

**113/BIOLOGI (BIOTEKNOLOGI UMUM)**

**LAPORAN AKHIR  
PENELITIAN FUNDAMENTAL**



**SINTESIS BIOPLASTIK OLEH BAKTERI AMILOLITIK LOKAL ASAL  
SULAWESI TENGGARA MENGGUNAKAN SUBSTRAT PATI SAGU  
DAN KARAKTERISTIK BIODEGRADASINYA**

**TAHUN II**

**Dr. NUR ARFA YANTI, M.Si./0014017303  
Dr. NURHAYANI H. M, M.Si./ 0031126716**

**UNIVERSITAS HALU OLEO  
2016**

## HALAMAN PENGESAHAN

**Judul** : SINTESIS BIOPLASTIK OLEH BAKTERI  
AMILOLITIK LOKAL ASAL SULAWESI TENGGARA  
MENGUNAKAN SUBSTRAT PATI SAGU DAN  
KARAKTERISTIK BIODEGRADASINYA

**Peneliti/Pelaksana**  
Nama Lengkap : Dr. NUR ARFA YANTI M.Si.  
Perguruan Tinggi : Universitas Halu Oleo  
NIDN : 0014017303  
Jabatan Fungsional : Lektor  
Program Studi : Pendidikan Biologi  
Nomor HP : 081392148522  
Alamat surel (e-mail) : arfayanti73@yahoo.com

**Anggota (1)**  
Nama Lengkap : Dr. NURHAYANI H MUHIDIN M.Si.  
NIDN : 0031126716  
Perguruan Tinggi : Universitas Halu Oleo  
Institusi Mitra (jika ada) :  
Nama Institusi Mitra : -  
Alamat : -  
Penanggung Jawab : -  
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 2 dari rencana 2 tahun  
Biaya Tahun Berjalan : Rp 60.000.000,00  
Biaya Keseluruhan : Rp 125.000.000,00

Mengetahui,  
Dekan FMIPA



(Dr. Muh. Zamrun F. S.Si., M.Si., M.Sc.)  
NIP/NIK 197204221998031001

Kendari, 31 - 10 - 2016  
Ketua,



(Dr. NUR ARFA YANTI M.Si.)  
NIP/NIK 197301142000032001

Menyetujui,  
Ketua LPPM



(Dr. Ir. H. R. Marsuki Iswandi, M.Si.)  
NIP/NIK 196511281991031005

## RINGKASAN

Tujuan jangka panjang dari penelitian ini adalah menghasilkan bioplastik terdegradasi berbasis pati sagu yang dapat digunakan sebagai alternatif pengganti plastik sintetis dan menghasilkan publikasi pada jurnal nasional/internasional. Tujuan khusus yang ingin dicapai pada penelitian ini adalah informasi ilmiah mengenai mekanisme sintesis dan karakteristik degradasi bioplastik PHB dari pati sagu oleh bakteri amilolitik yang dapat digunakan sebagai modal dasar untuk mengembangkan bioplastik tersebut.

**Pada Tahun II** difokuskan pada kajian mengenai karakteristik degradasi (*biodegradability characteristic*) bioplastik PHB yang disintesis oleh bakteri amilolitik lokal asal Sulawesi Tenggara dan kecepatan degradasinya di alam. Luaran pada Tahun II ini berupa informasi dasar yang mengungkap karakteristik bioplastik PHB yang dihasilkan oleh bakteri amilolitik lokal sebagai bahan yang mudah didegradasi dan publikasi pada jurnal internasional.

Pengambilan data pada tahun II meliputi pembuatan film polimer PHB, uji degradasi polimer PHB di alam dan uji degradasi polimer PHB secara enzimatik. Pembuatan lapisan film bioplastik PHB dilakukan dengan mengekstraksi polimer PHB menggunakan campuran larutan kloroform dan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Uji degradasi polimer PHB di alam dilakukan untuk mengetahui laju biodegradasi PHB secara alami dengan metode penimbunan dalam tanah (*soil burial test*) sedangkan uji degradasi polimer PHB secara enzimatik dilakukan untuk mengetahui laju biodegradasi PHB oleh enzim dengan menggunakan enzim PHB depolimerase dan enzim lipase. Pada penelitian ini juga dilakukan Pengamatan morfologi film PHB sebelum dan sesudah didegradasi dengan menggunakan SEM (*Scanning Electron Microscopy*).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa bioplastik PHB yang dihasilkan oleh *Bacillus megaterium* PSA10 dapat didegradasi secara enzimatik menggunakan enzim lipase dalam waktu 72 jam sebanyak 33,33%. Bioplastik PHB dapat juga didegradasi secara alami di tanah sebanyak 52,38% dalam waktu 5 minggu.

Hasil pengamatan permukaan bioplastik PHB sebelum dan setelah didegradasi menggunakan Scanning electron microscopy (SEM) menunjukkan bahwa terjadi kerusakan pada permukaan polimer PHB setelah didegradasi, baik secara enzimatik maupun secara alami di tanah. Dengan demikian, polimer PHB yang diproduksi oleh bakteri amilolitik lokal *B.megaterium* PSA10 menggunakan substrat pati sagu bersifat dapat didegradasi secara biologis (*biodegradable*).

**Kata Kunci : Bioplastik, Poli- -hidroksibutirat, Biodegradasi, Bakteri amilolitik, Pati sagu**

## PRAKATA

Puji dan syukur ke hadirat Allah SWT atas berkah dan karuniaNya maka penelitian yang berjudul **Sintesis Bioplastik oleh Bakteri Amilolitik Lokal asal Sulawesi Tenggara menggunakan Substrat Pati Sagu dan Karakteristik biodegradasinya** telah diselesaikan. Penelitian ini dapat dilaksanakan atas bantuan dari berbagai pihak, oleh karena itu penulis mengucapkan banyak terima kasih yang mendalam kepada :

1. Ketua Lembaga Penelitian Universitas Halu Oleo beserta stafnya, atas penyaluran dana dari Ditlitabmas Ditjen DIKTI melalui hibah penelitian fundamental sehingga penelitian ini dapat terlaksana dengan baik.
2. Rektor Universitas Halu Oleo, Dekan FMIPA UHO, dan ketua jurusan Biologi FMIPA yang telah memberikan kesempatan peneliti untuk melakukan penelitian.
3. Pimpinan dan staf Laboratorium Biologi, FMIPA UHO yang berkenan memberikan ijin pemakaian dan fasilitas di laboratorium Mikrobiologi selama penelitian.
4. Semua pihak yang belum disebutkan atas bantuan, dukungan dan kerjasama dalam menyelesaikan penelitian ini.

Hasil penelitian ini merupakan upaya untuk mengungkap karakteristik degradasi PHB berbasis pati sagu, namun penelitian ini masih memerlukan beberapa tahapan lanjutan agar dapat menyempurnakan kajian. Penulis berharap hasil penelitian ini dapat bermanfaat.

Kendari, 2016  
Tim Peneliti

## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
PRAKATA	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR GAMBAR	vi
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
BAB I. PENDAHULUAN	1
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	3
BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	6
BAB IV. METODE PENELITIAN	7
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN	10
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN	17
DAFTAR PUSTAKA	18

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
1. Skema sintesis dan degradasi Poli- $\beta$ -hidroksibutirat (PHB)	4
2. <i>Roadmap</i> rencana penelitian	5
3. Skema percobaan sintesis dan degradasi bioplastik PHB dari pati sagu oleh bakteri amilolitik	7
4. Hasil ekstraksi PHB dari sel <i>Bacillus</i> sp. PSA10	10
5. Lapisan film bioplastik PHB	11
6. Persentase penurunan bioplastik PHB hasil degradasi enzim lipase	12
7. Morfologi permukaan film PHB sebelum dan setelah degradasi secara mikroskopis	13
8. Persentase penurunan massa bioplastik PHB hasil degradasi secara alami	14
9. Morfologi permukaan film PHB sebelum dan setelah degradasi secara alami	15
10. Hasil pengamatan permukaan film PHB menggunakan SEM	16

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Hasil pengukuran persentase penurunan massa PHB setelah degradasi	11
2. Hasil pengukuran persentase penurunan massa PHB setelah degradasi secara alami	14

## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Bukti Publikasi hasil penelitian melalui seminar	20
2. Bukti naskah telah diterbitkan pada jurnal internasional	21
3. Bukti pendaftaran Paten	22
4. Sampul Draft Buku Ajar	23

## BAB I. PENDAHULUAN

### I.1. Latar Belakang

Poli- -hidroksibutirat (PHB) merupakan polimer yang disintesis oleh bakteri dan digunakan sebagai bahan baku plastik. Pemanfaatan bioplastik PHB sangat menguntungkan bagi lingkungan karena mudah didegradasi, dapat diperbaharui dan mengurangi ketergantungan pada minyak bumi yang merupakan bahan baku plastik sintetik. Namun demikian, hingga saat ini pengembangan PHB sebagai bahan baku plastik masih mengalami kendala karena harga produk PHB yang jauh lebih tinggi dibandingkan dengan plastik sintetik. Salah satu upaya untuk mengatasi kendala tersebut adalah menggunakan substrat murah, seperti pati sagu untuk memproduksi PHB. Penggunaan pati sagu sebagai substrat untuk memproduksi PHB memerlukan bakteri yang dapat menghidrolisis pati sagu menjadi glukosa (bersifat amilolitik) untuk dikonversi menjadi polimer PHB.

*Bacillus* sp. PSA10 merupakan bakteri amilolitik *indigenous* (lokal) asal Sulawesi Tenggara yang dapat memproduksi PHB menggunakan substrat pati sagu secara langsung sebanyak 66,81 % (g PHB/g berat kering sel) (Yanti *et al.*, 2013). Penelitian yang mengungkap mengenai mekanisme sintesis PHB dari pati sagu telah diawali dengan mengkaji mekanisme bakteri amilolitik lokal *Bacillus* sp. PSA10 mengkonversi pati sagu menjadi polimer PHB. Berdasarkan penelitian sebelumnya, diperoleh informasi bahwa *Bacillus* sp. PSA10 mampu menggunakan secara langsung pati sagu untuk mensintesis PHB melalui proses sakarifikasi dan fermentasi secara simultan (*simultaneous saccharification and fermentation*). Hal ini mengindikasikan bahwa *Bacillus* sp. PSA10 menghidrolisis pati sagu menjadi glukosa dan selanjutnya glukosa tersebut langsung difermentasi menjadi PHB, sehingga produksi PHB oleh bakteri tersebut berlangsung cepat dengan produk yang tinggi (Yanti *et al.*, 2013). Namun demikian, aktivitas enzim yang berperan dalam proses sintesis PHB dari substrat pati sagu oleh bakteri amilolitik belum pernah dilakukan. Sebagai akibatnya, kita hanya dapat berasumsi saja tentang mekanisme sintesis PHB dari pati sagu. Oleh karena itu, penelitian mengenai aktivitas enzim yang berperan dalam sintesis PHB dari pati sagu menjadi penting untuk mengungkap secara komprehensif mengenai mekanisme sintesis PHB dari pati sagu.

Salah satu persyaratan yang harus dimiliki oleh polimer bioplastik yang akan digunakan sebagai pengganti plastik sintetik adalah sifatnya yang mudah didegradasi secara alami di alam (*biodegradability characteristic*). Karakteristik degradabilitas Bioplastik PHB yang disintesis oleh bakteri amilolitik lokal sangat perlu diketahui, agar bioplastik tersebut dapat digunakan sebagai pengganti plastik sintetik yang bersifat sulit didegradasi (*undegradable*). Oleh karena itu, kajian mengenai sintesis PHB dari pati sagu oleh bakteri amilolitik dan karakteristik degradasi polimer PHBnya sangat diperlukan untuk pengembangan bioplastik PHB berbahan baku pati sagu.

## BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Polihidroksibutirat (PHB)

Polihidroksibutirat (PHB) adalah biopolimer alami yang merupakan bahan baku plastik terdegradasi yang disintesis oleh mikrobia dan diakumulasi sebagai granula intraselular (Lenz & Marchessault, 2005). PHB diperkenalkan oleh Byrom (1987) sebagai prototipe termoplastik terdegradasi yang dapat memecahkan masalah polusi plastik.

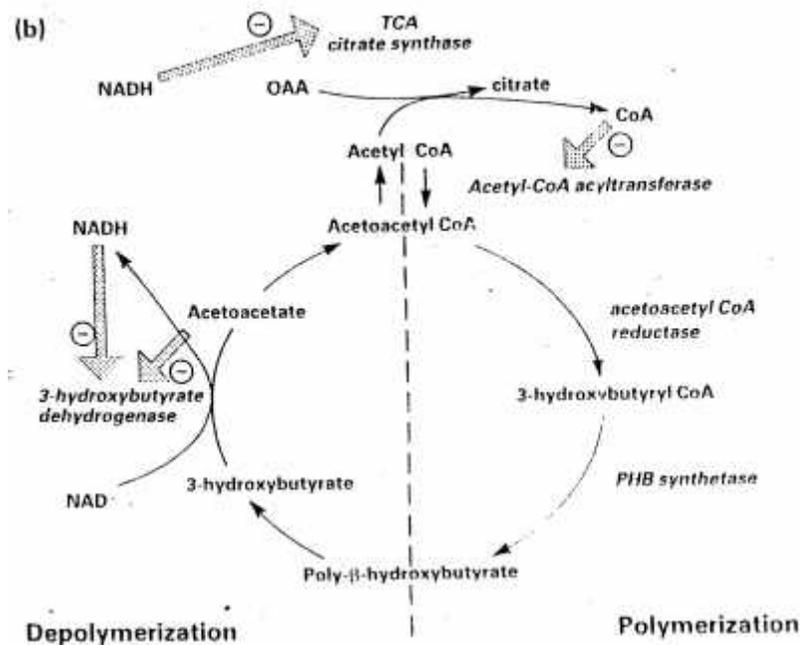
Keunggulan PHB sebagai bahan baku plastik terletak pada sifatnya yang tahan panas, mudah dibentuk, tidak mudah patah serta mudah didegradasi secara mikrobiologis (*biodegradable*). PHB juga memiliki sifat *biocompatible* terhadap jaringan di dalam tubuh manusia sehingga berpotensi digunakan dalam bidang medis, seperti benang bedah (Lenz & Marchessault, 2005).

PHB tersusun dari monomer 3-hidroksibutirat yang terangkai oleh ikatan . Gugus karboksil dari satu monomer berikatan dengan gugus hidroksil monomer lainnya dengan ikatan ester (Lenz & Marchessault, 2005).

### 2.2. Sintesis dan Degradasi Polihidroksibutirat (PHB) oleh Bakteri

Sumber C yang umum digunakan oleh bakteri untuk sintesis PHB adalah glukosa. Glukosa akan dimetabolisme oleh bakteri menjadi piruvat yang selanjutnya digunakan untuk mensintesis PHB. Sintesis PHB dilakukan oleh serangkaian kerja enzim yaitu (i) -ketotiolase (asetil-CoA asetil transferase) yang mengkatalisis dimerisasi derivat CoA asam asetat (asetil-CoA) menjadi asetoasetil-CoA, (ii) Asetoasetil-CoA reduktase yang mengkatalisis hidrogenasi asetoasetil-CoA menjadi [R]-3-hidroksibutiril-CoA yang merupakan monomer PHB dan (iii) PHB sintase mengkatalisis polimerisasi monomer PHB menjadi PHB (Byrom, 1987; Lenz & Marchessault, 2005).

Enzim yang berperan dalam degradasi polimer PHB adalah i) depolimerase atau hidrolase yaitu enzim yang menghidrolisis granula PHB menjadi [R]-3-asam hidroksibutirat, ii) dehidrogenase spesifik yaitu enzim yang mengubah [R]-3-asam hidroksibutirat menjadi asam asetoasetat dan iii) Asetoasetil-CoA sintetase merupakan enzim yang mengubah asam asetoasetat menjadi asam asetat (Byrom, 1987; Lenz & Marchessault, 2005). Mekanisme sintesis dan degradasi PHB disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Skema sintesis dan degradasi Poli- $\beta$ -hidroksibutirat (PHB) (Lenz & Marchessault, 2005)

### 2.3. Enzim Amilolitik Mikrobial

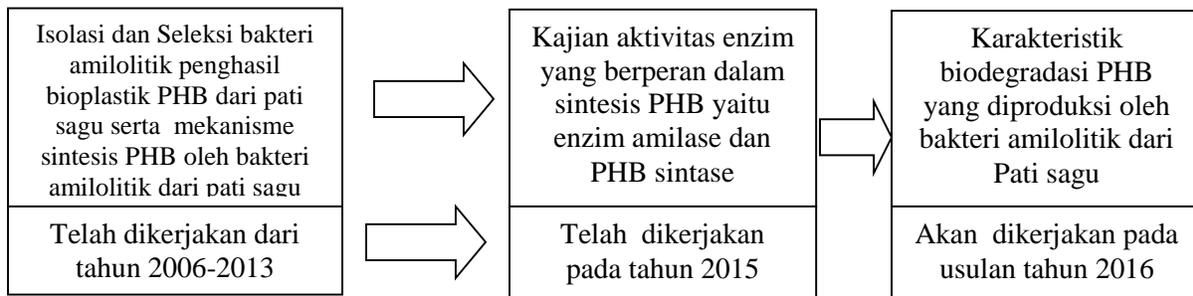
Enzim yang berperan dalam proses hidrolisis pati adalah enzim amilolitik (amilase). Enzim amilolitik menghidrolisis ikatan glikosidik pada polisakarida. Berdasarkan cara kerjanya dalam menghidrolisis pati, maka enzim amilolitik dibedakan dalam dua kelompok (Antranikian, 1990) yaitu :

- (i) Endoamilase, yaitu enzim yang menghidrolisis ikatan pada molekul pati di bagian dalam (interior) secara acak dan menghasilkan senyawa oligosakarida linier dan bercabang dengan panjang rantai bervariasi. Contohnya adalah  $\alpha$ -amilase.
- (ii) Eksoamilase, yaitu enzim yang menghidrolisis ikatan pada molekul pati dari ujung non reduksi dan menghasilkan produk akhir sakarida yang pendek. Enzim  $\alpha$ -amilase, glukamilase dan  $\beta$ -glukosidase merupakan enzim-enzim yang termasuk eksoamilase.

Beberapa penelitian mengenai produksi PHB menggunakan berbagai macam jenis pati dan limbahnya sebagai substrat seperti pati jagung, pati singkong, pati kentang (Ramadas *et al.*, 2009) dan pati sagu (Syamsu *et al.*, 2006) masih membutuhkan enzim amilase untuk menghidrolisis substrat. Perlakuan pendahuluan terhadap substrat pati menggunakan enzim kurang efisien dan ekonomis dalam produksi PHB (Byrom, 1987), sehingga pemanfaatan mikrobial penghasil enzim amilase dapat menjadi solusi yang tepat.

## Roadmap Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan memanfaatkan bakteri amilolitik lokal asal Sulawesi Tenggara yaitu *Bacillus* sp. PSA10. Bakteri ini dipilih karena telah terbukti mampu memproduksi bioplastik dari substrat pati sagu dengan kadar tinggi (66,81 %) sehingga berpotensi digunakan untuk skala industri. Kajian mengenai aktivitas enzim *Bacillus* sp. PSA10 yang berperan dalam sintesis PHB dari pati sagu dan karakteristik biodegradasinya direncanakan akan dilaksanakan secara bertahap selama 2 tahun. *Roadmap* penelitian ini ditampilkan pada Gambar 3.



Gambar 2. *Roadmap* rencana penelitian Sintesis bioplastik PHB dari Pati Sagu oleh Bakteri Amilolitik dan karakteristik biodegradasinya

Beberapa kegiatan yang telah dilakukan oleh pengusul terkait dengan topik penelitian yang diusulkan antara lain :

1. Pada Tahun 2005 melakukan penelitian berjudul Isolasi dan Seleksi Mikroorganisme Amilolitik dari Limbah Sagu melalui dana PDM-DIKTI
2. Pada Tahun 2009 melakukan penelitian berjudul Bakteri amilolitik penghasil Poli- -hidroksibutirat (PHB) dari substrat pati sagu : Identifikasi dan Optimasi Produksi PHB melalui dana Hibah Program Doktor-DIKTI..
3. Pada Tahun 2011 melakukan penelitian berjudul Bakteri Lokal Asal Sulawesi Tenggara yang Berpotensi sebagai Penghasil Bioplastik melalui dana BLU-Unhalu
4. Pada Tahun 2013 melakukan penelitian berjudul Mekanisme sintesis Bioplastik Poli- -hidroksibutirat (PHB) dari Pati Sagu oleh bakteri Amilolitik.

Berdasarkan pengalaman bekerja dengan bakteri amilolitik penghasil bioplastik PHB sebelumnya, maka topik kegiatan yang diusulkan diharapkan dapat diselesaikan, apabila didukung pendanaan DIKTI dan keahlian dari anggota tim. Kedepannya, informasi ilmiah yang diperoleh akan diaplikasikan untuk pengembangan produksi bioplastik terdegradasi dari pati sagu oleh bakteri amilolitik agar diperoleh PHB dengan kualitas dan kuantitas yang tinggi sebagai alternatif pengganti plastik sintetik.

## **BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN**

### **III.1. Tujuan**

Tujuan khusus dari penelitian untuk tahun II ini adalah :

1. mengetahui karakteristik *biodegradable* dan laju degradasi bioplastik PHB yang dihasilkan oleh bakteri amilolitik lokal di alam
2. mengetahui karakteristik *biodegradable* dan laju degradasi bioplastik PHB yang dihasilkan oleh bakteri amilolitik lokal secara enzimatik

Penelitian ini diharapkan menghasilkan informasi ilmiah yang dapat digunakan sebagai modal dasar untuk mengembangkan produksi bioplastik PHB dari pati sagu oleh bakteri amilolitik pada skala industri.

### **III.2. Manfaat Penelitian**

Penelitian ini diharapkan akan bermanfaat dalam :

1. Pengembangan produksi PHB dengan menggunakan pati sagu sebagai substrat dapat digunakan sebagai model teknologi bioplastik berbasis pati misalnya pati singkong, ganyong, garut dan ubi.
2. Pengembangan PHB dari pati sagu sebagai bahan baku plastik terdegradasi (*biodegradable plastics*) dapat mendukung program pemerintah yang mencanangkan pengembangan industri berwawasan lingkungan.

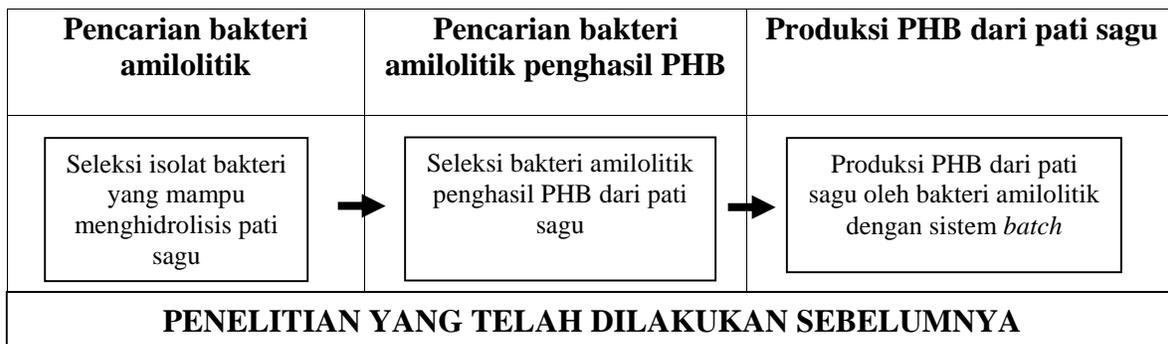
Pengembangan bakteri amilolitik *indigenous* sebagai agensia sakarifikasi yang dapat dimanfaatkan untuk memproduksi produk-produk yang bermanfaat seperti bioplastik, alkohol, aseton, *High Fructose Syrup* dan asam-asam organik.

## BAB IV. METODE PENELITIAN

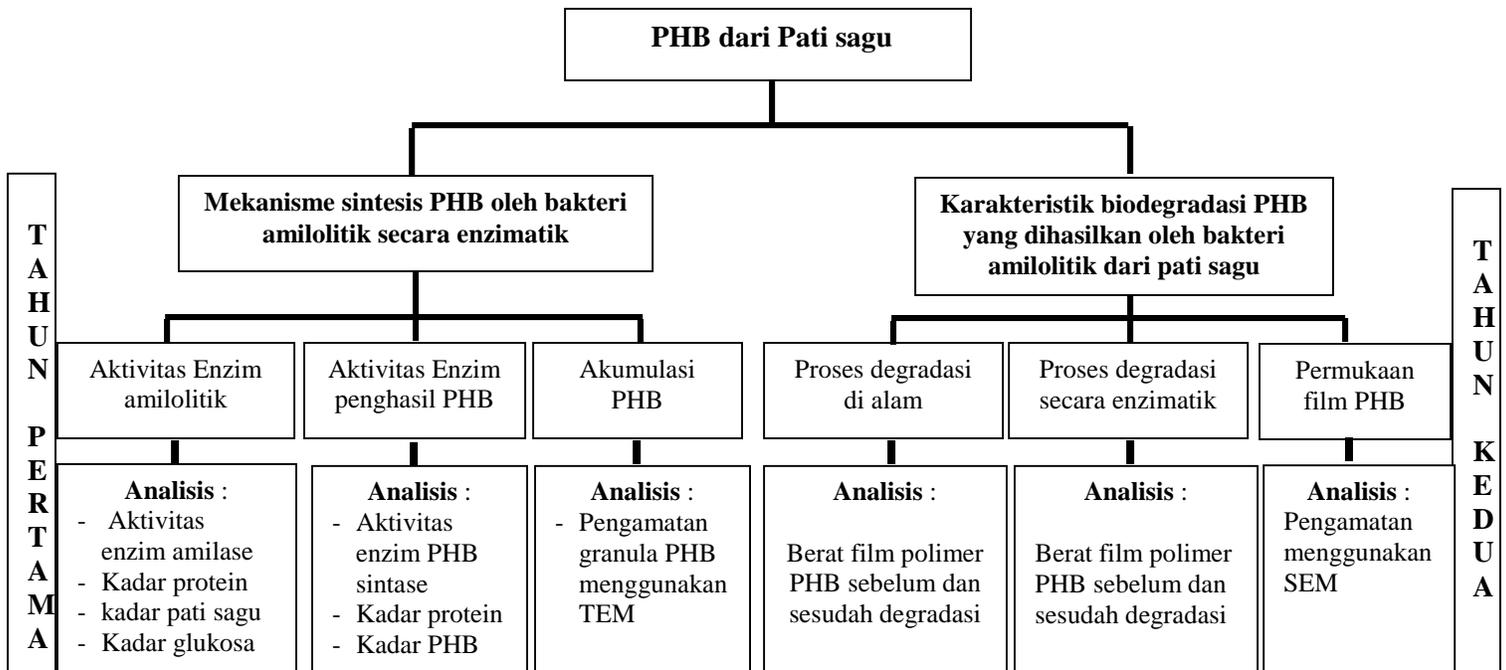
### A. Tahapan Penelitian

Pada dasarnya penelitian ini dilakukan dalam dua tahap selama 2 tahun. Bakteri amilolitik yang digunakan dalam penelitian ini merupakan strain bakteri amilolitik dari penelitian sebelumnya yaitu *Bacillus* sp. PSA10. Percobaan dan pengamatan serta analisis yang akan dilakukan pada setiap tahapan penelitian secara skematis ditampilkan pada Gambar 4.

#### Aspek Penelitian Produksi PHB dari pati sagu



#### Penelitian Kajian Sintesis dan degradasi Bioplastik PHB dari pati sagu oleh Bakteri Amilolitik



Gambar 3. Skema percobaan sintesis dan degradasi bioplastik PHB dari pati sagu oleh bakteri amilolitik

## **B. Prosedur Penelitian**

Penelitian pada tahun II dilakukan uji degradasi bioplastik PHB yang dihasilkan oleh bakteri amilolitik *Bacillus* sp. PSA10 dari substrat pati sagu. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui karakteristik degradabilitas polimer PHB di alam dan secara enzimatik. Hasil percobaan pada Tahun kedua ini diharapkan dapat mengungkap karakteristik biodegradabilitas polimer PHB yang dihasilkan oleh bakteri amilolitik dari pati sagu. Percobaan pada tahun kedua ini meliputi :

### **1. Pembuatan Film polimer PHB**

Polimer PHB yang akan diuji karakteristik degradabilitasnya, dibuat dalam bentuk lapisan film. Prosedur pembuatan lapisan film PHB adalah polimer diekstraksi dari sel dengan cara 10 g pelet sel disuspensikan dengan 100 ml larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 % (v/v) dan 100 ml kloroform lalu *dishaker* selama 2 jam kemudian disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 20 menit. Hasil sentrifugasi akan terbentuk 3 lapisan yaitu (i) larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (ii) debris sel dan (iii) larutan kloroform dan polimer. Lapisan pertama dan kedua dihilangkan sedangkan lapisan ketiga dituang pada cawan petri kemudian dibiarkan hingga kloroform menguap dan menghasilkan lapisan film yang tipis. Film PHB tersebut selanjutnya digunakan untuk uji degradasi di alam dan secara enzimatik.

### **2. Uji Degradasi Polimer PHB secara Enzimatik**

Uji degradasi enzimatik dilakukan untuk mengetahui laju biodegradasi polimer PHB oleh enzim. Enzim yang digunakan adalah enzim lipase dari *Rhizopus* sp (Oxoid). Degradasi enzimatik film PHB dilakukan dalam buffer fosfat 0,1M (pH 7,4) pada suhu 37°C. Film PHB (berat 10 mg; dimensi 10x10 mm; tebal 0,1 mm) ditempatkan dalam tabung reaksi kecil yang mengandung 1,0 mL buffer. Reaksi dimulai dengan penambahan larutan enzim lipase sebanyak 1,5 µl. Larutan diinkubasi disertai pengocokan. Film PHB kemudian dicuci dengan akuades, lalu metanol dan dikeringkan. Berat yang hilang dihitung sebagai persentase penurunan berat dari berat film awal (Suhartini & Rahmawati, 2007). Pengambilan sampel dilakukan setiap 12 jam selama 72 jam.

### **3. Uji Degradasi Polimer PHB di Alam**

Penelitian ini dilakukan dengan metode penimbunan dalam tanah (*soil burial test*) (Suhartini & Rahmawati, 2007). *Soil burial test* dilakukan untuk mengetahui laju biodegradasi

polimer dalam tanah. Sampel PHB ditanam di dalam tanah yang di ambil di sekitar area pembuangan sampah (TPA) menggunakan pot bunga plastik. Sampel disiram setiap 6 hari agar kandungan kelembabannya cukup. Pengambilan sampel dilakukan setiap 1 minggu (7 hari) selama 5 minggu.

#### **4. Pengamatan morfologi film PHB menggunakan SEM**

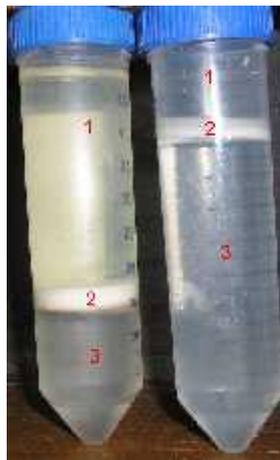
Pengamatan morfologi film PHB sebelum dan sesudah didegradasi, ditentukan menggunakan SEM (*Scanning Electron Microscopy*) JEOL JSM-5400 dengan akselerasi tegangan 15 kV.

## BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian yang dilakukan pada tahun kedua adalah mengkaji karakteristik degradasi bioplastik PHB yang diproduksi dari pati sagu oleh bakteri amilolitik lokal asal Sulawesi Tenggara. Tahapan penelitian untuk tahun kedua meliputi produksi bioplastik PHB dalam bentuk lapisan film dari substrat pati sagu menggunakan *Bacillus megaterium* PSA10, uji degradasi bioplastik secara enzimatik menggunakan enzim Lipase murni yang diisolasi dari kapang *Rhizopus* sp (Oxoid). Dan uji degradasi PHB secara alami di tanah. Analisis hasil degradasi biofilm PHB dilakukan berdasarkan persentase penurunan massa film PHB dan kerusakan permukaan bioplastik secara visual diamati menggunakan mikroskop cahaya dan *Scanning Electron Microscopy* (SEM).

### A. Produksi Lapisan Film bioplastik PHB

Produksi lapisan film PHB dilakukan pada media kultivasi sebanyak 1,5 L. Sel bakteri *Bacillus megaterium* PSA10 yang dihasilkan dari media yang diinkubasi selama 36 jam dipanen dengan sentrifugasi dan selanjutnya diekstraksi PHB dari dalam sel menggunakan campuran larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dan kloroform. Hasil ekstraksi disentrifugasi dan akan menghasilkan 3 lapisan yaitu 1) larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 2) debris sel dan 3) larutan kloroform, seperti yang ditampilkan pada Gambar 4.



Gambar 4. Hasil ekstraksi PHB dari sel *Bacillus* sp. PSA10

PHB terikat pada larutan kloroform dan pada saat kloroform diuapkan, akan terbentuk lapisan film bioplastik PHB. Lapisan film PHB ditampilkan pada Gambar 5. Lapisan bioplastik PHB yang dihasilkan adalah 5 g/1,5 L media kultivasi.



Gambar 5. Lapisan film bioplastik PHB

### B. Hasil degradasi bioplastik PHB secara enzimatik

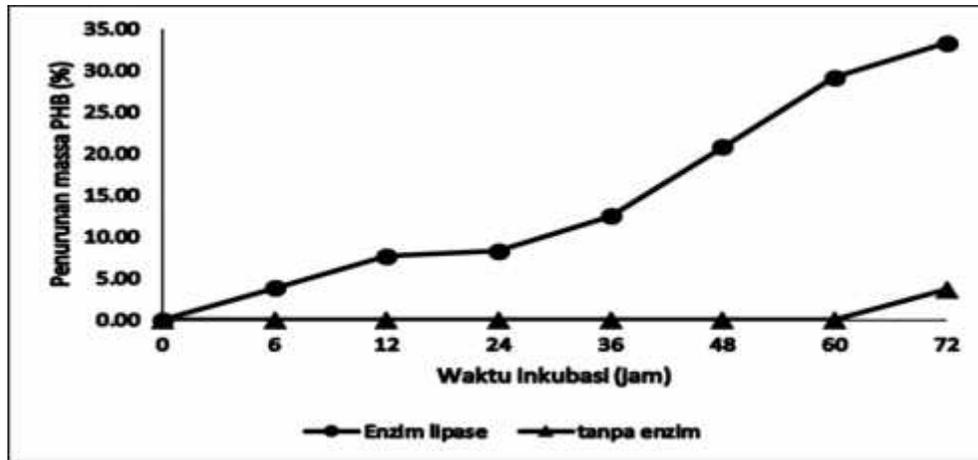
Uji degradasi enzimatik adalah metode yang paling tepat untuk mengetahui laju biodegradasi polimer dalam waktu yang singkat. Polimer dapat terbiodegradasi dengan katalis enzim jika rantai polimer tepat pada sisi aktif enzim. Monomer dari bioplastik PHB terikat oleh ikatan ester sehingga enzim yang mampu untuk memecah ikatan ester tersebut adalah PHB depolimerase (Lenz & Marchessault, 2005) dan lipase (Alejandra *et al.*, 2012). Biodegradasi polimer dianggap sebagai salah satu solusi untuk pengelolaan sampah plastik saat ini (Lenz & Marchessault, 2005). Pada penelitian ini dievaluasi kemampuan polimer bioplastik PHB yang dihasilkan oleh *Bacillus megaterium* PSA10 dari pati sagu terbiodegradasi secara enzimatik oleh enzim lipase dari *Rhizopus* sp (Oxoid).

Metode kuantitatif yang paling sederhana untuk mengkarakterisasi terjadinya biodegradasi suatu polimer adalah dengan menentukan kehilangan massa dan degradabilitas material polimer (Sumartono dkk., 2015). Kehilangan massa ditentukan dengan cara menimbang massa polimer sebelum dan setelah proses biodegradasi selama selang waktu tertentu. Hasil pengukuran persentase penurunan massa biofilm PHB dari uji degradasi secara enzimatik ditampilkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil pengukuran persentase penurunan massa PHB setelah degradasi

Waktu (jam)	Tanpa enzim lipase			Dengan enzim lipase		
	massa awal PHB (g)	massa akhir PHB (g)	% penurunan massa PHB	massa awal PHB (g)	massa akhir PHB (g)	% penurunan massa PHB
0	0.0024	0.0024	0.00	0.0024	0.0024	0.00
6	0.0026	0.0026	0.00	0.0026	0.0025	3.85
12	0.0026	0.0026	0.00	0.0026	0.0024	7.69
24	0.0024	0.0024	0.00	0.0024	0.0022	8.33
36	0.0024	0.0024	0.00	0.0024	0.0021	12.50
48	0.0025	0.0025	0.00	0.0024	0.0019	20.83
60	0.0025	0.0025	0.00	0.0024	0.0017	29.17
72	0.0027	0.0026	3.70	0.0024	0.0016	33.33

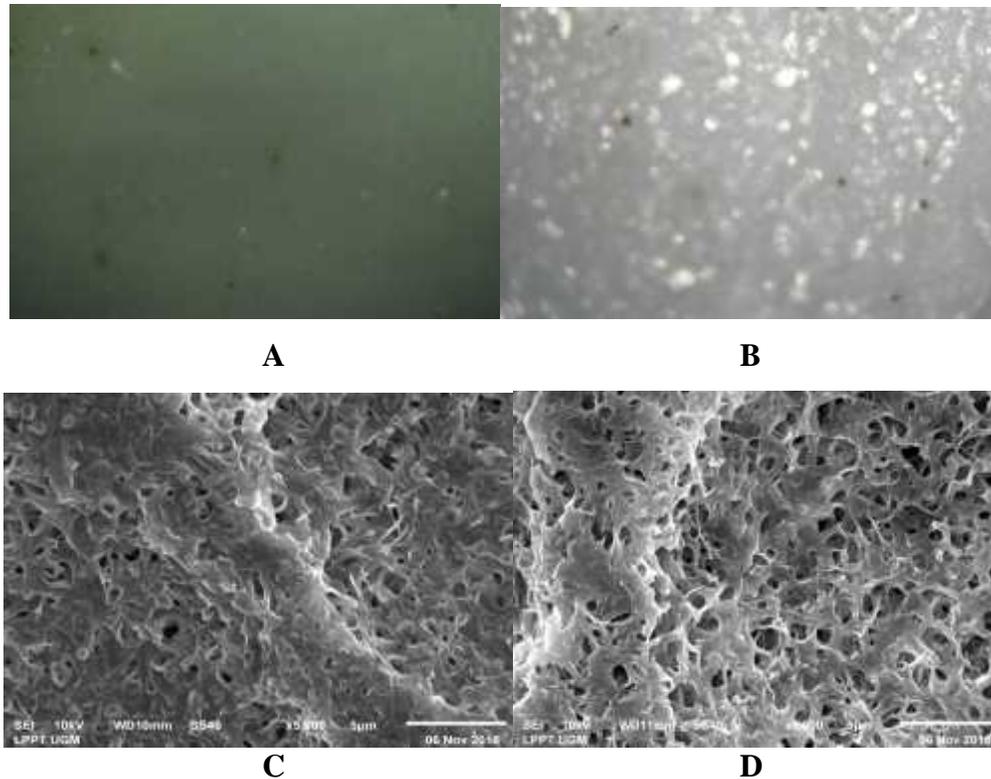
Laju degradasi bioplastik PHB secara enzimatik yang diukur berdasarkan persentase penurunan massa bioplastik PHB selama waktu inkubasi. Persentase penurunan massa bioplastik PHB dari hasil degradasi enzim lipase ditampilkan pada Gambar 6.



Gambar 6. Persentase penurunan massa bioplastik PHB hasil degradasi enzim lipase

Hasil penelitian pada Gambar 6 menunjukkan bahwa persentase penurunan massa PHB yang didegradasi oleh enzim lipase mulai meningkat sejak jam ke-6 inkubasi, namun meningkat sangat cepat setelah 24 jam inkubasi hingga mencapai 33% pada 72 jam inkubasi. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Alejandra *et al.* (2012) yang menyatakan bahwa proses degradasi polimer PHB oleh enzim lipase dimulai setelah 24 jam, sedangkan degradasi PHB sebelum 24 jam terjadi sangat lambat. Laju degradasi polimer PHB yang lambat pada 24 jam pertama (6-24 jam) mengindikasikan bahwa permukaan polimer PHB resisten terhadap reaksi enzim (Alejandra *et al.*, 2012). Gambar 6 juga menunjukkan bahwa pada perlakuan tanpa penambahan enzim lipase, tidak terjadi penurunan massa PHB selama inkubasi. Hal ini menunjukkan bahwa polimer PHB yang dihasilkan oleh *B.megaterium* PSA10 dapat didegradasi oleh enzim lipase yang dihasilkan oleh *Rhizopus* sp. Hasil ini mengindikasikan bahwa polimer PHB ini bersifat mudah didegradasi secara biologis.

Degradasi bioplastik PHB, secara visual dapat dilihat juga berdasarkan kerusakan yang terjadi pada permukaan PHB setelah didegradasi. Visualisasi permukaan film PHB sebelum dan setelah didegradasi oleh enzim lipase, ditampilkan pada Gambar 7.



Gambar 7. Morfologi permukaan film PHB sebelum dan setelah degradasi secara mikroskopis pada pembesaran 100 X dan menggunakan SEM. Hasil pengamatan morfologi Film PHB menggunakan mikroskop cahaya sebelum degradasi (A) dan setelah degradasi 60 jam (B). Hasil pengamatan morfologi Film PHB menggunakan SEM sebelum degradasi (C) dan setelah degradasi (D)

Gambar 7 menunjukkan bahwa permukaan film PHB sebelum didegradasi oleh enzim lipase tampak halus dan rapat, namun setelah didegradasi selama 60 jam permukaan PHB tampak kasar dan berlubang di beberapa tempat. Permukaan film PHB yang rusak menunjukkan bahwa enzim lipase mampu mendegradasi polimer PHB. Hal ini mengindikasikan bahwa degradasi PHB oleh enzim PHB terjadi dari permukaan polimer. Indikasi ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa enzim lipase mendegradasi polimer PHB dari permukaan, bukan dari dalam polimer (Suhartini & Rahmawati, 2007)

### C. Hasil Degradasi Secara Alami

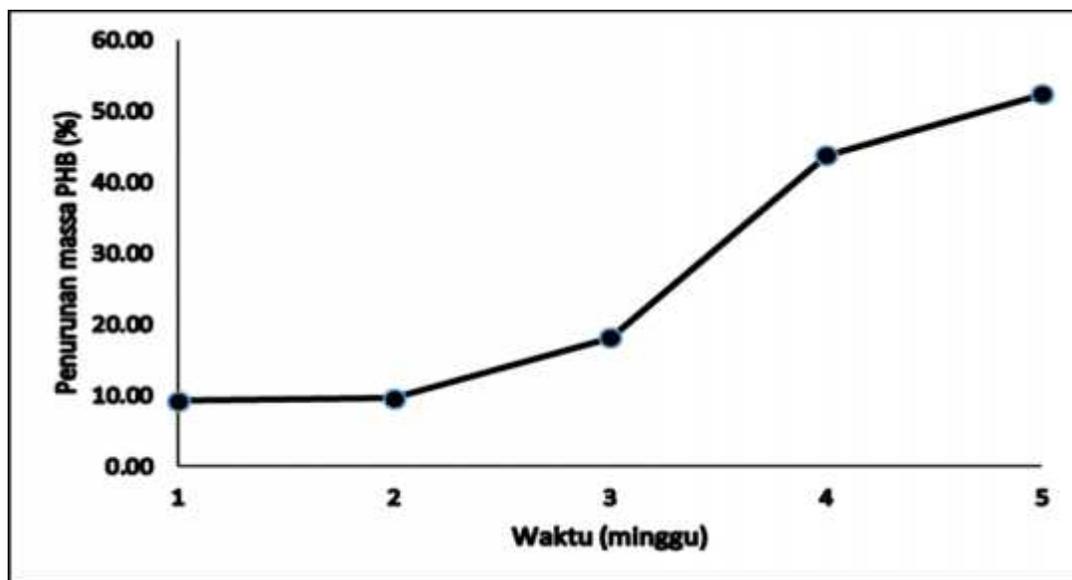
Degradasi bioplastik PHB secara alami dilakukan dengan menanam film PHB dalam tanah menggunakan metode *Soil burial test*. *Soil burial test* merupakan cara termudah untuk mengetahui kemampuan suatu bahan terdegradasi dan memiliki kondisi yang sama dengan pembuangan sampah sebenarnya (Suhartini & Rahmawati, 2007).

. Tanah yang digunakan sebagai substrat degradasi adalah tanah dari tempat pembuangan akhir sampah (TPAS), di Kendari. Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui laju degradasi bioplastik PHB secara alami. Hasil pengukuran persentase penurunan massa biofilm PHB dari uji degradasi secara alami ditampilkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil pengukuran persentase penurunan massa PHB setelah degradasi secara alami

Waktu (minggu)	Berat Awal PHB (g)	Berat Akhir PHB (g)	Penurunan berat PHB (%)
1	0.0054	0.0049	9.26
2	0.0042	0.0038	9.64
3	0.0028	0.0023	18.18
4	0.0045	0.0025	43.82
5	0.0021	0.0010	52.38

Laju degradasi bioplastik PHB secara alami diukur berdasarkan besarnya persentase penurunan massa bioplastik PHB selama waktu inkubasi. Persentase penurunan massa bioplastik PHB dari hasil degradasi alami ditampilkan pada Gambar 8.



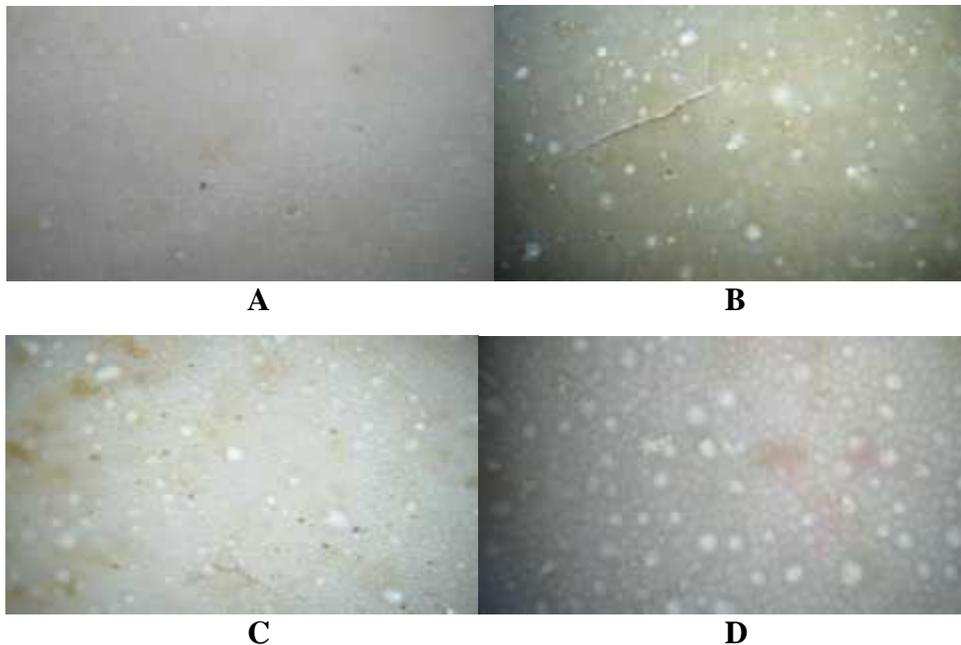
Gambar 8. Persentase penurunan massa bioplastik PHB hasil degradasi secara alami

Gambar 8 menunjukkan bahwa persentase penurunan massa PHB meningkat setelah ditanam di dalam tanah selama 5 minggu dengan persentase penurunan PHB mencapai 52,38% setelah 5 minggu. Hal ini mengindikasikan bahwa polimer PHB yang dihasilkan oleh *B.megaterium* PSA10 dari pati sagu dapat didegradasi secara alami di tanah sehingga relatif aman jika dibuang ke lingkungan.

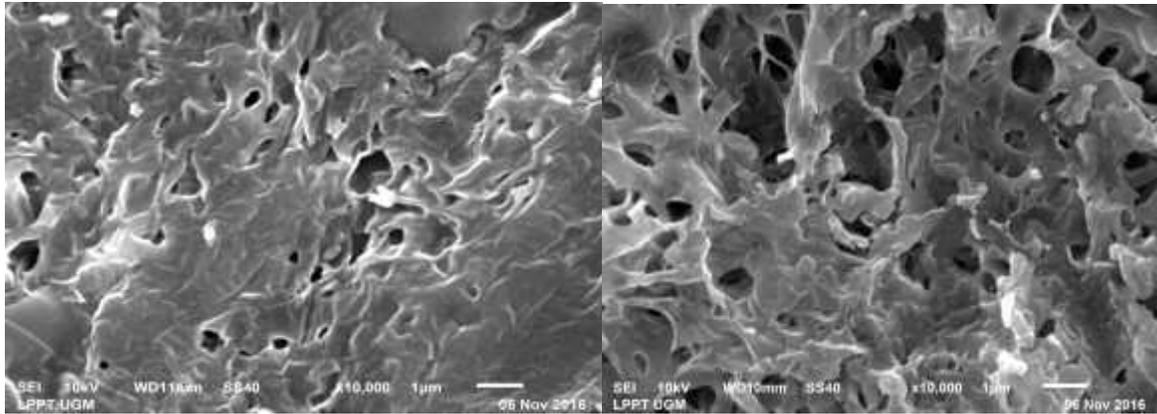
Pada dasarnya laju degradasi polimer di lingkungan dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu (Lenz, 1993) :

1. Struktur polimer, khususnya sifat hidrofil dan adanya gugus fungsi pada rantai utama, juga berat molekul dan distribusi berat molekul
2. Bentuk fisis dan morfologis dari polimer, berbentuk kristal (derajat dan bentuk kristalin) atau amorf (suhu transisi gelas)
3. Kondisi lingkungan (suhu, pH, kelembaban udara, ketersediaan oksigen dan cahaya) dan keberadaan substansi untuk pertumbuhan mikroorganisme
4. Populasi mikroba
5. *Surface to volume ratio*, ukuran sampel dan kemurnian sampel
6. Durasi pengujian
7. Metode kontak antara sampel dan mikroorganisme, dalam larutan, gel dan *soil burial*.

Degradasi bioplastik PHB di tanah, secara visual dapat dilihat juga berdasarkan kerusakan yang terjadi pada permukaan PHB setelah didegradasi. Visualisasi permukaan film PHB sebelum dan setelah didegradasi di tanah, ditampilkan pada Gambar 9 dan Gambar10.



Gambar 9. Morfologi permukaan film PHB sebelum dan setelah degradasi secara alami pada pembesaran 100 X. **A.** Film PHB sebelum degradasi, **B.** Film PHB setelah degradasi 2 minggu, **C.** Film PHB setelah degradasi 4 minggu, **D.** Film PHB setelah degradasi 5 minggu



**A**

**B**

Gambar 10. Hasil pengamatan permukaan film PHB menggunakan SEM. **A.** Sebelum degradasi, **B.** Setelah degradasi selama 4 minggu

Hasil pengamatan permukaan film PHB yang didegradasi secara alami di tanah menunjukkan bahwa polimer PHB mengalami kerusakan setelah ditanam di dalam tanah (Gambar 9). Kerusakan struktur permukaan tampak jelas pada pengamatan menggunakan SEM pada Gambar 10, yakni permukaan film PHB sebelum degradasi tampak kompak dan rapat, namun setelah didegradasi nampak serat permukaan menjadi longgar. Hal ini mengindikasikan bahwa polimer PHB mengalami degradasi secara alami di tanah pada permukaan. Suhartini & Rahmawati (2007) menyatakan bahwa polimer PHB yang didegradasi menggunakan metode *soil burial test* mengalami kerusakan pada permukaan.

Degradasi polimer PHB pada penelitian ini masih kurang dari 100%, setelah didegradasi selama 72 jam secara enzimatik hanya 33,33% dan secara alami selama 5 minggu hanya 52,38%. Hal ini mungkin disebabkan karena struktur polimer PHB lebih bersifat kristalin daripada amorf (Lenz & Marchessaul, 2005). Suhartini & Rahmawati (2007) menyatakan bahwa polimer dengan struktur amorf lebih mudah dibiodegradasi dibanding polimer dengan struktur kristalin. Struktur kristalin polimer PHB dapat dikurangi dengan menambahkan polimer P-4HB yang lebih bersifat amorf atau membuat kopolimer P-3HB co P-4HB (Suhartini & Rahmawati, 2007) atau dapat juga dilakukan dengan menambahkan senyawa pemlastis seperti gliserol dan kitosan (Sumartono dkk., 2012). Modifikasi polimer PHB dengan penambahan senyawa-senyawa yang dapat mengurangi struktur kristalinnnya akan dapat meningkatkan laju biodegradasinya di lingkungan.

## **BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN**

### **A. Kesimpulan**

1. Biofilm plastik PHB yang dihasilkan dari pati sagu oleh bakteri *Bacillus megaterium* PSA10 sebanyak 5 g/1,5 L.
2. Bioplastik PHB dapat didegradasi secara enzimatik menggunakan enzim lipase sebanyak 33,33% selama 72 jam
3. Degradasi bioplastik PHB secara alami di tanah sebanyak 52,38% selama 5 minggu.
4. Permukaan polimer PHB mengalami kerusakan setelah didegradasi secara enzimatik maupun secara alami di tanah.

### **B. Saran**

Penelitian ini merupakan kajian mengenai karakteristik degradasi bioplastik PHB dari pati. Oleh karena itu, masih diperlukan kajian lebih lanjut mengenai karakteristik sifat fisik-kimia dari bioplastik PHB yang dihasilkan dari pati sagu oleh bakteri amilolitik lokal sehingga diperoleh informasi yang komprehensif untuk dapat digunakan sebagai pengganti plastik sintetik.

## DAFTAR PUSTAKA

- Antranikian, G. 1990. Microbial Degradation of Starch. *FEMS Microbiology Review*. **75** : 201-218
- Alejandra, R.C., Margarita, C.M., Soledad, M.C.M. 2012. Enzymatic degradation of poly(3-hydroxybutyrate) by a commercial lipase. *Polymer Degradation and Stability*, **97** : 2473-2476.
- Bradford, M.M. 1976. A Rapid and Sensitive Methode for Quatification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye binding. *Analysis Biochemistry*. **72** : 248-254.
- Byrom, D. 1987. Polymer Synthesis by Micoorganisms : Technology and Economics. *Tibtech* **5** : 246 – 250.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, F.A. & F. Smith. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related of Substances. *Analytic Chemistry* **18** (33) :350-358.
- Espino, T.M. & Tambalo, R.D. 1997. Isolation, Screening and Characterization of High Yielding -Amylase Producing Bacteria. *Annual Reports of IC Biotech*. **20** : 744-754.
- Lenz, R. W. 1993. *Biodegradable Polymers*, In N. A PEPPAS and R. S. LANGER (Eds). *Advances in Polymer Science : Biopolymers I*. Springer - Verlag, Berlin : 22
- Lenz, R.W. & Marchessault, R.H. 2005. Bacterial Polyesters : Biosynthesis, Biodegradable Plastics and Biotechnology. *Biomacromolecules* **6** (1) : 1-8
- Ramadas, N.V. Singh, S.K., Soccol, C.R. & Pandey, A. 2009. Polyhydroxybutyrate Production using Agro-industrial Residue as Substrate by *Bacillus sphaericus* NCIM 5149. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **52** :17-23.
- Rodriguez-Contreras, A., Koller, M., Miranda-de Sousa, M.D., Calafell-Monfort, Braunegg, M G.and Marques-Calvo, M.S. 2013. High production of poly(3-hydroxybutyrate) from a wild *Bacillus megaterium* Bolivian strain. *Journal of Applied Microbiology* : 1-10.
- Sharma, L. Panda, B. Singh, A.K. & Mallick, N. 2006. Studies on Poly- -Hydroxybutyrate Synthase Activity of *Nostoc muscorum*, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **52** : 209-214
- Suhartini, M. dan Rahmawati. 2007. Sintesis dan Karakterisasi Film Poli (3-Hidroksibutirat-co-4-Hidroksibutirat) untuk Bidang Pertanian. *Jurnal Sains Materi Indonesia*, **9** (1) : 33-39
- Sumartono, N.W., Handayani, F., Desiriana, R., Novitasari, W., dan Hulfa, D.S. 2015. Sintesis dan Karakterisasi Bioplastik Berbasis Alang-alang (*Imperata cylindrical* (L.)) dengan Penambahan Kitosan, Gliserol, dan Asam Oleat. *Pelita* **10** (2) : 13-25.
- Syamsu, K., Fauzi. A.M, Hartoto, L., Suryani, A. & Atifah, N. 2006. Utilization of Hydrolyzed Sago Starch as Main Substrate for the Production of Bioplastic Poly Hydroxy Butyrate (PHB) By *Rasltonia eutropha* on Fed Batch Cultivation System. *Proceedings The Era of Bioscience Challenge and Hope*. The Fifth Regional IMT-GT Uninet Conference & International Seminar 2006. Faculty of Agriculture Universitas Sumatera Utara, Medan, 22 -23 June 2006.
- Yanti, N.A., L. Sembiring & S. Margino. 2009. Production of Poly- -hydroxybutyrate (PHB) from Sago Starch by the Native Isolate *Bacillus megaterium* PSA10. *Indonesian Journal of Biotechnology*, **14** (1) : 1111-1116.
- Yanti, N.A., Sembiring, L., Margino, S. and Muhiddin, N.H. 2013. A Study on Production of Poly- -Hydroxybutyrate Bioplastic from Sago Starch by Indigenous Amylolytic Bacteria. *Indonesian Journal of Biotechnology* **18** (2) : 144-150.

- Yanti, N.A. dan Munir, A. 2012. Bakteri Penghasil Bioplastik Poli- -hidroksibutirat (PHB) dari limbah padat sagu. *Prosiding dalam National Conference on Green Technology 3*, Universitas Islam Negeri Malang, Malang, 10 November 2012.
- Yanti, N.A. 2013. Produksi Bioplastik Poli- -hidroksibutirat oleh Bakteri Amilolitik yang Diisolasi dari Tepung Sagu Basah Menggunakan Berbagai Macam Substrat Pati. *Prosiding dalam Seminar XXII Perhimpunan Biologi Indonesia (PBI)*, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto. 30 Agustus-1 September 2013.

## LAMPIRAN 1. Bukti Publikasi hasil penelitian melalui seminar



Gambar 1. Sertifikat pemakalah pada seminar nasional Biologi 2016



Gambar 2. Sertifikat pemakalah pada seminar nasional SEMIRATA 2016

## Lampiran 2. Bukti naskah telah di publikasi pada jurnal internasional

Available online [www.jocpr.com](http://www.jocpr.com)

Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 2016, 8(7):918-923



Research Article

ISSN : 0975-7384  
CODEN(USA) : JCPRC5

### Bioconversion of Sago Starch to Bioplastic Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate (PHB) by Local Strain Bacterial *Bacillus megaterium* PSA10

Nur Arfa Yanti\* and Nurhayani H. Muhiddin

Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Science, Halu Oleo University, Kendari, Southeast Sulawesi, Indonesia

#### ABSTRACT

The potential local strain *Bacillus megaterium* PSA10 in bioconversion sago starch to bioplastic, Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) was investigated in this study. The bacterial strain was grown in fermenter using sago starch minimal media, furthermore was observed enzymatic activity, the products and its growth pattern. Amylase enzyme activity measurements performed using 3',5'-dinitrosalicylic acid (DNS) and PHB synthase enzyme activity using Valentin and Steinbuchel methods. Reducing sugar and PHB levels were detected using spectrophotometric method and the biomass growth was measured by gravimetric method. The highest specific activity of the enzyme amylase and reducing sugar concentration were obtained at 18 hours of incubation, i.e. 170.72 U/mg protein and 14.08 g/L, respectively while the highest specific activity of PHB synthase enzyme and the PHB concentration were obtained at 36 hours of incubation i.e. 85.72 U/mg protein and 2.86 g/L, respectively. The growth maximum of *B. megaterium* PSA10 was obtained at 42 hours of incubation and the strain bacteria was able to accumulate PHB as much as 85.04% w/wt of the cell dry weight at 36 hours of incubation. Therefore, *B. megaterium* PSA10 converts sago starch into bioplastic PHB via direct bioconversion.

**Keywords:** Bioconversion, Sago starch, Bioplastic, PHB, *Bacillus megaterium* PSA10

#### INTRODUCTION

Synthetic plastics are important for society due to their characteristics of versatility, durability and resistance to degradation. However, there are many environmental problems resulting from the use of petrochemical derived polymers making necessary to find alternatives to replace these bio recalcitrant materials. One of solution to this problem is the use of biodegradable polymers, which are polymers with the desirable properties of conventional plastics but also with rapid biodegradation in the environment after discarding [1]. One such biodegradable type of plastic is poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB), which is accumulated intracellularly by bacteria as carbon or energy reserves, mainly when there is a limitation of an essential nutrient, such as nitrogen, phosphorus, oxygen or sulphur [2].

The commercial use of PHB is still limited mainly due to its relatively high production cost. Therefore, the use of low cost substrates is an important factor, along with the need to obtain bacteria strains for efficient substrate to polymer conversion [3,4]. Low cost substrates include starchy substrates, which are important compounds in food industry by-products [5, 6]. Sago starch is one of the potential substrate for PHB production [7].

The utilization of starchy substrate for producing PHB still require treatment hydrolysis of starch into simple sugars, so that can be used to produce PHB. Some studies using enzyme or chemical compounds to hydrolyze starch before it is used as a substrate to produce PHB [5, 8, 9]. However, the use of enzymes or chemical compounds to hydrolyze starch before it is used as the substrate, is not efficient in terms of cost and time. The selections of suitable bacterial strains, inexpensive carbon sources, efficient fermentation and recovery processes are important aspects that should be taken into consideration for the commercialization of PHB [3]. Hence, requires bacteria strains that can hydrolyze

### Lampiran 3. Bukti pendaftaran Paten



KEMENTERIAN HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA  
REPUBLIK INDONESIA  
DIREKTORAT JENDERAL KEKAYAAN INTELEKTUAL  
Jl. H.R. Rasuna Said Kav 8-9, Kuningan, Jakarta Selatan, 12940  
Telepon: (021) 57905611 Faksimili: (021) 57905611  
Laman: <http://www.dgip.go.id> Surel: [dopatent@dgip.go.id](mailto:dopatent@dgip.go.id)

Nomor : HKI.3-HI.05.01.01.P00201508115 Jakarta, 23 Desember 2015  
Lampiran : 1 (satu) berkas  
Hal : Pemberitahuan Kekurangan Persyaratan  
Formalitas Permohonan Paten

Yth. Universitas Halu Oleo  
Kampus Hijau Bumi Tridharma Anduonohu,  
Kendari 93232

Dengan ini diberitahukan bahwa Permohonan Paten:

Tanggal Pengajuan : 03 Desember 2015  
(21) Nomor Permohonan : P00201508115  
(71) Pemohon : Universitas Halu Oleo  
(54) Judul Inovasi : PROSES PRODUKSI BIOPLASTIK POLI-J3-HIDROKSIBUTIRA  
T (PHB) DARI SUBSTRAT PATI SAGU MENGGUNAKAN  
Bacillus megaterium PSA10  
(30) Data Prioritas :  
(74) Konsultan HKI :  
(22) Tanggal Penerimaan : 03 Desember 2015

masih terdapat beberapa kekurangan sehingga Saudara harus memperbaiki kekurangan seperti yang tersebut dalam lampiran I dalam waktu yang telah ditentukan.



03-2015-17796

a.n. Direktur  
Kasubdit Permohonan dan Publikasi



Ir. Arif Syamsudin, S.H., M.Si.  
NIP. 196303021987111001

Tembusan:  
Direktur Jenderal HKI.

Lampiran 4. Sampul Draft Buku Ajar

