



# Pembuatan Asam Laktat dari Selulosa oleh Bakteri *Lactobacillus delbrueckii* dengan Selulase dari Bakteri *Bacillus subtilis* dan *Bacillus circulans*

Yanty Maryanty\*, Fandi Lintang Wahyu Saputra, Robby Prasetyo

Jurusan Teknik Kimia, Politeknik Negeri Malang, Jl. Soekarno Hatta 9 Malang

\*E-mail: yanty.maryanty@polinema.ac.id

## ABSTRAK

Bakteri asam laktat memanfaatkan gula sebagai sumber energi, pertumbuhan, dan menghasilkan metabolit berupa asam laktat selama proses fermentasi. Gula berupa monomer glukosa dapat diperoleh dari hidrolisis atau pemutusan ikatan pada selulosa. Penelitian ini bertujuan untuk memproduksi asam laktat dari media selulosa menggunakan metode *Simultaneous Saccharification and Fermentation* (SSF). SSF diharapkan bermanfaat untuk pengembangan produksi asam laktat yang efektif dari limbah lignoselulosa. Pada tahap pertama, selulosa digunakan oleh *Bacillus subtilis* dan *Bacillus circulans* untuk memproduksi enzim selulase. Tahap kedua, enzim selulase kemudian digunakan untuk sakarifikasi selulosa menghasilkan glukosa. Glukosa yang diperoleh difermentasi oleh *Lactobacillus delbrueckii* menghasilkan asam laktat. Proses pada tahap kedua ini terjadi secara simultan, setelah itu proses fermentasinya digunakan metode SSF, dengan variasi konsentrasi enzim selulase untuk proses sakarifikasi berasal dari *Bacillus subtilis* dan *Bacillus circulans*. Proses awal pembuatan enzim selulase menggunakan bakteri *Bacillus subtilis* dan *Bacillus circulans* sebagai variabel dan waktu inkubasi selama 84 jam. Enzim selulase selanjutnya digunakan untuk mendegradasi media selulosa dalam proses SSF menjadi glukosa yang selanjutnya akan difermentasi oleh *Lactobacillus delbrueckii*. Pada proses SSF dengan inokulum *Bacillus circulans* diperoleh asam laktat tertinggi pada kadar enzim selulase 10% yaitu 1,29% dan dengan inokulum *Bacillus subtilis* pada kadar enzim selulase 5% yaitu 1,24%.

**Kata kunci:** Asam laktat, *Bacillus circulans*, *Bacillus subtilis*, selulosa, selulase.

## ABSTRACT

Lactic acid bacteria use sugar as an energy source, growth, and produce metabolites in the form of lactic acid during the fermentation process. This research aimed to make lactic acid from cellulose used Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF). Cellulose is composed of glucose monomers. This method is expected to be useful for the development of significant lactic acid production from lignocellulosic waste. In the first stage, cellulose was used by *Bacillus subtilis* and *Bacillus circulans* to produce cellulase enzymes. In the second stage, the cellulase enzyme is then used to saccharify cellulose to produce glucose. The glucose fermented by *Lactobacillus delbrueckii* to produce lactic acid. The fermentation process uses the SSF method with various concentrations of cellulase enzymes. The initial process by making cellulase enzymes first used the bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus circulans* as variables, and the incubation time was 84 hours. The cellulase enzyme is then used to degrade cellulose media in the SSF process into glucose, which will then be fermented by *Lactobacillus delbrueckii*. In the SSF process with *Bacillus circulans* inoculum, the highest lactic acid was obtained at 10% cellulase enzyme levels, amounting to 1.29%, and with *Bacillus subtilis* inoculums at 5% cellulase enzyme levels, amounting to 1.24%.

**Keywords:** *Bacillus circulans*, *Bacillus subtilis*, cellulase, cellulose, lactic acid.

## 1. PENDAHULUAN

Asam laktat, secara alami mengandung asam organik yang banyak manfaatnya. Pada saat ini, penelitian mengenai asam laktat

berkembang semakin pesat karena asam laktat memiliki potensi yang besar dalam pemanfaatannya pada berbagai aspek pada industri pangan maupun non-pangan seperti

bahan pengawet pada industri pangan, pakan ternak (*feedstock*). Sementara untuk industri non-pangan digunakan pada industri farmasi, industri tekstil maupun bahan kimia untuk industri kosmetik.

Salah satu pemanfaatan asam laktat yaitu dalam bentuk polimernya menjadi bahan baku plastik ramah lingkungan yang dapat didegradasi yaitu PLA (*Poly Lactic Acid*)/poli asam laktat [1,2]. Dikarenakan sifat yang unik dari PLA, asam laktat memiliki potensi menjadi bahan pengganti untuk digunakan di pabrik plastik *degradable* dan menjadi komoditas yang sangat besar sebagai bahan kimia antara. Asam laktat sendiri secara alami juga mengandung dua isomer optik, D-(-)-asam laktat dan L-(+)-asam laktat. Akan tetapi, D-asam laktat tidak dapat dicerna oleh tubuh manusia atau dalam kata lain berbahaya untuk dikonsumsi, berbeda dengan L-asam laktat yang dapat dicerna tubuh manusia dan banyak digunakan dalam industri makanan dan farmasi [3].

Asam laktat dapat diproduksi melalui sintesis kimia maupun proses fermentasi. Proses sintesis asam laktat terjadi melalui hidrolisa laktonitril yang berasal dari asetaldehida dan hidrogen sianida. Sementara itu, pembentukan asam laktat secara biologis dapat dihasilkan satu isomer atau campuran isomer asam laktat yang berbeda tergantung oleh mikroorganisme, substrat, dan kondisi pertumbuhan yang digunakan. Adapun pembentukan asam laktat melalui proses secara kimia hanya dapat menghasilkan campuran dari kedua isomer asam laktat [4]. Asam laktat secara biologis dihasilkan oleh bakteri asam laktat (BAL). BAL membutuhkan gula untuk aktivitas metabolisme dan perkembangbiakan sel dengan salah satu produk metabolik sekunder berupa asam laktat.

Gula berupa glukosa merupakan penyusun utama dari pati maupun polimer selulosa. Untuk menghindari persaingan dengan sektor pangan, sumber gula dari selulosa sangat potensial untuk digunakan BAL dalam menghasilkan asam laktat. Kandungan selulosa banyak terdapat pada limbah

biomassa lignoselulosa tanaman. Pemanfaatan limbah lignoselulosa saat ini dikembangkan sebagai alternatif pengganti pembuatan asam laktat melalui sintesis kimia dibanding melalui cara biologis.

Metode SSF merupakan salah satu biokonversi material karbohidrat yang lebih efektif karena pada proses ini penggunaan enzim penghidrolisis substrat karbohidrat dan fermentasi turunan glukosa hasil hidrolisis oleh mikroba terjadi dalam satu tahapan proses. SSF ini telah digunakan untuk memproduksi asam laktat dari bahan dasar pati dengan bakteri asam laktat diantaranya spesies *Lactobacillus* dan *Lactococcus* [5]. Namun metode SSF belum banyak diterapkan untuk biokonversi selulosa murni menjadi asam laktat.

Keberhasilan proses fermentasi sangat dipengaruhi oleh keberhasilan dalam mengoptimalkan faktor-faktor dari pertumbuhan mikroba yang diinginkan. Faktor-faktor tersebut akan memberikan kondisi yang berbeda untuk setiap mikroba sesuai dengan lingkungan hidupnya masing-masing sehingga mempengaruhi kinetika fermentasinya [6]. Perbedaan bahan baku sumber glukosa menyebabkan perbedaan adaptasi mikroorganisme. Hal tersebut dapat diamati salahsatunya dengan kurva pertumbuhan yang merupakan bagian penting dari suatu penelitian karena dapat menggambarkan karakteristik kolonisasi bakteri [7].

Penelitian ini dilakukan dalam upaya pemanfaatan sumber gula dari biomassa lignoselulosa untuk menghasilkan asam laktat. *Bacillus subtilis* dan *Bacillus circulans* dipilih untuk menghasilkan enzim selulase. Selulase digunakan untuk memecah selulosa dari biomassa lignoselulosa menjadi monomer glukosa. Glukosa yang dihasilkan selanjutnya dikonversi menjadi asam laktat oleh bakteri asam laktat *Lactobacillus delbrueckii*. Produksi asam laktat ini dilakukan secara simultan menggunakan metode SSF. Penelitian ini juga dilakukan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi *crude* selulase pada pembentukan asam

laktat. Hasil penelitian ini diharapkan menjadi salah satu alternatif produksi asam laktat yang diproduksi dari limbah lignoselulosa, sehingga dapat mengurangi pemakaian sumber pati yang merupakan salah satu bahan pangan manusia.

## 2. METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan melalui metoda eksperimental yang meliputi beberapa tahap berkesinambungan. Dalam proses penelitian ini dibutuhkan alat - alat antara lain *incubator shaker*, *autoclave*, jarum ose, timbangan analitik, pH meter, *Erlenmeyer*, dan peralatan titrasi, Spektrofotometer UV-Vis.

Sedangkan bahan-bahan yang dibutuhkan dalam proses ini antara lain *Bacillus subtilis*, *Bacillus circulans*, *Lactobacillus delbrueckii*, media *Nutrient Agar* (NA) (Merck), media *de Man Rogosa Sharpe* agar (MRS) (Oxoid), Nutient Broth (NB), Hidroksiopropil Metil Selulosa (Hpmc), Buffer Sitrat-fosfat pH 5, Kertas Indikator pH universal, air demineralisasi steril, DNS (Himedia), dan larutan induk glukosa.

Tahapan-tahapan yang dilakukan pada proses ini dibagi menjadi beberapa tahap.

### 2.1. PEREMAJAAN STRAIN *Bacillus subtilis* DAN *Bacillus circulans*

Pembuatan media pada percobaan ini dengan menggunakan NA, dengan cara melarutkan NA instan sebanyak 20 gram ke dalam erlenmeyer dan menambahkan 1000 mL aquades, memanaskannya diatas hot plate diikuti oleh pengadukan. Setelah larutan NA homogen, disterilisasi dengan autoclave. Larutan NA kemudian didinginkan dan dimiringkan dalam tabung reaksi. Setelah dingin, diinokulasi dengan *Bacillus subtilis*, *Bacillus circulans*, dan *Lactobacillus delbrueckii* lalu diinkubasi selama lebih kurang 24 jam.

### 2.2. PEMBUATAN INOKULUM CAIRAN

Sebanyak 8 gram NB dilarutkan dalam 1000 mL akuades. Disterilisasi dalam autoclave selama 30 menit pada suhu 121°C. *Bacillus*

*subtilis*, *Bacillus circulans*, dan *Lactobacillus delbrueckii* dari agar miring ditambahkan sebanyak 1 ose ke dalam NB yang sudah disterilisasi. Kemudian diinkubasi pada rotary *shaking incubator* selama 24 jam pada suhu 37°C dan kecepatan agitasi 150 rpm.

### 2.3. PEMBUATAN KURVA PERTUMBUHAN

Pembuatan kurva standar dan kurva pertumbuhan *Bacillus subtilis* dan *Bacillus circulans* dilakukan dengan menggunakan medium NB. Sebelum pembuatan kurva standar dan kurva pertumbuhan, perlu dilakukan aktivasi terhadap isolat bakteri yang digunakan. Pertama 10 mL dalam tabung reaksi diinokulasi satu ose kultur kerja, dinkubasi 24 jam pada suhu 37°C. Aktivasi kedua yaitu menginokulasi 90 mL NB dengan 10 mL kultur pertama. Aktivasi ketiga dilakukan dengan memindahkan 25 mL dari tabung kedua kedalam Erlenmeyer ukuran 500mL isi 225 mL NB dan diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah diinkubasi, inokulum dianalisa terlebih dahulu dengan spektrofotometri untuk menyamakan optikal densitinya untuk kurva pertumbuhan. Pada pembuatan kurva pertumbuhan ini, bakteri ditumbuhkan pada media selulosa dan dianalisa menggunakan spektrofotometri dengan interval sampling waktu pertumbuhan setiap 12 jam selama 120 jam [8], dengan beberapa modifikasi.

### 2.4. UJI AKTIVITAS ENZIM SELULASE

Aktivitas enzim ditentukan menggunakan metode DNS yang dimodifikasi. Suspensi sampel bakteri disentrifugasi pada kecepatan 10000 rpm selama 5 menit. Supernatan yang merupakan ekstrak enzim kasar diuji aktivitas enzimnya. Sebanyak 1,8 ml substrat (1% selulosa CM-Cellulose (Sigma)) ditambah dengan 0,2 ml enzim ekstrak kasar, dikocok kuat dengan vortex, selanjutnya diinkubasi 30 menit pada suhu 50°C, aktivitas enzim dihentikan pada air mendidih selama 5 menit. Setelah itu, dari

larutan tersebut diambil sebanyak 1 ml dan ditambah dengan 1 ml DNS, dipanaskan di air mendidih selama 5-10 menit. Absorbansi diukur pada  $\lambda$  540 nm menggunakan spektrofotometer. Perlakuan kontrol dan blanko dilakukan secara bersamaan dengan metode dan tahapan yang sama pada pengujian sampel. Kontrol merupakan enzim yang telah diinaktivasi terlebih dahulu direaksikan dengan substrat, sedangkan blanko tidak menggunakan enzim melainkan menggunakan buffer sitrat-fosfat pH 5 yang direaksikan dengan substrat. CMC, Avicel, Selobiosa merupakan substrat yang digunakan untuk melihat masing-masing aktivitas dari endoglukanase, eksoglukanase dan selobiose, berturut-turut. endoglukanase, eksoglukanase dan selobiose merupakan jenis dari enzim selulase. Aktivitas enzim selulase diukur pada setiap waktu sampling sehingga diketahui waktu optimum produksi enzim selulase [9-12]. Metode DNS dapat mengukur kadar gula pereduksi dalam hal ini glukosa. Semakin banyak glukosa yang terbentuk karena adanya aktivitas selulase menghidrolisis selulosa, maka semakin besar aktivitas selulase.

### 2.5. PROSES SSF

Tahap selanjutnya adalah proses fermentasi dengan menggunakan metode SSF. Fermentasi ini menggunakan hasil sakarifikasi selulosa dengan enzim selulase dengan berbagai variasi yaitu 5%, 7,5%, 10%, 12,5%, dan 15% pada temperatur ruang (28°C) selama 0-5 hari dengan media selulosa. Sedangkan proses fermentasi hasil sakarifikasi menggunakan bakteri asam laktat yaitu *Lactobacillus delbrueckii*.

### 2.6 ANALISA ASAM LAKTAT

Analisa asam laktat dilakukan dengan metode titrasi dan analisa dengan spektrofotometri UV-Vis. Uji kuantitatif kadar Asam Laktat dilakukan secara alkalimetri dengan metode titrasi. Pertama masukkan 1 ml hasil yang telah difermentasi dan encerkan sampai 10 ml dengan aquades dalam Erlenmeyer 250 ml, ditambahkan 3

tetes larutan indikator pp 1%. Kemudian dilanjutkan titrasi dengan larutan NaOH  $0,5 \times 10^{-2}$  N hingga terjadi perubahan warna merah muda. Kadar asam dihitung sebagai asam laktat dengan rumus:

$$\% \text{ Asam Laktat} = \frac{(V \times N) \text{ NaOH} \times \text{BM A. Laktat} \times 100\%}{\text{Berat Bahan}(g) \times 1000}$$

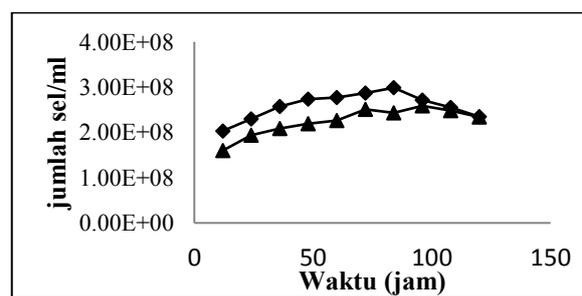
Dengan V= volum titran, N= Normalitas NaOH, BM= berat molekul

## 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini dilakukan pembuatan asam laktat dari media selulosa oleh bakteri *Lactobacillus delbueckii* dengan selulase dari bakteri *Bacillus subtilis* dan *Bacillus circulans* yang diaplikasikan sebagai bahan baku utama pembuatan plastik *degradable*. Asam laktat ini diproduksi dari media selulosa murni melalui fermentasi menggunakan metode SSF.

### 3.1. KURVA PERTUMBUHAN

Pembuatan kurva pertumbuhan bertujuan untuk menentukan waktu optimum *Bacillus circulans* dan *Bacillus subtilis* dalam memproduksi crude enzim selulase. Setelah mengetahui waktu optimal *Bacillus circulans* dan *Bacillus subtilis* berdasarkan kurva pertumbuhan, waktu tersebut dapat digunakan dalam lama waktu pembibitan dan produksi crude selulase.



**Gambar 1.** Kurva pertumbuhan *Bacillus circulans* dan *Bacillus subtilis* dalam media selulosa (◆*Bacillus circulans*, ▲*Bacillus subtilis*)

Seperti yang disajikan Pada Gambar 1 menjelaskan bahwa bakteri mengalami fase pertumbuhan yang cukup signifikan. Jumlah

sel mula-mula yang diberikan sebesar 10 % b/v dari media yang digunakan dengan kisaran jumlah sel  $10^6$ /ml. Pada kurun awal dapat dikatakan sebagai fase adaptasi *Bacillus circulans* terhadap media pertumbuhannya, peningkatan ukuran sel, mulai pada waktu sel sedikit mengalami pembelahan. Fase log atau fase eksponensial terjadi pada jam ke-12 sampai jam ke-72. Pada fase ini sel berada dalam keadaan pertumbuhan yang seimbang. Selama fase ini, masa dan volume sel meningkat oleh faktor yang sama dalam arti rata-rata komposisi sel dan konsentrasi metabolit relatif tetap konstan. Fase stasioner terjadi pada jam ke-72 sampai jam ke-84. Pada fase ini, bakteri sudah mulai kehilangan nutrisi dan terjadi penumpukan produk metabolit. Fase stasioner terjadi pada saat laju pertumbuhan bakteri sama dengan laju kematiannya. Sehingga jumlah bakteri keseluruhan bakteri akan tetap. Keseimbangan jumlah keseluruhan bakteri ini terjadi karena adanya pengurangan derajat pembelahan sel. Hal ini disebabkan oleh kadar nutrisi yang berkurang dan terjadi akumulasi produk toksik sehingga mengganggu pembelahan sel. Fase stasioner ini dilanjutkan dengan fase kematian yang ditandai dengan peningkatan laju kematian yang melampaui laju pertumbuhan, sehingga secara keseluruhan terjadi penurunan populasi bakteri. Pada umumnya waktu inkubasi bakteri 24-48 jam. Pengamatan dengan interval waktu kurang dari 12 jam dapat menghasilkan profil pertumbuhan dari fase adaptasi hingga fase kematian yang lebih baik. Pada kurva pertumbuhan, fase stasioner tidak terlalu terlihat dan langsung menunjukkan fase kematian. Sehingga ditentukan waktu inkubasi pada jam ke-72, dimana pada waktu tersebut *Bacillus circulans* dan *Bacillus subtilis* menunjukkan pertumbuhan optimal.

### 3.2. ANALISA AKTIVITAS ENZIM

Analisa aktivitas selulase menggunakan metode DNS dan kurva baku glukosa dengan spektrofotometri. Metode DNS adalah untuk

menguji konsentrasi gula reduksi dari absorbansi yang terbaca pada grafik standar glukosa, yang kemudian dari kurva standar tersebut digunakan untuk menghitung konsentrasi gula pereduksi dalam sampel. Intensitas warna menunjukkan banyaknya gula pereduksi dengan pengujian menggunakan panjang gelombang 540 nm. Apabila semakin tinggi kadar gula reduksi yang terdapat dalam sampel, maka akan semakin banyak pula molekul asam-3-amino-5-nitrosalisilat yang terbentuk, sehingga absorbansi sampel akan semakin tinggi. Bila terdapat gula reduksi pada sampel, maka larutan DNS yang awalnya berwarna kuning akan bereaksi dengan gula reduksi sehingga menimbulkan warna jingga kemerahan [10].

Sampel yang telah direaksikan dengan DNS selanjutnya ditentukan kadar gula pereduksinya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Agar dapat menentukan kadar gula reduksi pada sampel, terlebih dahulu dibuat kurva standar menggunakan larutan glukosa yang telah direaksikan dengan DNS dan ditentukan kadar gula reduksinya. Panjang gelombang yang digunakan 540 nm. Dari kurva standar tersebut akan didapatkan persamaan garis, yang menunjukkan hubungan antara konsentrasi dan absorbansi dengan persamaan umum :

$$Y=ax+b.....(1)$$

dengan  $y$  merupakan absorbansi,  $a$  merupakan slope,  $x$  merupakan konsentrasi sampel, dan  $b$  merupakan intersep.

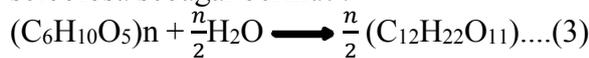
Dengan mensubstitusi nilai absorbansi sampel ke persamaan tersebut, maka dapat diketahui konsentrasi atau kadar gula pereduksi pada sampel. Dari persamaan ini, dapat dihitung kadar glukosa sebagai produk dari reaksi enzim selulase terhadap substrat pada beberapa seri konsentrasi substrat dengan menggunakan data hasil pengamatan nilai absorbansi dari tiap sampel [13].

Analisa aktivitas selulase menggunakan metode DNS dan kurva baku glukosa dengan

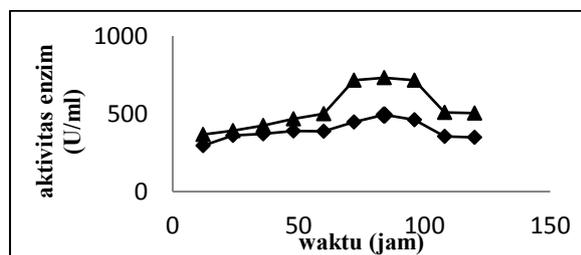
spektrofotometri. Inkubasi yang dilakukan selama 84 jam tersebut bertujuan untuk mengecek aktivitas enzim selulase dan karakter dari enzim selulase yang dihasilkan. Aktivitas enzim diukur dari jumlah glukosa yang dihasilkan oleh ekstrak kasar enzim. Enzim selulase bekerja untuk memutus ikatan glikosidik pada selulosa menjadi glukosa (dimana selulosa adalah polimer dengan monomernya yaitu selobiose yang merupakan gabungan dari dua unit glukosa). Secara teoritik reaksi hidrolisis selulase menjadi glukosa adalah sebagai berikut :



Sedangkan reaksi parsial selulosa menjadi selobiosa sebagai berikut :



Sedangkan reaksi hidrolisis selobiosa menjadi glukosa sebagai berikut :

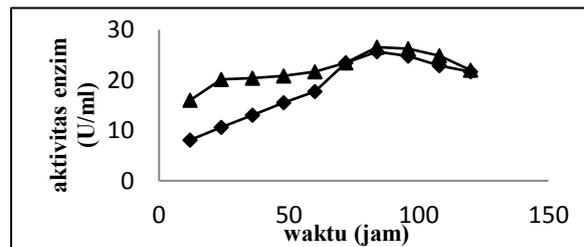


**Gambar 2.** Aktivitas eksoglukanase bakteri *Bacillus subtilis* (▲) dan *Bacillus circulans* (◆) pada media selulosa

Berdasarkan Gambar 2, dapat dilihat penurunan aktivitas enzim setelah jam ke-84 dikarenakan adanya akumulasi produk yang telah terbentuk sebelumnya dan menyebabkan penghambatan bagi enzim selulase [14]. Hal ini juga berlaku pada penurunan saat pengujian aktivitas enzim eksoglukanase (Gambar 2) dan glukosidase (Gambar 3).

Aktifitas optimum eksoglukanase pada jam ke-84 sebesar 26,54 U/ml untuk *Bacillus subtilis* dan sebesar 31,18 U/ml untuk *Bacillus circulans*. Adapun aktifitas optimum

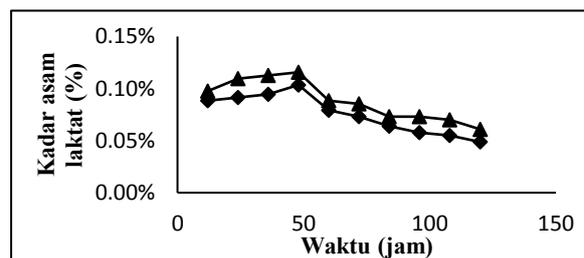
glukosidase pada jam ke-84 sebesar 388,20 U/ml untuk *Bacillus subtilis* dan sebesar 731,72 U/ml untuk *Bacillus circulans*. Waktu yang tepat untuk produksi enzim selulase ditentukan dari aktifitas enzim yang telah dilakukan sebelumnya, yaitu dari jam ke-12 hingga jam ke-120. Dilihat dari aktifitas enzim masing-masing bakteri dan substrat diperoleh waktu optimum yang sama yaitu pada jam ke-84.



**Gambar 3.** Aktivitas glukosidase bakteri *Bacillus subtilis*(▲) dan *Bacillus circulans*(◆) pada media selulosa

### 3.3. PENENTUAN WAKTU TERBAIK SSF

Profil pembentukan asam laktat yang dilakukan ini merupakan langkah awal untuk mendapatkan kadar asam laktat tertinggi dengan cara menentukan waktu yang terbaik pada proses SSF. Dapat dilihat pada Gambar 4, asam laktat yang diperoleh terdapat pada jam ke 48, sehingga pada jam ke 36-lah yang dijadikan waktu yang terbaik dalam proses SSF.

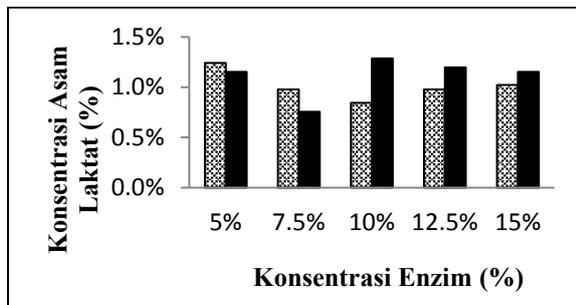


**Gambar 4.** Profil pembentukan asam laktat dengan konsentrasi enzim selulase 10% *Bacillus subtilis*(▲) dan *Bacillus circulans*(◆)

### 3.4. PEMBUATAN ASAM LAKTAT

Produksi asam laktat oleh bakteri *Lactobacillus delbrueckii* yang diperoleh

seperti terlihat pada Gambar 5. Selama proses SSF *crude* selulase yang ditambahkan dengan variasi, yaitu 5%; 7,5%; 10%; 12,5%; 15%. Lama fermentasi sesuai dengan waktu yang terbaik pada saat pembentukan asam laktat menggunakan kadar enzim selulase 10% yaitu selama 36 jam.



**Gambar 5.** Kurva kadar asam laktat *Lactobacillus delbrueckii* dari enzim selulase hasil sakarifikasi *Bacillus subtilis* (▨) dan *Bacillus circulans* (■) dalam media selulosa

*Lactobacillus delbrueckii* bersifat homofermentatif yang mampu menghasilkan 2-asam laktat [15] sehingga mendapatkan hasil yang terbaik pada pemberian kadar enzim sebesar 5% untuk *Bacillus subtilis* dengan media selulosa dengan menghasilkan asam laktat 1,24%. Berbeda dengan bakteri *Bacillus circulans* pada kadar enzim yang ke 10% dengan media selulosa menghasilkan 1,29% asam laktat. Sedangkan untuk kadar enzim yang lain hasil kadar asam laktatnya mengalami kenaikan dan penurunan yang tidak beraturan hal ini dikarenakan interaksi enzim dengan substrat yang semakin lama menyebabkan semakin banyak glukosa yang terbentuk. Namun, pada waktu hidrolisis tertentu konsentrasi glukosa akan mengalami penurunan.

Penurunan disebabkan oleh adanya akumulasi produk yang telah terbentuk sebelumnya dan menyebabkan penghambatan bagi enzim selulase. Inhibitor enzim selulase berupa produk dari hidrolisis selulosa yaitu glukosa dan selobiosa. Selobiosa menghambat enzim eksoglukonase sedangkan glukosa menghambat enzim  $\beta$ -glukosidase [16].

Pada penelitian yang telah dilakukan Huang [2], menyebutkan bahwa waktu yang terbaik untuk metode SSF ini adalah 36-48 jam. Hal ini sesuai dengan hasil yang diperoleh dalam penelitian ini, untuk waktu optimum inkubasi pada metode SSF yaitu 36 jam. Disamping itu, fermentasi dengan hasil terbaik pada pH 6,0 dan suhu 30°C untuk proses SSF yang menghasilkan asam laktat dengan perolehan asam laktat 0,87-0,97 g/g pati bersamaan dengan pembentukan biomassa 1,5-2,0 g/L. Pada penelitian ini juga digunakan variabel yang tetap pada suhu yang mendekati dengan penelitian tersebut dengan hasil yang kami dapat 1,24% asam laktat dari *Bacillus subtilis* dengan kadar enzim 5% dan 1,29% asam laktat dari *Bacillus circulans* dengan kadar enzim 10%.

Pramudyanti *et al* (2004) telah melakukan kajian tentang pengaruh pH terhadap produksi asam laktat dalam kajian tersebut, dilakukan pada variabel pengontrolan pH 5, 6, 7 dan diperoleh hasil tertinggi untuk produksi asam laktat metode SSF dengan pengaturan pH pada pH 6,0 dengan hasil 35,75 g/L. Sedangkan pada penelitian ini tidak dilakukan pengaturan pH [17].

#### 4. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, waktu optimum pertumbuhan untuk sakarifikasi oleh bakteri *Bacillus subtilis* dan *Bacillus circulans* yaitu pada fase stasioner di jam ke-84. *Bacillus circulans* dapat menghasilkan enzim selulase lebih tinggi daripada *Bacillus subtilis*. *Bacillus circulans* menghasilkan asam laktat tertinggi. Variasi enzim selulase yang digunakan pada metode SSF ini ialah 5%, 7,5%, 10%, 12,5% dan 15% menghasilkan konsentrasi asam laktat 1,24%; 0,98%; 0,84%; 0,98%; dan 1,02% dari *Bacillus subtilis*. Pada variasi konsentrasi yang sama *Bacillus circulans* menghasilkan asam laktat sebagai berikut: 1,15%; 0,75%; 1,29%; 1,20% ; dan 1,15%. Hasil terbaik pada metode SSF ini yaitu pada konsentrasi enzim 5% untuk *Bacillus subtilis* dengan media selulosa yang menghasilkan asam laktat sebesar 1,24% dan bakteri *Bacillus circulans*

pada kadar enzim 10% menghasilkan 1,29% asam laktat.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh Pemerintah Indonesia melalui pendanaan Hibah Bersaing.

### DAFTAR PUSTAKA

- [1]. R. Datta, S. P. Tsai, P. Bonsignore, S. H. Moon, J. R. Frank, Technological and economic potential of poly(lactic acid) and lactic acid derivatives, *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 16, no. 2–3, hal. 221–231, 1995.
- [2]. L. P. Huang, B. Jin, P. Lant, J. Zhou, Simultaneous saccharification and fermentation of potato starch wastewater to lactic acid by *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus arrhizus*, *Biochem. Eng. J.*, vol. 23, no. 3, hal. 265–276, 2005.
- [3]. C. Åkerberg, K. Hofvendahl, B. Hahn-Hägerdal, G. Zacchi, Modelling the influence of pH, temperature, glucose and lactic acid concentrations on the kinetics of lactic acid production by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 19435 in whole-wheat flour, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 49, no. 6, hal. 682–690, 1998.
- [4]. P. Yin, N. Nishina, Y. Kosakai, K. Yahiro, Y. Park, M. Okabe, Enhanced production of L(+)-lactic acid from corn starch in a culture of *Rhizopus oryzae* using an air-lift bioreactor, *J. Ferment. Bioeng.*, vol. 84, no. 3, hal. 249–253, 1997.
- [5]. P. Cheng, R. E. Mueller, S. Jaeger, R. Bajpai, E. L. Iannotti, Lactic acid production from enzyme-thinned corn starch using *Lactobacillus mylovorus*, *J. Ind. Microbiol.*, vol. 7, no. 1, hal. 27–34, 1991.
- [6] Y. H. Pratiwi, O. Ratnayani, I. N. Wirajana, Perbandingan Metode Uji Gula Pereduksi Dalam Penentuan Aktivitas  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase Dengan Substrat Janur Kelapa (*Cocos Nucifera*), *J. Kim.*, vol. 12, no. 2, hal. 134–139, 2018.
- [7] Y. Maryanty, S. B. Sumitro, A. Tri, Suharjo, Effect of Particle Size and Pretreatment on Cellulose Degradation of Rice Straw from Agricultural Land in Malang, *Int. J. ChemTech Res.*, vol. 10, no. 4, hal. 600–610, 2017.
- [8] Y. Maryanty, dan T. Anisa, Pembuatan Asam Laktat Dari Molase Dan Limbah Cair Tahu Menggunakan *Lactobacillus Bulgaricus* dan *Rhizopus Oryzae*, in: Prosiding Seminar Nasional Rekayasa Proses Industri Kimia, 2020
- [9] A. Sharah, R. Karnila, Desmelati, Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri Asam Laktat yang Diisolasi dari Ikan Peda Kembubg (*Rastrelliger* sp. ), *J. Online Mhs. Bid. Perikan. dan Ilmu Kelaut.*, vol. 2, no. 2, hal. 1–8, 2015.
- [10] Purkan, H. Purnama, dan S. Sumarsih, Produksi Enzim Selulase dari *aspergillus niger* Menggunakan Sekam Padi dan Ampas Tebu sebagai Induser., *J. Ilmu Dasar*, no. 2, hal. 95–102, 2015.
- [11] B. Adney dan J. Baker, Measurement of Cellulase Activities: Laboratory Analytical Procedure (LAP), 2008.
- [12]. I. R. Pramudyanti, T. Purwoko, A. Pangastuti, Pengaruh Pengaturan pH dengan  $\text{CaCO}_3$  terhadap Produksi Asam Laktat dari Glukosa oleh

- Rhizopus oryzae, *Bioteknologi*, vol. 1, no. 1, hal. 19–24, 2004.
- [13] Yuliana, Kinetika Pertumbuhan Bakteri Asam Laktat Isolat T5 yang Berasal dari Tempoyak, *Jurnal teknologi industri dan hasil pertanian*, vol. 73, no.2, hal. 108-116, 2008.
- [14] I. P. Wood, A. Elliston, P. Ryden, I. Bancroft, I. N. Roberts, K. W. Waldron, Rapid quantification of reducing sugars in biomass hydrolysates: Improving the speed and precision of the dinitrosalicylic acid assay, *Biomass and Bioenergy*, vol. 44, hal. 117–121, 2012.
- [15]. K. S. Ambriyanto, Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Aerob Pendegradasi Selulosa dari Serasah Daun Rumput Gajah (*Pennisetum purpureum schaum*), skripsi, Biologi, Institut Teknologi Sepuluh Nopember, 2010.
- [16] Y. Maryanty, K. Widjayanti, S. Rulianah, F. Krisna., T. Endahwati, Meiliefiana, W. P. Juwita, Effect concentration addition of crude cellulase by aspergillus niger on rice straw media for biodeinking application, in: AUN/SEED-Net Regional Conference on Chemical Engineering, 2014.
- [17] V. M. Talantan, Marina, O. Lambui, I. N. Suwastika, Uji Aktivitas Selulase Dari Jamur Selulolitik Asal Tanah Danau Kalimpa'a Sulawesi Tengah, *Nat. Sci. J. Sci. Technol.*, vol. 7, no. 3, hal. 323–333, 2018.