

Kode>Nama Rumpun Ilmu : 113 / Biologi (dan Bioteknologi Umum)
Bidang Fokus : Material Maju

LAPORAN AKHIR
PENELITIAN STRATEGIS NASIONAL
INSTITUSI



Produksi Ensim Selulase *Industrial Grade*
Berbasis Substrat Limbah Kulit Eksokarpa Buah Kopi

Ketua : Dr. Kahar Muzakhar, S.Si. / 0003056808
Anggota : Drs. Siswoyo, M.Sc., PhD. / 0029056606
Drs. Rudju Winarsa, M. Kes. / 0016086012

Universitas Jember

2020

HALAMAN PENGESAHAN

Judul Riset : Produksi Ensim Selulase Industrial Grade Berbasis Substrat Limbah Kulit Eksokarpa Buah Kopi
Nama Rumpun Ilmu : Biologi (Bioteknologi)
Skema Riset : Penelitian Strategis Nasional DRPM 2020
Ketua Periset:
a. Nama Lengkap : Dr. Kahar Muzakhar, S.Si.
b. NIDN/NIDK : 0003056808
c. Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
d. Program Studi : PS Magister (S2) Biologi, FMIPA (Bidang Keilmuan: Enzimologi)
e. Nomor HP : 081216060778
f. Alamat surel (e-mail) : kaharmzk@unej.ac.id

Anggota Peneliti 1

Nama : Drs. Siswoyo, M.Sc., PhD. / 0029056606
Program Studi : PS Kimia, FMIPA

Anggota Peneliti 2

Nama : Drs. Rudju Winarsa, M. Kes. / 0016086012
Program Studi : PS Biologi, FMIPA

Pembiayaan : DRPM – RistekDikti

Jember, Desember 2020

Mengetahui
a.n. Dekan FMIPA
Wakil Dekan 1



Dr. Siswoyo, M.Sc. Ph.D.,
196605291993031003

Pelaksana

Dr. Kahar Muzakhar.
196805031994011001

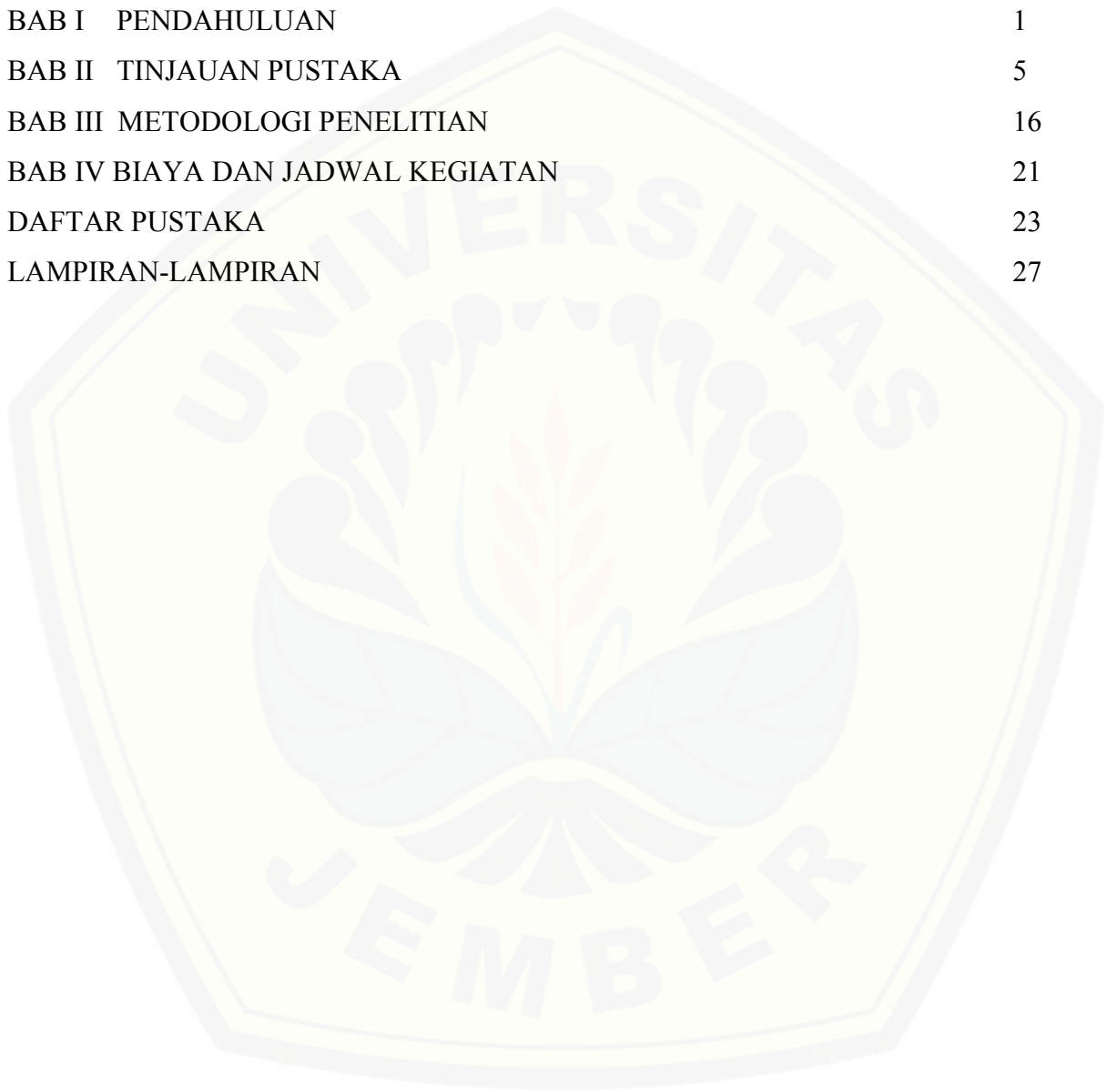
Menyetujui,
Lembaga Penelitian
Universitas Jember



Prof. Dr. Yuli Witono, S.TP., MP.
196912121998021001

DAFTAR ISI

Lembar Pengesahan	i
Identitas dan Uraian Umum	ii
Daftar Isi	iv
Ringkasan	v
BAB I PENDAHULUAN	1
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	16
BAB IV BIAYA DAN JADWAL KEGIATAN	21
DAFTAR PUSTAKA	23
LAMPIRAN-LAMPIRAN	27



RINGKASAN

Limbah kulit eksokarpa kopi (LKEK) dari buah kopi merupakan limbah padat yang melimpah selama produksi biji kopi. Dilaporkan, Indonesia sebagai negara pengekspor terbesar ke 4 dunia (Sumber: *International Coffee Organization*, data Januari 2017). Sedangkan limbah kulit kopi yang dihasilkan hingga 81 juta ton rata-rata pertahun. Setiap pengolahan 1 ton buah segar kopi akan dihasilkan sebanyak 0.45 ton LKEK. Biomasa LKEK merupakan limbah potensial dengan kandungan polimer karbohidrat hingga 40-45% dengan komposisi dari selulosa lebih dari 30%. LKEK telah dimanfaatkan sebagai bahan pupuk organik, biogas, selulase/biomethane, namun demikian sebagian besar masih tidak termanfaatkan sehingga dibakar, dibuang ke badan sungai dan ditumpuk hingga menjadi polutan. Melihat banyaknya jumlah perkebunan kopi (di kelola oleh rakyat dan PT Perkebunan Nusantara XII) di wilayah Besuki (Jember, Banyuwangi, Bondowoso, dan Situbondo) maka perlu dilakukan upaya pemanfaatan lainnya. Melalui biokonversi, biomasa LKEK diharapkan akan menjadi material berguna dan akan meningkatkan nilai tambah LKEK. Lima (5) isolat mikroorganisma selulolitik yaitu terdiri atas 4 isolat (VTM1, VTM5, VTM6, VT12 tergolong *Aspergillus sp.*) dan 1 isolat VM9 termasuk *Pestalotiopsis sp.* telah diuji mampu hidup dengan memanfaatkan sumber karbon dan nitrogen dari beberapa limbah pertanian termasuk limbah kulit kopi. Hasil penelitian sebelumnya (2014-2017) menunjukkan ke 5 isolat tersebut mampu memanfaatkan substrat limbah organik tandan kosong kelapa sawit dan kulit kopi bagian eksokarpa tanpa ada penambahan nutrisi apapun. Melalui proses *solid state fermentation* (SSF), isolat VM9 telah terbukti dapat menghasilkan selulase yang cukup tinggi dengan *yield* 0.13% dan 477 *fold*. Mengingat sumber selulosa LKEK yang tinggi maka dimungkinkan biomasa tersebut dapat dijadikan sebagai sumber substrat yang murah untuk memproduksi enzim selulase *industrial grade*. Melalui skema Penelitian Strategis Nasional Institusi, penelitian diusulkan selama 3 tahun, hasil yang dicapai di TAHUN 1 adalah: a) draft paten proses produksi selulase berbasis LKEK yang telah di submit ke Pusat HKI LPP UNIVERSITAS JEMBER (Lampiran A), dan b) Draft Publikasi ditujukan ke Jurnal Internasional terindeks bereputasi (LAMPIRAN B)

Kata kunci : limbah kulit eksokarpa buah kopi, selulase, purifikasi

BAB I PENDAHULUAN

Kebutuhan enzim dalam negeri dan dunia selau meningkat mengingat penggunaan akan enzim mencakup di banyak sektor terutama industri, obat dan kesehatan, pangan, dan pertanian. Diperkirakan permintaan kebutuhan akan selalu naik 4.6% sejak tahun 2016 sampai dengan tahun 2020 hingga mencapai nilai transaksi 7.2 Milyar USD (<http://www.prnewswire.com/news-releases/the-freedomia-group-world-enzyme-demand-to-reach-72-billion-300290651.html>), bahkan pasar enzim akan selalu naik hingga peningkatan 8% sampai dengan tahun 2024 yaitu akan mencapai nilai 10.7 Milyar USD (<http://www.crossroadstoday.com/story/34915797/enzyme-market-to-reach-107bn-by-2024>). Kebutuhan akan bahan enzim di dalam negeri perlu adanya usaha-usaha untuk memenuhinya. Hal ini telah dilaporkan oleh pemerintah bahwa kebutuhan enzim nasional cenderung meningkat setiap tahunnya, hingga mencapai 2.500 ton dengan nilai impor sekitar 200 Milyar Rupiah pada tahun 2017, dengan laju pertumbuhan volume 5-7% per tahun (<http://www.ristekdikti.go.id/kemandirian-produk-enzim-indonesia/>). Suatu nilai yang cukup besar untuk mendorong upaya kemandirian dalam memproduksi enzim nasional mengingat potensi sumberdaya alam seperti plasmanutfah dan biomasa di Indonesia sangat beragam sehingga kemandirian produksi enzim nasional adalah sangat memungkinkan.

Salah satu strategi untuk memproduksi enzim selulase dapat dilakukan melalui pemanfaatan biomasa sebagai substrat mikroorganisme selulolitik dari spesies kapang atau bakteri. Selama proses tumbuh dan berkembang, mikroorganisma tersebut akan menghasilkan selulase yang diperlukan untuk memecah substrat kompleks selulosa menjadi polimer karbohidrat sederhana yaitu dari oligosakarida sampai dengan monomer gula (monosakarida). Polimer sederhana tersebut dibutuhkan oleh mikroorganisme tersebut dalam proses metabolisme. Proses tersebut dapat dilakukan melalui proses fermentasi yang diinokulasi dengan mikroorganisma selulolitik yaitu jamur atau bakteri selulolitik.

Berbagai biomasa yang dimaksud dapat berasal dari berbagai limbah pertanian, yaitu salah satunya limbah berserat tinggi kaya selulosa atau hemiselulosa seperti kulit biji kopi. Kulit kopi mengandung material selulosa yang cukup tinggi yaitu berkisar 30% (Avallone et al., 2000). Ketersediaan limbah padat kulit kopi di Indonesia sangatlah melimpah mengingat Indonesia sampai tahun 2017 ini merupakan negara terbesar ke empat produsen dan penghasil kopi dunia setelah Brasilia, Vietnam dan Columbia (<http://www.ico.org/prices/po-production.pdf>). Setiap tahun sekitar 8.1 juta ton kulit kopi yang merupakan hasil samping selalu ada ketersediannya. Namun demikian pemanfaatan kulit kopi tersebut belumlah optimal dan belum mempunyai

nilai ekonomis yang berarti. Pada umumnya hanya ditimbun dan dibuang di sekitar lahan kebun kopi yang diharapkan akan menjadi humus dan sebagai suplemen pupuk organik. Strategi pemanfaatan limbah kulit kopi sebagai media atau substrat dalam proses produksi enzim khususnya selulase merupakan peluang yang menjanjikan dan akan berdampak pada biaya proses produksi skala industri yang murah (*low cost production*) mengingat ketersediaan limbah yang sangat melimpah dan murah, ramah lingkungan karena kulit kopi adalah limbah organik, dan pada akhirnya juga akan menekan harga enzim selulase yang dapat bersaing dengan harga impor dalam negeri ataupun dapat bersaing dengan harga selulase untuk peluang ekspor.

Hasil penelusuran paten yang ditemukan dari US Patent Office yang berjudul “*Purification of Celulase*” (3,251,750, Patented May 17, 1966) tentang penemuan berhubungan dengan metode baru untuk menyiapkan purifikasi (pemurnian) selulase yang sangat bagus dari koji dedak gandum yang diinokulasi dengan mikroorganisme Black Aspergillus, seperti *Aspergillus niger*. Selanjutnya, telah dipatenkan “*Method for Cellulase Production*” (US 8,093,019 B2) yaitu mengenai proses fermentasi menggunakan karbohidrat hemiselulosa untuk memproduksi campuran selulase dengan proporsi selulase yang tinggi relatif terhadap hemiselulase. Paten lain yang berjudul “*Process for producing cellulolytic enzymes*” (US 4762788 A) adalah berhubungan dengan penemuan menyangkut proses pembuatan enzim selulolitik dengan fermentasi menggunakan *Trichoderma reesei*. Invensi yang berjudul “*Aspergillus fumigatus Cellulolytic Enzyme Compositions and Uses Thereof*” dengan nomor US 20140234914 A1 mengupas tentang produksi enzim selulolitik yang berasal dari *Aspergillus fumigatus*. Paten lain yang berjudul “*Purification of cellulase*” dengan nomor US 3251750 A melindungi tentang purifikasi selulase. Namun demikian, hasil penelusuran menunjukkan bahwa belum diketemukan adanya paten produksi enzim selulase yang diproduksi dengan memanfaatkan biomasa kulit biji kopi, khususnya kopi jenis robusta. Berdasar alasan-alasan yang dijelaskan, maka dalam penelitian ini akan diteliti mikroorganisme potensial penghasil selulase yaitu terdiri atas 4 isolat (VTM1, VTM5, VTM6, VT12 tergolong *Aspergillus sp.*) dan 1 isolat VM9 termasuk *Pestalotiopsis sp.* berbasis substrat limbah kulit eksokarpa kopi.

a. Tujuan dan Sasaran

Di Indonesia, kebutuhan akan enzim di berbagai sektor selalu meningkat dari tahun ke tahun. Namun, sedikitnya produksi enzim di Indonesia menyebabkan Indonesia selalu bergantung dengan cara impor. Sedikitnya produsen enzim lebih dikarenakan melibatkan material dan proses produksi yang mahal, namun juga dikarenakan minimnya penguasaan teknologi serta proses produksi. Oleh karena itu, melihat banyaknya mikroorganisme potensial penghasil

ensim dan bahan baku yang tersedia (limbah kulit kopi), maka penelitian ini mempunyai tujuan dan manfaat sebagai berikut.

1. Optimasi dan peningkatan efisiensi produksi ensim selulase berbasis limbah LKEK yang siap dijadikan bahan baku sebagai selulase dengan memanfaatkan 5 mikroorganisme yang telah didapatkan dari penelitian sebelumnya; dan
2. Peningkatan produksi ensim selulase *industrial grade*

b. Manfaat dan Urgensi Penelitian

LKEK yang sangat melimpah sepanjang tahun merupakan biomasa yang potensial yang perlu dikaji pemanfaatannya dan tidak menyebabkan isu atau problematik lingkungan. Melalui penelitian ini yaitu proses biokonversi LKEK menjadi selulase merupakan salah satu pengembangan model dalam proses penanganan limbah yang berwawasan lingkungan dan mempunyai nilai secara ekonomis, serta merupakan terobosan *green* teknologi dalam memproduksi *selulase*.

c. Rencana Target Capaian Tahunan

Sebagaimana penjelasan sebelumnya maka dapat dirumuskan rencana target capaian atau luaran tahunan dalam usulan penelitian dapat dilihat dalam Tabel 1.1 sebagaimana berikut.

Tabel 1.1 Rencana Target Capaian Tahunan

No	Jenis Luaran		Indikator Capaian		
			TS ¹⁾	TS+1	TS+2
1	Publikasi ilmiah	Internasional	<i>draft</i>	<i>submitted</i>	<i>accepted</i> atau <i>published</i>
2	Publikasi	Nasional tidak terakreditasi	belum ada	<i>draft</i>	<i>accepted</i> atau <i>published</i>
3	Pemakalah dalam temu ilmiah	Internasional	terdaftar	sudah dilaksanakan	sudah dilaksanakan
4	Hak Kekayaan Intelektual (HKI)	Paten	<i>draft</i>	terdaftar	terdaftar
5	Tingkat Kesiapan Teknologi (TKT)		4	5	6

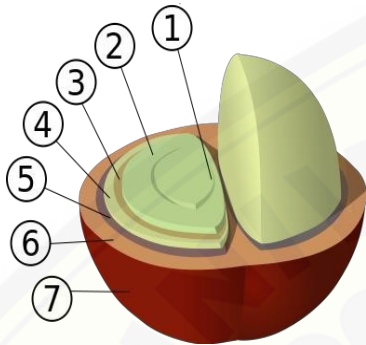
Seperti yang ditampilkan dalam Tabel 1.1, rencana target capaian/luaran yang dijanjikan di penelitian ini adalah **1 publikasi pada jurnal internasional, 1 seminar internasional** serta pada sampai **tahun ke 3 sebagai tambahan direncanakan 2 penyusunan dan pengusulan paten yang sudah terdaftar**. Diakhir tahun pertama penelitian diharapkan sudah ada satu draft artikel jurnal internasional, sehingga pada tahun ke 3 publikasi akan dapat tercapai. Dan pada tahun pertama juga akan dilakukan submission untuk mengikuti forum temu ilmiah (konferensi) internasional sehingga pada tahun kedua target pelaksanaannya akan tercapai pada tahun kedua. Dengan pola yang sama target luaran /capaian tahun ketiga akan dipersiapkan di tahun kedua pelaksanaan penelitian.

Sebagai luaran tambahan, hasil penelitian ini akan didaftarkannya 2 HKI (paten) dua proses produksi *industrial grade* ensim (selulase). Analog dari keberhasilan penelitian ini, maka dapat diterapkan biomasa limbah pertanian lainnya sebagai sumber yang berdayaguna dan ramah lingkungan sebagai sumber-sumber untuk mendukung produksi ensim khususnya dalam skala industri.



BAB II
TINJAUAN PUSTAKA

Secara umum struktur buah kopi terdiri dari 4 bagian yaitu lapisan kulit luar (*eksokarpium*), daging buah (*mesokarpium*), kulit tanduk (*parchment*), dan biji (*endosperm*). Kulit lunak buah kopi merupakan gabungan antara antara kulit luar (*eksokarpium*) dan daging buah (*mesokarpium*)



Gambar 2.1. Struktur buah kopi. 1. Pusat pemotongan (*center cut*), 2. Bean (*endosperm*), 3. Testa / epidermis biji, 4. *parchment* / kulit tanduk (*endokarpium*), 5. Lapisan pektin, 6 daging buah (*mesokarpium*), 7. *outer skin* (*eksokarpium*) (Yesuf, 2010).

Kulit lunak buah kopi merupakan salah satu limbah (Limbah Kulit Eksokarpa Kopi / LKEK) pengolahan buah kopi yang sangat melimpah. Dalam proses pengolahan buah kopi, dihasilkan sekitar 45 % kulit lunak, 10 % lendir, 5 % kulit ari, dan 40 % biji kopi (Pamungkas, 2008). Limbah hasil pengolahan berupa kulit memiliki persentase yang sangat tinggi pada proses ini, pada setiap 2 ton pengolahan buah kopi akan dihasilkan sekitar 1 ton kulit lunak buah kopi (Padmapriya *et al.*, 2013).

Kulit lunak buah kopi mengandung berbagai komponen diantaranya dijelaskan pada beberapa tabel berikut ini:

Tabel 2.1. Komposisi kimia kulit lunak buah kopi (Elias, 1979)

komposisi	Kulit kopi segar (%)	Dikeringkan (%)
Kelembaban	76,7	12,6
Material kering	23,3	87,4
Ekstrak eter	0,48	2,5
Crude proteinss	2,1	11,2
Abu	1,5	8,3
Ekstrak nitrogen bebas	15,8	44,4

Tabel 2.2 Komponen senyawa organik yang lainnya pada kulit lunak buah kopi (Elias, 1979)

komposisi	% Berat kering
Tannin	1,80-8,56
Total substansi pectin	6,5
Gula reduksi	12,4
Gula nonreduksi	2,0
Kafein	1,3
Asam Klorogenik	2,6
Total asam kafein	1,6

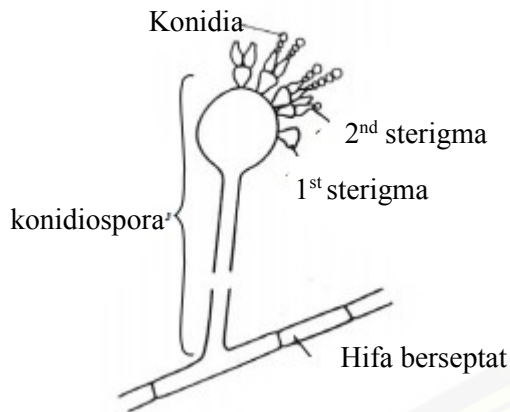
Tabel 2.3 Komposisi polisakarida (% berat kering) kulit lunak buah kopi (Peñaloza *et al.*, 1985)

Hemiselulosa	0,98
Selulosa	18,65
Lignin	12,20

Selain kandungan polisakarida yang berupa hemiselulosa, selulosa dan lignin yang tinggi. Kulit lunak buah kopi juga mengandung C:N rasio yang tinggi pula. Menurut Corro *et al.* (2013) C:N rasio pada kulit lunak buah kopi adalah sebesar 57,2, padahal menurut Zhang *et al.* (1999) dekomposisi akan lebih optimum ketika suatu media memiliki C:N ratio berkisar 25 – 35.

Fungi merupakan organisme heterotrof sehingga membutuhkan senyawa organik dari organisme lain sebagai sumber nutrisinya. Kelompok organisme ini ada yang mampu memanfaatkan materi organik dari organisme yang telah mati atau yang disebut sebagai saprofit. Beberapa diantaranya juga mampu menyerap materi noraganik dari organisme yang hidup dan menimbulkan penyakit atau biasa disebut fungi parasit. Fungi saprofit merupakan jenis fungi yang sering dimanfaatkan dalam dunia industri fermentasi industri pembuatan minuman beralkohol ataupun memproduksi penicillin (Pelczar, 1981).

Salah satu fungi berfilamen saprofit yang sering dimanfaatkan sebagai mikroorganisme pada dunia industri fermentasi adalah genus *Aspergillus*. Genus *Aspergillus* sering digunakan dalam dunia industri karena kemampuannya menghasilkan berbagai variasi enzim dengan kuantitas yang besar. Struktur somatik dari genus *Aspergillus* secara umum terdiri dari hifa yang bercabang, berseptat dan selnya biasanya bersifat multinukleat (Alexopoulos, 1960).



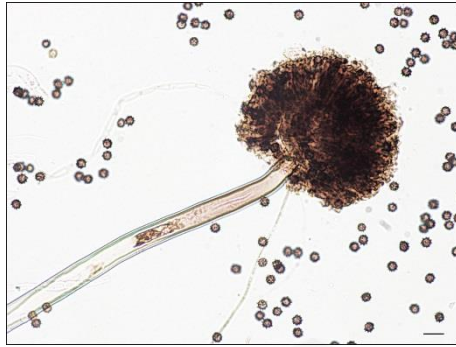
Gambar 2.2. Konidiospora dan hifa dari *Aspergillus* (Ashutosh Kar, 2008).

A. niger sering disebut sebagai *black mold* dan tersebar luas dari area artik sampai daerah tropis. *A. niger* merupakan fungi yang tumbuh secara aerobik pada material organik. Jenis fungi ini dapat tumbuh pada rentangan suhu yang luas yaitu 6-47 ° C, dengan suhu optimum pertumbuhannya berkisar 35-37 ° C. *A. niger* juga dapat tumbuh pada rentangan pH yang relatif luas yaitu berkisar dari 1,4-9,8 (Schuster *et al.*, 2002), *A. niger* memiliki warna dasar koloni putih atau kuning dengan konidiospora tebal berwarna coklat kehitaman. *A. niger* ini mampu tumbuh dengan cepat dan sering dimanfaatkan dalam dunia industri untuk produksi asam sitrat, asam glukonat, dan pembuatan beberapa enzim seperti amilase, pektinase, amilase, pektinase, amiloglukosidase, dan selulosa. (Ingrid & Suharto, 2012)

Secara makroskopis pada medium PDA (Potato Dextrose Agar) dengan suhu inkubasi 25 ° C koloni *A. niger* pada awalnya berwarna putih, kemudian secara berangsur-angsur berubah drastis menjadi hitam. Panjang konidiospora yaitu 400-3000 µm. Warna konidia adalah kecoklatan hingga hitam, kasar dengan diameter 4-5 µm (CMPT, 2007).

Berikut ini adalah klasifikasi *A. niger* :

Phylum : Eumycophyta
 Class : Ascomycetes
 Ordo : Aspergillales
 Family : Aspergillaceae
 Genus : *Aspergillus*
 Spesies : *Aspergillus niger*
 (Alexopoulos, 1960).



Gambar 2.3. Struktur Mikroskopis *A. niger*. (D'Halewyn & Chevalier, Tanpa Tahun)

Salah satu teknik untuk membedakan *A. niger* dengan spesies lain pada genus *Aspergillus* adalah dengan melihat ada tidaknya produksi karbon hitam atau spora yang sangat gelap. Selain itu *A. niger* juga memiliki pertumbuhan yang relatif lambat pada medium czapek agar (Raper, 1965).

Dalam segi keamanan, produk enzim *A. niger* telah memperoleh validasi keamanan atau GRAS (*Generally Recognized As Safe*) dari *the United States Food and Drug Administration* and is excused from the *Federal Food, Drug, and Cosmetic Act food additive tolerance requirements*. *A. niger* mampu memproduksi asam sitrat, asam glukonat dan berbagai enzim seperti amylase, cellulase, amyloglucosidase, catalase, glucose oxidase, lipase and pectinase yang secara umum dinyatakan aman (Schuster *et al.*, 2002).

Berikut ini adalah beberapa contoh enzim yang dihasilkan oleh *A. niger* :

Tabel 2.3 Enzim ekstraseluler *A. niger*

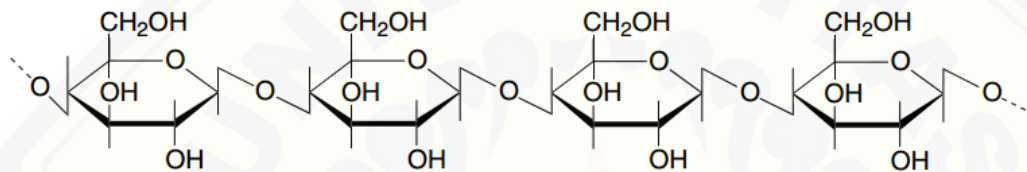
Enzim Ekstraseluler dari <i>A. niger</i>	Keterangan	Referensi
Amilase	1. Produksi amilase melalui <i>cultivasi</i> cair pada limbah industri makanan	1. (Hernández <i>et al.</i> , 2006)
	2. Produksi amilase melalui campuran cultur <i>A. niger</i> dan <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pada sorgum	2. (Abu <i>et al.</i> , 2005)
Feruloyl Esterase	Over produksi Feruloyl Esterase oleh <i>A. niger</i>	(Record <i>et al.</i> , 2003)
Innulinase	Optimasi produksi innulinase <i>A. niger</i>	(Skowronek & Fiedurek, 2004)
Lipase	Produksi Lipase Oleh <i>A. niger</i> menggunakan fermentasi padat	(Olama & El-Sabaeny, 1993)(Olama & El-Sabaeny, 1993)
Mannanase	Produksi mannanase oleh <i>A. niger</i> pada media sekam padi	(Ibrahim <i>et al.</i> , 2012)

Enzim Ekstraseluler dari <i>A. niger</i>	Keterangan	Referensi
Pektinase	Produksi pektinase oleh <i>A. niger</i> pada media limbah tongkol jagung	(Oyeleke <i>et al.</i> , 2012)
Protease	<ol style="list-style-type: none"> 1. Produksi protease dari limbah air leri menggunakan fermentasi padat 2. Karakterisasi dan purifikasi protease dari <i>A. niger</i> 	<ol style="list-style-type: none"> 1. (Paranthaman <i>et al.</i>, 2009) 2. (Devi <i>et al.</i>, 2008)
Selulase	<ol style="list-style-type: none"> 1. Perbandingan produksi selulase dari <i>A. niger</i> dan <i>Trichoderma reesei</i> 2. Produksi selulase oleh <i>A. niger</i> sekam padi dan serbuk gergaji 3. Produksi selulase dari <i>A. niger</i> pada temperatur dan pH tertentu 4. Optimalisasi produksi selulase oleh <i>A. niger</i> pada media serbuk gergaji 5. Produksi selulase pada media tongkol jagung oleh <i>A. niger</i> 6. Produksi selulase oleh <i>A. niger</i> pada substrat jerami padi menggunakan fermentasi padat 	<ol style="list-style-type: none"> 1. (Sathyavrathan & Krithika, 2013) 2. (Baig & Saleem, 2012) 3. (Sohail <i>et al.</i>, 2009) 4. (Acharya <i>et al.</i>, 2008) 5. (Oyeleke <i>et al.</i>, 2012) 6. (Sa'adah <i>et al.</i>, 2010)
Tannase	<ol style="list-style-type: none"> 1. Produksi tannase menggunakan <i>A. niger</i> pada media limbah kulit buah kopi 2. Produksi tannase oleh <i>A. niger</i> menggunakan sistem fermentasi padat dan cair 	<ol style="list-style-type: none"> 1. (Giyarto, 1997) 2. (Aguilar <i>et al.</i>, 2001)
Xylannase	<ol style="list-style-type: none"> 1. Produksi xylanase oleh <i>A. niger</i> pada limbah pertanian 2. Produksi xylanase pada substrat jerami padi oleh <i>A. niger</i> 	<ol style="list-style-type: none"> 1. (Okafor <i>et al.</i>, 2007) 2. (Pangesti <i>et al.</i>, 2012)

Material organik dari tumbuhan seperti kulit buah atau buah, kayu, serasah dan lain sebagainya akan mengalami dekomposisi menjadi senyawa anorganik oleh mikroorganisme secara alami. Mikroorganisme yang dapat melakukan proses dekomposisi diantaranya adalah bakteri, fungi, protozoa dan *actinomycetes*. Proses dekomposisi material organik dari tanaman tersebut akan lebih cepat apabila terdapat penambahan jumlah mikroorganisme (Hanum & Kuswytasari, 2014). Menurut Purwadaria *et al.*, (2003), kemampuan kapang dalam melakukan dekomposisi biomassa tanaman lebih efektif dibandingkan bakteri.

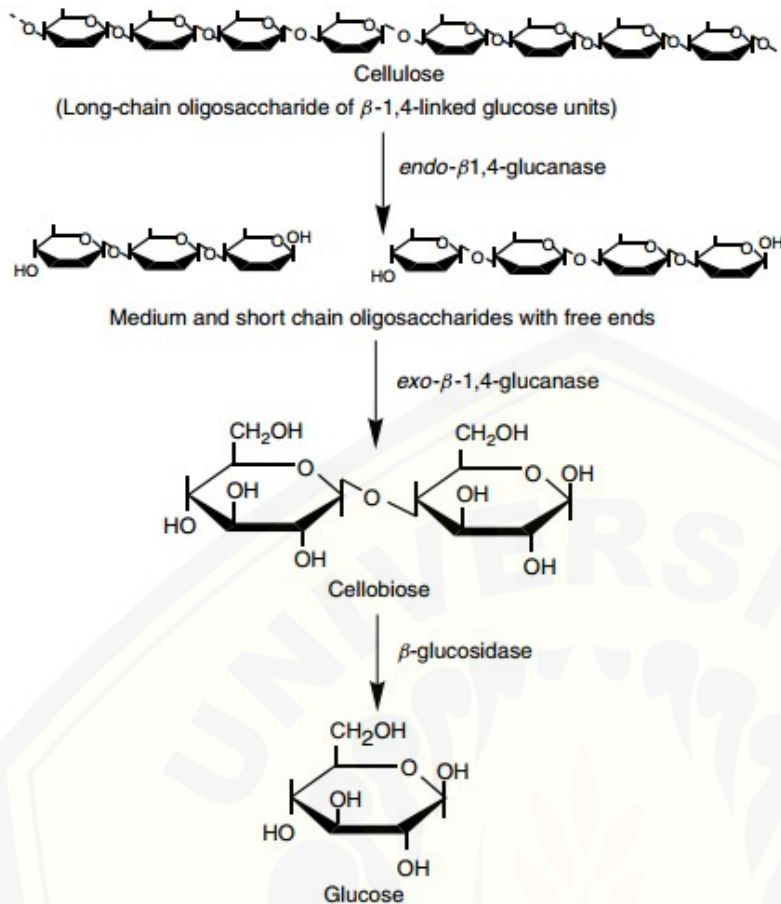
Biomassa yang berasal dari tanaman mayoritas adalah lignoselulosa yang terdiri dari 3 tipe polimer yaitu selulosa, hemiselulosa dan lignin (Pérez *et al.*, 2002). ketiga polimer ini bersama-sama membentuk biomassa tanaman dengan prosentase tertentu dan berbeda antara satu jenis tumbuhan dengan yang lain. Namun, secara umum selulosa menyusun sekitar 45 % dari berat kering tanaman, hemiselulosa sekitar 25-30 %, sedangkan sisanya berupa lignin dan komponen lain (Pérez *et al.*, 2002).

Selulosa merupakan homopolimer yang berbentuk linear, yang terdiri dari ikatan β 1,4-glikosidik yang berhubungan dengan unit D-glukopiranososa. Selulosa biasanya terbentuk dalam struktur kristalin dan amorf serta biasanya ditemukan dalam dinding tanaman ataupun fungi (Moat, Foster, & Spector, 2002)



Gambar 2.4. struktur selulosa (Moat *et al.*, 2002)

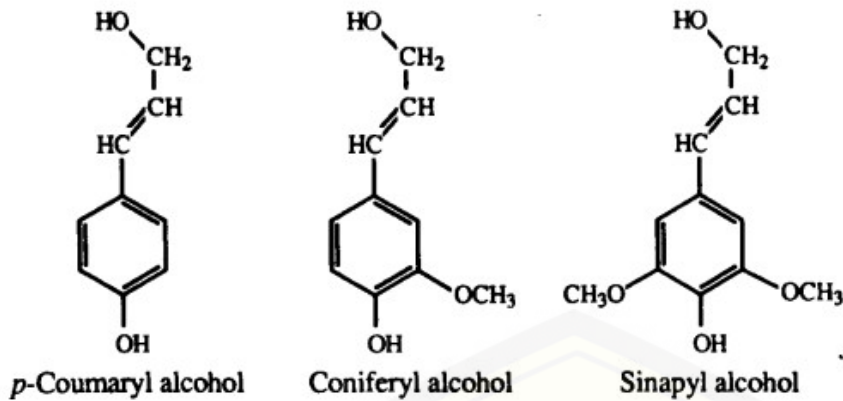
Degradasi selulosa memerlukan kombinasi dari 3 tipe enzim yaitu endo- β -1,4-glukanase yang mengubah selulosa menjadi oligosakarida yang lebih kecil, ekso - β -1,4-glukanase memindahkan disakarida unit selobiosa. Selobiosa kemudian dihidrolisis menjadi glukosa oleh β -glukosidase (Moat, 2002).



Gambar 2.5. degradasi selulosa oleh enzim (Moat *et al.*, 2002)

Hemiselulosa merupakan heteropolimer karbohidrat kompleks. Polisakarida ini memiliki massa yang lebih rendah dibandingkan dengan selulosa dan terdiri dari D-xylose, D-mannosa, D-galactosa, D-glucosa, L-arabinosa, 4-O-methyl-glucuronic, D-galacturonic and asam D-glucuronic yang diikat oleh β 1,4- dan β 1,3- glikosidik (Pérez *et al.*, 2002).

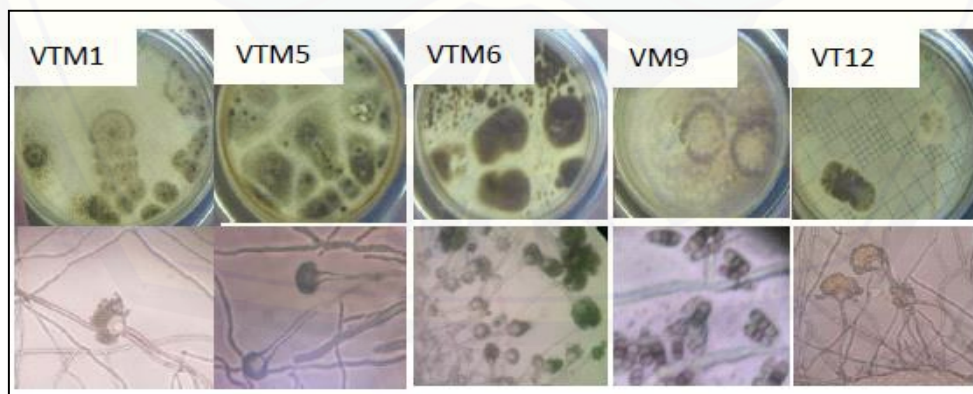
Perbedaan utama antara hemiselulosa dan selulosa adalah pada hemiselulosa terdapat cabang dengan rantai pendek yang terdiri dari gula yang berbeda. Hemiselulosa juga lebih mudah terhidrolisis dari pada selulosa (Pérez *et al.*, 2002). Lignin merupakan polimer aromatik yang dihubungkan oleh ikatan eter dan karbon yang tersusun dari 3 kompleks bangun utama yaitu p-coumaryl alcohol (p-hydroxyphenyl propanol), coniferyl alcohol (guaiacyl propanol), dan sinapyl alcohol (syringyl propanol) (Jeffries, 1994).



Gambar 2.6. Tiga kompleks struktur lignin (Jeffries, 1994).

Struktur yang kompleks dan berat molekul yang tinggi serta sulit terlarut menyebabkan lignin lebih sulit untuk didekomposisi (Pérez *et al.*, 2002). Diperlukan enzim-enzim tertentu untuk menghidrolisis lignin. Beberapa enzim yang sering digunakan untuk menghidrolisis lignin diantaranya lignin peroxidase, manganese peroxidase (MnPs), and laccase (Jeffries, 1994).

Penelitian yang diusulkan dilandasi dari hasil investigasi dari penelitian sebelumnya (2012-2017) yaitu didapatkannya isolat-isolat mikroorganisma yang mampu mendekomposisi LKEK dan menghasilkan gula reduksi. Sebanyak 4 isolat mikroorganisma yang secara makroskopis digolongkan kapang genus *Aspergillus sp.* (VTM1, VTM5, VTM6, VT12), dan 1 isolat kapang termasuk *Pestalotiopsis sp* (VM9) [Mustafa *et al.*; 2008; Yamane *et al.* 2003] seperti Gambar 2.7 berikut.



Gambar 2.7. Ciri-ciri Makroskopis dan Mikroskopis 5 Isolat Kapang

Isolat terpilih diatas mampu mendegradasi substrat LKEK dengan indeks aktivitas selulase yang dihasilkan seperti yang ditunjukkan pada Tabel 2.4 berikut.

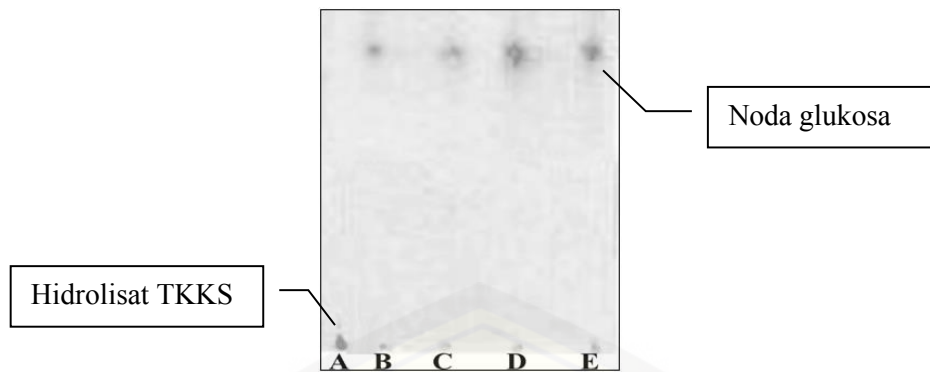


Tabel 2.1. Efisiensi selulase dalam menghidrolisis masing-masing substrat *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) dibandingkan dengan Alkali Ekstrak LKEK untuk menghasilkan gula reduksi

Isolat	Reducing sugar		Effisiensi Hydrolisis (%)	
	CMC($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Alkali Ekstrak LKEK ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	CMC	Alkali Ekstrak LKEK
VTM1	8,00	11,4	0,16	1,07
VTM5	7,72	5,77	0,15	0,25
VTM6	14,2	3,00	0,28	0,28
VM9	18,0	6,40	0,36	0,60
VT12	10,1	4,40	0,20	0,41

Ke lima mikroorganisma tersebut secara kualitatif dan kuantitatif mampu melakukan dekomposisi LKEK dan termasuk golongan mikroba *cellulolytic* dan *lignocellulolytic* [Muzakhar 2013; Muzakhar 2014; Nafissa *et al.* 2008]. Dalam proses dekomposisi tersebut telah diketahui bahwa isolat-isolat tersebut mampu menghidrolis LKEK menjadi gula reduksi dengan komponen utama monosakarida yaitu glukosa. Hal ini dikarenakan dalam isolat-isolat tersebut mensekresikan enzim ekstraseluler sehingga proses hidrolisis terjadi [Lee dan Blackburn 1975; Lee *et al.* 2011; Sukumaran *et al.* 2005]. Dalam penelitian sebelumnya didapatkan hasil bahwa kemampuan masing-masing isolat dalam melakukan dekomposisi / hidrolisis belum didapatkan hasil yang optimal.

Berdasarkan hasil-hasil penelitian yang diperoleh bahwa bakteri dan kapang *cellulolytic* mampu melakukan proses dekomposisi LKEK dan menghasilkan gula reduksi dengan efisiensi yang baik. Analisis selanjutnya, baik bakteri maupun kapang *cellulolytic* dalam melakukan proses dekomposisi akan menghasilkan selain gula sederhana dalam bentuk oligosakarida, juga menghasilkan gula monosakarida [Torres *et al.* 2011] sehingga dimungkinkan untuk difermentasi menjadi ethanol. Hasil awal juga menunjukkan bahwa melalui analisis hidrolisat menggunakan *thin layer chromatography* (TLC) menunjukkan adanya noda gula monosakarida selama proses hydrolysis alkali ekstrak LKEK oleh *crude* enzim yang dihasil oleh baik oleh bakteri maupun kapang *cellulolytic* seperti yang ditunjukkan dalam Gambar 2.8 berikut.



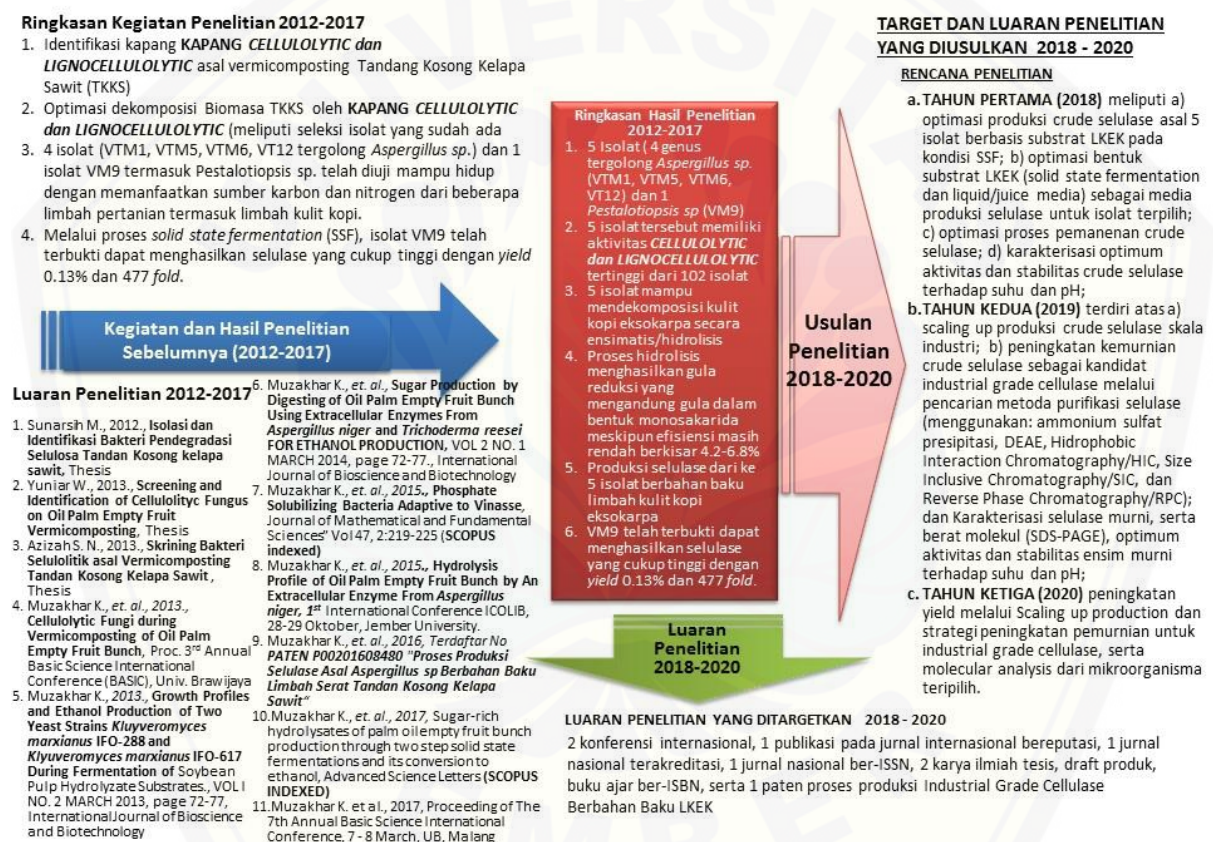
Gambar 2.8. Analisis TLC hidrolisat hasil hidrolisis LKEK menggunakan *crude* enzim kapang (B), bakteri (C), campuran kapang dan bakteri (D). A adalah kontrol (tanpa *crude* enzim) dan E adalah glukosa sebagai standar.

Selanjutnya efisiensi proses dekomposisi melalui hidrolisis untuk masing isolat hanya berkisar 4.2-6.8% sebagai gula reduksi. Selanjutnya, proses perubahan hidrolisat mejadi selulase melalui fermentasi anaerobik menggunakan *Kluyveromyces marxianus* hanya didapatkan konsentrasi selulase 0.8% dengan efisiensi 19.3% [Mustafa *et al.* 2008; Nafissa *et al.* 2008]. Rendahnya proses dekomposisi LKEK melalui hidrolisis dikarenakan belum dilakukannya dan diketemukannya optimasi proses hidrolisis yang dapat menghasilkan hidrolisat dengan kandungan gula reduksi konsentrasi tinggi [Meryandini *et al.* 2009; Muhammad *et al.* 2009; Torres *et al.* 2011] sebagai monosakarida. Dalam penelitian yang akan diusulkan, strategi proses optimasi hidrolisis peningkatan produksi monosakarida akan dilakukan melalui *multiple step solid state fermentation* LKEK. Mekanisme ini merupakan strategi yang telah terbukti berhasil dilakukan oleh beberapa penelitian dalam melakukan biokonversi dari beberapa material kaya akan serat, cellulose, lignocellulose, hemicellulose [Baharuddin *et al.* 2009; Wyk *et al.* 2003]. Serta biokonversi dengan cara ini terbukti meningkatkan kaya akan gula monosakarida dalam hidrolisat [Bund *et al.* 2002; Yamane *et al.* 2002]. sebagai bahan baku selulase merupakan upaya dalam meningkatkan efisiensi produksi hidrolisat gula dan selulase.

Hasil penelitian sebelumnya (2012-2016) juga menunjukkan 4 isolat tergolong *Aspergillus sp.* (VTM1, VTM5, VTM6, VT12), dan 1 isolat termasuk *Pestalotiopsis sp* (VM9) telah dianalisis secara kualitatif dan kuantitatif mampu melakukan dekomposisi LKEK dan termasuk golongan mikroba *cellulolytic* dan *lignocellulotic*. Observasi menunjukkan bahwa isolat-isolat kapang tersebut mampu hidup dan memanfaatkan sumber karbon LKEK dan mampu melakukan proses dekomposisi. Proses dekomposisi LKEK secara semikualitatif terbukti dengan terbentuknya

zona bening pada media padat mengandung carboxymethyl cellulose dan alkali ekstrak LKEK baik yang dihasilkan oleh kapang [Lee *et al.* 1998; Steindl 2010] maupun bakteri [Abubakar *et al.* 2013, Schell *et al.* 2004; Stichnothe *et al.* 2009].

Dalam penelitian ini diusulkan proses optimasi hidrolisis peningkatan produksi monosakarida melalui *multiple step solid state fermentation* LKEK serta biokonversi hidrolisatnya sebagai bahan baku selulase merupakan upaya dalam meningkatkan efisiensi produksi selulase. Berdasar hasil penelitian yang telah dilakukan (2012-2016) dan rasionalisasi target yang akan dicapai dalam usulan penelitian 2018-2020 dapat dijelaskan dalam Gambar 2.9 sebagai mana berikut.



Gambar 2.9. Ringkasan kegiatan dan hasil penelitian 2012-2017, serta target dan luaran usulan penelitian 2018-2020.

Melalui skema Penelitian Strategis Nasional Institusi, penelitian diusulkan selama 3 tahun dengan tahapan: **TAHUN PERTAMA (2018)** meliputi a) optimasi produksi *crude* selulase asal 5 isolat berbasis substrat LKEK pada kondisi SSF; b) optimasi bentuk substrat LKEK (*solid state fermentation* dan *liquid/juice media*) sebagai media produksi selulase untuk isolat terpilih; c)

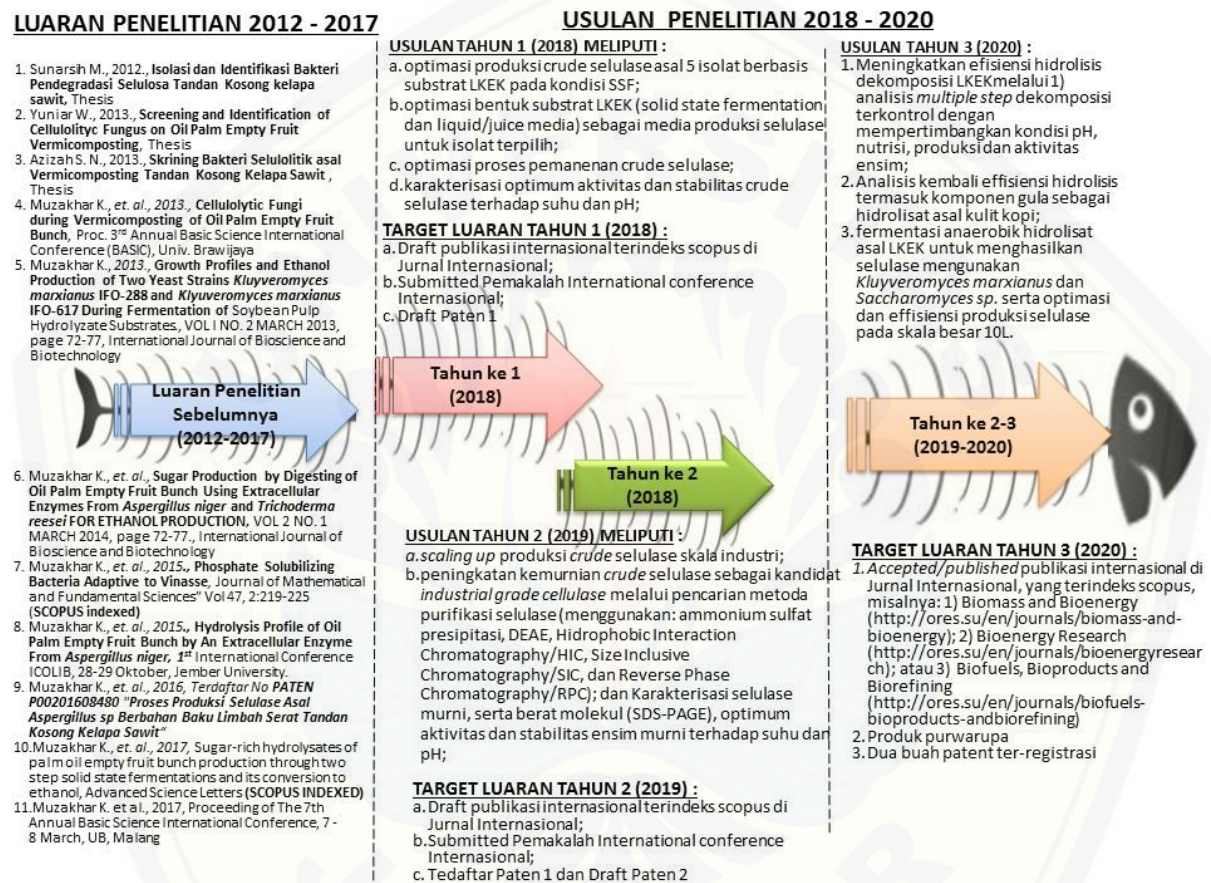
optimasi proses pemanenan *crude* selulase; d) karakterisasi optimum aktivitas dan stabilitas *crude* selulase terhadap suhu dan pH; **TAHUN KEDUA** (2019) terdiri atas a) *scaling up* produksi *crude* selulase skala industri; b) peningkatan kemurnian *crude* selulase sebagai kandidat *industrial grade cellulase* melalui pencarian metoda purifikasi selulase (menggunakan: ammonium sulfat presipitasi, DEAE, Hidrophobic Interaction Chromatography/HIC, Size Inclusive Chromatography/SIC, dan Reverse Phase Chromatography/RPC); dan Karakterisasi selulase murni, serta berat molekul (SDS-PAGE), optimum aktivitas dan stabilitas enzim murni terhadap suhu dan pH; di **TAHUN KETIGA** (2020) peningkatan *yield* melalui *Scaling up production* dan strategi peningkatan pemurnian untuk *industrial grade cellulase*, serta molecular analysis dari mikroorganisma terpilih. Selama pelaksanaan 3 tahun penelitian ditargetkan luaran-luaran berupa: 2 konferensi internasional, 1 publikasi pada jurnal internasional bereputasi, 1 jurnal nasional terakreditasi, 1 jurnal nasional ber-ISSN, 2 karya ilmiah tesis, draft produk, buku ajar ber-ISBN, serta 1 paten proses produksi *Industrial Grade Cellulase* Berbahan Baku LKEK.

Pemanfaatan biomasa LKEK menjadi enzim yaitu menjadi selulase melalui proses biokonversi masih belum secara intensif dan optimal dilakukan. Sehingga, secara umum penelitian ini mempunyai tujuan dan akan bermanfaat manfaat dalam usaha;

1. Peningkatan efisiensi produksi monosakarida berbasis limbah LKEK yang siap dijadikan bahan baku sebagai selulase
2. Peningkatan efisiensi produksi enzim selulase sebagai energi alternatif ramah lingkungan.
3. Kebaruan dan Terobosan Teknologi, yaitu LKEK yang sangat melimpah sepanjang tahun merupakan biomasa yang potensial yang perlu dikaji pemanfaatannya dan kedepan diharapkan tidak menyebabkan isu atau problematik lingkungan. Melalui penelitian ini yaitu proses biokonversi LKEK menjadi selulase merupakan salah satu pengembangan model dalam proses penanganan limbah yang berwawasan lingkungan dan mempunyai nilai secara ekonomis, serta merupakan terobosan *green* teknologi dalam memproduksi enzim.

**BAB III
METODE PENELITIAN**

Metode penelitian akan mengikuti tahapan usulan kegiatan penelitian yang akan direncanakan tahun 2018-2020 beserta target dan luaran sesuai peta jalan (*roadmap*) penelitian Gambar 3.1 berikut.



Gambar 3.1 Fishbone peta jalan tema penelitian Produksi Enzim Selulase Industrial Grade Berbasis Substrat Limbah Kulit Eksokarpa Buah Kopi

Sebagaimana di peta jalan penelitian di atas, maka detail tahapan kegiatan penelitian yang diusulkan selama 3 tahun adalah sebagaimana berikut.

3.1 TAHUN PERTAMA (2018): a) optimasi produksi *crude* selulase asal 5 isolat berbasis substrat LKEK pada kondisi SSF; b) optimasi bentuk substrat LKEK (*solid state fermentation* dan *liquid/juice media*) sebagai media produksi selulase untuk isolat terpilih; c) optimasi proses pemanenan *crude* selulase; d) karakterisasi optimum aktivitas dan stabilitas *crude* selulase terhadap suhu dan pH. Pada penelitian ini akan diinokulasikan bertahap dan kombinasi dari

ke 5 isolat pada medium LKEK segar tanpa ada penambahan nutrisi selama periode tertentu *solid state fermentation* seperti yang didesain pada Tabel 3.1 berikut.

Tabel 3.1 Perlakuan inokulum dalam proses *multiple step solid state fermentation* LKEK

Inokulum dalam LKEK	Penambahan Inokulum kapang (hari ke) dan lama dekomposisi					
	1	3	5	10
Isolat 1	-	-	-			
Isolat 2	+					
Isolat 3	-	+				
Isolat 4	-	-	+			
Isolat 5	-	-	-	+		
Pengamatan	1. Pengamatan pola pertumbuhan, aktivitas cellulolytic dan lignocellulolytic selama multiple dekomposisi 2. Efisiensi hidrolisis LKEK oleh kapang cellulolytic dan lignocellulolytic selama multiple dekomposisi					

Selanjutnya, dari hasil *multiple step solid state fermentation* akan dilakukan analisis :

a. Efisiensi hidrolisis LKEK

Effisiensi hidrolisis didasarkan pada analisis gula reduksi yang dihasilkan selama proses hidrolisis substrat alkali ekstrak LKEK yang dinyantakan dalam persentase. Penyiapan substrat alkali ekstrak LKEK yaitu dengan menimbang 100 gram bubuk LKEK dan dihidrolisis secara kimiawi dengan 1 L NaOH 1 M selama 24 jam sambil di *shaker*. NaOH berfungsi untuk memecah komponen karbohidrat dalam LKEK menjadi polisakarida yang dapat larut dalam air. Suspensi selanjutnya ditambah CH_3COOH hingga pH 7 dan difiltrasi menggunakan kertas saring. Proses selanjutnya, filtrat diekstraksi menggunakan selulase dengan perbandingan selulase dan filtrat 6:4 dan disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 10 menit untuk mendapatkan pellet alkali ekstrak polisakarida LKEK. Kemudian pelet dikeringkan melalui metoda *freeze-drying* sehingga didapatkan polisakarida substrat alkali ekstrak LKEK.

Hidrolisis enzimatis oleh dilakukan dengan menginkubasi 50uL crude enzim dan 1mL alkali ekstrak LKEK 1% dalam 20mM asetat. Selanjutnya, optimalisasi efisiensi hidrolisis juga dilakukan dengan mengamati proses hidrolisis dalam kisaran pH 3–pH 8 dalam 20mM asetat dan phosphate buffer. Optimalisasi hidrolisis juga dilakukan dalam kisaran suhu 25°C-70°C.

b. Analisis komponen gula sebagai hidrolisat LKEK

Secara kualitatif hidrolisat sebagai hasil hidrolisis LKEK dianalisis menggunakan thin layer chromatography (TLC) pada silica gel plate (Merck, silica gel 60 F254). Butanol-

ethanol-chloroform-amonia 25% (4:5:2:8) digunakan sebagai solvent system dan 1% asam sulfat digunakan untuk mendeteksi noda. Dalam analisis glukosa dan xylosa digunakan sebagai standar.

- c. Secara kuantitatif, komponen gula dalam hidrolisat bentuk monosakarida dilakukan dengan Gas Chromatography (GC) yang dikonversi sebagai monosakarida alditol acetates. Sampel hidrolisat dihidrolis terlebih dahulu menggunakan HCl 2N selama 6 jam dan di reduksi menggunakan NaBH₄ at 37°C 12 jam, kemudian di cuci menggunakan resin Dowex H type dan dilakukan filtrasi. Filtrate dikeringkan melalui evaporasi menggunakan nitrogen dan sisa asam borat dihilangkan dengan menambahkan methanol. Gula alkohol yang dihasilkan diasetilasi menggunakan 2 ml campuran acetic anhydride dan pyridine (1:1) dalam 100°C selama 10 menit. Selanjutnya ditambahkan chloroform:air (1:4), dikocok dan di sentrifus 2000 rpm selama 10 menit. Bagian supernatan yang mengandung pyridine dibuang. Lapisan bawah yang merupakan gula dalam bentuk alditol acetate dikeringkan sehingga tidak ada sisa air ataupun pyridine. Gula alditol acetate dilarutkan dalam chloroform 1ml dan siap untuk diinjeksikan ke GC. Dalam analisis ini digunakan *2-deoxy-D-glucose* sebagai internal standar. Analisis GC dilakukan pada suhu kolom 190°C selama 5 menit dan dilanjutkan dengan gradient suhu 1 °C/min sampai mencapai suhu 210 °C. Kolom GC yang digunakan adalah stainless column, 2mm I.D. x 1.83 m, packed with 3% (w/w) ECNSS-M on Gas Chrom Q, 100-120 Mesh.

BAB IV
HASIL YANG TELAH DICAPAI DAN USULAN PENELITIAN LANJUTAN

Hasil yang dicapai di TAHUN 1 adalah:

- a) draft paten proses produksi selulase berbasis LKEK yang telah di submit ke Pusat HKI LPP UNIVERSITAS JEMBER (Lampiran A), dan
- b) Draft Publikasi ditujukan ke Jurnal Internasional terindeks bereputasi (LAMPIRAN B)
- c) Usulan penelitian lanjutan (LAMPIRAN C)



DAFTAR PUSTAKA

- Alexopoulos, Constantine John. 1960. *Introductory Mycology Fifth Printing*. New York : John Wiley And Sons, Inc.
- Abu, E. A. Ado, S. A. & James, D. B. 2005. Raw Starch Degrading Amylase Production by Mixed Culture of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae* Grown on Sorghum Pomace, 4 : 785–790.
- Acharya, P. B. Acharya, D. K & Modi, H. A. 2008. Optimization for Cellulase Production by *Aspergillus niger* Using Saw Dust as Substrate. *African Journal of Biotechnology*, 7(22) : 4147–4152.
- Aguilar, C. N. Augur, C. Favela, E & Gonza, G. V. 2001. Production of Tannase by *Aspergillus niger* Aa-20 in Submerged and Solid-State Fermentation: Influence of Glucose and Tannic Acid. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 296–302.
- Ashutosh, Kar. 2008. *Pharmaceutical Microbiology* (p. 158). New Delhi: New Age International (P) Limited.
- Baig, S., & Saleem, M. 2012. Production and Characterization of Cellulases of *Aspergillus Niger* by Using Rice Husk and Saw Dust as Substrates, 1 : 377–382.
- Biswanger, H. 2002. *Principles and Methods* . Weinheim (Federal Republic of Germany): WILEY-VCH Verlag GmbH.
- Biswanger, H. 2014. Enzyme assays. *Perspectives in Science*, 1(1-6) : 41–55.
- CMPT. 2007. *Aspergillus niger*. *Mycology Plus*, 2-3. [Serial Online] http://cmpt.ca/pdf/pdf_mycology/myc2007/0704_3_a_nig.pdf [26 Januari 2015]
- Corro, G. Paniagua, L. Pal, U. Bañuelos, F & Rosas, M. 2013. Generation Of Biogas From Coffee-Pulp And Cow-Dung Co-Digestion: Infrared Studies Of Postcombustion Emissions. *Energy Conversion and Management*, 74 : 471–481.
- D'Halewyn, M.-A. & Chevalier, P. (Tanpa Tahun). *Aspergillus niger*. INSPQ (Institut national de santé publique du Québec). [Serial Online] <http://www.inspq.qc.ca/english/mould-compendium/aspergillus-niger>. [26 Januari 2015].
- Devi, M. K. Banu, A. R. Gnanaprabhal, G. R. Pradeep, B. V & Palaniswamy, M. 2008. Purification, Characterization Of Alkaline Enzyme From Native Isolate *Aspergillus niger* And Ist Compatibility With Commercial Detergents. *Indian Journal of Science and Technology*, 1(7) : 1–6.

- Elias, L. G. 1979. Chemical Composition of Coffee-Berry By-Product. dalam R. Bressani & J. Braham . Coffee Pulp Composition, Technology, and Utilization . Institute of Nutrition of Central America and Panama.
- Giyarto. 1997. Produksi Tannase Menggunakan *Aspergillus niger* Dalam Media limbah Kulit Buah Kopi.
- Hanum, A. M & Kuswytasari, N. D. 2014. Laju Dekomposisi Serasah Daun Trembesi (*Samanea saman*) dengan Penambahan Inokulum Kapang. *Jurnal Sains Dan Seni POMITS*, 3(1) : 17–21.
- Hernández, M. S. Rodríguez, M. R. Guerra, N. P & Rosés, R. P. 2006. Amylase Production by *Aspergillus niger* In Submerged Cultivation On Two Wastes From Food Industries. *Journal of Food Engineering*, 73 (1) : 93–100.
- Ibrahim, D. Puspitaloka, H. Rahim, R. A., & Hong, L. S. 2012. Characterization of Solid State Fermentation Culture Conditions for Growth and Mananase Production by *Aspergillus niger* USM F4 on Rice Husk in Tray System. *British Biothechnology Journal*, 2 (3) : 133–145.
- Ingrid, M., & Suharto, I. (2012). Fermentasi Glukosa Oleh *Aspergillus niger* Menjadi Asam Glukonat. Bandung: Universitas katolik Parahayangan.
- Jeffries, T. W. (1994). Biodegradation of Lignin and Hemicelluloses, 233–277.
- Moat, A. G., Foster, J. W., & Spector, M. P. 2002. *Microbial Physiology* (Fourth.). A John Wiley & Sons, INC.
- Okafor, U. Okochi, V. Onyegeme-okerinta, B & Nwodo-Chinedu, S. 2007. Xylanase Production by *Aspergillus niger* ANL 301 Using Agro - Wastes. *African Journal of Biotechnology*, 6 : 1710–1714.
- Olama, Z & El-Sabaeny, A. 1993. Lipase Production by *Aspergillus niger* Under Various Growth Conditions Using Solid State Fermentation. *Microbiologia*, 9 : 134–141.
- Oyeleke, S. Oyewole, O. Egwim, E. Dauda, B. E. & Ibeh, E. 2012. Cellulase And Pectinase Production Potentials Of *Aspergillus Niger* Isolated from Corn Cob. *Bayero Journal of Pure and Applied Science*, 5(1) : 78–83.
- Padmapriya, R. Tharian, J. A & Thirunalasundari, T. 2013. Coffee Waste Management-An Overview, 83–91.


- Pangesti, N. W. I. Pangastututi, A & Retnaningsih, E. 2012. Pengaruh Penambahan Molase Pada Produksi Enzim Xilanase Oleh Fungi *Aspergillus niger* Dengan Substrat Jerami Padi. *Bioteknologi*, 9(2) : 35–72.
- Paranthaman, R., Alagusundaram, K., & Indhumathi, J. 2009. Production of Protease from Rice Mill Wastes by *Aspergillus niger* in Solid State Fermentation. *Journal of Agricultural Science*, 5(3) : 308–312.
- Peñaloza, W. Molina, M. R. Brenes, R. G. Penaloza, W & Bressani, R. 1985. Solid-State Fermentation: an Alternative to Improve the Nutritive Value of Coffee Pulp Solid-State Fermentation: an Alternative to Improve the Nutritive Value of Coffee Pulp. *Applied and Environmental Microbiology*, 49(2).
- Pérez, J. Muñoz-Dorado, J. de la Rubia, T & Martínez, J. 2002. Biodegradation and Biological Treatments of Cellulose, Hemicellulose and Lignin: An Overview. *International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology*, 5(2) : 53–63.
- Purwadaria, T. Marbun, P. A. Sinurat, A. P & Ketaren, P. P. 2003. Perbandingan Aktivitas Enzim Selulase dari Bakteri dan Kapang Hasil Isolasi dari Rayap, 8(4) : 213–219.
- Raper, K.B. and D.I. Fennell. 1965. The genus *Aspergillus*. Williams and Wilkins Company, Baltimore MD.
- Record, E. Asther, M. Sigoillot, C. Pagès, S. Punt, P. J. Delattre, M. Asther, M. 2003. Overproduction of the *Aspergillus niger* Feruloyl Esterase for Pulp Bleaching Application. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62(4) : 349–55.
- Sa'adah, Z. Ika, N & Abdullah. 2010. Produksi Enzim Selulase oleh *Aspergillus niger* Menggunakan Substrat Jerami dengan Sistem Fermentasi Padat.
- Sathyavathan, P & Krithika, S. 2013. Comparison Of Cellulase Production In *Trichoderma reesei* (NCIM – 1052) And *Aspergillus niger* (NRRL – 322); Media Optimization And Enzyme Characterization Of Cellulase From *Trichoderma reesei* With Lyophilization. *International Journal of ChemTech Research*, 5(1) : 554–557.
- Schuster, E. Coleman, N.-D. Frisvad, J & Van Dijck, P. W. 2002. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. *Appl Microbiol Biotechnol*, 59: 426–435.
- Skowronek, M., & Fiedurek, J. 2004. Optimisation of Inulinase Production by *Aspergillus niger* Using Simplex and Classical Method. 42 (3) : 141–146.

- Sohail, M., Siddiqi, R., Ahmad, A., & Khan, S. A. 2009. Cellulase production from *Aspergillus niger* MS82: effect of temperature and pH. *New Biotechnology*, 25 (6) : 437–41.
- Sukumaran, R. K., Singhanian, R. R., & Pandey, A. 2005. Microbial Cellulases Production , Applications And Challenges. 64 : 832–844.
- Yesuf, Y. K. 2010. *Chemical Composition And In Vitro Digestibility Of Coffee Pulp And Coffee Husk Ensiled With Grass (Hyperchennia hirta) hay And Effective Microorganism (EM)*. Jimma University.
- Zhang R, Zhang Z. 1999. Biogasification Of Rice Straw With An Anaerobic-Phased Solids Digester System. *Bioresour Technol*, 8 (45) :235

Lampiran 1. Draft patent yang sedang di teliti untuk segera didaftarkan oleh LPPM UNEJ

Penjelasan dalam dokumen paten ini sengaja tidak dilampirkan dengan dokumen yang lengkap dan tulisan banyak dikaburkan sehubungan masih belum didaftarkan sehingga bersifat rahasia.



 LP2M	FORMULIR		
	FORM PENGAJUAN HKI DARI INTERNAL UNEJ KE LP2M		
	Kode Dokumen F 30-07.05	Terbitan / Revisi : 1 / 0 Tanggal Berlaku : 2018	Tanggal Revisi : Halaman : 1 dari 1

	KEMENTERIAN RISET TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI UNIVERSITAS JEMBER LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
	Alamat : Jl. Kalimantan No.37 Jember Telp. 0331-337818, 339385 Fax. 0331-33781 e-mail : penelitian.lemlit@unej.ac.id

No pengajuan : **HKI/ /2018**

Saya yang bertandatangan dibawah ini :

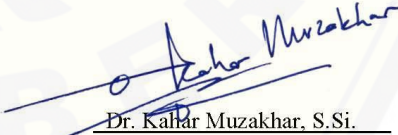
Nama : Dr. Kahar Muzakhar, S.Si
 NIP : 196805031994011001
 Fakultas : FMIPA
 Bidang Ilmu : BIOLOGI (Mikrobiologi Terapan)

Dengan ini mendaftarkan karya saya melalui *) Penelitian untuk diproses dalam pengajuan Hak Kekayaan Intelektual (HKI) ke Ditjen KI, yaitu sebagai berikut:

Judul : PROSES PRODUKSI SELULASE AKTIVITAS TINGGI ASAL ISOLAT KAPANG INDIGENOUS *Aspergillus niger* ISOLAT ICP2 BERBAHAN BAKU KULIT LUNAK BUAH KOPI

Jenis HKI yang diajukan (lingkari yang sesuai) : a. Hak Cipta
 b. Hak Paten
 c. Hak Merk
 d. Desain Industri
 e. Desain Tata Letak Sirkuit Terpadu
 f. Rahasia Dagang
 g. Perlindungan Varietas Tanaman (PVT)

Jember, 20 September 2018

Mengetahui, Ketua Sentra HKI Universitas Jember <u>Nuzulia Kumala Sari, S.H., M.H.</u> NIP. 198406172008122003	Pemohon,  <u>Dr. Kahar Muzakhar, S.Si.</u> NIP. 196805031994011001
--	---

Mengetahui,
 Ketua LP2M Universitas Jember

Prof. Ir. Achmad Subagio, M. Agr., Ph.D
 NIP. 196905171992011001



Formulir Permohonan Paten

		<p>Diisi oleh petugas Tanggal pengajuan : Nomor permohonan :</p>
Dengan ini saya/kami ¹⁾ :		
(71) Nama : Alamat ²⁾ : Warga Negara : Telepon : NPWP :	LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT, UNIVERSITAS JEMBER JL.KALIMANTAN 37 JEMBER 68121 Indonesia 0331-337818 ; 0331-339385 0.151.359.7-626.000	
mengajukan permohonan paten/ paten sederhana		[]
yang merupakan permohonan paten Internasional/PCT dengan nomor : -		
(74) melalui/tidak melalui *) Konsultan Paten Nama Badan Hukum ³⁾ : - Alamat Badan Hukum ²⁾ : - Nama Konsultan Paten : - Alamat ²⁾ : - Nomor Konsultan Paten : - Telepon/Fax : -		[]
(54) dengan judul invensi : PROSES PRODUKSI SELULASE AKTIVITAS TINGGI ASAL ISOLAT KAPANG INDIGENOUS <i>Aspergillus niger</i> ISOLAT ICP2 BERBAHAN BAKU KULIT LUNAK BUAH KOPI		[]
Permohonan paten ini merupakan pecahan dari permohonan paten nomor :		[]

DEPARTEMEN HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA R.I.
DIREKTORAT JENDERAL
HAK KEKAYAAN INTELEKTUAL

dibuat rangkap 4

Formulir Permintaan Pemeriksaan Substantif Paten

		Diisi oleh petugas Tanggal pengajuan:
Dengan ini saya/kami ¹⁾ :		
(71) Nama	: LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT UNIVERSITAS JEMBER	Diisi oleh petugas []
Alamat 2)	: JL. KALIMANTAN 37 JEMBER 68121	
Warga Negara	: Indonesia	
Telepon	: 0331-337818 ; 0331-339385	
NPWP (jika ada)	: 0.151.359.7-626.000	
yang telah mengajukan permintaan paten sendiri/melalui Konsultan HKI :		
(74) Nama Konsultan HKI	: -	[]
Nomor Konsultan HKI	: -	[]
dengan :		
(65) Nomor Permintaan Paten	:	[]
(22) Tanggal penerimaan permintaan paten	:	[]
(54) Judul penemuan	:	[]
PROSES PRODUKSI SELULASE AKTIVITAS TINGGI ASAL ISOLAT KAPANG INDIGENOUS <i>Aspergillus niger</i> ISOLAT ICP2 BERBAHAN BAKU KULIT LUNAK BUAH KOPI		[]
mengajukan permintaan pemeriksaan substantif untuk permintaan paten tersebut di atas.		[]
bersama ini, saya/kami sampaikan :		
[] biaya pemeriksaan substantif paten sebesar Rp. (..... rupiah.....)		[]
[] biaya klaim yang belum dibayar buah @ Rp. Sejumlah Rp. (.....)		
[] kekurangan-kekurangan lain yang rincian ringkasnya tersebut Dalam lampiran formulir ini.		

Yang mengajukan permintaan
UNTUK DAN ATAS NAMA
UNIVERSITAS JEMBER,
KETUA LEMBAGA PENELITIAN
DAN
PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT

(Prof. Ir. Achmad Subagio, M.Agr., PhD)

Deskripsi

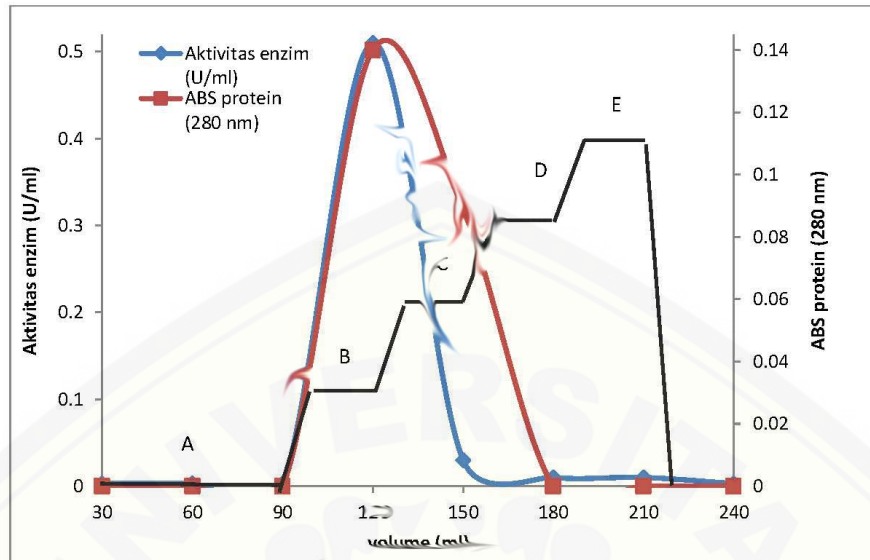
PROSES PRODUKSI SELULASE AKTIVITAS TINGGI DARI ISOLAT KAPANG INDIGENOUS *Aspergillus niger* ISOLAT ICP2 BERBAHAN BAKU KULIT LUNAK BUAH KOPI

5 Bidang Teknik Invensi

Invensi ini berhubungan produksi selulase aktivitas tinggi asal *Aspergillus niger* isolat ICP2. Lebih spesifik, proses produksi selulase aktivitas tinggi melalui proses ~~fermentasi~~ bentuk padat (*Solid State Fermentation/SSF*) berbahan dasar limbah kulit lunak buah kopi.

Latar Belakang Invensi

Kulit lunak buah kopi (*Coffee pulp*) merupakan limbah perkebunan yang jumlahnya sangat melimpah di Indonesia. Limbah padat berupa kulit lunak buah kopi mencapai 45% dari setiap pengolahan buah kopi (Pamungkas dan Utomo, 2008). Sebagai negara dengan ~~luas~~ terbesar keempat di dunia setelah Brazil, Vietnam, dan Kolombia, Indonesia mampu memproduksi kopi sekitar 1,2 juta ton yang terdiri atas kopi robusta (*C. Canadensis*) 601 ribu ton (50,4%) dan kopi arabika (*C. Arabica*) sebesar 170 ribu ton (19,6%) pada tahun 2012. Kapasitas produksi kopi dengan jumlah tersebut akan dihasilkan limbah padat berupa kulit lunak buah kopi sekitar 336,6 ribu ton per tahun (Indonesian-investment, 2017; Kemenperin, 2013). Kulit lunak buah kopi mengandung senyawa kafein, tannin, dan polifenol yang menunjukkan efek negatif apabila terakumulasi ke dalam lingkungan (Clifford 1991a; Clifford 1991b; Murthy dan Nair, 2012; Pandey et al., 2000; Pzani dan Ey, 2006). Selain itu kulit lunak buah kopi juga memiliki nilai nutrisi yang sangat tinggi (57,2 yang menunjukkan nilai energi yang relatif lama untuk terdekomposisi secara alami (Sano et al., 2012; Zhang dan Zhang, 2013). Proses dekomposisi secara alami yang



Gambar 4. Kurva purifikasi selulase *A. niger* Isolat ICP2 dengan IEC *open column* matrik DEAE Cellulofine. A = 0 M NaCl dalam 20 mM bufer asetat pH 5; B = 0,2 M NaCl dalam 20 mM bufer asetat pH 5; C = 0,4 M NaCl dalam 20 mM bufer asetat pH 5; D = 0,5 M NaCl dalam 20 mM bufer asetat pH 5; E = 0,6 M NaCl dalam 20 mM bufer asetat pH 5;

5

10 Tabel 1. Ringkasan purifikasi selulase *A. niger* isolat ICP2 dengan beberapa tahap purifikasi.

Tahap Purifikasi	Volume (ml)	Total Abs 280 nm	Total Aktivitas (U/ml)	Aktivitas Spesifik (U/ml)	Yield (%)	Purification fold
Crude	1000	512	512	0,3	100	1,0
Dialisis 10 dan 50 kDA	1000	300,4	385,1	0,4	100	1,3
DEAE cellulose	100	100,1	132,2	3,2	25	2,5
DEAE cellulofine	100	100,1	14,8	0,8	10	1,3

Abstrak

PROSES PRODUKSI SELULASE AKTIVITAS TINGGI ASAL ISOLAT
KAPANG INDIGENOUS *Aspergillus niger* ISOLAT ICP2 BERBAHAN
5 BAKU KULIT LUNAK BUAH KOPI

Kulit lunak buah kopi merupakan limbah sampingan yang
muncul dari proses pengolahan biji kopi. Kulit lunak buah
kopi mengandung selulosa sebesar 63% dari total berat
keringnya yang menjadikan limbah ini sangat potensial untuk
10 dijadikan substrat bioproses produksi enzim selulase. Hasil
skrining dan identifikasi kapang indigenous kulit lunak buah
kopi didapatkan isolat ICP2 yang teridentifikasi secara
morfologi ~~mikroskopis~~ dan makroskopis sebagai spesies *A.*
niger. Isolasi ini mampu ~~bertumbuh dengan baik pada~~
15 kulit lunak buah kopi ~~dan~~ ~~tidak~~ ~~tergantung~~ ~~perubahan~~ sumber N,
mineral, maupun nutrisi yang ~~tidak~~ ~~terdapat~~ ~~dalam~~ ~~selulosa~~
dari *A. niger* isolat ICP2 optimal pada inkubasi ~~ber~~
dengan kepadatan spora sebesar ~~9~~ ~~10⁷~~ ~~spora/ml~~. Purifikasi
enzim selulase dengan beberapa ~~metode~~ ~~purifikasi~~ didapatkan
20 tingkat kemurnian selulase sebesar ~~100%~~ ~~100~~ dan yield
sebesar ~~17,12%~~. Hasil karakterisasi selulase *niger* isolat
ICP2 didapatkan bahwa selulase stabil pada pH 3-6,5 dan suhu
~~30-50°C~~. Optimalitas berada pada kondisi pH 4 dan
25

Lampiran 2: Draft Artikel

Research Article

INDIGENOUS CELLULOLITIC FUNGI *Aspergillus niger* ICP2 FROM COFFEE PULP

¹Syafiq Ubaidillah, ²Siswoyo, ^{1*}Kahar Muzakhar

¹Department of Biological Science, Faculty of Mathematic and Natural Sciences, Jember University, Indonesia

²Department of Chemical Science, Faculty of Mathematic and Natural Sciences, Jember University, Indonesia

*Corresponding author: kaharmzk@unej.ac.id

Abstract

Background and Objective: Coffee pulp is abundant agricultural wastes in Indonesia. it's contain 63 % cellulosa of dry weight, so potensial as a bioprocessing substrate. **Methodology:** Indigenous cellulolitic fungi was isolated from decomposed coffee pulp identified by macroscopic and microscopis morphology. The cellulolitik fungi with highest cellulase activity used as inoculum for enzym production in coffee pulp powder by solid state fermentation. Cellulase was purified by 4 steps of purification methods. Then, purified cellulase were characterized by range of pH and themperature.

Result: Speciment ICP2 is Indigenous fungi isolated from decomposed coffee pulp. It was indentified as *Aspergillus niger* and produced high activity of cellulase on coffee pulp substrate by solid state fermentation. Partial purification of ICP2 cellulase obtained 3 peaks of enzyme activity with different characteristic. Peak 1 had purification fold 69.58% and yiled 3.39%, peak 2 had purification fold 57.77% and yield 2.51, and peak 3 had had purification fold 82 % and yield 26.67%. ICP2 purified cellulase showed that the enzyme at peak 1 and 2 were stable at range pH 3-5.5 and temperature 30-55 °C, and the enzyme at peak 3 were stable at pH 2-6.5 and temperature 30-65 °C. The optimum pH of reaction from cellulase at peak 1 was 5, whereas peak 2 and 3 had optimum reaction with substrate at pH 4.5. The optimum temperature for reaction with substrate of each peak showed similarity at 55 °C.

Conclusion: Speciment ICP2 could grew well and produced high activity of cellulase within coffee pulp as susbtrate of solid state fermentation without addition simple C or N source.

Key words: *Aspergillus niger* speciment ICP2, cellulase, coffee pulp, and solid state fermentation.

Corresponding Author: Department of Biological Science, Faculty of Mathematic and Natural Sciences, Jember University, Indonesia. email: kaharmzk@unej.ac.id. Telp: +62 812-1606-0778.

INTRODUCTION

Indonesia is the fourth highest producen of coffee in the world after Brazil, Vietnam, and Columbia. Capacity of coffee production in Indonesia approximately 748 milion tons at 2012. It's consist of 601 milion tons (80.4%) of robusta coffee (*Coffea canephora*) and 147 milion tons of arabica coffee (*C. Arabica*)^{1,2}. Based on³ 45% of coffee bean processing result is pulp, so from these total amount of indonesian coffee production will be produced approximately 336.6 milion tons of coffee pulp every year.

Coffee pulp has cafein, tannin, and polyphenol. These compounds has negative effect seriously for enviromental. Then, coffee pulp has high C/N ratio reach of 57.2 as well and make it take a long time to be decomposed naturally⁴. Because of those reasons, coffee pulp is very potential as

polutan for enviromental and it need treatment seriously. A treatment for organic wastes can be done by improved it value as substratrate for bioprocess, such as enzyme production. The utilizing of coffee pulp as substrate without addition of simple C or N source was purposed to reduced cost of process.

Coffee pulp contain lignocellulosa that consist of 63% dry weight of cellulosa, 17% of lignin, and 2.3% of hemicellulosa [4]. The high content of cellulosa is very potensial to be used as substrate for production of cellulase by indigenou cellulolitic fungi. Indigenou isolate was chosen because has native adaptive ability for grow well on the coffee pulp substrate.

MATERIALS AND METHODS

Inoculum Preparation: Indigenous cellulolytic fungi was isolated from naturally decomposed coffee pulp (\pm 2 months) from coffee plantation of Durjo village, Sukorambi, Jember. Preculture of isolate was grown on PDA (Potato Dextrose Agar) 5 ml and temperature of incubation was 37 °C for 3 days.

Solid State Fermentation (SSF) for Production of Cellulase: SSF for production of cellulase used coffee pulp powder (less than $<200 \mu\text{m}$) with water content was 2.3 ml/gr substrate. Total spora of inoculum were 9.2×10^6 spora/gr substrate. Temperature of fermentation was 37 °C for 4 days of incubation time. Crude of cellulase was extracted by 2 ml/gr substrate of aquadest containing 0.01% Na Azide + 1% NaCl or solven and substrate ratio was 2:1. This mixture was incubated on shaker for 12 hours and 30 °C of temperature. Extraction methods used filtration and sentrifugation of mixture with 8000 rpm for 15 minutes.

Partial Purification of Cellulase: Purification of cellulase was performed by 4 steps of purification including dialysis 10 and 50 kDa, ammonium sulfate precipitation with 40% of saturation, anion

exchanger chromatography with macroporous quaternary 75 cm^2 of surface area (MA Q-75) ammonium as matrix, and anion exchanger chromatography with DEAE cellulofine. The eluent buffer in every single process used 20 mM acetate buffer pH 5.

Enzyme Assay: Analysis of cellulase activity was performed by mixed purified cellulase and Carboxymethyl Cellulosa (CMC) 0.5% in 20 mM acetate buffer pH 5. The temperature for reaction was kept at 37 °C for 2 hours of incubation time. Cellulase activity was observed from reduction sugars based on method by Somogy-Nelson. Cellulase activity was represented in the Unit/ml, which 1 U/ml activity is volume of cellulase to produce 1 μmol glucose every minute at experimental condition.

Characterization of Purified Cellulase: Characterization of cellulase was observed based on stability and optimum pH as well as temperature. Stability of enzyme based on pH and temperature were performed with incubated purified cellulase at range temperature 30-80 °C and pH 3-8 respectively. These mixturer were incubated for 4 hours of incubation time.

The optimum pH and temperature for reaction were observed with incubated enzyme and substrate in the same range of temperature and pH but used 2 hour of incubation time. Cellulase activity was observed based on method by Somogy-Nelson ⁵.

filamented colony with exceed than 35 mm of diameter on Czapeks Yeast Agar (CYA) and Malt Extrat Agar (MEA). In these media, ICP2 can grew faster than on the 25% glycerol Nitrate media (G25N). This speciment had septated hifa structure, mature spora presence on 7 days of incubation time in the CYA and MEA, conida stucture grew from phialides with diameter not exceed than 6 μm ($\pm 3 \mu\text{m}$) and phialides as well as metulae came from swollen apex stipe (vesicle).

RESULT AND DISCUSSION

Characteristic of *Aspergillus niger* Speciment ICP2 From Decomposed Coffee pulp: Speciment ICP2 can produced

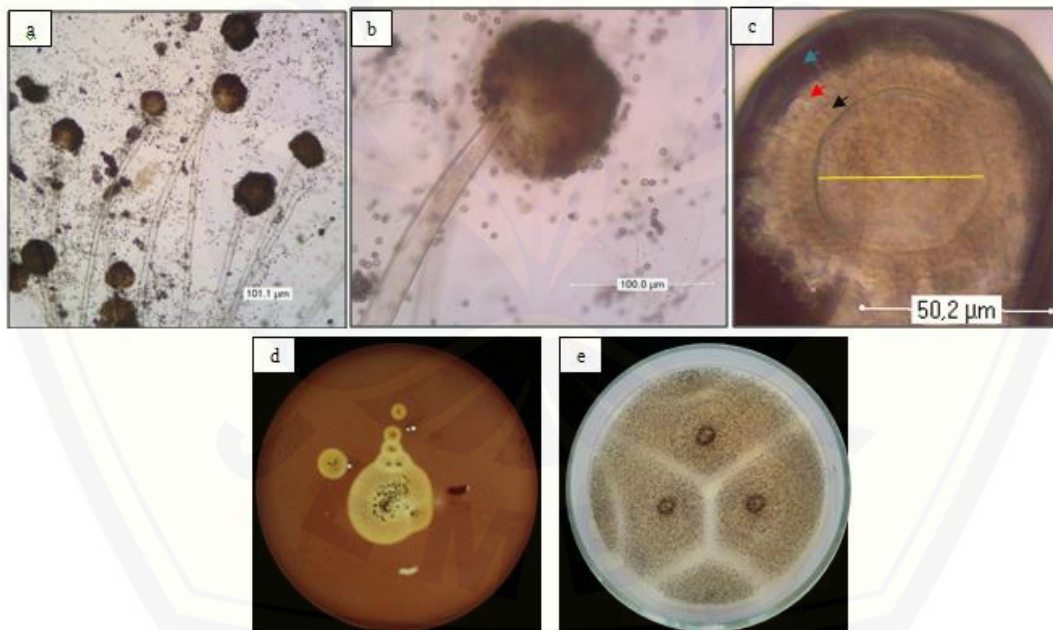


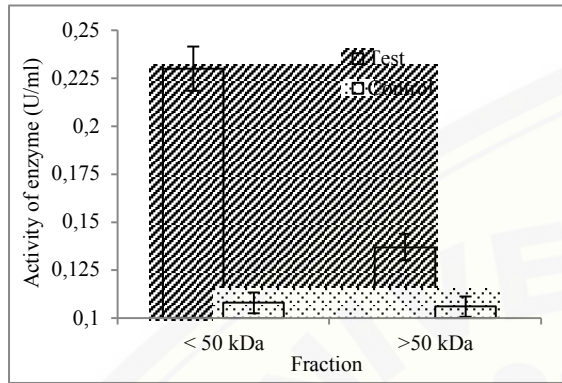
Figure 1. Macroscopic morphology of specimen ICP2. (a-b) general structure of specimen ICP2 (c) Conidiospora (▶) phialides, (▶) metulae, (■) vesicle, (d) Speciment ICP2 on media CMC Agar 0.5 % after addition of iodine 0.33% (e) specimen ICP2 on Malt Extract Agar (MEA) at 37 °C of temperature with 7 days of incubation time. .

Production and Purification of Cellulase.

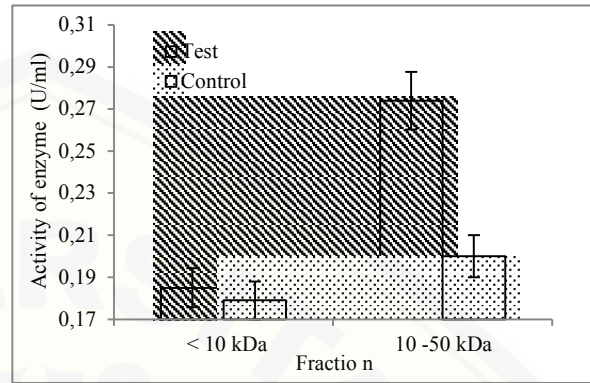
Dialysis of crude cellulase *A. niger* specimen

ICP2: Dialysis process used microdialysis cut off 50 kDa obtained 2 fraction of enzyme. Fraction <50 kDa of Cellulase shown higher

activity than fraction >50 kDa. Total activity of fraction <50 kDa was 0.23 U/ml and 0.13 U/ml for fraction >50 kDa, respectively (fig. 2a).



(a)



(b)

Figure 2. cellulase activity of specimen ICP2 based on dialysis 50 and 10 kDa. (a) Dialysis 50 kDa (b) Dialysis 10 kDa.

Then cellulase fraction <50 kDa was performed redialysis used microdialysis cut off 10 kDa. In this process, cellulase would be separated into 2 main fraction again namely the first one was fraction with size <10 kDa and second one had size 10-50 kDa. The fraction with size 10-50 kDa had higher activity than another fraction. It was 0.27 U/ml, meanwhile fraction fraction >10 kDa had 0.18 U/ml of cellulase activity (fig. 2b).

therefor that molcul will be pass inside of membrane, and to be ocured on the contrary. Based on these result, cellulase of *A. niger* specimen ICP2 had size appoximety 10-50 kDa.

Protein dialysis use microdialysis 10 and 50 kDa depend on Molecular Weight Cut Off (MWCO) of membrane or lower molecular weight that can be endured by membrane. It's mean if a molcul has weight less than minimal endured molecular weight of membrane

Ammonium sulfate precipitation: Dialysed cellulase from previously process was concentred by ammonium sulfate. Optimization of percent saturation of ammonium sulfate was 40 % for precipited target protein. It was obtained 90% of recovery activity (figure 3a) with enzyme activity reached of 0.69 U/ml (fig. 3b). Whereas, almost of protein had been precipited at 70% saturation of ammonium sulfate (fig. 3b). Scaling up of precipitation

process was performed by added 60.75 gr ammonium sulfate into 250 dialysed cellulase.

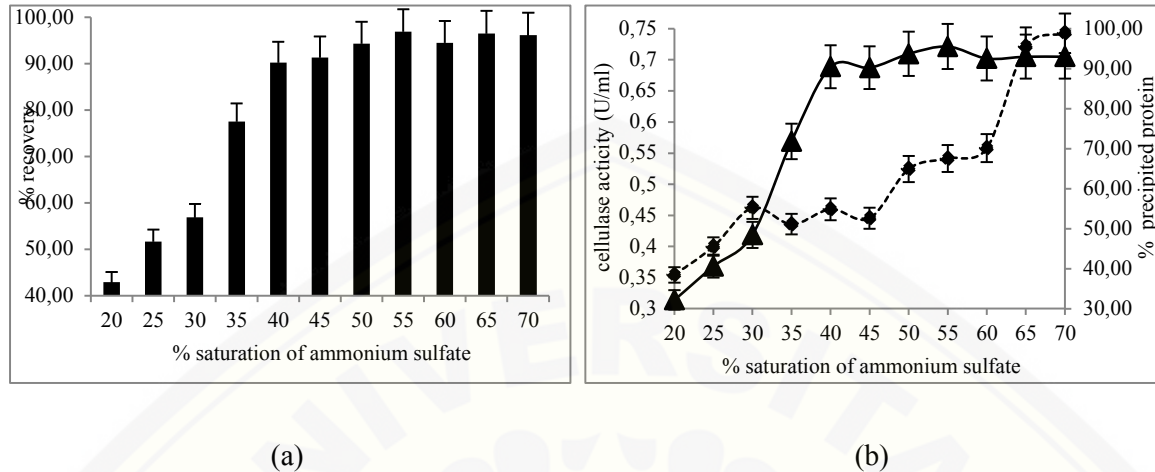


Figure 3. Optimization of ammonium sulfate % saturation. (a) % recovery of cellulase activity (b) cellulase activity and % relative precipitated protein, (■▲■) cellulase activity (U/ml), (- - ■ - -) % relative precipitated protein.

Anion exchanger chromatography used MA Q-75 ammonium and DEAE cellulofine:

Precipitated cellulase was purified again used anions exchanger chromatography. There were 2 matirx that to be used for this step, namely Q-75 ammonium and DEAE cellulofine. MA Q-75 anion exchanger chromatography was performed to reduced protein contaminant that not belong to target protein. Cellulase that bound in matrix was eluted by added relative high concentration of NaCl to got all of the protein target. The other protein that could not

bound in matrix will be released and separated from protein target.

Based on this step, there was obtained purified cellulase with activity reached of 1,04 U/ml (fig.4). Then, cellulase was purified again by used DEAE cellulofine anions exchanger chromatography. Among this step, there were 3 peak of cellulase activity with different concentration of NaCl as elution solvent. They were eluted at NaCl 0.1 M, 0.15 M, and 0.2-0.25 M of NaCl, respectively (fig. 5)

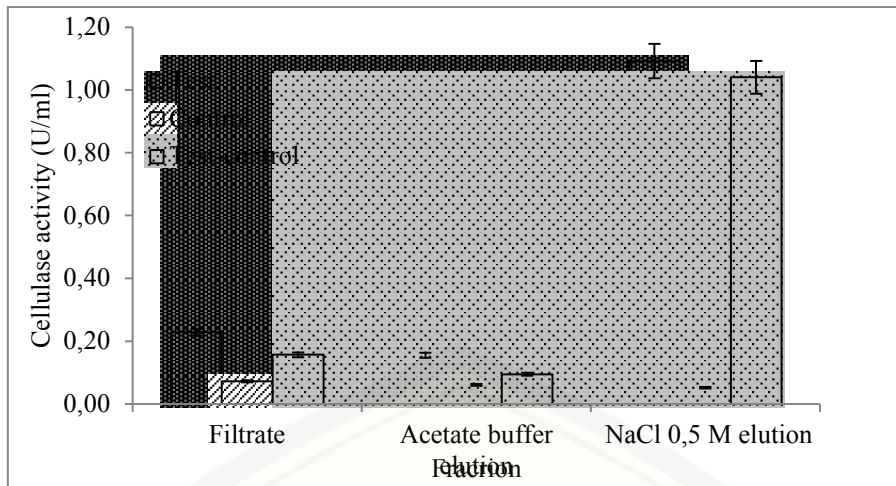


Figure 4. Result of purification of crude cellulase used MA Q-75 ammonium anion exchanger chromatography.

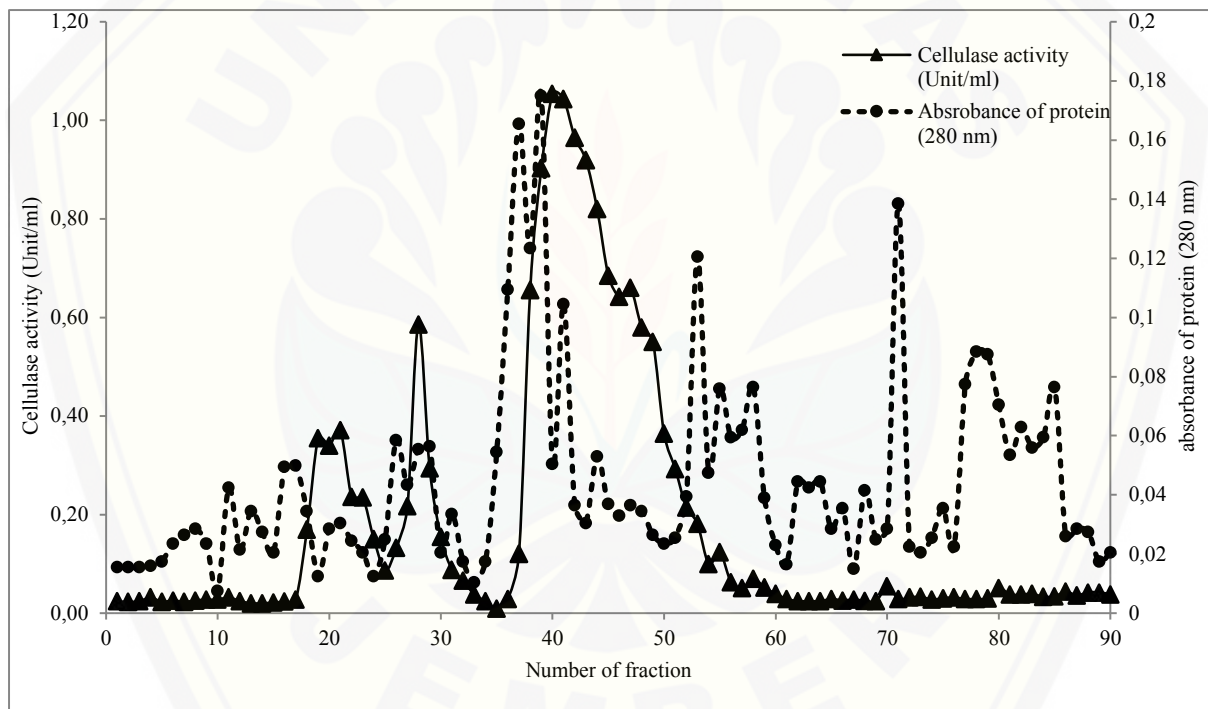


Figure 5. Purification of cellulase used DEAE cellulofine anion exchanger chromatography.

There were 3 peak of cellulase activity based on appearance in figure 5. It was might caused a fungi generally produced a complex cellulase (ekso β 1.4 glucanase, endo β 1.4

glucanase, and β glucosidase) in the separated structure. The enzyme that hydolized substrate CMC (cellulose amorf) might bound on the matrix as well and to be eluted together with β

glucosidase at appropriate concentration of NaCl. It was potentially to produced higher reduction sugars despite of lower concentration content of CMC_{ase} (endo β 1.4 glucanase).

Cellulase purification by DEAE cellulofine obtained purification fold reached to

69.58 and yield was 3.3% for peak 1. Peak 2 had purification fold 57.77 and yield 2.51%. Purification fold and yield of peak 3 were 82 and 2.51% resepectively compared to crude cellulase before purified (table 1).

Table 1. Resume of purification steps of Cellulase from speciment ICP2

Purification steps	volume	Activity (U/ml)	Total activity (U/ml)	Abs 280 nm	Total Abs. 280	activity/Abs. 280 nm	yield (%)	purification fold
Crude enzyme	300	0.33	99.00	2.46	738.00	0.13	100.00	1.00
Dialysis 10 dan 50 kDA	250	0.28	68.75	0.27	67.00	1.03	69.44	7.65
Ammonium sulfate precipitation	25	0.68	16.88	1.39	34.75	0.49	17.05	3.62
Sartobind MA Q-75	40	1.04	41.40	0.11	4.44	9.32	41.82	69.51
DEAE cellulofine								
peak 1	12	0.28	3.36	0.03	0.36	9.33	3.39	69.58
peak 2	8	0.31	2.48	0.04	0.32	7.75	2.51	57.77
peak 3	40	0.66	26.40	0.06	2.40	11.00	26.67	82.00

Characterization of Purified Cellulase

Purified cellulase by DEAE cellulofine anion exchanger chromatography was characterized based on pH and temperature of reaction.

Stability and optimum pH Purified cellulase showed stable activity at the range of appropriate pH. Stabily of enzyme was difined

as relative activity more than 80% compare to highest activity at range tested pH. Cellulase in the peak 1 had stability of enzyme at pH 3-5.5, stability of enzyme from peak 2 was at pH 3.5-5.5, and peak 3 had stability enzyme at pH 3-6.5 (fig.6a).

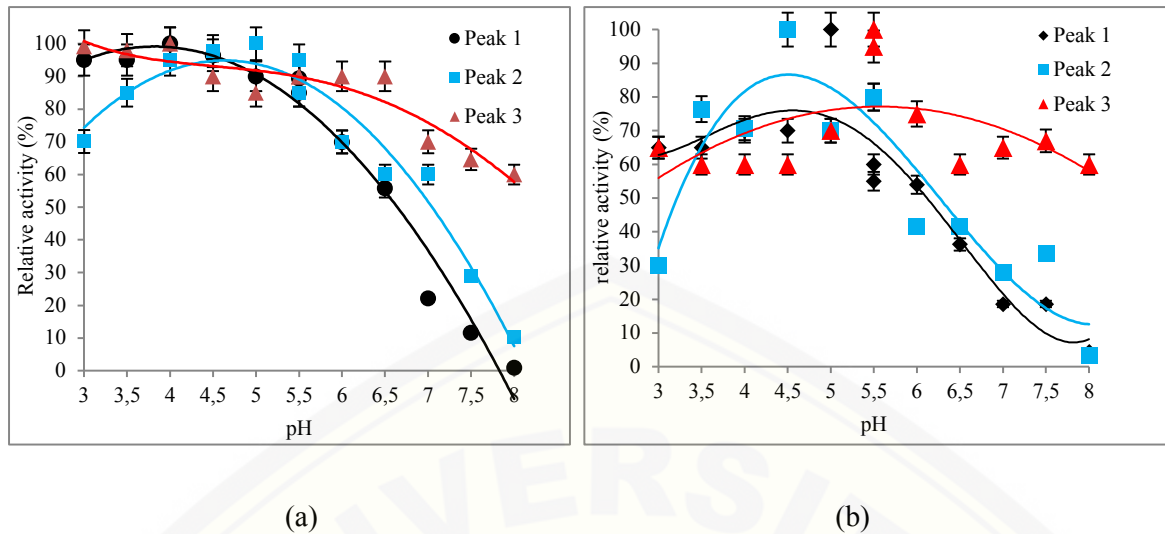


Figure 6. Stability and optimum pH of cellulase from specimen ICP2. (a) Range stability pH of cellulase from specimen ICP2 (b) Optimum pH reaction of cellulase from specimen ICP2.

Cellulase from specimen ICP2 had stability at range acid pH. Optimum of pH for reaction between enzyme and substrate was presence at acid pH. It were pH 5, 4.5, and 5.5 for peak 1,2, and 3 respectively (fig. 6b). Activity of cellulase decreased relatively after optimum pH of reaction, even peak 1 and 2 had relative activity 0% when pH to be alkali at pH 8 (fig. 6b).

Enzyme has sensitive structure toward the alteration of pH. If the condition for enzyme reaction too high level of acid or alkali, therefore it cause ionization on active site of enzyme and make enzyme activity to be decreased or even to be inhibited⁶. Based on¹⁰, reduction of enzyme activity toward change of pH because enzyme is charged molecule. The alteration of

pH will change ion at binding area between enzyme and substrate, therefore inhibit binding of capacity between each other. The alteration of pH cause change of charge in the outside of binding area that very important to tertiary or quaternary structure of enzyme¹⁰.

There were some report about cellulase from *A. niger* based on pH of reaction, namely⁷ reported that cellulase from *A. niger* was optimum at pH 4.5, 4.5-7.5⁸ and⁹ also reported that cellulase activity or *A. niger* was highest at pH 4 and then reduced until almost 0 when pH was 9.

Stability and optimum temperature:
Cellulase of specimen ICP2 had different

characteristic at appropriate range of temperature. Purified cellulase in the peak 1 and 2 was stable at range 30-55 °C of temperature, while cellulase in the peak 3 was stable at 30-65 °C (fig. 7a). optimum temperature for reaction between enzyme and substrate was 55 °C for peak every purified cellulase, except enzyme in the peak 3 with pH optimum was 55-60 °C (fig. 7b).

Enzyme is protein or combination between protein and other compounds. As protein, enzyme has high sensitive toward to temperature as well. Too low of temperature will reduce of enzyme activity, while if temperature is too high therefor enzyme structure will be denaturated⁶. Enzyme has thermosensitive area that very easy to be denaturated if exposed to temperature more than range of temperature stability⁶.

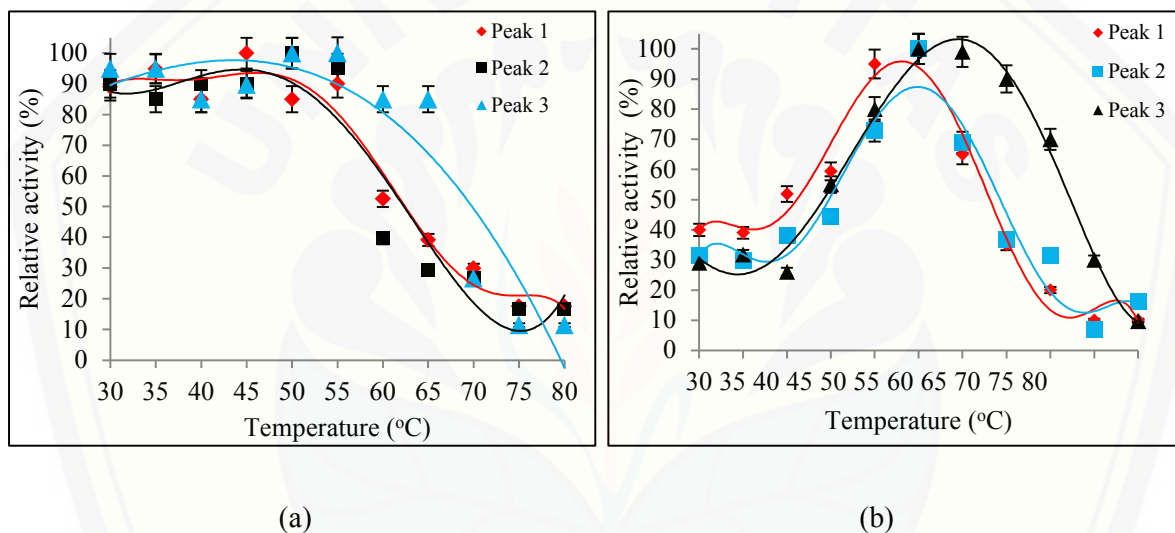


Figure 7. Stability and optimum temperature of Celulase ICP2 (a) range stability temperature of cellulase from specimen ICP2 (b) range optimum temperature of cellulase from specimen ICP2.

CONCLUSION

Speciment ICP2 was indentified as *Aspergillus niger*. This speciment could grew well and produced high activity of cellulase within coffee pulp as susbtrate of solid state fermentation, although without addition simple C and N source. So, coffee pulp was very

potential as future substrate for cellulase production.

REFERENCES

1. Indonesian-investment. Coffee in

- Indonesia, Production & Export Indonesian Coffee . 2017. <https://www.indonesia-investment.com> [Accessed 18 July 2018].
2. Kemenperin. Produksi Kopi Nusantara Ketiga Terbesar Di Dunia. 2013. <http://www.kemenperin.go.id/artikel/6611/Produksi-Kopi-Nusantara-Ketiga-Terb Besar-Di-Dunia> [Accessed 18 July 2018].
 3. Pamungkas D, Utomo R. Kecernaan Bahan Kering In Saccotumpi Jagung dan Kulit Kopi Substrat Tunggal dan Kombinasi. 2008:205-211.
 4. Corro G, Paniagua L, Pal U, Bañuelos F, Rosas M. Generation of Biogas from Coffee-Pulp and Cow-Dung Co-Digestion: Infrared Studies of Postcombustion Emissions. *Energy Convers Manag.* 2013;74:471-481. doi:10.1016/j.enconman.2013.07.017.
 5. Nelson N. A Photometric Adaptation of The Somogyi Method for The Determination of Glucose. *BiolChem.* 1944;153:375-380.
 6. Bisswanger H. Enzyme assays. *Perspect Sci.* 2014;1(1-6):41-55. doi:10.1016/j.pisc.2014.02.005.
 7. Peñaloza W, Molina MR, Brenes RG, Penaloza W, Bressani R. Solid-State Fermentation: an Alternative to Improve the Nutritive Value of Coffee Pulp Solid-State Fermentation: an Alternative to Improve the Nutritive Value of Coffee Pulp. *Appl Enviromental Microbiol.* 1985;49(2).
 8. Coral G, Arikan B, Unaldi MN, Govenmez H. Some Properties of Crude Carboxymethyl Cellulase of *Aspergillus niger* Z10 WildType Strain. 2002;26:209-213.
 9. Oyeleke S., Oyewole O., Egwim E., Dauda BE., Ibeh E. Cellulase And Pectinase Production Potentials Of *Aspergillus Niger* Isolated from Corn Cob. *Bayero J Pure Appl Sci.* 2012;5(1):78-83.
 10. Murray. Graner. Mayer. Rodwell. 1995. *Microbial Enzyme and Biotechnology.* London: Applied Science Pub.

