



PROTEKSI ISI PROPOSAL

Dilarang menyalin, menyimpan, memperbanyak sebagian atau seluruh isi proposal ini dalam bentuk apapun kecuali oleh pengusul dan pengelola administrasi pengabdian kepada masyarakat

PROPOSAL PENELITIAN 2023

Rencana Pelaksanaan Penelitian: tahun 2023 s.d. tahun 2023

1. JUDUL PENELITIAN

Isolasi Bakteri Laut Pendegradasi Pati dari Pulau Pelapis Kalimantan Barat untuk Produksi Bioetanol dari Limbah Makanan

Bidang Fokus RIRN / Bidang Unggulan Perguruan Tinggi	Tema	Topik (jika ada)	Rumpun Bidang Ilmu
Kemaritiman	Teknologi kedaulatan daerah 3T (terdepan, terpencil, terbelakang)	Eksplorasi dan pemanfaatan sumber daya pesisir dan laut	Bioteknologi

Kategori (Kompetitif Nasional/ Desentralisasi/ Penugasan)	Skema Penelitian	Strata (Dasar/ Terapan/ Pengembangan)	SBK (Dasar, Terapan, Pengembangan)	Target Akhir TKT	Lama Penelitian (Tahun)
Penelitian Kompetitif Nasional	Penelitian Dosen Pemula	Riset Dasar	SBK Riset Pembinaan/ Kapasitas	2	1

2. IDENTITAS PENGUSUL

Nama, Peran	Perguruan Tinggi/ Institusi	Program Studi/ Bagian	Bidang Tugas	ID Sinta
SOFI SITI SHOFIYAH Ketua Pengusul	Universitas Oso	Ilmu Kelautan	Mengkoordinasikan pelaksanaan penelitian, melakukan skrining bakteri pendegradasipati, mengidentifikasi bakteri pendegradasi pati yang dihasilkan, menyusun laporan, dan menulis artikel ilmiah.	6770202
ETHA MARISTA Anggota Pengusul	Universitas Oso	Ilmu Kelautan	Melakukan isolasi bakteri dari Karang asal pulau pelapis, menguji aktivitas enzimatis terhadap pati, menyusun laporan, dan menulis artikel ilmiah	6771405

3. MITRA KERJASAMA PENELITIAN (JIKA ADA)

Pelaksanaan penelitian dapat melibatkan mitra kerjasama yaitu mitra kerjasama dalam melaksanakan penelitian, mitra sebagai calon pengguna hasil penelitian, atau mitra investor

Mitra	Nama Mitra	Dana
-------	------------	------

4. LUARAN DAN TARGET CAPAIAN

Luaran Wajib

Tahun Luaran	Jenis Luaran	Status target capaian	Keterangan
1	Artikel di Jurnal	accepted/published	Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan

5. ANGGARAN

Rencana Anggaran Biaya penelitian mengacu pada PMK dan buku Panduan Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat yang berlaku.

Total RAB 1 Tahun Rp. 20.000.000,00

Tahun 1 Total Rp20.000.000,00

Jenis Pembelanjaan	Komponen	Item	Satuan	Vol.	Biaya Satuan	Total
Bahan	Bahan Penelitian (Habis Pakai)	pati mentah beras	Unit	1	50.000	50.000
Bahan	Barang Persediaan	mikrotube 1,5 mL	Unit	1	75.000	75.000
Analisis Data	Biaya konsumsi rapat	Rapat Laporan Akhir Penelitian	OH	4	35.000	140.000
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	HR Sekretariat/ Administrasi Peneliti	Sekretariat Peneliti	OB	1	300.000	300.000
Analisis Data	Uang Harian	Rapat Kemajuan Penelitian	OH	4	75.000	300.000
Pengumpulan Data	FGD persiapan penelitian	Uang Harian Kegiatan Rapat	Paket	4	75.000	300.000
Bahan	Bahan Penelitian (Habis Pakai)	Soluble Starch 500 g	Unit	1	1.900.000	1.900.000
Bahan	Barang Persediaan	tip mikropipet 1-10 uL	Unit	2	65.000	130.000
Bahan	ATK	Paket Alat Tulis Kantor	Paket	1	500.000	500.000
Bahan	Bahan Penelitian (Habis Pakai)	CloneJET PCR Kit	Unit	1	2.080.000	2.080.000
Pengumpulan Data	HR Pembantu Peneliti	Pembantu Peneliti 8 jam/minggu	OJ	160	25.000	4.000.000
Bahan	Barang Persediaan	tabung PCR (0,5 ml)	Unit	1	70.000	70.000
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Biaya seminar nasional	Biaya Seminar Nasional	Paket	1	500.000	500.000
Bahan	Bahan Penelitian (Habis Pakai)	Etanol Absolut 2,5 L	Unit	1	700.000	700.000
Bahan	Bahan Penelitian (Habis Pakai)	Iodine 10 g	Unit	1	150.000	150.000
Analisis Data	Biaya konsumsi rapat	Rapat Kemajuan Penelitian	OH	4	35.000	140.000
Bahan	Bahan Penelitian (Habis Pakai)	Chelex-100 25 gr	Unit	1	1.750.000	1.750.000
Bahan	Bahan Penelitian (Habis Pakai)	Zobell Marine Broth 200 g	Unit	1	880.000	880.000
Analisis Data	Biaya analisis sampel	Analisi Sequencing	Unit	6	150.000	900.000
Bahan	Bahan Penelitian	6x Loading Dye Buffer	Unit	1	200.000	200.000

Jenis Pembelanjaan	Komponen	Item	Satuan	Vol.	Biaya Satuan	Total
	(Habis Pakai)					
Pengumpulan Data	FGD persiapan penelitian	Konsumsi FGD	Paket	4	35.000	140.000
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Biaya Publikasi artikel di Jurnal Nasional	Buaya Publikasi Jurnal Nasional	Paket	1	700.000	700.000
Analisis Data	HR Pengolah Data	Pengolahan Data Filogenetik	P (penelitian)	1	1.000.000	1.000.000
Bahan	Bahan Penelitian (Habis Pakai)	Bacto Agar 250 g	Unit	1	800.000	800.000
Bahan	Barang Persediaan	tip mikropipet 10-100 uL	Unit	2	65.000	130.000
Bahan	Barang Persediaan	tip mikropipet 100-1000 uL	Unit	1	65.000	65.000
Bahan	Bahan Penelitian (Habis Pakai)	Agarosa 10 gram	Unit	1	350.000	350.000
Analisis Data	Uang Harian	Rapat Laporan Akhir Penelitian	OH	4	75.000	300.000
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Uang harian rapat di luar kantor	Uang Harian Seminar Nasional	OH	1	150.000	150.000
Bahan	Bahan Penelitian (Habis Pakai)	pati mentah singkong	Unit	1	50.000	50.000
Bahan	Bahan Penelitian (Habis Pakai)	Pati mentah Kentang	Unit	1	50.000	50.000
Pengumpulan Data	HR Sekretariat/ Administrasi Peneliti	Honor Sekretariat Peneliti	OB	4	300.000	1.200.000



Isian Substansi Proposal **SKEMA PENELITIAN DASAR**

Petunjuk: Pengusul hanya diperkenankan mengisi di tempat yang telah disediakan sesuai dengan petunjuk pengisian dan tidak diperkenankan melakukan modifikasi template atau penghapusan di setiap bagian.

JUDUL

Tuliskan Judul Usulan

Isolasi Bakteri Laut Pendegradasi Pati dari Pulau Pelapis Kalimantan Barat untuk Produksi Bioetanol dari Limbah Makanan

RINGKASAN

Ringkasan penelitian tidak lebih dari 300 kata yang berisi urgensi, tujuan, dan luaran yang ditargetkan.

Peningkatan populasi masyarakat dunia berdampak pada meningkatnya konsumsi makanan, dan tentunya limbah makanan akibat aktivitas tersebut. Sebagai negara berpenduduk padat, limbah makanan yang dihasilkan di Indonesia menjadi limbah dengan timbunan terbesar yang dapat mengakibatkan permasalahan lingkungan. Hingga saat ini, pengelolaan limbah makanan dilakukan melalui pengomposan, pembakaran, atau pembuangan di tempat pembuangan sampah. Pengelolaan yang efektif dan efisien pada limbah makanan diperlukan agar dapat tercipta pola konsumsi dan produksi yang berkelanjutan, sesuai dengan salah satu tujuan dalam *sustainable development goals*.

Dengan konsep *circular economy* dalam ekonomi berkelanjutan, fokus pengolahan limbah diarahkan untuk menghasilkan produk baru bernilai guna tinggi. Urgensi penelitian ini adalah mencari alternatif pengelolaan limbah makanan yang selaras dengan *circular economy*. Limbah makanan banyak berasal dari makanan berbasis pati dan biomolekul lainnya, seperti lipid, protein, vitamin, dan selulosa. Pati merupakan polisakarida yang dapat dihidrolisis menjadi monosakarida, seperti glukosa, melalui proses hidrolisis enzimatis. Glukosa yang dihasilkan dapat difermentasikan menjadi bioetanol dengan menggunakan mikroorganisme, sebagai sumber energi alternatif.

Dalam implementasi pengolahan limbah makanan menjadi bioetanol, diperlukan enzim yang memiliki aktivitas dan stabilitas baik. Enzim yang berasal dari bakteri laut berpotensi memiliki efektivitas yang lebih baik, karena lingkungan laut yang unik memberikan tekanan selektif pada bakteri, untuk menghasilkan enzim yang dapat beradaptasi dengan kondisi ekstrem. Oleh karena itu, penelitian ini memiliki sasaran untuk mengungkap potensi bakteri laut yang memiliki kemampuan degradasi pati, dari Pulau Pelapis, Kalimantan Barat.

Hal tersebut sesuai dengan topik dalam fokus riset kemaritiman yang tertuang pada Rencana Induk Riset Nasional, yaitu eksplorasi dan pemanfaatan sumber daya pesisir dan laut. Adapun luaran wajib yang ditargetkan adalah menghasilkan artikel ilmiah yang dipublikasikan pada jurnal nasional terakreditasi, yaitu Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis. Tingkat kesiapterapan teknologi yang dihasilkan pada penelitian ini adalah TKT 2, yaitu status formulasi konsep dan aplikasi formulasi. Penelitian ini menjadi langkah awal dalam pemanfaatan limbah makanan menjadi bioetanol.

KATA KUNCI

Kata kunci maksimal 5 kata

Bakteri laut; pati; bioetanol; limbah makanan; enzim

PENDAHULUAN

Penelitian Dasar merupakan riset yang memuat temuan baru atau pengembangan ilmu pengetahuan dari kegiatan riset yang terdiri dari tahapan penentuan asumsi dan dasar hukum yang akan digunakan, formulasi konsep dan/ atau aplikasi formulasi dan pembuktian konsep fungsi dan/ atau karakteristik penting secara analitis dan eksperimental.

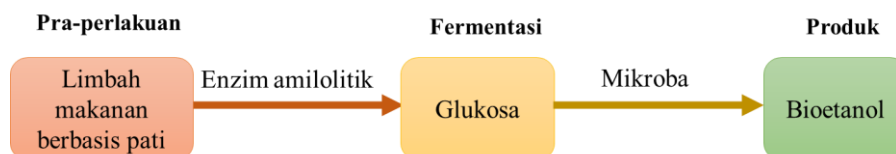
Pendahuluan penelitian tidak lebih dari 1000 kata yang terdiri dari:

- A. Latar belakang dan rumusan permasalahan yang akan diteliti
- B. Pendekatan pemecahan masalah
- C. *State of the art* dan kebaruan
- D. Peta jalan (*road map*) penelitian 5 tahun kedepan (jika dalam bentuk konsorsium harus dilengkapi dengan roadmap penelitian konsorsium)
- E. Sitasi disusun dan ditulis berdasarkan sistem nomor sesuai dengan urutan pengutipan, mengikuti format Vancouver

A. Latar belakang dan rumusan masalah

Peningkatan populasi masyarakat dunia berdampak pada meningkatnya konsumsi makanan, sehingga limbah makanan juga meningkat. *Food and Agriculture Organization* (FAO), mengatakan bahwa pada tahun 2050, jumlah penduduk dunia diperkirakan akan tembus 10 miliar, sehingga diprediksi meningkatkan limbah makanan hingga 72% (1). Sebagai negara yang memiliki populasi padat, Indonesia menjadi negara kedua berkontribusi paling banyak terhadap limbah makanan dunia, setelah Arab Saudi (2). Saat ini, Indonesia telah memproduksi lebih dari 16,3 juta ton limbah makanan pada tahun 2022 (3). Limbah makanan menjadi jenis limbah dengan timbunan terbesar, mencapai 41,55% dari total limbah yang dihasilkan (4). Limbah makanan adalah limbah organik yang berasal dari berbagai sumber, seperti restoran, sektor industri, kegiatan komersil, dan domestik (5). Sekitar 1,5 triliun ton makanan menjadi limbah pada saat pengolahan makanan, termasuk buah, sayuran, roti, daging, dan produk *dairy* lainnya (6).

Pengelolaan limbah makanan umumnya dilakukan melalui pengomposan, pembakaran, atau pembuangan di tempat pembuangan sampah (7). Hal tersebut mengakibatkan permasalahan lingkungan yang signifikan. Pengelolaan yang efektif dan efisien pada limbah makanan diperlukan agar dapat tercipta pola konsumsi dan produksi yang berkelanjutan. Dengan konsep *circular economy* dalam ekonomi berkelanjutan, fokus pengolahan limbah diarahkan untuk menghasilkan produk bernilai guna tinggi/sumber daya baru (8). Limbah makanan banyak berasal dari makanan berbasis pati dan juga mengandung biomolekul lainnya, seperti gula, lipid, protein, vitamin, dan selulosa (5). Pati merupakan polisakarida yang dapat dihidrolisis menjadi monosakarida, seperti glukosa, melalui proses hidrolisis enzimatis. Glukosa yang dihasilkan dapat difermentasikan dengan menggunakan mikroorganisme menghasilkan bioetanol, sebagai sumber energi alternatif terbarukan (Gambar 1) (5,9).



Gambar 1 Diagram proses produksi bioetanol

Dalam implementasi pengolahan limbah makanan menjadi bioetanol, diperlukan enzim yang memiliki aktivitas dan stabilitas baik. Enzim yang berasal dari bakteri laut berpotensi memiliki efektivitas yang lebih baik, karena lingkungan laut yang unik memberikan tekanan selektif pada bakteri, untuk menghasilkan enzim yang dapat beradaptasi dengan kondisi ekstrem (10). Oleh karena itu, penelitian ini memiliki sasaran untuk mengungkap potensi bakteri laut yang berasosiasi dengan spons laut pada ekosistem terumbu karang, di Pulau Pelapis, Kalimantan Barat. Spons laut merupakan rumah bagi mikroorganisme laut hingga

mencapai 40–60% dari total biomasnya (11). Keanekaragaman mikroorganisme dalam spons dalam berpotensi menghasilkan bakteri baru yang dapat memproduksi enzim pendegradasi pati dengan karakteristik yang unik.

Berdasarkan uraian latar belakang tersebut, rumusan masalah dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. apakah bakteri yang berasosiasi dengan terumbu karang dari Perairan Pulau Pelapis memiliki kemampuan degradasi pati?;
2. bagaimana kondisi optimum degradasi pati oleh bakteri laut tersebut?;
3. apakah spesies bakteri yang berhasil diisolasi dan memiliki kemampuan degradasi tersebut?;
4. bagaimana kekerabatan (filogenetik) bakteri tersebut dibandingkan dengan bakteri yang telah ada?.

B. Pendekatan pemecahan masalah

Sesuai dengan latar belakang dan rumusan masalah yang diuraikan di atas, pendekatan pemecahan masalah yang digunakan dalam penelitian ini dimaksudkan agar tujuan penelitian ini dapat tercapai, yaitu memperoleh isolat bakteri laut yang berpotensi untuk menghasilkan enzim pendegradasi pati yang efektif digunakan dalam proses hidrolisis enzimatis pada limbah makanan. Uraian pendekatan pemecahan masalah tersebut adalah sebagai berikut:

1. mengisolasi bakteri laut yang berasosiasi dengan spons asal perairan Pulau Pelapis menggunakan metode pengenceran bertahap pada media pertumbuhan ZoBell Marine;
2. menguji kemampuan isolat bakteri dalam mendegradasi pati terhadap pati terlarut dan pati mentah;
3. melakukan variasi kondisi degradasi pati oleh isolat bakteri;
4. mengidentifikasi spesies isolat bakteri dengan metode 16s rRNA menggunakan *polymerase chain reaction* (PCR);
5. menganalisis filogenetik untuk melihat tingkat kekerabatan isolat bakteri terhadap basis data urutan 16s rRNA spesies bakteri yang telah ada.

C. State of the art

Kandungan utama dari limbah makanan adalah karbohidrat yang dapat terdiri atas glukosa, pati, fruktosa, sukrosa, selulosa, dan hemiselulosa. Pada limbah makanan roti, kandungan karbohidrat mencapai 64,3%, limbah makanan café mencapai 76,8%, dan limbah makanan rumah tangga mencapai 71,3% (12,13). Hidrolisis enzimatis pati, sebagai salah satu cara *pre-treatment* sebelum dilakukan proses fermentasi bioetanol, menunjukkan hasil hidrolisis yang paling tinggi jika dibandingkan hidrolisis menggunakan asam, yaitu sebanyak 127 g/L glukosa dihasilkan dengan efisiensi konversi hampir 40% lebih tinggi dari hidrolisis asam (14). Hal ini menunjukkan keunggulan hidrolisis enzimatis yang dapat menghemat biaya, energi, dan ramah lingkungan.

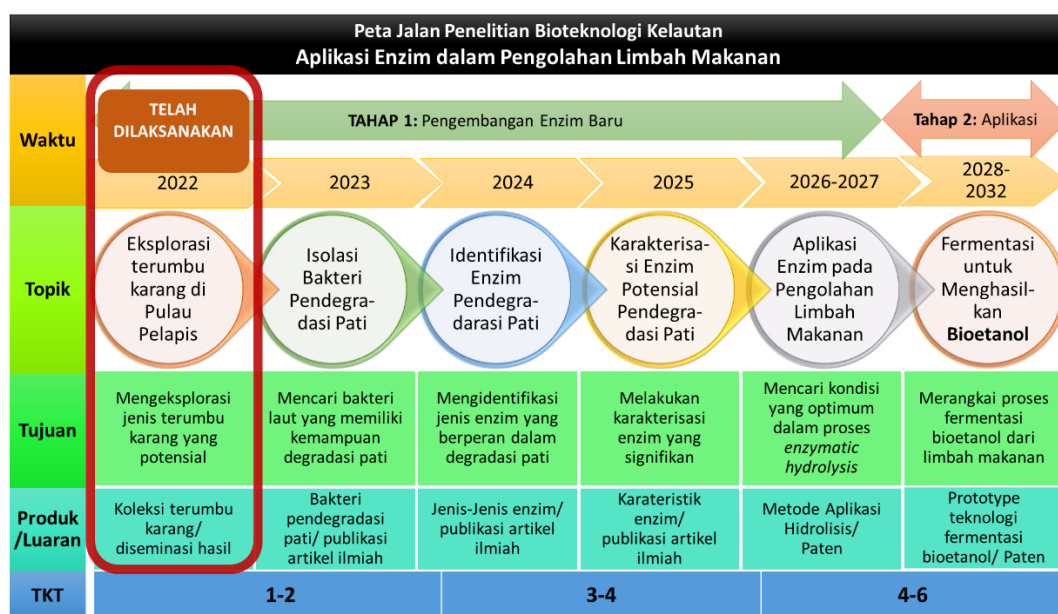
Enzim penghidrolisis pati yang dapat digunakan dalam proses *pre-treatment* limbah makanan diantaranya adalah α -amylase, glucoamylase, dan selulase (5). α -Amilase dari *Aspergillus niger* dan *Saccharomyces cerevisiae* umum digunakan dalam proses *simultaneous saccharification and fermentation* (SSF) (15). Namun, keterbatasan aktivitas, stabilitas, dan efisiensi produksi beberapa enzim tersebut menjadi kendala dalam proses hidrolisis, sehingga harus sangat selektif untuk memilih jenis enzim dengan sifat yang unggul.

Mikroorganisme laut memiliki keunggulan, yaitu menghasilkan enzim yang aktif pada suhu rendah untuk hidrolisis pati, selulosa, dan polisakarida alga, yang dapat digunakan dalam proses produksi bioetanol. Mikroorganisme laut juga mampu menghasilkan fermentasi gula di lingkungan dengan kadar garam yang tinggi, sehingga biokatalis dengan enzim asal bakteri laut menjanjikan untuk pengembangan proses yang efisien dalam produksi bioetanol (16). Enzim pendegradasi pati yang dihasilkan dari bakteri laut, memiliki sifat yang unik jika dibandingkan

dengan bakteri terestrial, seperti toleran terhadap garam, basa, dan reagen lain (17). Selain itu, terdapat juga enzim amilase yang stabil tanpa perlu ion kalsium yang diisolasi dari spons laut (18,19). α -Amilase yang berasal dari *Bacillus aquimaris* MKSC 6.2 mampu mendegradasi pati mentah (20). Selain itu, *Bacillus megaterium* NL3, memiliki enzim α -amilase, lebih dari satu dengan karakteristik yang berbeda, yaitu BmaN1 dan BmaN2 (21,22). Selain itu, amilase yang berasal dari *Bacillus subtilis* S8–18 tahan terhadap konsentrasi garam yang tinggi (23). Maka dari itu, pencarian enzim baru yang berasal dari bakteri laut berpotensi untuk menghasilkan enzim baru dengan karakteristik yang unik untuk proses pengolahan limbah makanan menjadi bioetanol.

D. Peta jalan penelitian

Gambar 2 menunjukkan peta jalan penelitian untuk kurun waktu 2022-2032, dengan topik aplikasi enzim dalam pengolahan limbah makanan menjadi bioetanol. Penelitian yang diajukan dalam proposal ini termasuk ke dalam tahap awal dalam pengembangan enzim baru yang akan diaplikasikan dalam proses produksi bioetanol dari fermentasi limbah makanan. Sejak tahun 2022, tim peneliti telah melakukan sampling potensi sumber daya alam dari Perairan Pulau Pelapis, Kalimantan Barat. Koleksi sampel terumbu karang tersebut akan dieksplorasi potensi bakteri sebagai sumber enzim baru dan unik untuk berbagai aplikasi.



Gambar 2 Peta Jalan Penelitian

METODA

Metode atau cara untuk mencapai tujuan yang telah ditetapkan ditulis tidak melebihi 1000 kata. Bagian ini dapat dilengkapi dengan diagram alir penelitian yang menggambarkan apa yang sudah dilaksanakan dan yang akan dikerjakan selama waktu yang diusulkan. Format diagram alir dapat berupa file JPG/PNG. Metode penelitian harus dibuat secara utuh dengan penahapan yang jelas, mulai dari awal bagaimana proses dan luarannya, dan indikator capaian yang ditargetkan yang tercermin dalam Rencana Anggaran Biaya (RAB).

A. Metode penelitian

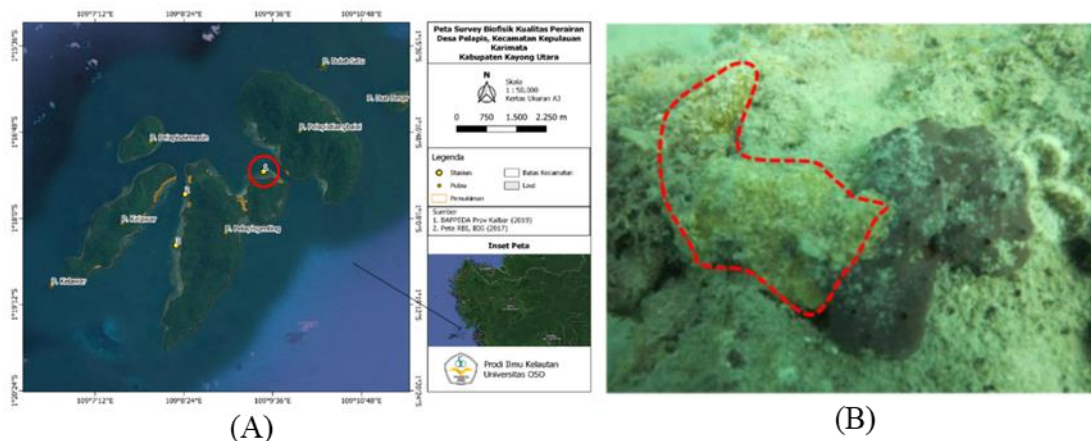
Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Sains dan Kelautan, Prodi Ilmu Kelautan Univoersitas OSO. Penelitian terdiri atas lima tahap, yaitu (i) isolasi bakteri yang berasosiasi dengan spons laut; (ii) Skrining bakteri pendegradasi pati; (iii) variasi kondisi degradasi pati oleh isolat bakteri; (iv) identikasi isolat bakteri; dan (v) analisis filogenetik. Adapun diagram alir penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3 Diagram alir penelitian

1. Isolasi bakteri yang berasosiasi dengan spons laut

Sampel spons/karang berasal dari Perairan Pulau Pelapis, Kalimantan Barat yang disimpan di Laboratorium Sains dan Kelautan, Universitas OSO dalam larutan stok gliserol dan disimpan di suhu -20°C . Sampel karang tersebut diambil pada lokasi di titik koordinat *latitude* $01^{\circ}17.460'$ (S) dan *longitude* $109^{\circ}08.421'$ (T) pada tahun 2022 dalam program penelitian Eksplorasi Pulau Pelapis (Gambar 4A). Jenis karang yang akan digunakan sebagai sumber isolat bakteri adalah *Axinella* sp (Gambar 4B).



Gambar 4 Lokasi asal sampel spons/karang yang digunakan pada penelitian ini

Isolasi bakteri dilakukan dengan menggunakan metode pengenceran bertahap. Sampel dibilas menggunakan air laut steril untuk membersihkan sedimen dan kotoran yang menempel pada jaringan. Permukaan sampel jaringan organisme laut diusap menggunakan tisu yang telah dibasahi alkohol 70%. Sampel jaringan dihaluskan (24). Sebanyak 1 g sampel dimasukkan ke dalam 9 mL air laut steril (pengenceran 10^{-1}), kemudian divortex hingga homogen, dan dilanjutkan pengenceran bertahap. Dari setiap hasil pengenceran, diambil $35\ \mu\text{L}$ dan ditanam ke permukaan media agar ZoBell Marine 2216E. Hasil isolasi diinkubasi pada suhu 30°C . Koloni yang tumbuh diamati berdasarkan morfologinya. Setiap koloni yang berbeda warna dan bentuk dipisahkan dan dimurnikan dengan menggunakan metode *streak plates* hingga didapatkan koloni tunggal (25)

2. Skrining bakteri pendegradasi pati

Kemampuan isolat bakteri dalam mendegradasi pati dilakukan dengan menumbuhkan bakteri pada media ZoBell *Marine* 2216E. dengan menambahkan 1% pati terlarut (b/v). Setelah kultur diinokasi pada suhu 30 °C selama 24 jam, larutan iodin (0,5 % KI (b/v) dan 0,15% I₂ (b/v)) dituangkan ke atas permukaan media. Bakteri yang menunjukkan aktivasi pendegradasi pati akan membentuk area halo bening disekitar koloni bakteri. Bakteri yang menunjukkan aktivitas amilolitik selanjutnya akan diuji kemampuannya untuk mendegradasi pati mentah (26).

3. Variasi kondisi degradasi pati oleh isolat bakteri

Uji kemampuan degradasi pati mentah dilakukan terhadap beberapa jenis pati, yaitu pati kentang, beras, dan singkong. Pati mentah dipersiapkan terlebih dahulu dengan pencucian menggunakan alkohol selama 18 jam, kemudian dikeringkan pada oven suhu 50 °C hingga kering. Pati tersebut dicampurkan ke dalam media ZoBell steril, sebelum dituangkan ke dalam cawan petri. Koloni bakteri ditumbuhkan dan diinokulasi pada suhu 30 °C selama 24 jam., kemudian diuji dengan larutan iodin. Selain itu, dilakukan variasi uji aktivitas dalam beberapa variasi suhu dan juga konsentrasi pati mentah. Selanjutnya, bakteri dengan aktivitas degradasi pati yang paling tinggi akan ditentukan jenis spesiesnya menggunakan metode 16s rRNA (27).

4. Identifikasi isolat bakteri

Isolat bakteri diidentifikasi berdasarkan urutan nukleotida gen 16S rRNA. Bakteri ditumbuhkan pada media ZoBell *Marine* pada suhu 30°C dan pengocokan 150 rpm selama 24 jam. Kultur sel disentrifuga pada 14.000 rpm selama 1 menit. Pelet sel diresuspensi dengan 50 µL 5% Chelex-100. Campuran divortex selama 5–10 detik, lalu diinkubasi pada suhu 98–100 °C selama 8–10 menit. Campuran sel segera didinginkan di es selama 1 menit. Sel divortex kembali dan disentrifuga selama 1 menit dengan kecepatan 14.000 rpm. Sebanyak 1 µl larutan digunakan dalam 20 µL reaksi PCR (28).

Amplifikasi gen 16S rRNA dilakukan dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR), dengan menggunakan pasangan primer BactF1 (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) dan UniB1 (GGTTACSTTGTACGACTT). Campuran reaksi PCR terdiri atas 1,25 U Taq DNA polimerase, 1 µL DNA genom isolat, 20 pmol masing-masing primer, bufer PCR (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂), dan 20 mmol campuran dNTP dalam volume total 50 µ L. Reaksi PCR dilakukan sebanyak 30 siklus (denaturasi pada 94 °C selama 45 detik, penempelan pada suhu yang bervariasi selama 45 detik, polimerisasi pada 72 °C selama 1 menit). Hasil PCR ditentukan konsentrasinya dengan metode elektroforesis gel agarosa. Urutan nukleotida produk PCR ditentukan dengan metode Sanger (Macrogen, Korea) (26). Pensejajaran urutan nukleotida dilakukan untuk dengan membandingkan urutan 16s rRNA yang diperoleh dengan basis data GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)(29) dengan menggunakan perangkat lunak webserver BLAST (30).

5. Analisis filogenetik dari isolat bakteri

Konstruksi pohon filogenetik dibuat untuk melihat jarak kekerabatan isolate bakteri dengan spesies bakteri lain. Pensejajaran urutan nukleotida 16s rRNA dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak MEGA (31). Pohon filogenetik dibangun dengan menggunakan metode *neighbor-joining* (32). Proses ini menghasilkan pohon filogenetik atau dendrogram yang merepresentasikan tingkat kekerabatan antar spesies bakteri.

a review [Internet]. Vol. 21, Reviews in Environmental Science and Biotechnology. Springer Netherlands; 2022. 299–329 p. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11157-021-09606-9>

- [10] Mühling M, Joint I, Willetts AJ. The biodiscovery potential of marine bacteria: an investigation of phylogeny and function. *Microb Biotechnol* [Internet]. 2013;6(4):361–70. Available from: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12054>
- [11] Becking LE, Cleary DFR, De Voogd NJ. Sponge species composition, abundance, and cover in marine lakes and coastal mangroves in Berau, Indonesia. *Mar Ecol Prog Ser* [Internet]. 2013;481:105–20. Available from: doi: <https://doi.org/10.3354/meps10155>
- [12] Kiran EU, Liu Y. Bioethanol production from mixed food waste by an effective enzymatic pretreatment. *Fuel* [Internet]. 2015;159:463–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2015.06.101>
- [13] Loizidou M, Alamanou DG, Sotiropoulos A, Lytras C, Mamma D, Malamis D, et al. Pilot Scale System of Two Horizontal Rotating Bioreactors for Bioethanol Production from Household Food Waste at High Solid Concentrations. *Waste and Biomass Valorization* [Internet]. 2017;8(5):1709–19. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12649-017-9900-6>
- [14] Trisna TE, Jai J, Shirleen D, Matthew R, K K. A Review on Bioethanol Production through the Valorization of Food Waste in Indonesia. *Indones J Life Sci | ISSN 2656-0682* [Internet]. 2022;4(2):60–86. Available from: <https://doi.org/10.54250/ijls.v4i2.139>
- [15] Febrianti F, Syamsu K, Rahayuningsih M. Bioethanol production from tofu waste by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) using microbial consortium. *Chem Eng* [Internet]. 2017;8(5):898–908. Available from: <https://doi.org/10.14716/ijtech.v8i5.872>
- [16] Swain MR, Natarajan V, Krishnan C. Marine Enzymes and Microorganisms for Bioethanol Production [Internet]. 1st ed. Vol. 80, Marine Enzymes Biotechnology: Production and Industrial Applications Part III - Application of Marine Enzymes. Elsevier Inc.; 181–197 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.12.003>
- [17] Chakraborty S, Khopade A, Kokare C, Mahadik K, Chopade B. Isolation and characterization of novel alpha-amylase from marine *Streptomyces* sp. D1. *J Mol Catal B Enzym* [Internet]. 2009;58(1–4):17–23. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2008.10.011>
- [18] Mohapatra BR, Banerjee UC, Bapuji M. Characterization of a fungal amylase from *Mucor* sp. associated with the marine sponge *Spirastrella* sp. *J Biotechnol* [Internet]. 1998 Feb 5;60(1–2):113–7. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165697001971>
- [19] Bhanja T, Kumar A, Banerjee R, Chandna P, Chander R. Improvement of microbial α -amylase stability: Strategic approaches. *Process Biochem* [Internet]. 2016;51(10):1380–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2016.06.021>
- [20] Puspasari F, Radjasa OK, Noer AS, Nurachman Z, Syah YM, van der Maarel M, et al. Raw starch-degrading α -amylase from *Bacillus aquimaris* MKSC 6.2: Isolation and expression of the gene, bioinformatics and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *J Appl Microbiol* [Internet]. 2013;114(1):108–20. Available

from: <https://doi.org/10.1111/jam.12025>

- [21] Shofiyah SS, Yuliani D, Widya N, Sarian FD, Puspasari F, Radjasa OK, et al. Isolation, expression, and characterization of raw starch degrading α -amylase from a marine lake *Bacillus megaterium* NL3. *Heliyon* [Internet]. 2020;6(12):0–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05796>
- [22] Sarian FD, Janeček Š, Pijning T, Nurachman Z, Radjasa OK, Dijkhuizen L, et al. A new group of glycoside hydrolase family 13 α -amylases with an aberrant catalytic triad. *Sci Rep* [Internet]. 2017;7(1):1–10. Available from: <https://www.nature.com/articles/srep44230>
- [23] Kalpana BJ, Pandian SK. Halotolerant, acid-alkali stable, chelator resistant and raw starch digesting α -amylase from a marine bacterium *Bacillus subtilis* S8 – 18. *J Basic Microbiol* [Internet]. 2014;54(8):802–11. Available from: <https://doi.org/10.1002/jobm.201200732>
- [24] Cita YP, Radjasa OK, Sudharmono P. Aktivitas Antibakteri Isolat bakteri X2 yang Berasosiasi Spons *Xestospongia testudinaria* dari Pantai Pasir Putih Situbondo terhadap Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. *J Ilmu Kefarmasian Indones* [Internet]. 2016;14(2):206–11. Available from: <http://jifi.farmasi.univpancasila.ac.id/index.php/jifi/article/view/32>
- [25] Radjasa OK, Salasia SIO, Sabdono A, Wiese J, Imhoff JF, Lämmle C, et al. Antibacterial activity of marine bacterium *Pseudomonas* sp. associated with soft coral *Sinularia polydactyla* against *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. *Int J Pharmacol.* 2007;3(2):170–4. Available from: <https://doi.org/10.3923/ijp.2007.170.174>.
- [26] Puspasari F, Nurachman Z, Noer AS, Radjasa OK, Van Der Maarel MJEC, Natalia D. Characteristics of raw starch degrading α -amylase from *Bacillus aquimaris* MKSC 6.2 associated with soft coral *Sinularia* sp. *Starch/Staerke* [Internet]. 2011;63(8):461–7. Available from: <https://doi.org/10.1002/star.201000127>
- [27] Puspasari F. Alpha-Amilase Bakteri Terumbu Karang *Bacillus Aquimari* MKSC 6.2: Suatu Enzim Baru Pendegarasi Butir Pati. Institut Teknologi Bandung; 2011.
- [28] Cao M, Fu Y, Guo Y, Pan J. *Chlamydomonas* (Chlorophyceae) colony PCR. *Protoplasma* [Internet]. 2009;235(1):107–10. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00709-009-0036-9>
- [29] Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Wheeler DL. GenBank. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2008;36(SUPPL. 1):25–30. Available from: <https://doi.org/10.1093/nar/gku1216>
- [30] Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST : a new generation of protein database search programs. 2017;25(17):3389–402. Available from: <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- [31] Kumar S, Nei M, Dudley J, Tamura K. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinform* [Internet]. 2008 Jul 1;9(4):299–306. Available from: <https://doi.org/10.1093/bib/bbn017>
- [32] Kapli P, Yang Z, Telford MJ. Phylogenetic tree building in the genomic age. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2020;21(7):428–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41576-020-0233-0>



UNIVERSITAS OSO

Jl. Untung Suropati No. 99 Pontianak, Telp. +628115686060, Website: oso.ac.id Email: info@oso.ac.id
Akta Notaris Herlina Pakpahan, S.H. No. 01 Tanggal 02 September 2015
Disahkan Menkumham RI No. AHU-0012655.AH.01.04 Tahun 2015

PERNYATAAN KESANGGUPAN PELAKSANAAN DAN PENYUSUNAN LAPORAN PENELITIAN

Saya yang bertanda-tangan di bawah ini:

Nama : Dr. Sofi Siti Shofiyah
NIDN : 1118128804
Instansi : Universitas OSO

Sehubungan dengan Kontrak Penelitian:

Tanggal Kontrak Induk* : 19 Juni 2023
Nomor Kontrak Induk* : 187/E5/PG.02.00.PL/2023
Tanggal Kontrak Turunan** : 23 Juni 2023
Nomor Kontrak Turunan** : 123/LL11/KM/2023
Judul Penelitian : Isolasi Bakteri Laut Pendegradasi Pati dari Pulau Pelapis
Kalimantan Barat untuk Produksi Bioetanol dari Limbah Makanan
Tahun Usulan : 2023
Tahun Pelaksanaan : 2023
Jangka Waktu Penelitian : 1 tahun
Periode Penelitian : Tahun ke 1 dari 1 tahun*
Dana Penelitian : Rp. 20.000.000,00

Periode	Dana Penelitian (Rp)	Dana Tambahan (Rp)
Tahun ke-1	Rp. 20.000.000,00	-
Tahun ke-2	-	-
Tahun ke-3	-	-

Dengan ini menyatakan bahwa Saya bertanggungjawab penuh untuk menyelesaikan penelitian serta mengunggah laporan kemajuan dan laporan akhir penelitian sebagaimana diatur dalam Kontrak Penelitian tersebut diatas.



UNIVERSITAS OSO

Jl. Untung Suropati No. 99 Pontianak, Telp. +628115686060, Website: oso.ac.id Email: info@oso.ac.id
Akta Notaris Herlina Pakpahan, S.H. No. 01 Tanggal 02 September 2015
Disahkan Menkumham RI No. AHU-0012655.AH.01.04 Tahun 2015

Apabila sampai dengan masa penyelesaian pekerjaan sebagaimana diatur dalam Kontrak Penelitian tersebut di atas saya lalai/cidera janji/wanprestasi dan/atau terjadi pemutusan Kontrak Penelitian, saya bersedia untuk mengembalikan/menyetorkan kembali uang ke kas negara sebesar nilai sisa pekerjaan yang belum ada prestasinya.

Demikian surat pernyataan ini dibuat dengan sebenarnya.

Pontianak, 10 Juli 2023



(Dr. Sofi Siti Shofiyah)

Keterangan:

*diisi tanggal dan nomor Kontrak Induk antara DRTPM Kemdikbudristek dengan LP/LPPM Perguruan Tinggi Negeri atau LLDIKTI

**Kontrak Turunan:

- Untuk Perguruan Tinggi Negeri diisi tanggal dan nomor kontrak antara LP/LPPM Perguruan Tinggi dengan Peneliti
- Untuk Perguruan Tinggi Swasta diisi tanggal dan nomor kontrak LLDIKTI dg PTS dan PTS dengan Peneliti yang dipisahkan dengan tanda koma (,)

PERSETUJUAN PENGUSUL

Tanggal Pengiriman	Tanggal Persetujuan	Nama Pimpinan Pemberi Persetujuan	Sebutan Jabatan Unit	Nama Unit Lembaga Pengusul
14/04/2023	14/04/2023	Dr SOFI SIT SHOFIYAH S.Si, M.Si	Pimpinan LP/LPPM - Penelitian	Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat

Komentar : Disetujui

Proposal sangat baik
