 2009)

## 2.7. Gula Reduksi

Gula reduksi adalah semua gula yang memiliki kemampuan untuk mereduksi dikarenakan adanya gugus aldehid atau keton bebas. Aldehid dapat teroksidasi langsung melalui reaksi redoks. Namun, gugus keton tidak dapat teroksidasi secara langsung, gugus keton, tetapi harus diubah menjadi aldehid dengan perpindahan tautomerik yang memindahkan gugus karbonil ke bagian akhir rantai. Monosakarida yang termasuk gula reduksi antara lain glukosa, fruktosa, gliseraldehida, dan galaktosa. Untuk disakarida, contohnya adalah laktosa dan maltosa. Sedangkan yang termasuk gula non-reduksi adalah sukrosa. Gula non-reduksi dicirikan dengan tidak adanya struktur rantai terbuka, sehingga tidak rentan terhadap proses oksidasi reduksi.

Pada polimer glukosa seperti amilum dan turunan amilum (maltodextrin dan dextrin), makromolekulnya dimulai dengan gula reduksi. Umumnya gula pereduksi yang dihasilkan berhubungan erat dengan aktifitas enzim, dimana semakin tinggi aktifitas enzim maka semakin tinggi pula gula pereduksi yang dihasilkan. Persentase gula reduksi di dalam turunan amilum/pati disebut dengan dextrose equivalent (DE).

Metode penentuan komposisi gula reduksi dalam sampel yang mengandung karbohidrat yang digunakan adalah menggunakan pereaksi asam dinitro salisilat / 3,5-dinitrosalicylic acid. Metode ini adalah metode kimiawi. DNS merupakan senyawa aromatis yang akan bereaksi dengan gula reduksi maupun komponen pereduksi lainnya untuk membentuk 3-amino-5-nitrosalicylic acid, suatu senyawa yang mampu menyerap dengan kuat radiasi gelombang elektromagnetik pada 540 nm. Semakin banyak komponen pereduksi yang terdapat dalam sampel, maka akan semakin banyak pula molekul 3-amino-5-nitrosalicylic acid yang terbentuk dan mengakibatkan serapan semakin tinggi. Reaksi dengan DNS yang terjadi merupakan reaksi redoks pada gugus aldehid gula dan teroksidasi menjadi gugus karboksil. Sementara itu DNS sebagai oksidator akan tereduksi membentuk 3-amino dan 5-nitrosalicylic acid.

Reaksi ini berjalan dalam suasana basa. Bila terdapat gula reduksi pada sampel, maka larutan DNS yang awalnya berwarna kuning akan bereaksi dengan gula reduksi sehingga menimbulkan warna jingga kemerahan. Dalam pembuatan reagen DNS, kita perlu menambahkan NaOH ke dalam larutan yang bertujuan untuk memberikan suasana basa. Karena nantinya reaksi dari reagen DNS ini bekerja pada suasana basa. Selain menambahkan NaOH, juga ditambahkan kalium natrium tartrat 40% (Rochelle Salt).

Fungsi dari penambahan ini adalah untuk menstabilkan warna yang terbentuk pada saat reaksi terjadi yaitu merah bata/kecoklatan. Di samping itu, kadang juga diperlukan pemanasan untuk membantu mempercepat jalannya reaksi. Karena nantinya yang akan diukur adalah absorbansi dari warna yang terbentuk tersebut dengan spektrofotometri pada panjang gelombang 575 nm.

## 2.8. Pertumbuhan Bakteri

Pertumbuhan merupakan salah satu karakteristik yang dimiliki oleh semua mikroorganisme hidup. Menurut Benefield dan Randall (1980) pertumbuhan bakteri sederhana didefinisikan sebagai peningkatan jumlah mikroorganisme per unit waktu. Kebanyakan bakteri bereproduksi dengan cara membelah diri, di mana akan terbentuk dua sel baru dari satu sel induk. Waktu yang dibutuhkan untuk membentuk dua sel baru tersebut dinamakan waktu generasi. Waktu generasi bervariasi tergantung pada spesies dan kondisi pertumbuhan, ada yang hanya beberapa menit ada yang sampai beberapa jam.

Jika bakteri ditanam dalam suatu larutan biak, maka bakteri akan terus tumbuh sampai salah satu faktor kebutuhannya mencapai minimum dan pertumbuhan menjadi terbatas. Kalau sepanjang peristiwa ini tidak terjadi tidak terjadi penambahan nutrisi atau penyaluran keluar produk-produk metabolisme, maka pertumbuhan dalam lingkungan hidup seperti ini mematuhi hukum-hukum, yang tidak hanya berlaku bagi organisme bersel tunggal saja, tetapi juga untuk organisme bersel banyak dengan pertumbuhan yang dibatasi secara genetik.

Perkembangbiakan bakteri dapat dinyatakan dalam grafik logaritma jumlah sel hidup setiap waktu. Menurut Monod (1949) terdapat beberapa tahap pertumbuhan, yaitu:

### 1. Fase lag

Fase ini merupakan fase yang dilakukan mikroorganisme untuk beradaptasi dengan lingkungannya yang baru sebelum memulai pertumbuhan. Waktu yang dibutuhkan untuk berkembang biak cukup lama, kecepatan pertumbuhan berada pada titik yang rendah mendekati nol dengan waktu generasi yang panjang. Ukuran serta kecepatan aktivitas metabolisme berada pada kondisi maksimum. Fase log akan pendek jika inokulum yang dipakai adalah bakteri pada pertumbuhan eksponensial dan media memiliki komposisi yang sama dengan media pertumbuhan sebelumnya. Inokulasi bakteri pada fase stasioner atau inokulasi ke media dengan komposisi berbeda akan menghasilkan fase lag sepuluh sampai dua puluh jam lebih lama.

Fase lag mengindikasikan waktu yang diperlukan bakteri untuk mensintesis enzim yang dibutuhkan dalam metabolisme nutrisi baru.

## **2. Fase akselerasi**

Setelah aklimatisasi sel akan mengalami fase percepatan pertumbuhan eksponensial, di mana nutrisi digunakan untuk membentuk materi sel baru. Pada tahap ini waktu yang dibutuhkan untuk berkembang biak semakin pendek dan terjadi peningkatan kecepatan pertumbuhan.

## **3. Fase eksponensial**

Pada tahap ini waktu yang dibutuhkan untuk berkembang biak atau waktu generasi berada pada kondisi minimal atau konstan, kecepatan pertumbuhan spesifik berada pada kondisi maksimal atau konstan. Terjadinya kondisi ini ditandai dengan nilai DNA/sel, RNA/sel, protein/sel dan kerapatan sel berada pada kondisi konstan, sedangkan untuk ukuran sel biasanya minimum. Karena kecepatan pembelahan diri relatif konstan maka tahap ini paling cocok untuk menetapkan kecepatan pembelahan diri dan kecepatan pertumbuhan. Selain dapat juga digunakan untuk mempelajari faktor – faktor lingkungan dan untuk mengetahui kemampuan mikroorganisme dalam menggunakan substrat. Laju pertumbuhan didefinisikan sebagai:

$$dx / dt = \mu \cdot x$$

dimana;

x = konsentrasi biomassa ( $ML^{-1}$ )

t = waktu inokulasi (T)

$\mu$  = laju pertumbuhan spesifik ( $T^{-1}$ )

## **4. Fase stasioner**

Pada fase ini nutrisi telah habis, konsentrasi tinggi dari hasil metabolisme yang bersifat toksik, serta mempunyai kepadatan populasi yang tinggi. Fase stasioner merupakan fase keseimbangan antara pertumbuhan dan kematian sel. Sebenarnya dalam fase ini sel berada pada tahap tidak melakukan aktivitas (*suspended animation*) (Wilkinson, 1975).

## 5. Penurunan fase pertumbuhan

Pada fase ini terjadi penurunan kecepatan pertumbuhan spesifik yang disebabkan oleh penurunan konsentrasi substrat dan akumulasi hasil metabolisme yang bersifat toksik.

## 6. Fase endogenus

Dengan berakhirnya fase stasioner akan diikuti dengan mulainya fase kematian. Pada fase ini proses metabolisme berhenti, laju kematian meningkat dan ada kemungkinan sel – sel dihancurkan oleh pengaruh enzim yang berasal dari sel itu sendiri (autolisis). Ketika proses lisis terjadi nutrisi intraseluler terlepas ke dalam medium yang kemudian dapat digunakan oleh mikroorganisme lain yang masih hidup. Laju kematian merupakan reaksi orde satu yang dapat dinyatakan sebagai:

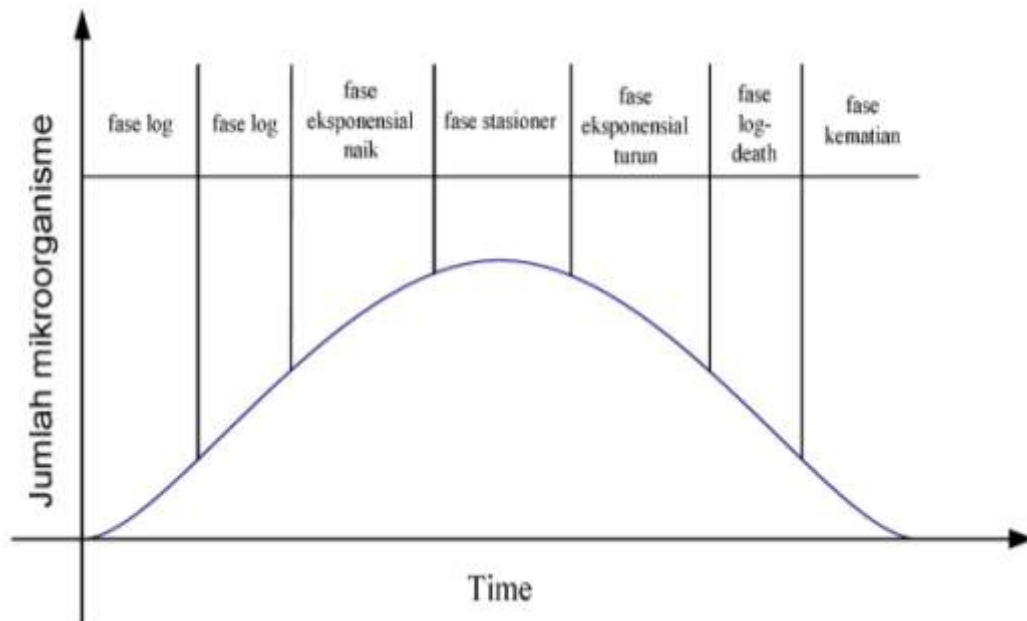
$$dx / dt = - \mu_d \cdot x$$

dimana;

x = konsentrasi biomass ( $ML^{-1}$ )

t = waktu inokulasi (T)

$\mu_d$  = konstanta laju kematian ( $T^{-1}$ )



Kurva 2.1. Kurva Pertumbuhan Mikroorganisme

# BAB III

## METODE PENELITIAN

### 3.1 Diagram Alir Penelitian

Penelitian terbagi menjadi beberapa tahap, salah satunya yaitu tahap pra-penelitian atau melakukan studi literatur mengenai hal-hal yang berhubungan dengan produksi *poli-3-hydroxy butirat*. Selanjutnya penelitian ini secara umum dibagi menjadi lima tahapan utama, yaitu :

1. Persiapan Media dan Nutrisi
2. Tahap Pra Culture Mikroba
3. Fermentasi Produk (PHB)
4. Ekstraksi PHB
5. Analisa

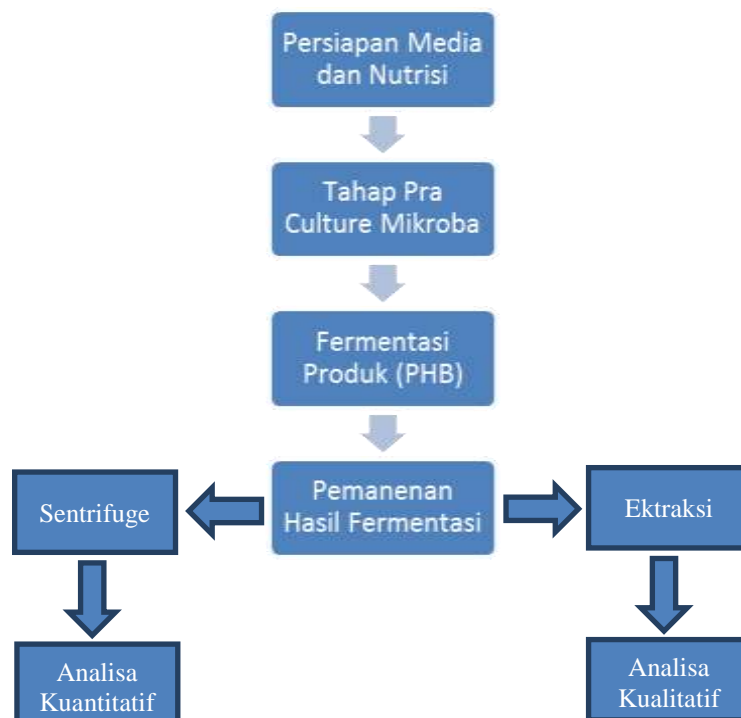


Diagram 3.1 Diagram Alir Garis Besar Penelitian

### 3.2 Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian ini terbagi menjadi variabel bebas (*independent*), variabel terikat (*dependent*) dan variabel kontrol. Berikut ini adalah rincian dari variabel bebas (*independent*), variabel terikat (*dependent*) dan variabel kontrol yang digunakan dalam penelitian ini.

- Variabel Bebas (*Independent*)

Variabel bebas adalah variabel yang diatur pada suatu harga tertentu. Variabel bebas pada penelitian ini adalah sumber karbon dan sumber nitrogen. Sumber karbon yang digunakan adalah glukosa, sedangkan sumber nitrogen yang digunakan adalah ammonium sulfat  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

- a. Rasio C/N

Dalam hal ini jumlah karbon tetap sebesar 1.5 gr sedangkan jumlah nitrogennya tidak tetap, yaitu : 0.1 ; 0.3 ; 0.5 gr.

- b. Temperatur saat Fermentasi

Temperatur yang ingin di uji adalah mulai dari 40 °C, 50°C, 60°C.

- Variabel Terikat (*Dependent*)

Variabel Terikat adalah variabel yang diukur nilainya setelah diberikan harga tertentu pada variabel bebas. Variabel terikat pada penelitian ini adalah bobot kering (CDW) dan Reduksi Glukosa.

- Variabel Kontrol

Variabel kontrol adalah variabel yang menyebabkan hubungan variabel bebas dan variabel terikat tetap konstan. Variabel kontrol pada penelitian ini adalah :

- a. Waktu Fermentasi = 96 Jam (4 Hari)

- b. Kecepatan Fermentasi = 150 Rpm

### 3.3 Alat dan Bahan Baku

#### 3.3.1 Alat

Alat- alat yang digunakan adalah alat-alat ukur laboratorium (pipet volume, Pipet ukur, labu ukur dll) (Duran & Pyrex), *Shaking Incubator* (custom), *Oven* (Memmert), autoklaf (ALP), timbangan analitik (ADAM), *sentrifuge* (Centurion), *hotplate stirrer* (Favorit), *Thermometer* (Yenaco), tabung sentrifusi (Duran & Pyrex), alat gelas (Duran & Pyrex), *Ultra Sonic* (WISD), Spektrofotometer UV-mini 1240 (Shimadzu), *Fourier Transform Infra Red* (Agilent), *Gas Chromatographic* (Perkin-Elmer).

#### 3.3.2 Bahan Baku

##### a. Luria Bertani

Fungsi dari Luria Bertani ialah sebagai media pertumbuhan mikroba.

Luria Bertani mengandung :

- 10 g/L Tryptone
- 5 g/L Yeast Ekstrak
- 10 g/L NaCl

*Supplier Luria Bertani: Sigma-Aldrich*

##### b. Mineral Salts Medium (MSM)

Mineral Salts Medium (MSM) bisa juga disebut Media Garam Mineral berfungsi sebagai pelarut untuk sumber Karbon dan Nitrogen yang nantinya menjadi sumber pakan Bakteri. MSM Mengandung :

- 0.5 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 1.5 g/L sitrat. $\text{H}_2\text{O}$
- 11.8 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 10 mL/L Larutan Trace elemen dengan pH 6.8

*Supplier Bahan Baku: MERCK*

c. Sumber Karbon dan Nitrogen

Bahan yang digunakan sebagai sumber Karbon adalah Glukosa, sedangkan bahan yang digunakan sebagai sumber Nitrogen adalah  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

*Supplier Bahan Baku: MERCK*

### **3.4 Prosedur Penelitian**

#### **3.4.1 Persiapan Media dan Nutrisi**

Siapkan Luria Bertani, timbang 25 gr lalu larutkan dalam 1 L aqua dest . kemudian buat MSM dengan menyiapkan komponen-komponen pembentuk MSM lalu larutkan dalam 1 L aqua dest. Selanjutnya di sterilisasi bersamaan dengan alat-alat lab yang akan kontak dalam proses penelitian. Disterilisasi pada  $121^{\circ}\text{C}$  selama 20 menit.

#### **3.4.2 Tahap Pra Culture Mikroba**

Kaldu Luria Bertani (LB) yang sudah di sterilisasi di dinginkan terlebih dahulu hingga suhu kamar. Lalu dibagi menjadi 4 erlenmeyer dimana masing-masing dimasukan LB sebanyak 250 mL.

Siapkan biakan bakteri, lalu masukan sebanyak 10 ml bakteri kedalam erlenmeyer. Kemudian kultur dikocok di dalam *shaker inkubator* selama 24 jam pada suhu ruang dengan kecepatan 150 rpm. Bakteri yang tumbuh ditandai dengan kekeruhan dari media cair.

Setelah dirasa bakteri yang tumbuh sudah cukup. Selanjutnya bakteri dikumpulkan dengan centrifuge pada 5000 rpm selama 10 menit, kemudian setelah selesai di centrifuge bakteri di larutkan dalam 9 g/L NaCl steril dan disimpan di kulkas pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$  sampai digunakan.

### 3.4.3 Fermentasi (Produksi PHB)

Produksi PHB dilakukan dalam tempat berkapasitas 250 mL, yang berisi 150 mL MSM ditambah dengan jumlah tertentu sumber karbon dan sumber nitrogen. Sebelumnya MSM, sumber karbon (glukosa), dan sumber nitrogen ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) disterilisasi pada 121<sup>0</sup>C selama 20 menit.

Setelah media dingin ditambahkan kultur mikroba 10% (v/v) yaitu 15 mL. Fermentasi dilakukan di beberapa variabel temperatur dan kecepatan pengadukan tetap yaitu 150 rpm. Selama 96 jam (4 hari).

Kemudian setelah fermentasi selesai, larutan di centrifuge pada 5000 rpm selama 10 menit, untuk mengambil padatannya. Sedangkan terhadap filtrat dilakukan analisa kadar gula reduksi sisa.

### 3.4.4 Ekstraksi PHB

Ekstaksi PHB sesuai dengan metode yang dijelaskan oleh Hahn et al. (1994). Biomassa/sel hasil fermentasi dilarutkan dalam 7% sodium hipoklorit (1 g sel basah per mL), pindahkan ke dalam erlenmeyer 25 mL. kemudian tambahkan kloroform (1 g sel basah per mL) masukan ke dalam erlenmeyer 25 mL. Selanjutnya campuran diaduk pada 300 rpm selama 2 jam, dan selanjutnya disonifikasi selama 20 menit. Pemisahan larutan kloroform yang kaya PHB dari padatan dilakukan dengan sentrifugasi pada 5000 rpm selama 10 menit.

Setelah itu larutan diuapkan, untuk mengurangi konsentrasi kloroform. Selanjutnya terhadap larutan kloroform yang kaya PHB ditambahkan metanol dingin (metanol: kloroform = 9:1, v/v) untuk mengendapkan polimer PHB. Butiran polimer kemudian dikumpulkan di dalam suatu wadah dan dikeringkan di suhu kamar. Pada proses ini dimaksudkan untuk pelaksanaan Analisa Kualitatif menggunakan alat FTIR (*Fourier Transform Infra Red*).

### 3.5 Rancangan Percobaan

Pada penelitian ini digunakan metode *Response Surface Methode* dimana Metode *response surface* merupakan gabungan dari teknik matematika dan statistika yang digunakan dalam pemodelan dan analisis dimana respon yang diamati dipengaruhi oleh sejumlah variabel. Metode *response surface* bertujuan untuk mengoptimalkan respon (Montgomery, 2009). Proses optimasi seringkali dilakukan didunia industri sebagai bentuk upaya meningkatkan mutu dan kualitas produk yang dihasilkan. Selain digunakan dalam proses optimasi produk, metode *response surface* juga seringkali digunakan dalam upaya meminimalisasi kecacatan suatu produk dan juga selain pada bidang industri,

metode *response surface* digunakan dibidang yang lain seperti bidang ilmu pangan, biologi, ilmu kedokteran dan kesehatan (Myers et.all, 1989) software yang digunakan untuk menggunakan metode ini yaitu Design Expert 9.

Berdasarkan rancangan Response Surface Metode, berikut rancangan penelitiannya :

Tabel 3.1. Matriks eksperimen RSM

RUN	Jumlah Nitrogen	Temperatur Fermentasi	Glukosa Terpakai	Bobot Kering
1	0,5828	50		
2	0,3	50		
3	0,3	64,1421		
4	0,1	40		
5	0,5	60		
6	0,3	50		
7	0,3	50		
8	0,1	60		
9	0,3	50		
10	0,01715	50		
11	0,5	40		
12	0,3	35,8579		
13	0,3	50		

Ketiga-belas percobaan tersebut dilakukan di laboratorium untuk mencari nilai kadar glukosa, bobot kering, serta kadar PHB dari tiap-tiap kombinasi faktor yang diberikan. Dari hasil yang didapat, segera diketahui kombinasi variabel tak tetap yang paling optimum secara percobaan. Akan tetapi, hasil yang didapat perlu diolah di *software* untuk mendapatkan model matematis, grafik permukaan respons beserta kondisi optimum yang dihasilkan melalui grafik permukaan respons tersebut.

### **3.6 Metode Analisis**

#### **3.6.1 Analisis Gula Reduksi**

Analisis gula reduksi mengukur konsentrasi senyawa gula yang dihasilkan setelah proses hidrolisis dan fermentasi. Dengan menggunakan metode Miller yaitu dengan menambahkan DNS atau *3,5-dinitrosalicylic acid*. DNS merupakan Senyawa Aromatis yang bereaksi dengan gula reduksi untuk membentuk *3-amino-5-nitrosalicylic acid* yang dapat menyerap panjang gelombang 575 nm.

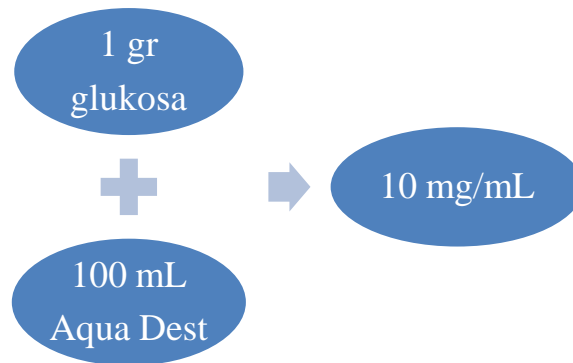
Reaksi dengan DNS yang terjadi merupakan reaksi redoks pada gugus aldehid gula dan teroksidasi menjadi gugus karboksil. Sementara itu DNS sebagai oksidator akan tereduksi membentuk 3-amino dan *5-nitrosalicylic acid*. Reaksi ini berjalan dalam suasana basa.

Bila terdapat gula reduksi pada sampel, maka larutan DNS yang awalnya berwarna kuning bereaksi dengan gula reduksi sehingga menimbulkan warna jingga kemerahan. Proses yang dilakukan adalah menguji kandungan gula reduksi menggunakan spektrofotometer UV Genesys dan melihat konsentrasi dengan absorbansi pada panjang gelombang 575 nm kemudian dibandingkan dengan standar kurva kalibrasi glukosa.

Berikut adalah tahapan pembuatan kurva standar kalibrasi glukosa dan cara analisa sampel reduksi glukosa :

1. Siapkan 6 Labu ukur yang mengindikasikan 1 titik larutan standar dan 5 titik pengenceran larutan standar yang nantinya menjadi deret kurva standar.

Gambar 3.1. Pembuatan Larutan Glukosa Standar



2. Buat pengenceran 40x, 50x, 80x, 100x, dan 200x dari larutan standar.
 

5 mL	$\xrightarrow{\text{diencerkan}}$	200 mL	= pengenceran 40x = 0,25 mg/mL
1 mL	$\xrightarrow{\text{diencerkan}}$	50 mL	= pengenceran 50x = 0,20 mg/mL
2,5 mL	$\xrightarrow{\text{diencerkan}}$	200 mL	= pengenceran 80x = 0,125 mg/mL
1 mL	$\xrightarrow{\text{diencerkan}}$	100 mL	= pengenceran 100x = 0,1 mg/mL
1 mL	$\xrightarrow{\text{diencerkan}}$	200 mL	= pengenceran 200x = 0,05 mg/mL
3. Sampel dimasukkan sebanyak 3 mL ke dalam tabung reaksi, ditambah 3 mL pereaksi DNS, dikocok hingga homogen.
4. Panaskan dalam air mendidih selama 15 menit pada suhu 90<sup>0</sup>C, lalu didinginkan di suhu ruang.
5. Setelah suhu kamar, masukan sampel ke dalam cuvet. Analisa spektro dengan panjang gelombang 575  $\mu\text{m}$  dan blanko Aqua dest.

Setelah didapat data hasil pengukuran berupa absorbansi dari setiap sampel, dilakukan penghitungan kadar gula pereduksinya.

$$A \text{ rata-rata} = \frac{A_1 + A_2}{2} = Y$$

Keterangan :  $A_1$  = Absorban ulangan pertama

$A_2$  = Absorban ulangan kedua

Selanjutnya, absorban rata-rata dimasukkan kedalam persamaan garis dari data kurva standar.

$$Y = aX(+/-)b$$

Keterangan :  $Y$  = Absorban rata-rata

$X$  = Konsentrasi gula pereduksi (mg/L)

### **3.6.2 Analisis Berat Kering (CDW)**

Untuk menentukan berat kering sel (CDW), 10 ml campuran / suspensi sel hasil fermentasi dilakukan sentrifugasi pada 5000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang, sedangkan sel diambil. Selanjutnya sel dicentrifuge dengan aqua dest dan dikeringkan pada 70°C sampai berat konstan.

### **3.6.3 Analisa kualitatif terhadap PHB**

Analisa kualitatif terhadap PHB dilakukan setelah tahap ekstraksi produk PHB dan alat yang digunakan adalah alat FTIR (*Fourier Transform Infrared*), dengan melakukan scan sampel PHB dari ekstraksi PHB.

## **3.7 Waktu dan tempat penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan dari tanggal 28 Februari – 28 Mei 2015, dan dilakukan sepenuhnya di Laboratorium Fakultas Teknik Universitas Muhammadiyah, Jakarta.

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Tujuan umum dari penelitian ini adalah mendapatkan Kondisi optimum produksi PHB. Tujuan tersebut dapat dicapai dengan melakukan serangkaian percobaan seperti yang telah diuraikan di metode penelitian. Hasil yang didapat dari percobaan-percobaan itu antara lain Bobot Kering (CDW) dan Reduksi Glukosa. serta permukaan respons dari kedua respons tersebut pada optimasi menggunakan RSM (*Response Surface Methode*).

Kami mencari kisaran nilai dari tiap variabel yaitu konsentrasi C/N dan temperatur Fermentasi. Konsentrasi C/N adalah 1,5 gr/N (Y.Zhang 2013) dan temperatur yang dipilih berkisar dari 40<sup>0</sup>C – 60<sup>0</sup>C karena dapat dilihat dari ketahanan bakteri *Bacillus Cereus* yang kemungkinan akan mati di atas suhu 55<sup>0</sup>C.

#### 4.1. Optimasi Produksi PHB Menggunakan RSM

Keunggulan optimasi menggunakan permukaan respons dibandingkan dengan metode optimasi *one-variable-at-a-time* adalah karena RSM dapat diketahui bagaimana variabel-variabel yang dioptimasi memiliki pengaruh satu sama lain.

Optimasi Kondisi Produksi PHB menggunakan RSM kali ini adalah untuk melihat bagaimana interaksi antara Temperatur dan Konsentrasi Nitrogen terhadap PHB yang diproduksi.

Setelah desain eksperimen didapat, dilakukan percobaan sesuai desain eksperimen tersebut dan data yang didapat kemudian diolah di *software* yang digunakan, yakni Design-Expert. Data-data tersebut diolah dengan tujuan untuk mendapatkan persamaan matematis yang menjelaskan tentang efek variabel-variabel terhadap respons yang diinginkan, dalam hal ini reduksi glukosa dan bobot kering sel.

Persamaan matematis tersebut bila sesuai dan memenuhi syarat secara statistik dapat dijadikan sebuah model dari peristiwa yang terjadi dalam percobaan ini. Model tersebut kemudian dapat dipakai untuk memprediksi respons dari kondisi yang diinginkan.

Untuk dapat membuat sebuah model matematis dari data desain eksperimen yang dilakukan, kita perlu menguji kesesuaian dan kebenaran model yang diusulkan, melalui statistika. Ada tiga pengujian dalam menentukan suatu model, supaya model yang dipilih adalah benar-benar sesuai dengan kondisi yang ada sebenarnya. Tiga pengujian tersebut antara lain: uji Sum of Squares, uji Lack of fit, dan uji statistika dasar (R-Squared).

## 4.2. Uji Statistika Calon Model

### 4.2.1. Uji Sum of Squares

➤ Glukosa yang terpakai

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F
Mean vs Total	135.76	1	135.76		
Linear vs Mean	136.19	2	68.09	9.96	0.0042
2FI vs Linear	0.11	1	0.11	0.014	0.9085
Quadratic vs 2FI	52.06	2	26.03	11.23	0.0065
Cubic vs Quadratic	4.78	2	2.39	1.04	0.4178
Residual	11.44	5	2.29		
Total	340.33	13	26.18		

**Suggested**

Sumber : *Response Surface Methode, Design Expert 9*

Tabel 4.1. Uji *Sum of Squares* Glukosa yang terpakai

➤ Bobot Kering sel

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F
Mean vs Total	17.73	1	17.73		
Linear vs Mean	11.12	2	5.56	28.88	< 0.0001
2FI vs Linear	0.27	1	0.27	1.48	0.2548
Quadratic vs 2FI	0.96	2	0.48	4.81	0.0486
Cubic vs Quadratic	9.617E-003	2	4.808E-003	0.035	0.9658
Residual	0.69	5	0.14		
Total	30.77	13	2.37		

**Suggested**

Sumber : *Response Surface Methode, Design Expert 9*

Tabel 4.2. Uji *Sum of Squares* Bobot Kering Sel

Dalam uji Sum of Squares, suatu model dinyatakan cocok apabila probabilitas nilai- $p > F$  adalah lebih kecil daripada 0.05. Nilai tersebut memiliki arti yakni ketidaktepatan model yang diberikan adalah kurang dari 5%. Bila melihat dari tabel nilai p-value Prob > F yang kurang dari 0.05 adalah model “Linear vs Mean” dan “Quadratic vs 2FI”. Karena model yang kita tentukan yaitu model Quadratic, maka model ini disarankan oleh *software* Design-Expert dalam uji Sum of Squares.

#### 4.2.2. Uji Lack of Fit

➤ Glukosa yang terpakai

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F
Linear	66.11	6	11.02	19.32	0.0064
2FI	66.00	5	13.20	23.14	0.0047
Quadratic	13.94	3	4.65	8.15	0.0353
Cubic	9.16	1	9.16	16.06	0.0160
Pure Error	2.28	4	0.57		

**Suggested**

Sumber : *Response Surface Methode, Design Expert 9*

Tabel 4.3. Uji *Lack of Fit* Glukosa yang terpakai

➤ Bobot Kering sel

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F
Linear	1.36	6	0.23	1.59	0.3392
2FI	1.09	5	0.22	1.53	0.3506
Quadratic	0.13	3	0.043	0.30	0.8228
Cubic	0.12	1	0.12	0.84	0.4107
Pure Error	0.57	4	0.14		

**Suggested**

Sumber : *Response Surface Methode, Design Expert 9*

Tabel 4.4. Uji *Lack of Fit* Bobot Kering Sel

Pengujian lack of fit dilakukan untuk melihat apakah terdapat ketidakcocokan antara model dengan orde dua. Model yang baik adalah model yang tidak memiliki lack of fit. Uji hipotesis berikut dilakukan terhadap masing-masing model.

Ho : Tidak ada lack of fit pada model, nilai “p-value prob > F”  $\geq$  5%

Hi : Ada lack of fit pada model, nilai “p-value prob > F” < 5%

Berdasarkan hipotesis tersebut, model yang baik adalah model yang tidak menerima Hi. Bila melihat pada tabel 4.3. Uji *Lack of Fit* Glukosa yang terpakai , Semua model menerima Hi, karena nilai model kuadratik lebih besar dari pada model yang lain maka model kuadratik disarankan oleh *software* Design-Expert meskipun terdapat ketidakcocokan model dengan orde dua.

Sedangkan bila melihat Tabel 4.4. Uji *Lack of Fit* Bobot Kering Sel semua model tidak menerima Hi, karena model kuadratik bernilai lebih besar dari model lain, maka model kuadratik disarankan oleh *software* Design-Expert. Oleh karena itu respons bobot kering sel tidak terdapat ketidakcocokan model dengan orde dua.

#### 4.2.3. Uji R-Squared

➤ Glukosa yang terpakai

Source	Std. Dev.	R-Squared	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared	PRESS
Linear	2.62	0.6657	0.5989	0.3750	127.85
2FI	2.75	0.6662	0.5550	-0.0197	208.59
Quadratic	1.52	0.9207	0.8640	0.4979	102.71
Cubic	1.51	0.9441	0.8658	-1.8835	589.89

**Suggested**

Sumber : *Response Surface Methode, Design Expert 9*

Tabel 4.5. Uji R-Squared Glukosa Terpakai

➤ Bobot Kering sel

Source	Std. Dev.	R-Squared	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared	PRESS
Linear	0.44	0.8524	0.8229	0.7539	3.21
2FI	0.43	0.8733	0.8310	0.7946	2.68
Quadratic	0.32	0.9466	0.9084	0.8616	1.80

**Suggested**

Cubic	0.37	0.9473	0.8736	0.3459	8.53
-------	------	--------	--------	--------	------

Sumber : *Response Surface Methode, Design Expert 9*

Tabel 4.6. Uji *R-Squared* Bobot Kering Sel

Pada pengujian *R-squared*, tiap-tiap model dilihat nilai *Adjusted-R-Squared*

nya dan juga *Predicted-R-Squared* nya. Model yang baik adalah model yang memiliki nilai *R-squared* mendekati 1. Bila dilihat pada tabel, model kuadratik memenuhi syarat tersebut, baik untuk *Adjusted-R-Squared* nya dan juga *Predicted-R-Squared* nya. Tetapi dalam tabel 4.5. Uji *R-Squared* Glukosa Terpakai nilai *Adjusted-R-Squared* model kubik lebih tinggi dari nilai *Adjusted-R-Squared* model kuadratik, model kubik tidak dapat dipilih karena nilai *Predicted-R-Squared* tidak memenuhi syarat. Oleh karena itu model kuadratik disarankan oleh *software* Design-Expert.

### 4.3. Interaksi Respons Antar Variabel

Untuk mengetahui interaksi respons antar variabel yang terkandung dalam persamaan yang didapat, kita perlu merujuk pada hasil *analysis of variance* (ANOVA) model. Model persamaan yang didapat di percobaan ini memiliki 5 *term* dengan masing-masing *term* memiliki 1 derajat bebas. *Term* tersebut terdiri dari 2 efek linear, 1 efek interaksi dan 2 efek kuadratik.

Tabel 4.7. ANOVA model RSM Glukosa terpakai

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F
Model	188.35	5	37.67	16.25	0.0010
<i>A-Total N</i>	<i>0.042</i>	<i>1</i>	<i>0.042</i>	<i>0.018</i>	<i>0.8962</i>
<i>B-Temperature</i>	<i>136.14</i>	<i>1</i>	<i>136.14</i>	<i>58.74</i>	<i>0.0001</i>
<i>AB</i>	<i>0.11</i>	<i>1</i>	<i>0.11</i>	<i>0.046</i>	<i>0.8368</i>
<i>A^2</i>	<i>1.92</i>	<i>1</i>	<i>1.92</i>	<i>0.83</i>	<i>0.3931</i>
<i>B^2</i>	<i>51.85</i>	<i>1</i>	<i>51.85</i>	<i>22.37</i>	<i>0.0021</i>

**Significant**

Residual	16.22	7	2.32		
<i>Lack of Fit</i>	13.94	3	4.65	8.15	0.0353
<i>Pure Error</i>	2.28	4	0.57		
Cor Total	204.57	12			

Sumber : *Response Surface Methode, Design Expert 9*

Tabel 4.8 ANOVA model RSM Bobot Kering

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F
Model	12.34	5	2.47	24.81	0.0003
<i>A-Total N</i>	0.75	1	0.75	7.54	0.0287
<i>B-Temperatur</i>	10.37	1	10.37	104.19	< 0.0001
<i>AB</i>	0.27	1	0,27	2,73	0,1424
<i>A<sup>2</sup></i>	0.095	1	0.095	0.95	0.3618
<i>B<sup>2</sup></i>	0.92	1	0.92	9.27	0.0187
Residual	0.70	7	0.099		
<i>Lack of Fit</i>	0.13	3	0.043	0.30	0.8228
<i>Pure Error</i>	0.57	4	0.14		
Cor Total	13.04	12			

**Significant**

**Not Significant**

Sumber : *Response Surface Methode, Design Expert 9*

Dalam Tabel 4.7. & 4.8. A menyatakan jumlah sumber nitrogen, B menyatakan temperatur fermentasi. *Term* yang terdiri dari satu huruf (variabel tunggal) menyatakan efek linear sedangkan *term* dua huruf (dua variabel), menyatakan efek interaksi. Untuk bisa dinyatakan memiliki pengaruh yang signifikan, setiap *term* harus memiliki nilai “probabilitas p-value > F” yang lebih dari 0.05. Jika melihat pada tabel 4.7. ANOVA model RSM Glukosa terpakai, ada 2 *term* yang memiliki nilai yang signifikan yaitu *term* B dan B<sup>2</sup>. Hal ini berarti bahwa salah satu efek linear yaitu B beserta salah satu efek kuadratnya yaitu B<sup>2</sup> memiliki pengaruh yang signifikan terhadap respons yang dihasilkan.

Jika melihat pada tabel 4.8. ANOVA model RSM Bobot Kering Sel, ada 3 *term* yang memiliki nilai yang signifikan yaitu *term* A,B dan B<sup>2</sup>. Hal ini berarti bahwa semua efek linear yaitu A & B beserta salah satu efek kuadratnya yaitu B<sup>2</sup> memiliki pengaruh yang signifikan terhadap respons yang dihasilkan. Sedangkan efek interaksi antar variabel dalam tabel 4.7. dan 4.8. tidak signifikan terhadap respons yang dihasilkan.

#### 4.4. Permukaan Respons Optimum Yang Dihasilkan

Dari hasil pengujian-pengujian yang telah dilakukan, kami memilih model kuadratik sebagai model permukaan respons aktivitas terhadap Glukosa yang digunakan dan Bobot Kering sel. Adapun model yang dihasilkan adalah berbentuk persamaan matematis yang bila disusun: Glukosa yang terpakai atau Bobot kering sel dengan Y, C/N dengan X<sub>1</sub>, dan Temperatur fermentasi dengan X<sub>2</sub>, adalah :

- Glukosa yang terpakai

$$Y_i = 89,96174 - 3,44520 X_1 - 3,11833 X_2 - 0,081375 X_1 X_2 + 13,13031 X_1^2 + 0,027302 X_2^2$$

- Bobot Kering sel

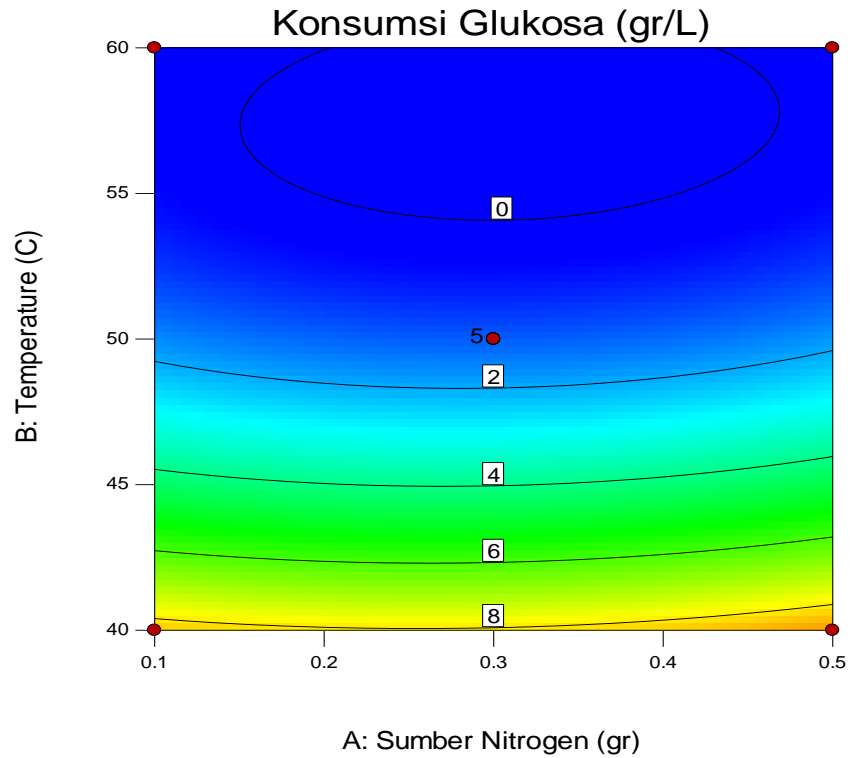
$$Y_i = 13,51581 + 6,29712 X_1 - 0,43889 X_2 - 0,13031 X_1 X_2 + 2,91641 X_1^2 + 3,64156E-003 X_2^2$$

Model yang dihasilkan dapat dikatakan cukup akurat untuk menggambarkan kondisi yang sebenarnya dari proses yang terjadi. Model yang didapat tersebut kemudian ditampilkan dalam grafik kontur permukaan dan juga dalam permukaan tiga dimensi seperti yang ada di Gambar 4.1. - 4.2 dan Grafik 4.1 - 4.2. Gambar dan grafik tersebut merupakan permukaan respons glukosa yang terpakai dan Bobot Kering Sel yang diproduksi sebagai pengaruh dari Sumber Nitrogen dan Temperatur Fermentasi. Nilai variabel sumber nitrogen dan temperatur fermentasi pada respons glukosa terpakai diatur ke nilai optimum pada *running* #11 desain eksperimen RSM yang mana merupakan *running* desain eksperimen yang memberikan aktivitas tertinggi yaitu pada N = 0,5 gr dan T = 40<sup>0</sup>C.

Sedangkan nilai variabel sumber nitrogen dan temperatur fermentasi pada respons Bobot kering sel diatur ke nilai optimum pada *running* #12 desain eksperimen RSM yang mana merupakan *running* desain eksperimen yang memberikan aktivitas tertinggi yaitu pada  $N = 0,3$  gr dan  $T = 36^{\circ}\text{C}$ . Hasil keseluruhan *running* desain eksperimen dapat dilihat di bagian lampiran.

Design-Expert® Software  
 Factor Coding: Actual  
 Konsumsi Glukosa (gr/L)  
 ● Design Points  
 10.416  
 0.367

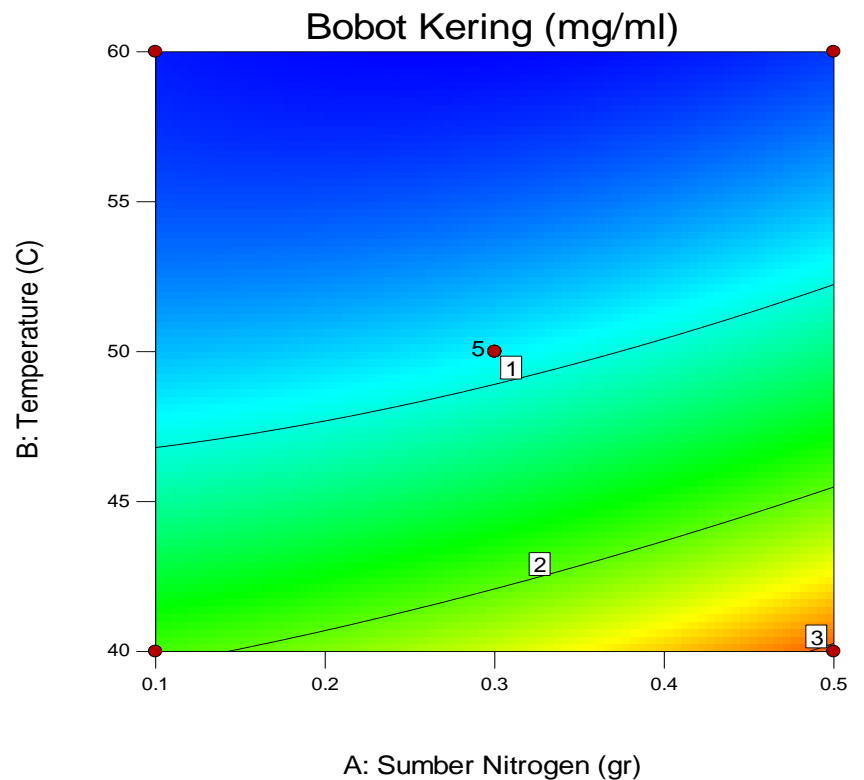
X1 = A: Sumber Nitrogen  
 X2 = B: Temperature



Gambar 4.1. Plot kontur Glukosa Terpakai terhadap sumber N dan Temperatur Fermentasi

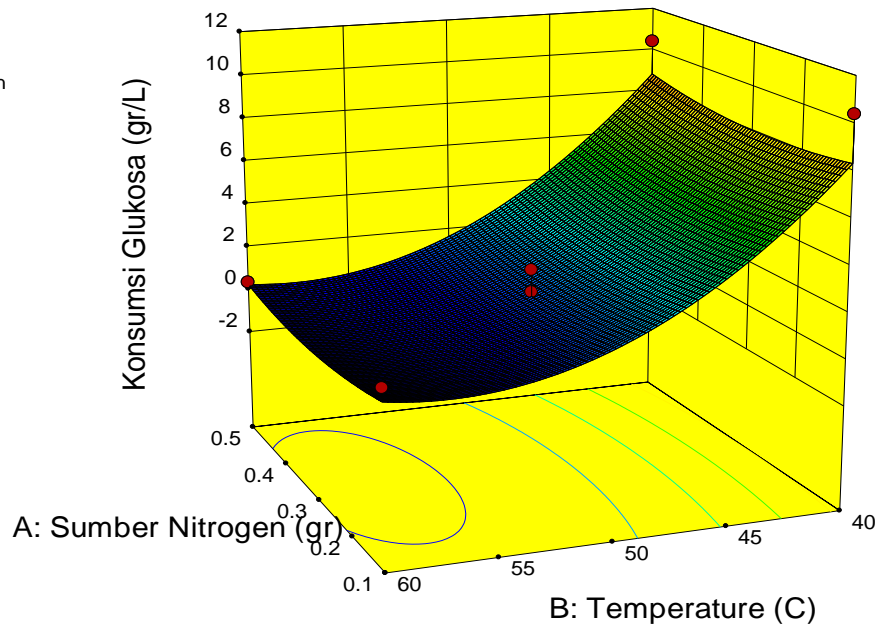
Design-Expert® Software  
 Factor Coding: Actual  
 Bobot Kering (mg/ml)  
 ● Design Points  
 3.3467  
 0.09

X1 = A: Sumber Nitrogen  
 X2 = B: Temperature



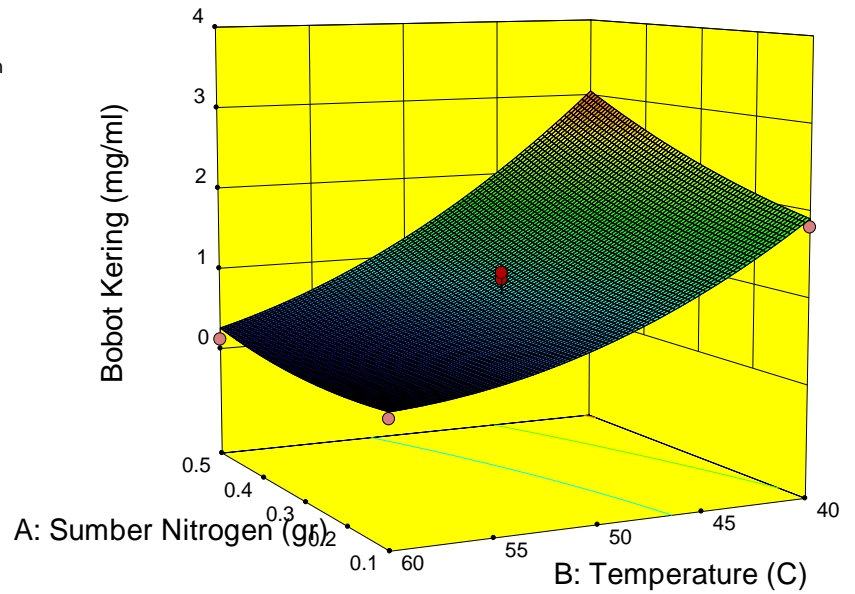
Gambar 4.2. Plot kontur Bobot Kering sel terhadap sumber N dan Temperatur Fermentasi

Design-Expert® Software  
 Factor Coding: Actual  
 Konsumsi Glukosa (gr/L)  
 ● Design points above predicted value  
 ● Design points below predicted value  
 10.416  
 0.367  
 X1 = A: Sumber Nitrogen  
 X2 = B: Temperature



Grafik 4.1. Grafik permukaan respons Glukosa Terpakai terhadap sumber N dan Temperatur Fermentasi

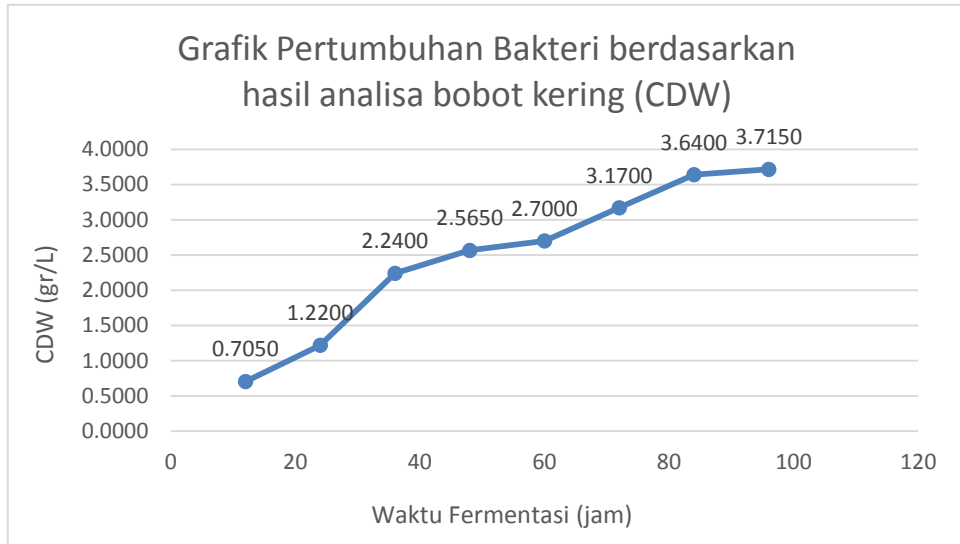
Design-Expert® Software  
 Factor Coding: Actual  
 Bobot Kering (mg/ml)  
 ● Design points above predicted value  
 ● Design points below predicted value  
 3.3467  
 0.09  
 X1 = A: Sumber Nitrogen  
 X2 = B: Temperature



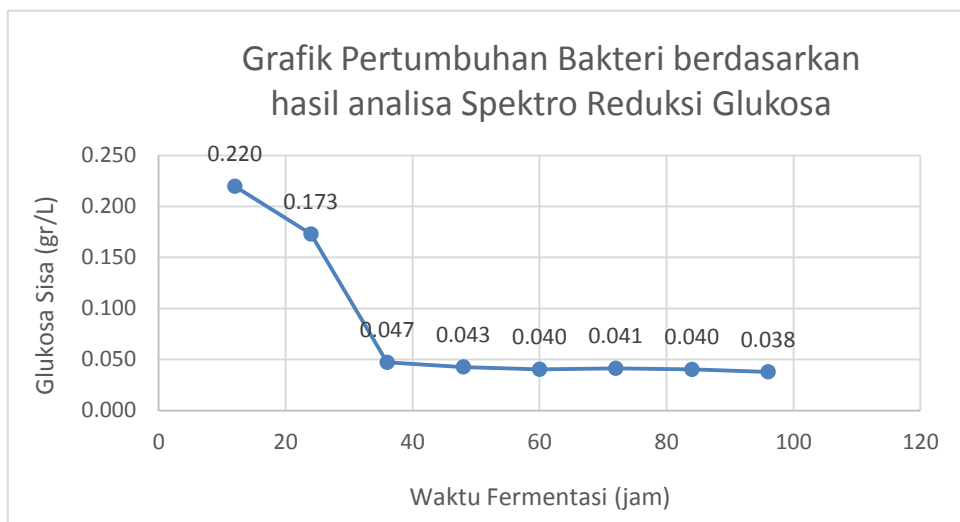
Grafik 4.2. Grafik permukaan respons Bobot Kering Sel terhadap sumber N dan Temperatur Fermentasi

#### 4.5. Hasil Laju Pertumbuhan Bakteri

Gambar 4.3. Grafik Hasil Pertumbuhan Bakteri berdasarkan Bobot Kering



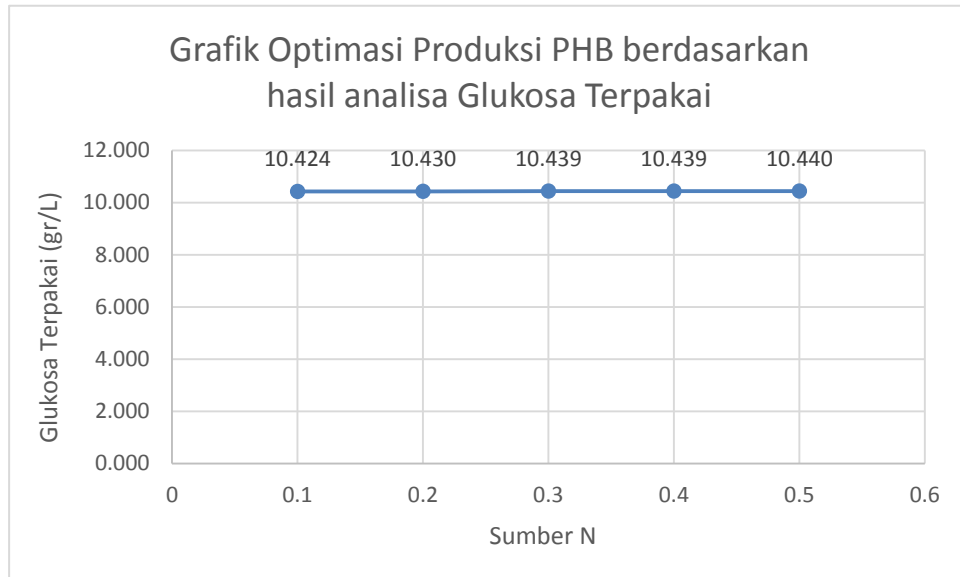
Gambar 4.4. Grafik Hasil Pertumbuhan Bakteri berdasarkan Reduksi Glukosa



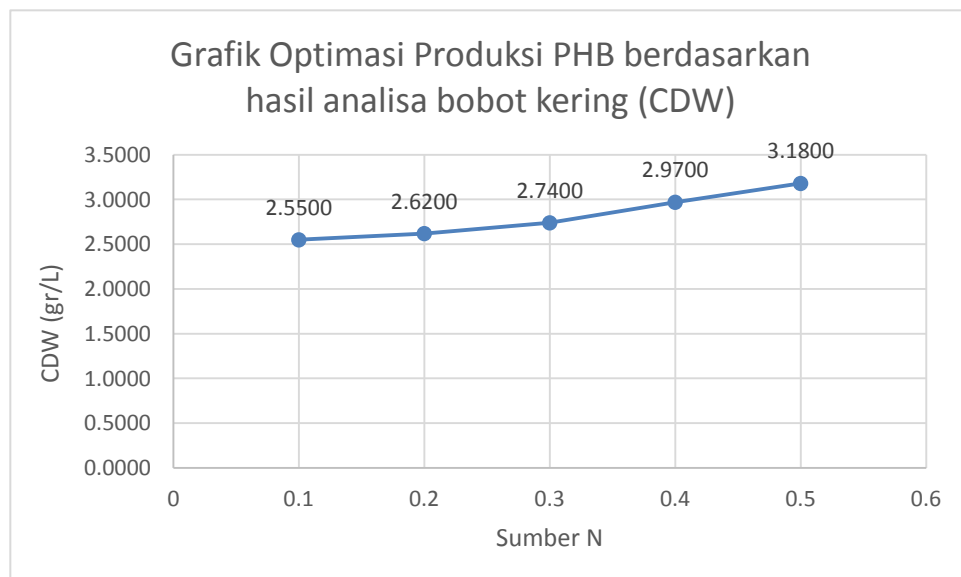
Hasil dari pemantauan pertumbuhan yang kami lakukan yaitu selama 24 jam ternyata pertumbuhan mikroorganisme dalam tahap lag, setelah itu dari 24 jam ke 48 jam mikroorganisme memasuki fase akselerasi. Selanjutnya dari 48 jam ke 72 jam mikroorganisme memasuki fase eksponensial, dan terakhir dari 72 jam ke 96 jam mikroorganisme memasuki fase stationer. Mungkin jika sehari lebih lama maka pertumbuhan mikroorganisme akan memasuki tahap eksponensial turun dan fase log death.

#### 4.6. Hasil pengujian Sampel PHB dengan Temperature Fermentasi 36<sup>0</sup>C

Gambar 4.5. Grafik Hasil Optimasi Produksi PHB Berdasarkan Glukosa Terpakai



Gambar 4.6. Grafik Hasil Optimasi Produksi PHB Berdasarkan Bobot Kering Sel



Tahap ini merupakan validasi proses dengan temperatur optimum yang didapatkan saat produksi PHB, dengan sumber nitrogen. Semakin tinggi konsentrasi sumber nitrogen yang digunakan, semakin tinggi pula kadar PHB yang dihasilkan.

Rasio C/N penting bagi proses kultivasi, karena akan mempengaruhi fase pertumbuhan mikroba. Mikroba akan tumbuh maksimal pada fase ekponensial apabila rasio C/N dalam keadaan seimbang, setelah fase ekponensial mikroba akan melakukan fase pertumbuhan stasioner. Pada fase stasioner ini PHA yang merupakan produk intraseluler yang dihasilkan oleh mikroba dalam proses metabolit sekunder akan mulai terbentuk dan terakumulasi selama fase pertumbuhan stasioner ini. Pemilihan rasio C/N diharapkan dapat mengetahui pada rasio mana pembentukan biomassa tertinggi dan pada rasio mana akumulasi produk tertinggi. Pada penelitian ini perbandingan rasio C/N yang digunakan adalah 1,5 gr : 0,1 gr, 1,5 gr : 0,3 gr, 1,5 gr : 0,5 gr.

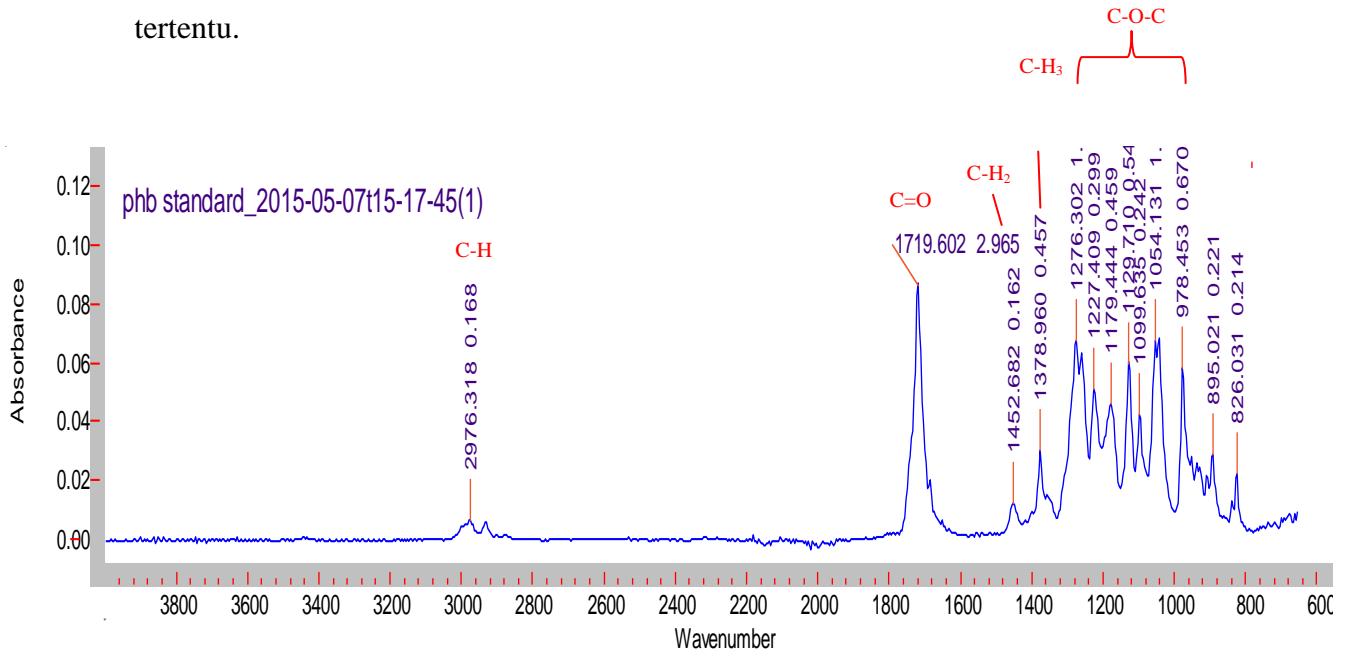
#### **4.7. Hasil Analisa FTIR Sampel PHB**

Analisa gugus fungsi PHB dilakukan dengan menggunakan *Fourier Transform Infra-Red Spectroscopy* (FTIR) dengan merek *AGILENT*. Menurut Nur (1989), inframerah merupakan salah satu jenis gelombang elektromagnetik dengan panjang gelombang 0,78 sampai 1000  $\mu\text{m}$  atau bilangan gelombang 12800 sampai 10  $\text{cm}^{-1}$ . Penggunaan inframerah yang paling banyak adalah pada daerah pertengahan dengan kisaran bilangan gelombang 4000 sampai 670  $\text{cm}^{-1}$ . Kegunaan yang paling penting adalah untuk identifikasi senyawa organik karena spektrumnya sangat kompleks yang terdiri dari banyak puncak. Spektrum inframerah dari senyawa organik mempunyai sifat fisik yang khas, artinya kemungkinan dua senyawa mempunyai spektrum sama adalah kecil sekali. Energi radiasi inframerah akan diabsorpsi oleh senyawa organik sehingga molekulnya akan mengalami rotasi atau vibrasi. Setiap ikatan kimia yang berbeda seperti C-C, C=C, C=O, O-H dan sebagainya mempunyai frekuensi vibrasi yang berbeda sehingga kemungkinan dua senyawa berbeda akan mempunyai absorpsi yang sama adalah kecil sekali. Hasil analisa gugus fungsi PHB dengan FTIR dapat dilihat pada Grafik 4.7 – 4.10.

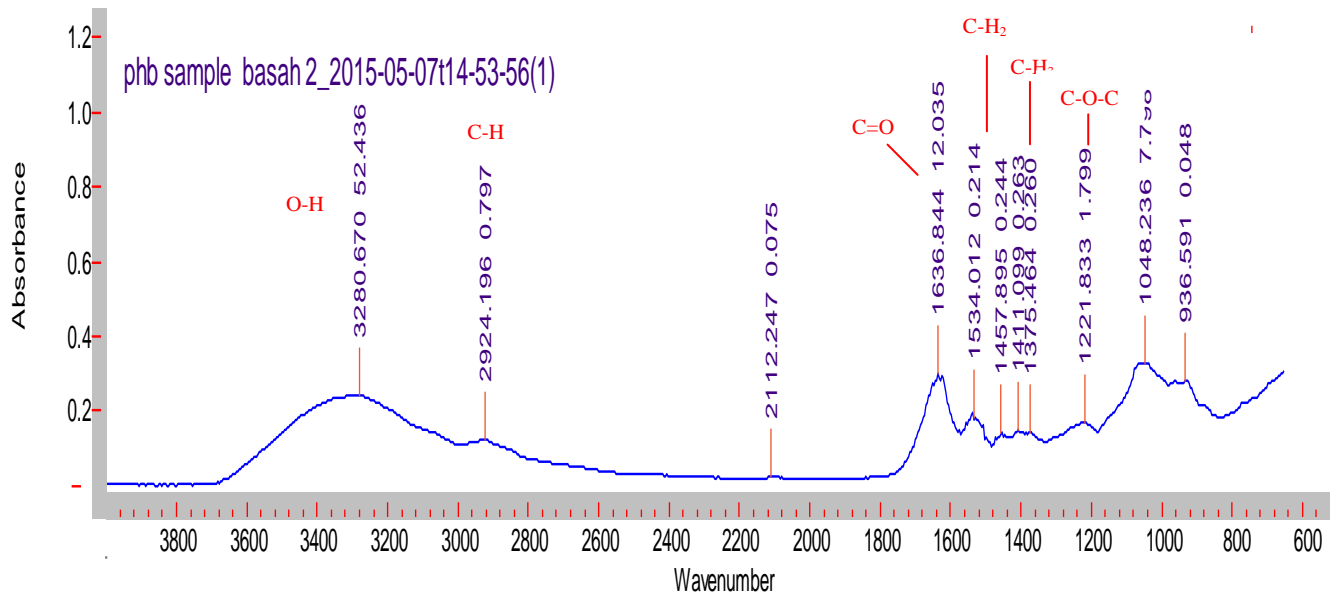
Beberapa *peak* (puncak absorpsi) yang muncul pada spektra FTIR PHB (Grafik 4.7 – 4.10) menunjukkan bahwa dalam PHB yang dianalisa terdapat lebih dari satu jenis ikatan (gugus fungsi). PHB merupakan suatu poliester yang

mempunyai beberapa gugus fungsi dominan seperti karbonil ester (C=O), ikatan polimerik -C-O-C-, -OH, -CH-, -CH<sub>2</sub>, dan -CH<sub>3</sub>.

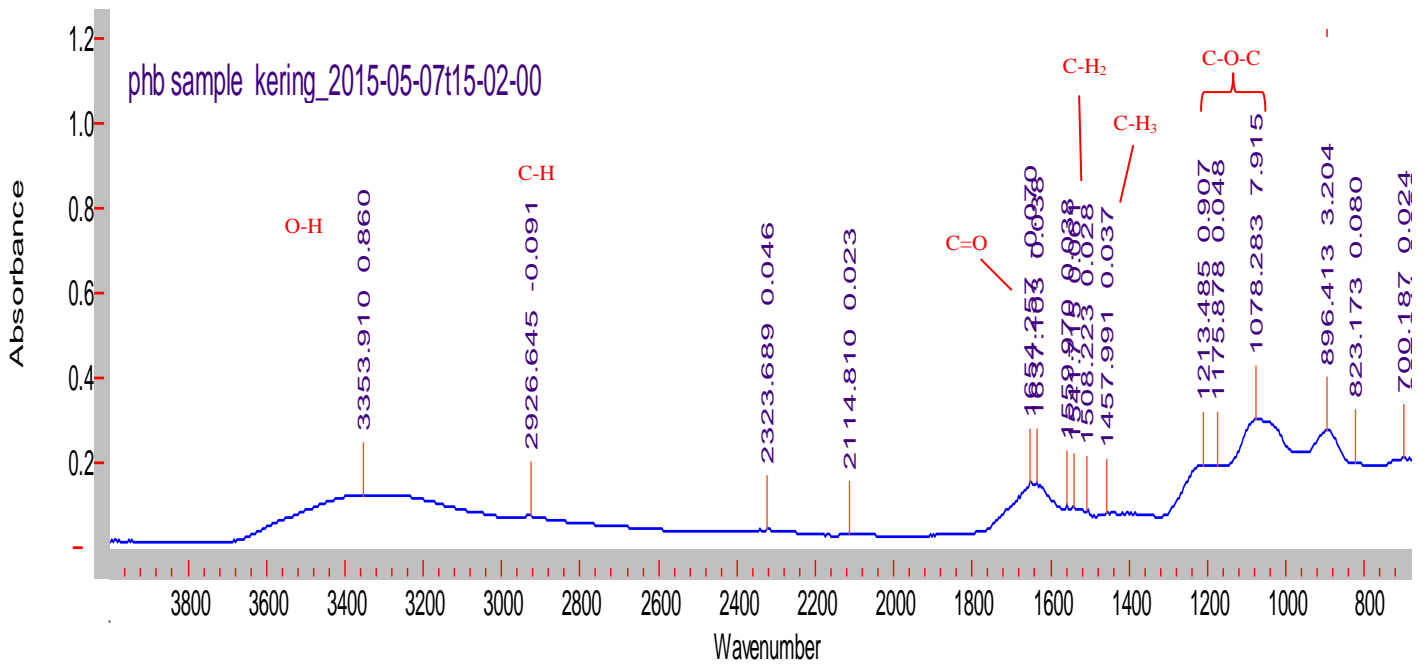
Identifikasi terhadap spektrum FTIR sampel PHB perlu dilakukan untuk mengetahui jenis gugus fungsi yang ada berdasarkan bilangan gelombang dimana suatu *peak* muncul. Tabel 4.8. menyajikan hasil identifikasi jenis-jenis gugus fungsi terkait dengan pita spektrum FTIR yang terbaca pada bilangan gelombang tertentu.



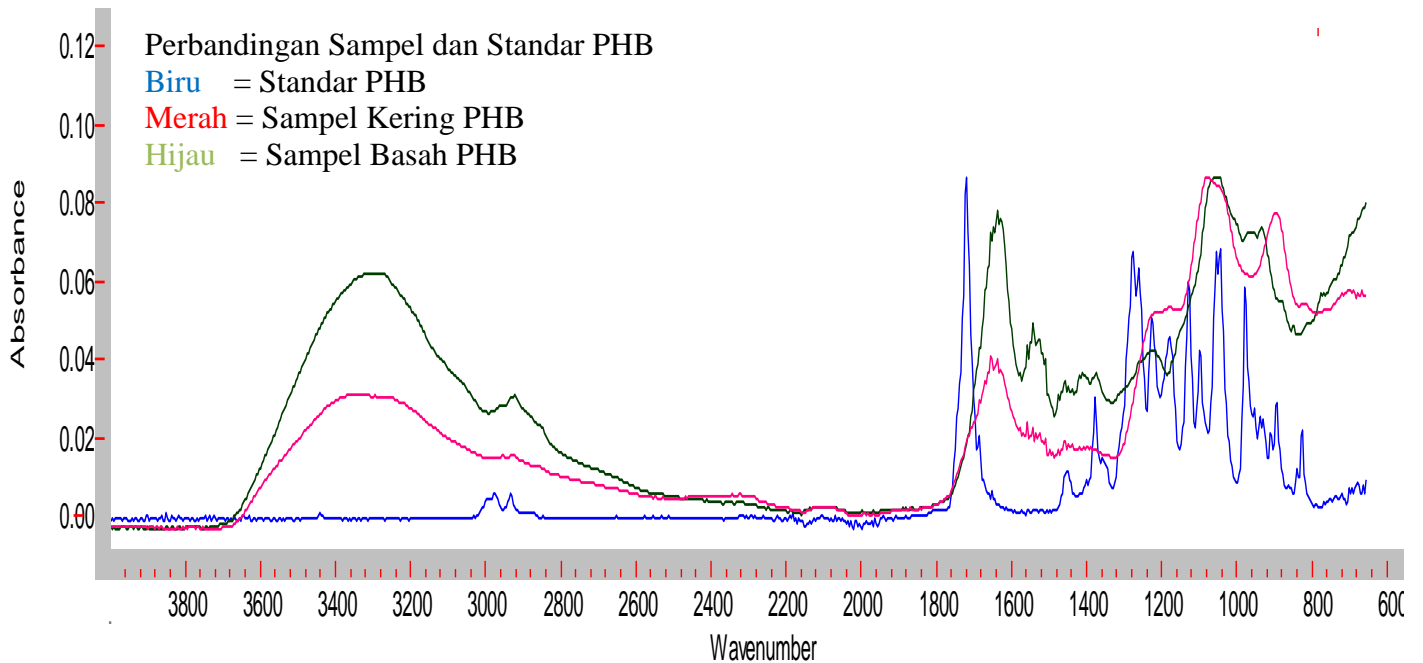
Grafik 4.7. Hasil FTIR Standar PHB



Grafik 4.8. Hasil FTIR Sampel Basah PHB



Grafik 4.9. Hasil FTIR Sampel Kering PHB



Grafik 4.10. Hasil FTIR Perbandingan Sampel dan Standar PHB

Tujuan dari analisa gugus fungsi adalah untuk mengetahui gugus fungsi yang ada pada molekul PHB. Hasil identifikasi gugus fungsi yang tersaji pada Tabel 4.9. menunjukkan bahwa semua gugus fungsi dominan dari molekul PHB muncul pada spektra FTIR standar dan sampel PHB. Gugus fungsi tersebut meliputi karbonil ester (C=O), ikatan polimerik C-O-C, -OH, CH, dan CH<sub>2</sub>. Tetapi pada spektra FTIR standar PHB menunjukkan bahwa *peak* gugus OH tidak terdeteksi. Keberadaan gugus OH pada molekul PHB diakibatkan karena pembuatan PHB dari supplier memang memiliki konsentrasi 99,9 % PHB. Oleh karena gugus OH sangat hal ini ditunjukkan dengan tidak munculnya *peak* pada bilangan gelombang untuk gugus OH (~3300 cm<sup>-1</sup>).

Tabel 4.9. Hasil Identifikasi FTIR sampel dan standar PHB

No	Standar PHB			Sampel Basah PHB			Sampel Kering PHB		
	Bilangan Gelombang (cm <sup>-1</sup> )	Intensitas	Identifikasi	Bilangan Gelombang (cm <sup>-1</sup> )	Intensitas	Identifikasi	Bilangan Gelombang (cm <sup>-1</sup> )	Intensitas	Identifikasi
1				3280,67	Sedang	OH Karboksilat	3353,91	Sedang	OH Karboksilat
2	2916,32*	Sedang	CH	2924,19*	Sedang	CH	2926,64*	Sedang	CH
3	1719,6*	Tajam	C=O ester	1636,84*	Sedang	C=O ester	1654,25 - 1637,1*	Sedang	C=O ester
4	1526,82*	Sedang	CH <sub>2</sub>	1534,01*	Sedang	CH <sub>2</sub>	1559,97 - 1508,22*	Sedang	CH <sub>2</sub>
5	1318,96*	Tajam	CH <sub>3</sub>	1457,89 - 1375,46*	Sedang	CH <sub>3</sub>	14,57,99*	Sedang	CH <sub>3</sub>
6	1216,30 - 1051,13*	Tajam	C-O-C Polimer	1221,83 - 1048,23*	Sedang	C-O-C Polimer	1213,48 - 1078,28*	Sedang	C-O-C Polimer
7	918,153 - 826,03*	Sedang	ttd	936,59*	Sedang	ttd	896,41 - 700,18*	Sedang	ttd

Catatan : \*Identifikasi didasarkan Nur (1985)

ttd = tidak diketahui

\* Gugus Fungsi PHB

## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **5.1 Kesimpulan**

Hasil Proses optimasi produksi PHB dari *Bacillus Cereus* yang optimal didapatkan pada kondisi temperatur 36<sup>0</sup>C dengan rasio C/N adalah 1,5 gr / 0,5 gr.

#### **5.2. Saran**

Perlu dilakukan Penelitian lebih lanjut tentang optimasi produksi PHB dengan Konsentrasi Sumber Karbon selain Glukosa, Konsentrasi Sumber Nutrisi Esensial selain Nitrogen dan Rasio C/N yang lain.

## DAFTAR PUSTAKA

Anonim. 2015. Kurva pertumbuhan Mikroorganisme. <http://www.belajarbiologi.com/2014/04/kurva-pertumbuhan-mikroorganisme.html> [08 Juni 2015]

Anonim. 2015. Kurva pertumbuhan Bakteri. <https://jujubandung.wordpress.com/2012/06/05/kurva-pertumbuhan-bakteri/> [08 Juni 2015]

Anonim. 2015. Gula Reduksi. <http://bisakimia.com/2012/11/24/gula-reduksi-dan-metode-deteksinya/>

Bakti, Chandra Paska. 2012. Optimasi Produksi Enzim Selulase dari *Bacillus* sp. BPPT CC RK2 dengan variasi pH dan Suhu menggunakan *Response Surface Methodology*. Universitas Indonesia.

Braunegg, G., Sonnleitner, B., Lafferty, R.M. 1978. A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in microbial biomass. *Eur. J. Appl. Microbiol.* 6, 29-37.

Braunegg, G., Lefebvre, G., and Genser, K. 1998. *Polyhydroxyalkanoates, Biopolyesters from Renewable Resources: Physiological and Engineering Aspects. Journal of Biotechnology.* 65, 127-161.

D, Radhika., A,G, Murugesan. 2012. *Bioproduction, statistical optimization and characterization of microbial plastic (poly 3-hydroxy butyrate) employing various hydrolysates of water hyacinth (Eichhornia crassipes) as sole carbon source.* *Bioresource. Technology.* 121, 83-92.

Dietrich, Diane., Illman, Barbara., Crooks, Casey. 2013. *Differential sensitivity of polyhydroxyalkanoate producing bacteria to fermentation inhibitors and comparison of polyhydroxybutyrate production from Burkholderia cepacia and pseudomonas pseudoflava.* *Biomedcentral.* 6:219.

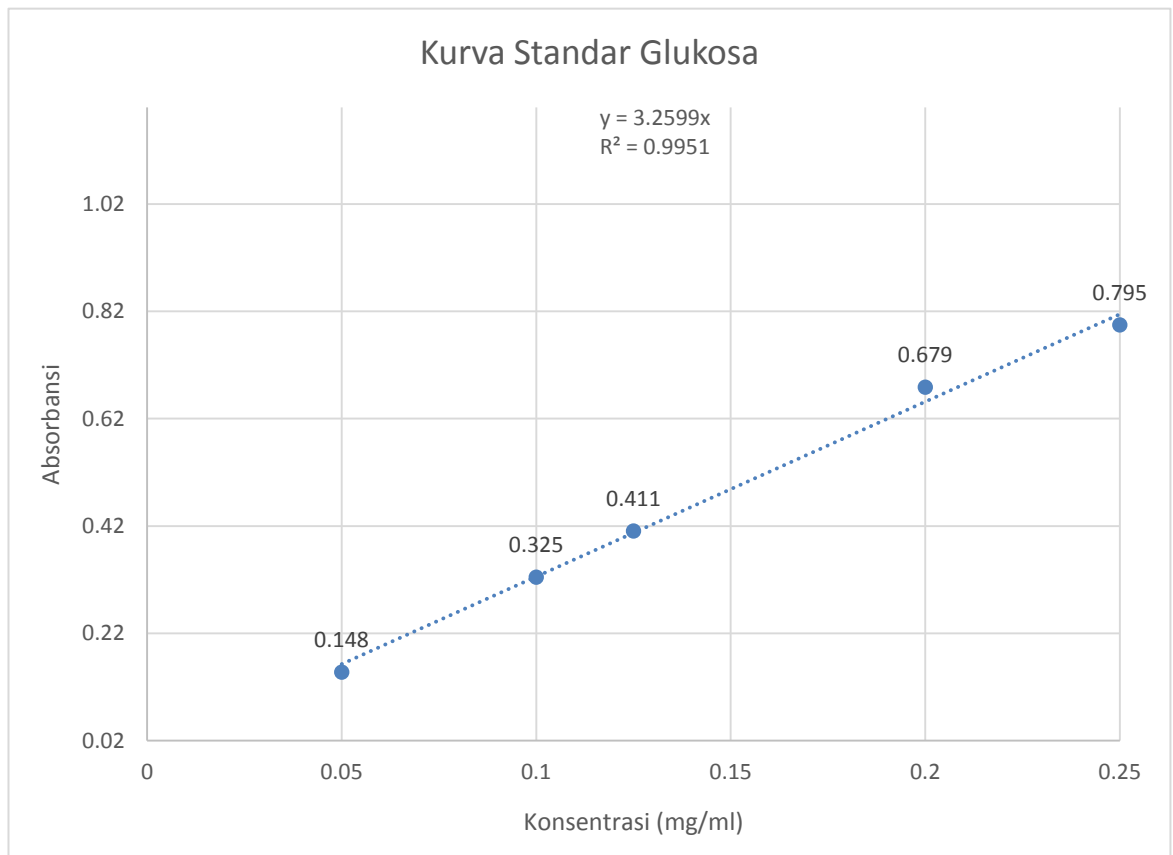
- Fardiaz, S. 1989. Mikrobiologi Pangan. IPB, Bogor.
- Gupte, S. 1990. Mikrobiologi Dasar. Binarupa Aksara, Jakarta.
- Hadioetomo, R. S. 1993. Mikrobiologi Dasar dalam Praktek. Gramedia, Jakarta.
- Juari. 2006. Pembuatan dan karakterisasi Bioplastik dari Poly-3-Hidroksialkanoat (PHA) yang dihasilkan *Ralstonia Eutropha* pada Hidrolisat pati sagu dengan penambahan Dimetil Ftalat (DMF). Institut Pertanian Bogor
- Supono., Hutabarat, Johannes., Prayitno, Slamet Budi., Darmanto, YS. 2013. *The effect of different C:N and C:P ratio of Media on the Content of polyhydroxybutyrate in biofloc inoculated with bacterium Bacillus cereus*. Journal of coastal Development. Vol 16 : 114-120
- Lim,D. 1998. *Microbiology*. McGraw-hill book, New york.
- Nur, M.A. 1989. Spektroskopi. Pusat Antar Universitas-Institut Pertanian Bogor (PAU-IPB), Bogor.
- Schlegel, Hans G. 1994. *Mikrobiologi Umum*. UGM, Yogyakarta.
- Sukri, Aidil., 2011. Pra Rancangan Pabrik Pembuatan Polihidroksibutirat (PHB) dari Glukosa Pada *Alcaligenes Eutrophus* dengan Kapasitas 5000 Ton/Tahun. USU Repository
- Y, Zhang., W, Sun., H, Wang., A, Geng. 2013. *Polyhydroxybutyrate production from oil palm empty fruit bunch using Bacillus Megaterium R11*. Bioresource. Technology. 147, 307-314.

## LAMPIRAN

### a. Absorbansi Larutan Standar Pengenceran Glukosa

Pengenceran	Konsentrasi ( mg/ml )	Absorbansi
200x	0,05	0,148
100x	0,1	0,325
80x	0,125	0,411
50x	0,2	0,679
40x	0,25	0,795

### b. Kurva Standar Glukosa



Tahap	Standar & Suhu Fermentasi (Tanpa Pengenceran)	Absorbansi	Rata-rata Absorbansi	Standar & Suhu Fermentasi (Pengenceran 50x)	Absorbansi	Rata-rata Absorbansi	Kons. Glukosa	Glukosa yang digunakan
Pra Fermentasi	Tanpa Pengenceran a	1,145	1,028	Pengenceran a	0,679	0,684	10,483	0
	Tanpa Pengenceran b	0,910		Pengenceran b	0,688			
1	12 a (35 <sup>0</sup> C)	0,091	0,135	12 a (35 <sup>0</sup> C)	-	-	0,041	10,442
	12 b (35 <sup>0</sup> C)	0,178		12 b (35 <sup>0</sup> C)	-			
2	4 a (40 <sup>0</sup> C)	0,141	0,123	4 a (40 <sup>0</sup> C)	-	-	0,038	10,445
	4 b (40 <sup>0</sup> C)	0,104		4 b (40 <sup>0</sup> C)	-			
	11 a (40 <sup>0</sup> C)	0,120	0,117	11 a (40 <sup>0</sup> C)	-	-	0,036	10,447
	11 b (40 <sup>0</sup> C)	0,113		11 b (40 <sup>0</sup> C)	-			
3	1 a (50 <sup>0</sup> C)	1,098	1,106	1 a (50 <sup>0</sup> C)	0,565	0,576	8,835	1,648
	1 b (50 <sup>0</sup> C)	1,113		1 b (50 <sup>0</sup> C)	0,661			
	2 a (50 <sup>0</sup> C)	1,639	1,659	2 a (50 <sup>0</sup> C)	0,502	0,525	8,052	2,431
	2 b (50 <sup>0</sup> C)	1,678		2 b (50 <sup>0</sup> C)	0,548			
	6 a (50 <sup>0</sup> C)	1,195	1,235	6 a (50 <sup>0</sup> C)	0,599	0,612	9,379	1,104
	6 b (50 <sup>0</sup> C)	1,274		6 b (50 <sup>0</sup> C)	0,624			
	7 a (50 <sup>0</sup> C)	1,587	1,570	7 a (50 <sup>0</sup> C)	0,612	0,646	9,908	0,575
	7 b (50 <sup>0</sup> C)	1,552		7 b (50 <sup>0</sup> C)	0,680			
	9 a (50 <sup>0</sup> C)	1,219	1,241	9 a (50 <sup>0</sup> C)	0,666	0,624	9,563	0,920
	9 b (50 <sup>0</sup> C)	1,263		9 b (50 <sup>0</sup> C)	0,581			
	10 a (50 <sup>0</sup> C)	1,501	1,491	10 a (50 <sup>0</sup> C)	0,629	0,633	9,709	0,774
	10 b (50 <sup>0</sup> C)	1,481		10 b (50 <sup>0</sup> C)	0,637			
	13 a (50 <sup>0</sup> C)	1,323	1,402	13 a (50 <sup>0</sup> C)	0,600	0,610	9,356	1,127
	13 b (50 <sup>0</sup> C)	1,480		13 b (50 <sup>0</sup> C)	0,620			
4	5 a (60 <sup>0</sup> C)	1,431	1,407	5 a (60 <sup>0</sup> C)	0,637	0,660	10,115	0,368
	5 b (60 <sup>0</sup> C)	1,382		5 b (60 <sup>0</sup> C)	0,682			
	8 a (60 <sup>0</sup> C)	2,165	2,092	8 a (60 <sup>0</sup> C)	0,606	0,617	9,463	1,020
	8 b (60 <sup>0</sup> C)	2,018		8 b (60 <sup>0</sup> C)	0,628			
5	3 a (64 <sup>0</sup> C)	1,220	1,250	3 a (64 <sup>0</sup> C)	0,615	0,630	9,655	0,828
	3 b (64 <sup>0</sup> C)	1,279		3 b (64 <sup>0</sup> C)	0,644			

c. Hasil Spektro Glukosa Terpakai

\*Rumus Perhitungan Konsentrasi Glukosa

Absorbansi yang diambil berkisar antara 0 – 1 .

Berdasarkan rumus Kurva standard

$$Y=3,2599$$

$Y = X / 3,2599$  → Tanpa pengenceran

$Y = (X / 3,2599) \times 50$  → Dengan Pengenceran 50x

d. Hasil Analisa Bobot Kering Sampel PHB

Tahap	Std	Bobot Awal	Bobot Akhir	Bobot Kering	Rata-Rata	Rata-Rata Standard (mg/10 ml)	Rata-Rata Standard (mg/L)
1	12	19,8666	19,8968	0,0302	0,0331	0,0335	3,3467
		20,3915	20,4229	0,0314			
		19,5407	19,5783	0,0376			
	12	20,8194	20,8514	0,0320	0,0339		
		20,5246	20,5565	0,0319			
		20,0450	20,0827	0,0377			
2	4	20,2661	20,2832	0,0171	0,0159	0,0182	1,8250
		20,5306	20,5453	0,0147			
	4	20,4141	20,4256	0,0115	0,0206		
		20,8140	20,8437	0,0297			
	11	20,2385	20,2655	0,0270	0,0193	0,0289	2,8925
		20,3400	20,3516	0,0116			
	11	20,4983	20,5202	0,0219	0,0385		
		19,9738	20,0290	0,0552			
3	1	20,5693	20,5840	0,0147	0,0185	0,0171	1,7075
		20,5559	20,5782	0,0223			
	1	20,4416	20,4713	0,0297	0,0156		
		20,6582	20,6598	0,0016			
	2	20,0442	20,0523	0,0081	0,0098	0,0105	1,0475
		20,3073	20,3189	0,0116			
	2	20,4029	20,4138	0,0109	0,0111		
		20,5156	20,5269	0,0113			
	6	20,7037	20,7138	0,0101	0,0082	0,0111	1,1075
		20,2348	20,2411	0,0063			
	6	20,4949	20,5118	0,0169	0,0139		
		20,0649	20,0759	0,0110			
	7	20,4046	20,4080	0,0034	0,0104	0,0113	1,1275
		20,3290	20,3463	0,0173			
7	20,2520	20,2593	0,0073	0,0122			
	20,8421	20,8592	0,0171				

Tahap	Std	Bobot Awal	Bobot Akhir	Bobot Kering	Rata-Rata	Rata-Rata Standard (mg/10 ml)	Rata-Rata Standard (mg/L)
3	9	19,7564	19,7594	0,0030	0,0036	0,0050	0,5025
		20,4013	20,4055	0,0042			
	9	20,2028	20,2108	0,0080	0,0064		
		20,6369	20,6418	0,0049			
	10	20,5446	20,5488	0,0042	0,0044		
		20,4048	20,4094	0,0046			
	10	20,0695	20,0804	0,0109	0,0105		
		20,1106	20,1208	0,0102			
	13	20,8995	20,9046	0,0051	0,0106		
		20,3128	20,3288	0,0160			
13	20,1763	20,1775	0,0012	0,0009			
	20,7485	20,7492	0,0007				
4	5	20,8006	20,8012	0,0006	0,0007	0,0011	0,1150
		20,1028	20,1036	0,0008			
	5	20,3819	20,3828	0,0009	0,0016		
		20,1142	20,1165	0,0023			
	8	20,0888	20,0897	0,0009	0,0011		
		20,3756	20,3768	0,0012			
8	20,9348	20,9352	0,0004	0,0007			
	19,7936	19,7947	0,0011				
5	3	20,8703	20,8717	0,0014	0,0012	0,0010	0,0983
		20,4153	20,4169	0,0016			
		20,9919	20,9924	0,0005			
	3	20,5789	20,5796	0,0007	0,0008		
		19,9096	19,9104	0,0008			
		21,0196	21,0205	0,0009			

e. Hasil analisa spektro dan bobot kering sampel laju pertumbuhan bakteri

Waktu Sampling	Hasil								
	Spektro				Bobot Kering (CDW)				
	Tanpa Pengenceran	Rata-Rata	Kons. Glukosa	Glukosa yang digunakan	Bobot Kosong	Bobot Isi	Bobot Kering	Rata-Rata (mg/ml)	Rata-Rata (gr/L)
12 Jam	0,707	0,716	0,220	10,263	18,2280	18,2346	0,0066	0,0070	0,7050
	0,725				17,5705	17,5780	0,0075		
24 Jam	0,575	0,564	0,173	10,310	17,7201	17,7326	0,0125	0,0122	1,2200
	0,552				18,1587	18,1706	0,0119		
36 Jam	0,155	0,154	0,047	10,436	18,3648	18,3872	0,0224	0,0224	2,2400
	0,152				18,2237	18,2461	0,0224		
48 Jam	0,138	0,139	0,043	10,440	18,0352	18,0613	0,0261	0,0257	2,5650
	0,140				18,3496	18,3748	0,0252		
60 Jam	0,130	0,132	0,040	10,443	17,9667	17,9936	0,0269	0,0270	2,7000
	0,133				18,0421	18,0692	0,0271		
72 Jam	0,133	0,135	0,041	10,442	17,9610	17,9914	0,0304	0,0317	3,1700
	0,136				17,8526	17,8856	0,0330		
84 Jam	0,130	0,131	0,040	10,443	18,0070	18,0433	0,0363	0,0364	3,6400
	0,132				18,5877	18,6242	0,0365		
96 Jam	0,126	0,124	0,038	10,445	17,9281	17,9698	0,0417	0,0372	3,7150
	0,121				17,8967	17,9293	0,0326		

f. Hasil Analisa Spektro dan bobot kering sampel Optimasi produksi PHB

Sumber N	Hasil						
	Spektro			Bobot Kering (CDW)			
	Tanpa Pengenceran	Kons. Glukosa	Glukosa yang digunakan	Bobot Kosong	Bobot Isi	Bobot Kering (mg/ml)	Bobot Kering (gr/L)
0,1	0,091	0,028	10,424	17,6161	17,6416	0,0255	2,5500
0,2	0,072	0,022	10,430	17,9374	17,9636	0,0262	2,6200
0,3	0,044	0,013	10,439	17,6933	17,7207	0,0274	2,7400
0,4	0,043	0,013	10,439	17,8518	17,8815	0,0297	2,9700
0,5	0,040	0,012	10,440	18,0080	18,0398	0,0318	3,1800

g. Data Analisa *Response Surface Methodology*

RUN	Jumlah Nitrogen	Temperatur Fermentasi	Kadar Glukosa	Bobot Kering
1	0,5828	50	1,644	1,7075
2	0,3	50	2,424	1,0475
3	0,3	64,1421	0,826	0,0983
4	0,1	40	10,415	1,8250
5	0,5	60	0,367	0,1150
6	0,3	50	1,101	1,1075
7	0,3	50	0,574	1,1275
8	0,1	60	1,017	0,0900
9	0,3	50	0,918	0,5025
10	0,01715	50	0,773	0,7475
11	0,5	40	10,416	2,8925
12	0,3	35,8579	10,411	3,3467
13	0,3	50	1,124	0,5750

h. Gambar proses penelitian

	<p>Proses Fermentasi</p>
	<p>Hasil Fermentasi</p>
	<p>Hasil Fermentasi di sentri fuge</p>
	<p>Didapatkan massa PHB</p>



Sisa glukosa di tambahkan DNS dan dipanaskan  $90^{\circ}\text{C}$  selama 20 menit



Lakukan uji spektrofotometer