



**DEGRADASI BUNGKIL BIJI JARAK PAGAR OLEH  
ENZIM EKSTRASELULER *Trichoderma viride***

**SKRIPSI**

Oleh

**Citra Purnama Wijaya  
NIM 101810401026**

**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS JEMBER  
2015**





**DEGRADASI BUNGKIL BIJI JARAK PAGAR OLEH  
ENZIM EKSTRASELULER *Trichoderma viride***

**SKRIPSI**

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat  
untuk menyelesaikan Program Studi Biologi (S1)  
dan mencapai gelar Sarjana Sains

Oleh  
**Citra Purnama Wijaya**  
**NIM 101810401026**

**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS JEMBER  
2015**

## PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan dengan penuh rasa syukur dan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Allah Swt atas rahmat dan hidayah-Nya;
2. Ayahku Suhartono, Ibuku Indayati, kakek, nenek, beserta seluruh keluarga besar atas do'a dan dukungannya;
3. guru-guruku dari taman kanak-kanak, sekolah dasar, sekolah menengah sampai perguruan tinggi. Terimakasih atas bimbingan dan ilmu yang bermanfaat;
4. Almamater tercinta, Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

**MOTO**

Allah akan meninggikan orang-orang yang beriman di antara kamu dan orang-orang yang diberi ilmu pengetahuan, beberapa derajat.

(Q.S. Al- Mujadalah: 11)\*)

Ojo adigang adigang adiguno,

Semakin sukses seseorang, hendaklah semakin rendah hati, dan berguna bagi orang lain.

(Suhartono)

Keberhasilan yang sebenarnya yaitu ketika kita meraih sesuatu dengan usaha yang maksimal.

(Wendy Joni Hartono)

---

\*) Departemen Agama Republik Indonesia, Lajnah Pentashih Mushaf Alquran. 2004. *Al-Qur'an dan terjemahannya dalam Bahasa Indonesia*. Bandung: Penerbit Jumanatul Ali-Art.

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

nama : Citra Purnama Wijaya

NIM : 101810401026

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Degradasi Bungkil Biji Jarak Pagar oleh Enzim Ekstraseluler *Trichoderma viride*” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada paksaan dan tekanan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 13 Mei 2015

Yang menyatakan,

Citra Purnama Wijaya  
NIM 101810401026

**SKRIPSI**

**DEGRADASI BUNGKIL BIJI JARAK PAGAR OLEH  
ENZIM EKSTRASELULER *Trichoderma viride***

Oleh

Citra Purnama Wijaya  
NIM 101810401026

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dr. Kahar Muzakhar, S.Si.  
Dosen Pembimbing Anggota : Drs. Rudju Winarsa, M.Kes

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “Degradasi Bungkil Biji Jarak Pagar oleh Enzim Ekstraseluler *Trichoderma viride*” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember pada:

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas  
Jember.

Tim Penguji :

Ketua,

Sekretaris,

Dr. Kahar Muzakhar, S.Si.  
NIP 196805031994011001

Drs. Rudju Winarsa, M. Kes.  
NIP 196008161989021001

Anggota I,

Anggota II,

Drs. Siswanto, M.Si.  
NIP 196012161993021001

Dr. rer.nat. Kartika Senjarini, M. Si.  
NIP 197509132000032001

Mengesahkan  
Dekan,

Prof. Drs. Kusno, DEA., Ph.D.  
NIP 196101081986021001

## RINGKASAN

**Degradasi Bungkil Biji Jarak Pagar oleh Enzim Ekstraseluler *Trichoderma viride***; Citra Purnama Wijaya, 101810401026; 2015: 33 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Bungkil biji jarak pagar (BBJP) merupakan produk samping industri pengolahan minyak biji jarak. Minyak jarak dikembangkan sebagai sumber bahan bakar alternatif pengganti bahan bakar minyak bumi. Komponen utama BBJP adalah protein 24,54%, selulosa 20,3%, hemiselulosa 5,55% dan lignin 19,46%. Selulosa dan lignin merupakan polimer alami bahan organik, disebut lignoselulose yang sulit didegradasi secara alami. Pemecahan rantai polimer dari limbah lignoselulosa dapat dipercepat dengan bantuan mikroorganisme, *T. viride* merupakan salah satu mikroorganisme yang berpotensi menghasilkan beberapa enzim ekstraseluler untuk mendegradasi komponen BBJP. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui kondisi optimum degradasi BBJP oleh enzim ekstraseluler *T. viride* sehingga dapat diketahui kondisi optimum degradasi BBJP oleh enzim ekstraseluler *T. viride*.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari (i) persiapan bahan-bahan penelitian seperti sampel BBJP dan biakan *T. viride*, dilanjutkan (ii) penentuan kepadatan spora *T. viride* dalam media agar yang mengandung BBJP 1%, kemudian (iii) optimasi produksi enzim dan produksi enzim dalam jumlah lebih banyak pada media BBJP jenuh air, dan diakhiri dengan (iv) analisis kondisi optimum degradasi BBJP oleh enzim ekstraseluler *T. viride* meliputi penentuan stabilitas dan optimum aktivitas enzim terhadap pH, (v) penentuan stabilitas dan optimum aktivitas enzim terhadap suhu, dan (vi) penentuan waktu optimum degradasi BBJP oleh enzim ekstraseluler *T. viride* menggunakan metode analisis gula reduksi *Somogy-Nelson*.

Hasil penentuan kepadatan spora *T. viride* dalam media agar miring yang mengandung substrat BBJP 1 % menunjukkan jumlah spora optimum, yaitu  $4,25 \cdot 10^7$  dengan waktu inkubasi 6 hari. Dilanjutkan dengan optimasi produksi enzim menunjukkan waktu inkubasi terbaik untuk produksi enzim oleh *T. viride* pada media BBJP adalah 6 hari dengan aktivitas enzim sebesar 72,3  $\mu\text{g/ml}$ . Aktivitas enzim diketahui stabil pada rentang pH 5-7 dengan aktivitas enzim pH 5 (29,9  $\mu\text{g/ml}$ ); pH 5,5 (29,9  $\mu\text{g/ml}$  dan 32,9  $\mu\text{g/ml}$ ); pH 6 (37,7  $\mu\text{g/ml}$ ); pH 6,5 (29,1  $\mu\text{g/ml}$ ); dan pH 7 (24,4  $\mu\text{g/ml}$ ) sedangkan pada pH 7,5-8 menunjukkan penurunan aktivitas enzim. Berdasarkan uji aktivitas enzim pada rentang pH tersebut diketahui aktivitas enzim optimum pada pH 6, yaitu 37, 7  $\mu\text{g/ml}$ . Sedangkan pada variasi suhu, menunjukkan aktivitas enzim stabil pada rentang suhu 30°C sampai 55°C dengan aktivitas enzim pada suhu 30°C sebesar 20,65  $\mu\text{g/ml}$ ; suhu 35°C (21,96  $\mu\text{g/ml}$ ); suhu 40°C (19,2  $\mu\text{g/ml}$ ); suhu 45°C (19,2  $\mu\text{g/ml}$ ); suhu 50°C (19,64  $\mu\text{g/ml}$ ); suhu 55°C (19,78  $\mu\text{g/ml}$ ) dan menunjukkan penurunan aktivitas pada suhu 60°C dan 65°C. Berdasarkan pengukuran suhu optimum, aktivitas enzim mencapai puncak pada suhu 45°C yaitu sebesar 38,7  $\mu\text{g/ml}$  dan menunjukkan penurunan aktivitas setelahnya. Degradasi bungkil biji jarak pagar oleh enzim ekstraseluler *T. viride* berdasarkan waktu inkubasi menunjukkan peningkatan aktivitas hingga 12 jam dengan kemampuan degradasi sebesar 2,4% dari total komponen BBJP dan gula reduksi yang dihasilkan sebesar 1197,8  $\mu\text{g/ml}$ .

## PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah Swt. atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi yang berjudul “Degradasi Bungkil Biji Jarak Pagar oleh Enzim Ekstraseluler *Trichoderma viride*”. Skripsi ini disusun guna memenuhi salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penulisan skripsi ini tidak lepas dari dukungan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih dan penghargaan kepada:

1. Dr. Kahar Muzakhar, S.Si. selaku Dosen Pembimbing Utama dan Drs. Rudju Winarsa, M.Kes. selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran dan perhatian guna memberikan bimbingan demi terselesaikannya skripsi ini;
2. Drs. Siswanto, M.Si. dan Dr. rer.nat. Kartika Senjarini, M. Si. selaku Dosen Penguji I dan II yang banyak memberikan saran dan masukan demi kesempurnaan skripsi ini;
3. Dr. Hidayat Teguh Wiyono M.Pd. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang senantiasa memberikan arahan dan bimbingan selama penulis menjadi mahasiswa;
4. Ir. Endang Soesetyaningsih, selaku teknisi Laboratorium Mikrobiologi dan Purnama, selaku teknisi Laboratorium Biologi Dasar Universitas Jember yang banyak membantu selama penelitian;
5. ayah, ibu, kakek dan nenek, serta seluruh keluarga yang telah memberikan motivasi, materi, tenaga, pikiran dan doa;
6. teman-teman di Laboratorium Mikrobiologi, Sri, Laras, Latifah, Widya, Syafiq, Anis, Putri, Hilma, Atika, Ruroh, Rion, Dini, Layla, Tifany, Bagus

serta semua teman-teman di biologi khususnya 2010, atas segala kebersamaan, semangat dan dukungannya selama ini;

7. semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis memohon maaf apabila terdapat kesalahan penulisan serta menerima kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi kita semua.

Jember, Mei 2015

Penulis

DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	<b>i</b>
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	<b>ii</b>
<b>HALAMAN MOTO</b> .....	<b>iii</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	<b>iv</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	<b>vi</b>
<b>RINGKASAN</b> .....	<b>vii</b>
<b>PRAKATA</b> .....	<b>ix</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>xiii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>xiv</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xiv</b>
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Latar Belakang</b> .....	<b>2</b>
<b>1.2 Rumusan Masalah</b> .....	<b>2</b>
<b>1.3 Ruang Lingkup Penelitian</b> .....	<b>3</b>
<b>1.4 Tujuan</b> .....	<b>3</b>
<b>1.5 Manfaat</b> .....	<b>3</b>
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1 Degradasi Limbah Organik oleh Mikroorganisme</b> .....	<b>4</b>
<b>2.2 Bungkil Biji Jarak Pagar (BBJP)</b> .....	<b>5</b>
<b>2.3 <i>T. viride</i> dan Enzim Ekstraseluler</b> .....	<b>8</b>
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN</b> .....	<b>11</b>
<b>3.1 Waktu dan Tempat Penelitian</b> .....	<b>11</b>
<b>3.2 Alat dan Bahan</b> .....	<b>11</b>
<b>3.3 Prosedur Penelitian</b> .....	<b>11</b>
<b>3.3.1 Persiapan Bahan-bahan Penelitian</b> .....	<b>11</b>

3.3.2 Produksi Enzim Ekstraseluler <i>T. viride</i> .....	13
3.3.3 Analisis Kondisi Optimum Degradasi BBJP oleh Enzim Ekstraseluler <i>T. viride</i> .....	15
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	<b>17</b>
<b>4.1 Penentuan Kepadatan Spora <i>T. viride</i></b> .....	<b>17</b>
<b>4.2 Optimasi Produksi Enzim Ekstraseluler <i>T. viride</i></b> .....	<b>18</b>
<b>4.3 Analisis Kondisi Optimum Degradasi BBJP oleh Enzim Ekstraseluler         <i>T. viride</i></b> .....	<b>20</b>
4.3.1 Stabilitas dan Optimum Aktivitas Enzim Terhadap pH .....	20
4.3.2 Stabilitas dan Optimum Aktivitas Enzim Terhadap Suhu .....	21
4.3.3 Degradasi BBJP oleh Enzim Ekstraseluler <i>T. viride</i> .....	23
<b>BAB 5. PENUTUP</b> .....	<b>25</b>
<b>5.1 Kesimpulan</b> .....	<b>25</b>
<b>5.2 Saran</b> .....	<b>25</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	<b>26</b>
<b>LAMPIRAN</b> .....	<b>31</b>

**DAFTAR TABEL**

	Halaman
2.1 Komponen BBJP .....	6



**DAFTAR GAMBAR**

	Halaman
2.1 Bungkil biji jarak pagar (BBJP).....	6
2.2 <i>T. viride</i> mikroskopis .....	8
4.1 Kepadatan spora <i>T. viride</i> .....	17
4.2 Optimasi produksi enzim oleh <i>T. viride</i> .....	19
4.3 Stabilitas dan optimum aktivitas enzim terhadap pH .....	20
4.4 Stabilitas dan optimum aktivitas enzim terhadap suhu .....	21
4.5 Degradasi BBJP oleh enzim ekstraseluler <i>T. viride</i> .....	23

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
<b>A. Komposisi Bahan .....</b>	<b>31</b>
<b>A.1 Komposisi Media PDA .....</b>	<b>31</b>
<b>A.2 Komposisi Media Agar Alkali Ekstrak BBJP .....</b>	<b>31</b>
<b>A.3 Komposisi Media Produksi Enzim .....</b>	<b>31</b>
<b>A.4 Komposisi Media Alkali Ekstrak BBJP .....</b>	<b>31</b>
<b>A.5 Komposisi Buffer Phospat 1 M .....</b>	<b>31</b>
<b>A.6 Komposisi Buffer Asetat 1 M .....</b>	<b>32</b>
<b>A.7 Komposisi Reagen <i>Somogyi</i> .....</b>	<b>32</b>
<b>A.8 Komposisi Reagen <i>Nelson</i> .....</b>	<b>32</b>
<b>B. Kurva Kalibrasi Glukosa .....</b>	<b>33</b>



## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Bungkil biji jarak pagar (BBJP) merupakan produk samping industri pengolahan minyak biji jarak. Minyak jarak pagar merupakan sumber energi alternatif yang sedang dikembangkan untuk menggantikan sumber bahan bakar minyak (BBM) (Mukherjee *et al.*, 2011). Kebutuhan bahan bakar minyak semakin meningkat, sementara minyak bumi merupakan bahan bakar yang sifatnya tidak dapat diperbaharui (Azocar, 2011). Kondisi ini telah mendorong pemerintah Indonesia untuk mengupayakan pengembangan produksi bahan bakar alternatif dari beberapa tumbuhan penghasil minyak. Jarak pagar merupakan salah satu tanaman yang berpotensi sebagai penghasil minyak nabati yang dapat diolah menjadi sumber bahan bakar alternatif (biodiesel) pengganti minyak tanah maupun solar (Gubitz, *et al.*, 1999). Di Indonesia populasi tanaman jarak pagar mencapai 2500-3300 pohon/ha, tingkat produktivitasnya berkisar antara 8-15 ton biji/ha. Biji jarak pagar mengandung rendemen minyak sebesar 25-35%, sehingga setiap produksi minyak jarak dapat menghasilkan sekitar 56-75% limbah berupa bungkil biji jarak pagar (Hariadi, 2005). Biomasa dari limbah jarak pagar ini lebih besar dari pada minyak yang dihasilkan, sehingga apabila tidak ditangani akan menimbulkan dampak negatif terhadap lingkungan (Makkar dan Becker, 1998).

Menurut Staubmann *et al.* (1997) komponen BBJP adalah abu 6,03%, gula 0,71%, lemak 6,40%, protein 24,54%, selulosa 20,3%, hemiselulosa 5,55% dan lignin 19,46%. Selulosa dan lignin merupakan polimer alami bahan organik yang disebut lignoselulosa dan dikenal sebagai komponen yang sulit didegradasi di lingkungan (Sutanto, 2002). Pemecahan rantai polimer dari limbah yang komponen utamanya lignoselulosa dapat dipercepat dengan bantuan mikroorganisme yang aktif



mendegradasi dan memanfaatkan selulosa sebagai sumber karbon dan energinya. Fungi merupakan mikroorganisme yang dianggap lebih baik dalam menghasilkan enzim ekstraseluler (Gianfreda dan Rao, 2004). *T. viride* merupakan salah satu fungi yang berpotensi menghasilkan enzim ekstraseluler, sehingga memungkinkan untuk memanfaatkan residu tanaman sebagai bahan nutrisi (Druzhinina *et al.*, 2006). Menurut Gautam *et al.* (2010) *T. viride* mampu memproduksi enzim ekstraseluler selulase dari residu limbah padat yang mengandung selulosa, dengan aktivitas enzim optimum pada konsentrasi substrat 4-5%, pH 6,5 dan suhu 45°C. Amira *et al.* (2012) menyatakan bahwa produksi selulase dan xilanase oleh *T. viride* aktif mendegradasi lignoselulosa pada limbah *Empty Fruit Bunches* (EFB) dan *Palm Oil Mill Effluent* (POME). *T. viride* juga diketahui mampu menghasilkan enzim xyloglucanase yang dapat membantu degradasi limbah selulosa (Tribak *et al.*, 2002). Menurut Simkovic *et al.* (2008) *T. viride* juga mampu memproduksi protease yang distimulasi oleh adanya ekstrak yeast atau protein murni seperti serum albumin dan casein.

Pemanfaatan mikroorganisme untuk mempercepat proses degradasi bahan organik telah banyak dihasilkan, namun belum ada informasi mikroorganisme dekomposer yang efektif dalam mendegradasi BBJP (Alleorerung, 2010). Berdasarkan potensi *T. viride* dalam memproduksi beberapa enzim ekstraseluler, maka dilakukan penelitian untuk mengetahui kemampuan degradasi BBJP oleh enzim ekstraseluler *T. viride*.

## 1.2 Rumusan Masalah

BBJP merupakan produk samping industri pengolahan minyak dari biji jarak pagar yang jumlahnya melimpah dan belum dimanfaatkan secara optimal. Komponen utama BBJP adalah lignoselulosa, sehingga degradasi limbah BBJP dapat dipercepat dengan bantuan mikroorganisme. *T. viride* merupakan mikroorganisme yang mampu memproduksi enzim ekstraseluler, namun belum diketahui potensi aktivitas enzim dalam mendegradasi komponen BBJP.

### **1.3 Ruang Lingkup Penelitian**

Penelitian ini meliputi produktivitas enzim ekstraseluler dari *T. viride* dan optimasi uji aktivitas enzim mendegradasi komponen polisakarida BBJP.

### **1.4 Tujuan**

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kondisi optimum degradasi BBJP oleh enzim ekstraseluler *T. viride*.

### **1.5 Manfaat**

Dari penelitian ini diharapkan dapat diketahui potensi enzim ekstraseluler *T. viride* dalam membantu proses degradasi BBJP.



## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Degradasi Limbah Organik oleh Mikroorganism

Dekomposisi merupakan kegiatan penguraian bahan organik oleh mikroorganism. Konversi biologi bahan organik dilakukan oleh bermacam-macam kelompok mikroorganism heterotrofik seperti bakteri, fungi, dan aktinomycetes (Bennet *et al.*, 2002). Kelompok bakteri yang aktif mendegradasi bahan organik diantaranya berasal dari genus *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Cytophaga*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Poliangium*, *Sorangium*, *Vibrio* (Anbu *et al.*, 2013). Beberapa kelompok fungi seperti *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Neurospora*, dan *Fusarium* mempunyai aktivitas tinggi dalam menghasilkan enzim tertentu untuk mendegradasi bahan organik (Chandel *et al.*, 2007). Fungi yang paling banyak digunakan sebagai biodekomposer limbah organik adalah *Trichoderma* dan *Aspergillus* karena berpotensi menghasilkan enzim ekstraseluler yang aktif mendegradasi rantai polimer komponen penyusun limbah (Bennet *et al.*, 2002).

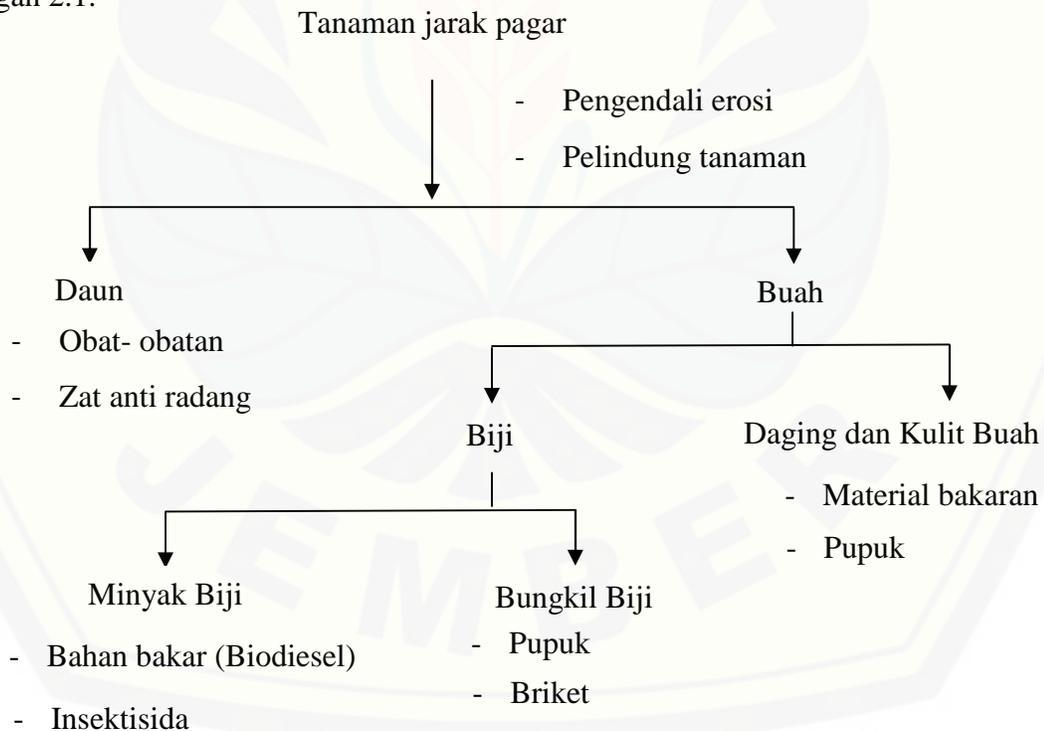
Penggunaan biokatalis seperti enzim merupakan faktor kunci dalam proses degradasi limbah sebagai pengganti katalis logam, hal ini disebabkan enzim bersifat spesifik dan selektif. Enzim untuk industri umumnya merupakan protein, maka enzim mudah dipisahkan dari produk yang dihasilkan, dan enzim juga mudah didegradasi secara alamiah. Enzim hidrolitik juga dapat digunakan dalam proses-proses industri untuk menggantikan senyawa-senyawa korosif dan berbahaya bagi lingkungan seperti asam kuat HCl, dan Klorin (Gianfreda dan Rao, 2004). Berbagai fungi biokontrol, terutama dari genus *Trichoderma*, merupakan penghasil enzim hidrolitik ekstraseluler (disekresi ke luar sel). Enzim atau biokatalisator ini diproduksi *Trichoderma* bukan hanya untuk proses mikoparasitisme, tetapi juga untuk memperoleh nutrisi dari lingkungan hidupnya (Druzhinina *et al.*, 2006).



## 2.2 Bungkil Biji Jarak Pagar (BBJP)

Jarak pagar termasuk famili *Euphorbiaceae* merupakan tanaman tahunan toleran kekeringan yang memiliki nilai ekonomis tinggi karena dapat dimanfaatkan sebagai sumber bioenergi. Bioenergi adalah bahan bakar alami yang dibuat dari minyak nabati sebagai bahan bakar alternatif terbarukan yang prospektif untuk dikembangkan karena harga minyak bumi semakin melonjak naik (Staubmann, 1997). Bioenergi memiliki beberapa keunggulan, yaitu dapat diperbaharui, bersifat ramah lingkungan, dapat terurai, mampu mengurangi efek rumah kaca, dan kontinuitas bahan bakunya terjamin. Bioenergi dapat diperoleh dengan cara yang cukup sederhana, yaitu melalui budidaya tanaman penghasil *biofuel* seperti tanaman jarak pagar (Mukherjee *et al.*, 2011).

Setiap bagian dari tanaman jarak pagar memiliki manfaat yang berbeda. Secara skematis manfaat setiap bagian tanaman jarak pagar dapat digambarkan pada bagan 2.1.



Bagan 2.1 Eksploitasi Tanaman Jarak Pagar (Guibitz *et al.*, 1999).

Proses pengolahan biji jarak menghasilkan rendemen minyak sebesar 30% dari total biji jarak pagar yang diekstraksi, maka diperoleh sekitar 70% limbah berupa bungkil biji sisa ekstraksi yang masih mengandung sisa minyak cukup tinggi. BBJP merupakan limbah dari pengepresan biji jarak yang belum banyak dimanfaatkan dan sifatnya sulit terdekomposisi secara alami (Allorerung, 2010).



Gambar 2.1 Bungkil biji jarak pagar (Dokumen pribadi)

Menurut Staubmann *et al.* (1997) beberapa komponen BBJP antara lain dapat dilihat pada tabel 2.1.

Tabel 2.1 Komponen bungkil biji jarak pagar antara lain:

<b>Komponen</b>	<b>% Berat Kering</b>
Kadar Abu	6,03
Lemak	6,40
Gula	0,71
Protein	24,54
Hemiselulosa	5,55
Selulosa	20,3
Lignin	19,46

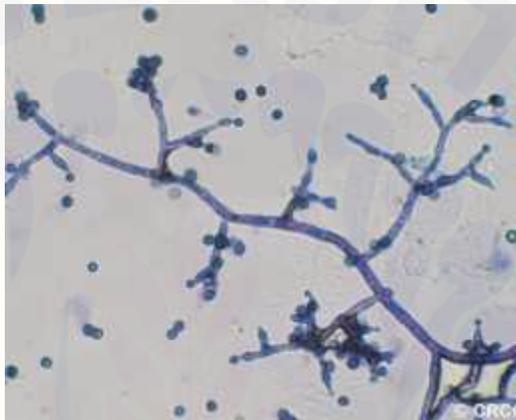
Persentase protein murni (*true protein*) pada bungkil biji jarak pagar sangat tinggi, sehingga BBJP dapat dimanfaatkan sebagai pakan alternatif sumber protein untuk ternak (Arafadi *et al.*, 2013). Makkar *et al.* (1998) menyebutkan bahwa kandungan protein biji jarak mencapai 64% lebih tinggi dibandingkan dengan biji kedelai. Namun adanya senyawa racun (*phorbol ester*) dan senyawa antinutrisi

(lectin/kursin) membatasi penggunaan bungkil biji jarak sebagai pakan ternak (Makkar dan Becker, 1999). BBJP masih mengandung sisa minyak sehingga dapat dimanfaatkan untuk pembuatan briket sebagai bahan bakar alternatif pengganti minyak tanah (Sriharti *et al.*, 2011). BBJP juga mengandung bahan organik dan dapat dimanfaatkan sebagai pupuk. Umumnya bahan organik tanaman segar tidak dapat dimanfaatkan langsung oleh tanaman, sehingga perlu dilakukan pengomposan untuk memecah senyawa-senyawa organik yang dikandungnya untuk menyediakan unsur hara bagi tanaman. Pengomposan BBJP dapat dilakukan dengan bantuan mikroorganisme pendekomposisi bahan organik (dekomposer). Namun kandungan selulosa dan lignin yang tinggi menyebabkan BBJP sulit didekomposisi (Alloerung, 2010). Selulosa dan lignin adalah polimer alami dan tergolong ke dalam senyawa rekalsitran karena tahan terhadap degradasi (Sutanto, 2002). Pemecahan rantai polimer BBJP dapat dilakukan oleh mikroorganisme terpilih, oleh karena itu pemanfaatan mikroorganisme dekomposer mempunyai potensi yang baik untuk digunakan dalam proses pengomposan limbah BBJP (Alloerung, 2010). Pemanfaatan mikroorganisme dekomposer lebih menguntungkan karena prosesnya lebih mudah dan dapat mempercepat proses dekomposisi bahan organik yang umumnya terdiri atas senyawa selulosa dan lignin (Sutanto, 2002).

Degradasi komponen kompleks lignoselulosa menjadi komponen yang lebih sederhana membutuhkan bantuan enzim. Enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme banyak dimanfaatkan karena mudah diproduksi dalam jumlah banyak dengan waktu relatif singkat melalui proses fermentasi (Anbu *et al.*, 2013). Enzim merupakan biokatalisator yang berfungsi menurunkan energi aktivasi suatu proses reaksi. Aktivitas enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain pH, suhu, konsentrasi substrat dan enzim. Faktor pH dan suhu tertentu dapat meningkatkan aktivitas enzim karena menyediakan kondisi optimum bagi kerja enzim. Sebaliknya, kondisi ekstrim seperti panas tinggi dan pH ekstrim dapat merusak protein penyusun enzim dan menghentikan aktivitas kerja enzim (Anbu *et al.*, 2013).

### 2.3 *T. viride* dan Enzim Ekstraseluler

*T. viride* merupakan kelompok fungi yang memiliki karakter morfologi berupa koloni berwarna putih, hijau muda hingga hijau tua, miselium yang berseptata, bercabang, konidiofor bercabang dan cabang yang paling ujung tumbuh sel yang disebut fialida, konidia berwarna hijau cerah bergerombol menjadi satu berbentuk bola. *T. viride* mampu tumbuh pada suhu 20°C – 36°C dan mampu tumbuh optimum pada pH 5 dan 5,5 (Lieckfeldt *et al.*, 1999).



Gambar 2.2 *Trichoderma viride* Mikroskopis

Sumber: <http://mycota-crcc.mnhn.fr/site/espece.php?idE=111#ancr10>

Klasifikasi *T. viride* menurut Lieckfeldt *et al.*, (1999) adalah sebagai berikut:

Divisio	: Thallophyta
Phylum	: Fungi (Eumycota)
Kelas	: Deuteromycetes
Famili	: Moniliales
Ordo	: Moniliaceae
Genus	: <i>Trichoderma</i>
Spesies	: <i>Trichoderma viride</i>

*T. viride* mampu menghasilkan beberapa macam enzim hidrostatik, tahan terhadap zat penghambat yang dihasilkan mikroorganisme lain dan relatif resisten terhadap zat fungistatis (Druzihinina *et al.*, 2006). Selain sebagai mikroorganisme

pengurai, *T. viride* juga berfungsi sebagai agen pengendali hayati karena mempunyai sifat antagonis yang mampu menghambat pertumbuhan mikroorganisme lain. *T. viride* diketahui menghambat pertumbuhan *Fusarium moniliforme* secara kompetisi dan mikoparasit (Yates *et al.*, 1999). *T. viride* juga diketahui berpotensi menghasilkan beberapa enzim ekstraseluler sehingga memungkinkan untuk memanfaatkan residu tanaman sebagai bahan nutrisi (Ul-Haq *et al.*, 2005). Enzim ekstraseluler adalah enzim yang diekskresikan oleh mikroorganisme ke luar tubuhnya untuk mendegradasi substrat. Enzim ekstraseluler juga disebut dengan eksoenzim, yaitu enzim yang bekerja di luar sel. Umumnya berfungsi untuk mencerna substrat secara hidrolisis untuk dijadikan molekul yang lebih sederhana dengan BM lebih rendah sehingga dapat masuk dalam sel dengan mudah. Sebagian besar enzim bekerja secara khas, yaitu setiap jenis enzim hanya dapat bekerja pada satu macam senyawa. Hal ini disebabkan perbedaan struktur kimia setiap enzim bersifat tetap (Gianfreda dan Rao, 2004).

*T. viride* merupakan salah satu kapang yang berpotensi menghasilkan enzim dan banyak digunakan dalam bidang industri karena memiliki beberapa kelebihan, yaitu biaya produksi enzim lebih murah, prosesnya lebih mudah dan cepat, mampu menghasilkan enzim yang spesifik dengan karakteristik yang beragam (Arnata, 2009). *T. viride* mampu menghasilkan selulase, xilanase dan xiloglukanase. Selulase merupakan enzim yang berperan dalam proses biokonversi limbah organik berselulosa. Selulase adalah enzim kompleks yang memotong rantai selulosa menjadi glukosa secara bertahap (Gianfreda dan Rao, 2004). Menurut Cheng dan Timilsina (2011) selulase terdiri dari tiga komponen enzim yang penting, yaitu Endoglukanase, Eksoglukanase atau selobiohidrolase, dan -glukosidase atau selobiase. Endoglukanase berfungsi secara acak memotong ikatan selulosa menjadi selooligosakarida. Eksoglukanase atau selobiohidrolase berfungsi memotong ujung rantai selulosa non-pereduksi dan membebaskan selobiosa dari rantai selulosa. -glukosidase atau selobiase berfungsi untuk menghidrolisis selobiosa menjadi glukosa.

Beberapa penelitian terdahulu menunjukkan bahwa *T. viride* mampu memproduksi beberapa enzim ekstraseluler. Menurut Gautam *et al.* (2010) *T. viride* mampu memproduksi selulase secara optimal dari residu limbah padat pada konsentrasi media 4-5% dan 1,0% dengan suhu 45°C dan pH 6,5. Mojsov (2010) dalam penelitiannya memproduksi selulase dengan metode *Solid-State Fermentation* (SSF), menunjukkan bahwa *T. viride* mampu tumbuh optimum pada media jerami dengan waktu fermentasi 240 jam (123,44 mg/petridish). Produksi selulase oleh *T. viride* pada media jagung brangkasan secara SSF optimal pada waktu inkubasi 6 hari, pH 6 dan suhu 35°C dengan aktivitas enzim 5,6 U/ml (Shahzadi *et al.*, 2013). Produksi enzim selulase dan  $\alpha$ -glukosidase oleh *T. viride* pada biomasa lignoselulosa optimum pada periode inkubasi 6-7 hari pada suhu 30°C (Kandari *et al.*, 2013). *T. viride* juga dapat memproduksi protease yang distimulasi oleh adanya protein murni, aktivitas protease optimal pada pH 7 dan suhu 37°C dengan persen aktivitas enzim mendekati 100% (Simkovic *et al.*, 2008). Produksi  $\alpha$ -glukosidase oleh *T. viride* pada media bungkil kedelai optimal pada pH 5,5, suhu 30°C, dan waktu inkubasi 72 jam dengan aktivitas  $\alpha$ -glukosidase sebesar 19,92 U/ml (Ikram *et al.*, 2006).

*T. viride* juga mampu memproduksi enzim xilanase dari substrat limbah lignoselulolitik yang kaya akan xilan. Xilanase merupakan enzim ekstraseluler yang mempunyai kemampuan menghidrolisis xilan (hemiselulosa) menjadi xilo-oligosakarida dan xilosa yang terkandung pada substrat (Goyal *et al.*, 2008). *T. viride* juga dapat memproduksi xilanase dari substrat kulit kedelai dan kulit kacang hijau yang sebagian besar komponen penyusunnya berupa selulosa, hemiselulosa dan lignin dengan aktivitas enzim pada substrat kulit kedelai sebesar 18,71 U/ml dan substrat kulit kacang hijau sebesar 15,57 U/ml (Windari *et al.*, 2014). *T. viride* juga dapat menghasilkan enzim xiloglukanase saat tumbuh pada media mikrokristal selulase. Xiloglukanase merupakan enzim yang jarang diketahui, namun berperan penting dalam mendegradasi dinding sel tumbuhan yang utamanya tersusun atas hemiselulosa (Tribak *et al.*, 2002).



## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dimulai pada bulan Juli 2014 sampai Maret 2015 di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

### 3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian terdiri dari Spektrofotometer, *Sentrifuge*, Autoklaf, *Shaker*, Oven, Mikropipet, Vortek, Neraca analitik, Penangas air, *Laminar Air Flow* (LAF), *DC motor*, Inkubator, Kertas saring, Mikroskop, *Haemocytometer*, pH meter, *Water bath*, Thermometer.

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah Bungkil Biji Jarak Pagar (BBJP) dari PT Semen Gresik, Isolat biakan *T. viride* B10 MCC-00136 dari Balai Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT), media *Potato Dextrose Agar* (PDA), NaCl 1 %, Natrium azide, Reagen *Somogyi* dan *Nelson*, Akuades, Buffer asetat, Buffer fosfat, Etanol, Alkohol 70 %, Alkohol 97%, dan NaOH.

### 3.3 Prosedur Penelitian

#### 3.3.1 Persiapan Bahan-Bahan Penelitian

##### a. Persiapan Sampel BBJP dan Biakan *T. viride*

Persiapan sampel dilakukan dengan menumbuk BBJP sampai halus dan diayak sehingga diperoleh bubuk BBJP. Biakan kapang yang digunakan pada penelitian ini adalah *T. viride* B10 MCC-00136 yang diperoleh dari Badan Pengkajian Penerapan Teknologi (BPPT) Tangerang Selatan. Subkultur *T. viride* dibuat dengan menginokulasi satu jarum ose biakan ke dalam media PDA miring dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 3 hari.



#### b. Pembuatan Substrat Alkali Ekstrak BBJP

Sebanyak 20% bubuk BBJP disuspensikan dan dihidrolisis secara kimiawi dalam 1000 ml NaOH 1 M selama 24 jam. NaOH berfungsi untuk memotong rantai polisakarida BBJP sehingga lebih sederhana dan dapat larut. Setelah 24 jam, dilakukan penetralan pH menggunakan asam asetat sampai mendapatkan pH 7. Hasil hidrolisis tersebut difiltrasi menggunakan kertas saring dan diperoleh filtrat kemudian disentrifugasi 8000 rpm selama 10 menit. Proses selanjutnya, dilakukan pengendapan polisakarida dalam alkohol 97% dengan perbandingan filtrat dan alkohol 6 : 4. Campuran tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 10 menit dan akan menghasilkan endapan polisakarida, kemudian endapan diresuspensi dengan etanol agar terbebas dari sisa gula, lalu dikeringkan pada suhu 50° C selama ± 3 hari dan digerus sehingga didapatkan substrat alkali ekstrak BBJP.

#### c. Pembuatan Substrat BBJP Jenuh Air

Substrat BBJP jenuh air merupakan media yang digunakan untuk produksi enzim ekstraseluler *T. viride*. Pembuatan substrat jenuh air diawali dengan penentuan kadar air yang terkandung pada sampel BBJP, yaitu dengan mengukur berat basah dan berat kering pada 10 gr substrat BBJP. Selanjutnya 10 gr substrat BBJP dijenuhkan menggunakan akuades sebanyak kadar air yang diketahui, kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf. Sehingga diperoleh media produksi enzim dengan kondisi jenuh air.

#### d. Pembuatan Kurva Kalibrasi Glukosa

Pembuatan kalibrasi kurva glukosa menggunakan analisa gula reduksi metode *Somogyi-Nelson*. Stok glukosa dengan konsentrasi 100 µg/ml dibuat seri pengenceran sehingga didapatkan konsentrasi glukosa 5 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml, 20 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, dan 75 µg/ml. Pada masing-masing konsentrasi glukosa ditambahkan 0,5 ml reagen *Somogyi* dan dipanaskan dalam air mendidih selama 15 menit. Setelah dingin, ditambahkan reagen *Nelson* sebanyak 0,5 ml dan

akuades 2,5 ml. Kadar gula reduksi diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 500 nm. Berdasarkan nilai absorbansi yang diperoleh dibuat kurva regresi linear yang menunjukkan hubungan antara konsentrasi dengan nilai absorbansi larutan sampel.

### 3.3.2 Produksi Enzim Ekstrak Kasar (*Crude Enzim*) *T. viride*

#### a. Peremajaan Biakan *T. viride*

Biakan *T. viride* B10 MCC-00136 diinokulasikan ke dalam media agar miring yang mengandung substrat alkali ekstrak BBJP 1 %, kemudian diinkubasi selama 72 jam pada suhu 30°C sebagai kultur sumber inokulum.

#### b. Penentuan Kepadatan Spora

Perhitungan kepadatan spora *T. viride* bertujuan untuk mengetahui waktu inkubasi terbaik dalam memperoleh spora optimum. Kerapatan spora yang baik dan banyak digunakan sebagai sumber inokulum untuk genus *Trichoderma* adalah  $10^6$ - $10^8$  spora/ml (Gautam *et al.*, 2010). Sebanyak 8 tabung biakan *T. viride* dalam media agar miring yang mengandung alkali ekstrak BBJP 1 % diinkubasi selama 7 hari pada suhu 30°C. Setiap 24 jam dalam kurun waktu 7 hari dilakukan perhitungan jumlah spora dengan cara menambahkan 1 ml aquades pada tabung biakan kemudian dikerik secara merata. Selanjutnya suspensi biakan dituang dalam 9 ml aquades dan dihitung jumlah spora menggunakan *Haemocytometer*.

#### c. Optimasi Produksi Enzim Ekstrak Kasar Berdasarkan Waktu Inkubasi

Optimasi produksi enzim ekstrak kasar bertujuan untuk mengetahui waktu inkubasi terbaik *T. viride* mampu memproduksi enzim ekstrak kasar secara optimum. Produksi enzim menggunakan metode *Solid-State Fermentation* (SSF), yaitu metode produksi enzim dengan cara menumbuhkan mikroorganisme pada media padat dengan kadar air rendah (Manpreet *et al.*, 2005). Produksi enzim diawali dengan pembuatan prekultur *T. viride* dalam media agar yang mengandung BBJP 1% dengan

waktu inkubasi sesuai hasil penentuan jumlah spora optimum. Sebanyak 1 ml suspensi biakan *T. viride* dalam media agar BBJP 1% diinokulasikan secara aseptis pada 10 gr media BBJP jenuh air, inkubasi selama 7 hari pada suhu 30°C, dilanjutkan dengan preparasi dan ekstraksi enzim setiap 24 jam pada hari ke-1 sampai hari ke-7. Preparasi dilakukan dengan menambahkan 20 ml larutan NaCl 1% dan Natrium azide 0,01 % yang bertujuan untuk membantu ekstraksi enzim dan menjaga enzim dari kontaminasi mikroorganisme. Kemudian dishaker selama 12 jam, dilanjutkan dengan filtrasi dan sentrifugasi 8000 rpm selama 10 menit dan enzim disimpan pada suhu 4°C. Sehingga diperoleh enzim ekstrak kasar *T. viride* hasil produksi hari ke-1 sampai hari ke-7. Selanjutnya dilakukan uji aktivitas enzim secara serempak menggunakan metode *Somogyi-Nelson*.

Dilanjutkan dengan produksi enzim ekstrak kasar skala besar berdasarkan waktu produksi optimum. Metode produksi yang digunakan sama dengan metode optimasi produksi enzim, menggunakan substrat BBJP sebanyak 50 g dengan dua kali pengulangan sehingga dihasilkan enzim ekstrak kasar lebih banyak dan disimpan pada lemari pendingin (4°C).

#### d. Uji Aktivitas Enzim Ekstrak Kasar

Uji aktivitas enzim ekstrak kasar dilakukan dengan mengukur gula reduksi yang dihasilkan menggunakan *Somogyi-Nelson*. Sebanyak 500 µl substrat BBJP 0,5% dalam buffer pH 7 50 mM diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit. Kemudian ditambahkan ekstrak enzim kasar sebanyak 50 µl dan diinkubasi pada 37°C selama 2 jam. Pada perlakuan kontrol penambahan enzim dilakukan setelah penambahan reagen *Somogyi*. Setelah inkubasi 2 jam ditambahkan 500 µl reagen *Somogyi* dan digojog hingga homogen, kemudian dididihkan selama 15 menit. Kemudian ditambahkan 500 µl reagen *Nelson* dan 2,5 ml akuades. Kadar gula reduksi diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 500 nm. Pengukuran dibuat dengan dua kali pengulangan dan hasil uji aktivitas dibandingkan dengan kurva kalibrasi glukosa yang telah dibuat sebelumnya.

### 3.3.3 Analisis Kondisi Optimum Degradasi BBJP oleh Enzim Ekstraseluler *T. viride*

#### a. Penentuan Stabilitas dan Optimum Aktivitas Enzim Terhadap pH

Penentuan stabilitas pH bertujuan untuk mengetahui rentang pH stabil bagi enzim *T. viride* dalam mendegradasi BBJP. Uji stabilitas aktivitas enzim terhadap pH, dilakukan dengan mengkondisikan *crude* enzim pada larutan buffer dengan rentang pH tertentu, yaitu buffer asetat untuk rentang pH 3, 3,5, 4, 4,5, 5 dan 5,5 dan buffer fosfat untuk rentang pH 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, dan 8. Sedangkan untuk perlakuan kontrol *crude* enzim dikondisikan pada akuades. Sebanyak 500 µl *crude enzim* dalam 500 µl buffer variasi pH dikondisikan pada suhu 37°C selama 4 jam. Kemudian dilanjutkan dengan mereaksikan 100 µl enzim tersebut dengan 500 µl substrat BBJP 0,5% dalam buffer pH 5. 60 mM pada suhu 37°C selama 2 jam dan diuji aktivitas enzim berdasarkan gula reduksi yang terbentuk menggunakan metode *Somogyi Nelson* untuk mengetahui rentang pH dengan aktivitas enzim yang stabil.

Penentuan pH optimum bertujuan untuk mengetahui aktivitas enzim tertinggi pada rentang pH tertentu. Penentuan pH optimum dilakukan dengan cara mereaksikan 100 µl *crude enzim* dalam buffer pH stabil dengan 500 µl substrat BBJP 0,5% dalam buffer pH 5. 60 mM pada suhu 37°C selama 2 jam, kemudian diuji aktivitas enzim berdasarkan gula reduksi yang terbentuk menggunakan metode *Somogyi Nelson*. Sehingga diketahui pH dengan aktivitas enzim tertinggi.

#### b. Penentuan Stabilitas dan Optimum Aktivitas Enzim Terhadap Suhu

Penentuan stabilitas suhu dilakukan untuk mengetahui aktivitas enzim stabil pada rentang suhu tertentu. Uji stabilitas aktivitas enzim terhadap suhu, dilakukan dengan mengkondisikan 500 µl *crude enzim* dan 500 µl buffer pH optimum pada variasi suhu 30°C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, dan 65 °C selama 4 jam, untuk perlakuan kontrol atau pembanding tanpa pengkondisian selama 4 jam. Kemudian sebanyak 100 µl *crude enzim* dalam buffer direaksikan dengan 500 µl substrat BBJP 0,5% pada suhu 37 °C selama 2 jam, dilanjutkan dengan uji aktivitas

dengan mengukur gula reduksi yang terbentuk menggunakan metode *Somogyi Nelson*. Sehingga diketahui presentase aktivitas enzim pada rentang suhu yang stabil dalam mendegradasi BBJP berdasarkan gula reduksi yang terbentuk.

Penentuan suhu optimum bertujuan untuk mengetahui aktivitas tertinggi enzim ekstraseluler *T. viride* dalam mendegradasi BBJP. Penentuan suhu optimum dilakukan menggunakan 100 µl *crude enzim* dalam buffer pH optimum direaksikan dengan 500 µl substrat BBJP 0,5% dalam buffer pH optimum 60 mM pada variasi suhu stabil selama 2 jam. Kemudian diuji aktivitas enzim berdasarkan gula reduksi yang terbentuk menggunakan metode *Somogyi Nelson*. Sehingga diperoleh suhu dengan aktivitas enzim ekstraseluler *T. viride* tertinggi dalam mendegradasi BBJP.

c. Degradasi BBJP oleh Enzim Ekstraseluler *T. viride*

Analisis kemampuan degradasi BBJP secara maksimal oleh enzim ekstraseluler *T. viride* dilakukan dengan menganalisis waktu optimum aktivitas enzim berdasarkan gula reduksi yang terbentuk. Bubuk BBJP 5% dalam *crude enzim T. viride* ditambahkan dengan 300 µl Natrium azide 0,1% kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 12 jam. Selanjutnya dilakukan sampling pada jam ke 0, 1, 2, 3, 6, dan 12 dengan cara mengambil sebanyak 500 µl substrat dalam enzim lalu dididihkan selama 15 menit dan disentrifus 4000 rpm selama 5 menit. Dilanjutkan dengan uji aktivitas enzim secara serempak dengan mengukur gula reduksi yang terbentuk menggunakan *Somogyi Nelson*, kemudian ditentukan kemampuan degradasi yang menunjukkan persen aktivitas degradasi BBJP oleh enzim ekstraseluler *T. viride* dengan rumus :

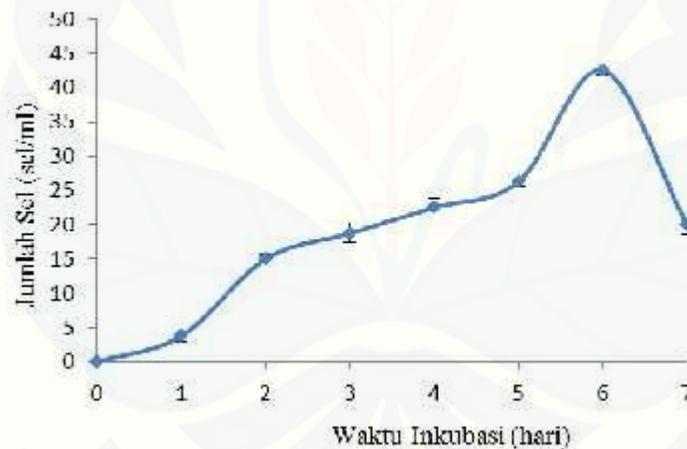
$$\text{Kemampuan degradasi : } \frac{\text{Total gula reduksi hasil hidrolisis } (\mu\text{g/ml})}{\text{Total substrat yang digunakan (BBJP 5\%)}} \times 100\%$$



## BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Kepadatan Spora *T. viride*

Kepadatan spora yang dihitung setiap interval waktu tertentu menunjukkan fase-fase pertumbuhan mikroorganismenya sehingga dapat diketahui fase logaritmiknya. Fase logaritmik merupakan fase eksponensial dimana pertumbuhan mikroorganismenya mencapai puncak optimum (Kumhar, 2014). Penentuan fase logaritmik pertumbuhan *T. viride* pada media agar miring yang mengandung BBJP 1% bertujuan untuk mengetahui waktu pertumbuhan optimum *T. viride* pada media BBJP. Pada penelitian ini, penentuan kepadatan spora dilakukan dengan menghitung kepadatan spora dengan *Haemocytometer*.



Gambar 4.1 Kepadatan spora *T. viride* pada media BBJP

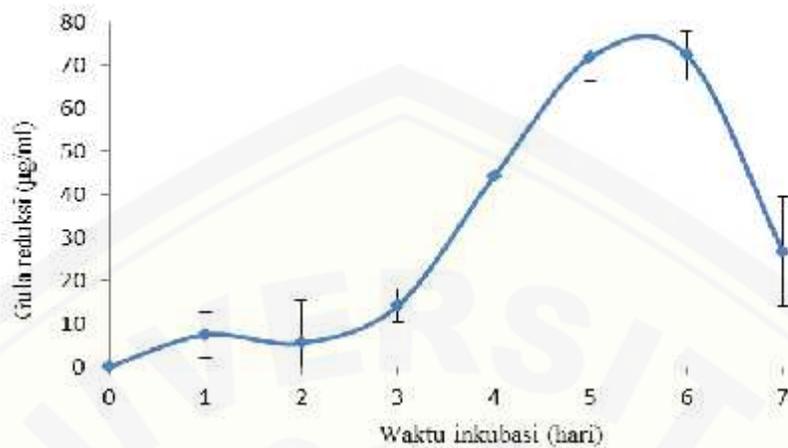
Hasil penentuan kepadatan spora *T. viride* dalam media agar yang mengandung BBJP 1% diperoleh pola pertumbuhan *T. viride* selama masa inkubasi 7 hari. Dari Gambar 4.1 diketahui pertumbuhan *T. viride* mengalami peningkatan



seiring bertambahnya waktu inkubasi. Jumlah spora /ml berturut-turut adalah  $1 \times 10^6$ ,  $3,8 \times 10^6$ ,  $1,5 \times 10^7$ ,  $1,9 \times 10^7$ ,  $2,3 \times 10^7$ ,  $2,6 \times 10^7$ ,  $4,2 \times 10^7$ , dan  $2 \times 10^7$ . Menurut Gautam *et al.* (2010), kepadatan spora *T. viride* yang baik digunakan sebagai sumber inokulum adalah  $10^6$ - $10^8$ . Pada waktu inkubasi 6 hari *T. viride* menunjukkan pertumbuhan optimum, yaitu  $4,2 \times 10^7$  yang selanjutnya digunakan sebagai sumber inokulum untuk proses produksi enzim. Meningkatnya pertumbuhan *T. viride* pada media BBJP ditunjukkan dengan meningkatnya jumlah sel/ml yang dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain kandungan nutrisi, kondisi pH, suhu dan kelembaban udara pada medium. Pada akhir fase logaritmik jumlah spora mengalami penurunan, hal ini dapat disebabkan karena spora telah tumbuh menjadi miselium sehingga tidak dapat terbaca oleh *Haemocytometer*, selain itu berkurangnya nutrisi dalam media dan adanya akumulasi hasil metabolisme dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme (Kumhar, 2014).

#### 4.2 Optimasi Produksi Enzim Ekstraseluler *T. viride*

Enzim ekstraseluler diproduksi menggunakan metode *Solid-State Fermentation* (SSF) pada substrat BBJP jenuh air dengan kadar air sebesar 71 %. Menurut Raimbault (1998) pertumbuhan fungi secara optimum dalam media SSF membutuhkan kelembaban berkisar antara 40-80%. Produksi enzim ekstrak kasar diawali dengan optimasi produksi enzim berdasarkan waktu inkubasi bertujuan untuk mengetahui aktivitas enzim tertinggi pada waktu inkubasi hari ke 1-7. Aktivitas enzim diukur berdasarkan pembentukan gula reduksi menggunakan metode *Somogyi Nelson*. Kadar gula reduksi menunjukkan kemampuan aktivitas enzim mendegradasi substrat, semakin tinggi aktivitas enzim maka semakin tinggi gula reduksi yang dihasilkan. Gula reduksi merupakan gula sederhana yang memiliki gugus aldehid dan keton bebas yang mampu mereduksi senyawa pengoksidasi pada reagen. Berdasarkan komponen penyusun BBJP, diduga gula reduksi yang terbentuk berupa glukosa sebagai hasil degradasi selulosa serta galaktosa dan xilosa sebagai hasil degradasi hemiselulosa (Amira *et al.*, 2012; Goyal *et al.*, 2008).



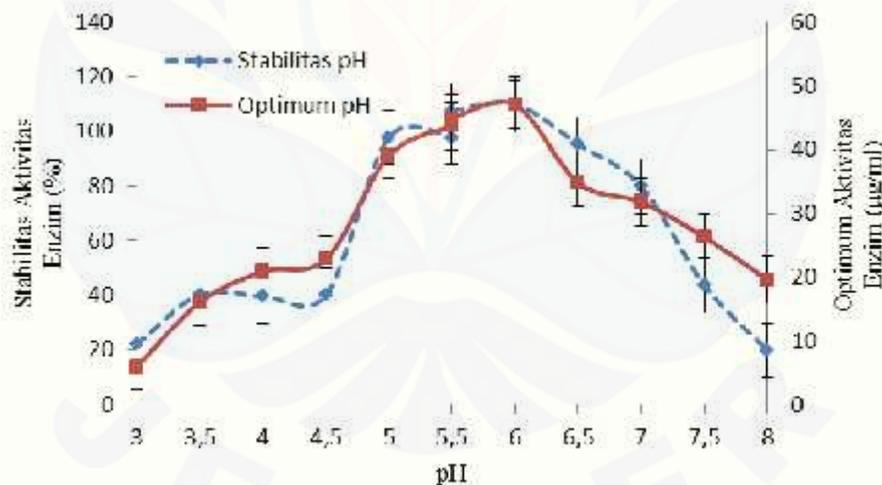
Gambar 4.2 Optimasi produksi enzim oleh *T. viride* pada media BBJP

Berdasarkan Gambar 4.2 menunjukkan bahwa aktivitas enzim mencapai optimum ditandai dengan kadar gula reduksi tertinggi pada hari ke 6, yaitu 72,3 µg/ml dan mengalami penurunan aktivitas setelahnya. Penurunan aktivitas enzim terkait dengan berkurangnya nutrisi atau akumulasi produk yang dihasilkan mikroorganisme dalam media (Ikram *et al.*, 2005). Komponen BBJP yang lebih mudah untuk dicerna akan dimanfaatkan terlebih dahulu oleh fungi sehingga pertumbuhan meningkat dan biosintesis enzim dapat terjadi secara pesat. Enzim ekstraseluler yang disekresi oleh fungi berfungsi untuk menghidrolisis substrat menjadi molekul lebih sederhana sehingga mudah untuk dicerna (Ul-Haq *et al.*, 2005). Bertambahnya waktu fermentasi meningkatkan jumlah produk akhir dan menghambat kerja enzim dalam mendegradasi BBJP, ditunjukkan dengan penurunan jumlah gula reduksi yang dihasilkan. Sebagian besar kelompok jamur berfilamen seperti *Trichoderma* banyak dimanfaatkan dalam proses SSF karena kemampuannya menyebar dan menembus media, serta kemampuan miselia mensintesis enzim ekstraseluler dalam jumlah besar (Manpreet *et al.*, 2005). Berdasarkan hal tersebut dilakukan produksi enzim ekstraseluler oleh *T. viride* pada substrat BBJP dengan periode fermentasi 6 hari, yang akan digunakan untuk uji selanjutnya.

### 4.3 Analisis Kondisi Optimum Degradasi BBJP oleh Enzim Ekstraseluler *T. viride*

#### 4.3.1 Stabilitas dan Optimum Aktivitas Enzim Terhadap pH

Enzim adalah protein yang khusus disintesis oleh sel hidup untuk mengkatalisis reaksi yang berlangsung di dalamnya. Aktivitas enzim sangat dipengaruhi oleh kondisi lingkungan seperti perubahan pH. Setiap enzim memiliki rentang pH yang berbeda untuk mencapai aktivitas stabil dan optimum (Wilbraham dan Matta, 1992). Stabilitas pH dapat diketahui dengan perlakuan enzim pada pH tertentu selama waktu percobaan, selanjutnya dicari nilai pH di mana aktivitas enzim dalam keadaan stabil dengan cara mengukur aktivitasnya. Sedangkan pH optimum merupakan nilai pH dengan aktivitas enzim tertinggi (Bintang, 2010). Kondisi pH yang optimum akan membantu enzim mengkatalisis suatu reaksi dengan baik. Sebaliknya, kondisi pH yang tidak sesuai dapat merusak protein enzim dan menghambat aktivitas enzim (Sivaraman, 2013).



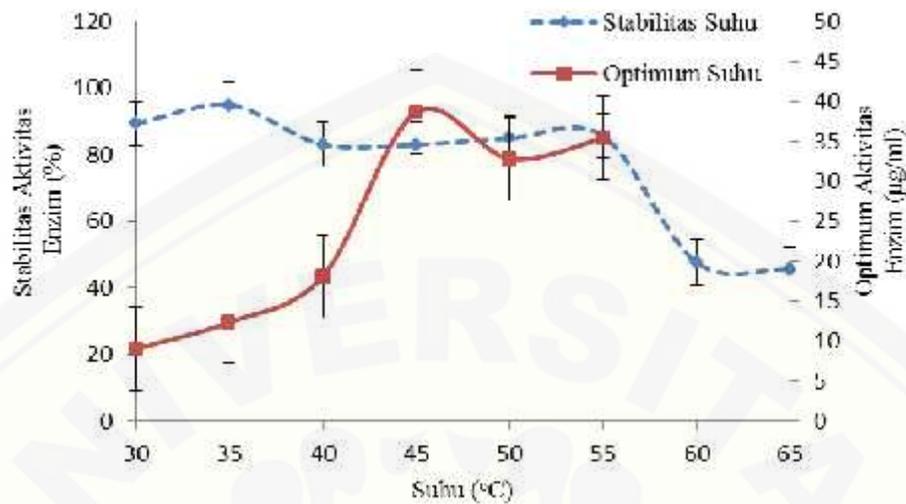
Gambar 4.3 Stabilitas dan optimum aktivitas enzim *T. viride* terhadap pH

Berdasarkan Gambar 4.3 diketahui aktivitas enzim *T. viride* pada substrat BBJP menunjukkan persen aktivitas enzim stabil pada rentang pH 5-7 mencapai 100% dari total potensial komponen BBJP, dengan kadar gula reduksi pH 5 (29,9

$\mu\text{g/ml}$ ); pH 5,5 (29,9  $\mu\text{g/ml}$  dan 32,9  $\mu\text{g/ml}$ ); pH 6 (37,7 $\mu\text{g/ml}$ ); pH 6,5 (29,1  $\mu\text{g/ml}$ ); pH 7 (24,4) sedangkan pada pH 7,5-8 aktivitas enzim menunjukkan penurunan yang disebabkan oleh penurunan sifat katalitik. Enzim adalah protein yang tersusun atas asam amino dimana pengaruh pH berhubungan erat dengan sifat asam basa protein. Kondisi pH yang tidak sesuai dapat menyebabkan perubahan sisi aktif enzim sehingga enzim mengalami perubahan dan aktivitasnya dapat berkurang atau bahkan menjadi tidak aktif (Wilbraham dan Matta, 1992). Berdasarkan uji aktivitas enzim lebih lanjut, didapatkan nilai pH dengan aktivitas enzim tertinggi yang disebut pH optimum. Diketahui pH optimum untuk enzim mendegradasi BBJP adalah pH 6 dengan kadar gula reduksi yang terbentuk sebesar 37,7  $\mu\text{g/ml}$ . Kondisi pH yang sesuai dapat menjaga konformasi enzim dalam bentuk stabil, sehingga memungkinkan enzim untuk berikatan dengan substrat membentuk kompleks enzim substrat dan menghasilkan produk secara maksimal. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa pH merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim. Setiap perubahan pH mempengaruhi struktur enzim dan penurunan aktivitas enzim diluar pH optimum dapat disebabkan oleh ketidakstabilan enzim dan penurunan daya kerja enzim (Luis *et al.*, 2012).

#### **4.3.2 Stabilitas dan Optimum Aktivitas Enzim Terhadap Suhu**

Enzim merupakan protein yang aktivitasnya sangat dipengaruhi oleh faktor lingkungan. Salah satu faktor lingkungan yang mempengaruhi kerja enzim adalah suhu. Reaksi katalis enzim meningkat dengan meningkatnya suhu, kecepatan reaksi enzim meningkat dua kali lebih cepat pada kenaikan suhu 10°C (Bintang, 2010). Namun peningkatan suhu yang cukup besar akan meningkatkan proses denaturasi enzim, dan mengakibatkan daya kerja enzim menurun (Luis *et al.*, 2012) Menurut Sivaramanan (2013) enzim yang dihasilkan oleh *Trichoderma* sp. menunjukkan peningkatan reaksi sampai suhu 50°C dan diikuti dengan penurunan sesudahnya. Sebagian besar enzim mengalami denaturasi pada suhu lebih dari 70°C (Bintang, 2010).

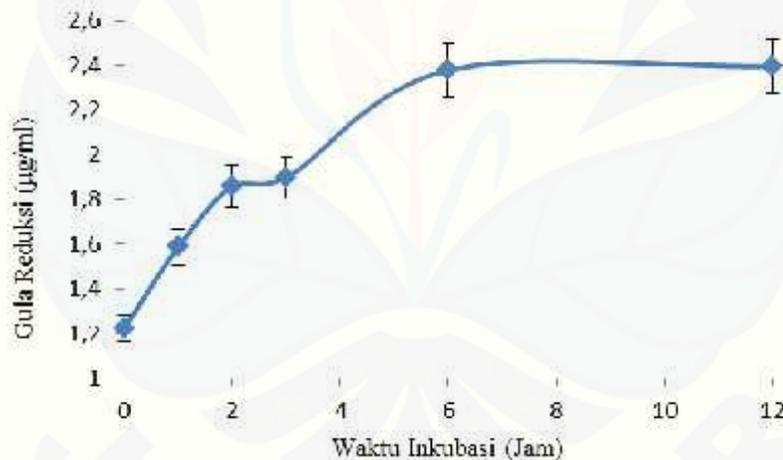


Gambar 4.4 Stabilitas dan optimum aktivitas enzim *T. viride* terhadap suhu

Berdasarkan Gambar 4.2 diketahui bahwa aktivitas enzim *T. viride* stabil pada rentang suhu 30°C sampai 55°C dengan persen aktivitas enzim berkisar antara 83-95% dari total potensial komponen BBJP, menghasilkan gula reduksi pada suhu 30°C sebesar 20,65 µg/ml; suhu 35°C (21,96 µg/ml); suhu 40°C (19,2 µg/ml); suhu 45°C (19,2 µg/ml); suhu 50°C (19,64 µg/ml); suhu 55°C (19,78 µg/ml). Sedangkan pada suhu 60°C-65 °C aktivitas enzim mengalami penurunan yang disebabkan inaktivasi atau penurunan daya kerja enzim. Berdasarkan pengukuran aktivitas enzim dengan menghitung banyaknya substrat yang diubah dalam variasi suhu stabil, maka didapatkan suhu optimum. Suhu optimum merupakan suhu pada saat laju reaksi enzim paling tinggi mengubah substrat menjadi produk. Diketahui suhu optimum aktivitas enzim adalah suhu 45°C (38,7 µg/ml) dan menunjukkan penurunan aktivitas setelahnya. Penurunan aktivitas enzim ini terjadi karena enzim sebagai protein dapat mengalami perubahan sisi aktif bahkan dapat denaturasi pada suhu tinggi, dan kehilangan fungsi katalitik enzim (Luis *et al.*, 2012).

### 4.3.3 Degradasi BBJP oleh Enzim Ekstraseluler *T. viride*

Degradasi BBJP bertujuan untuk mengubah komponen bungkil biji jarak pagar menjadi bentuk yang lebih sederhana dengan bantuan enzim ekstraseluler *T. viride*. Beberapa penelitian terdahulu menemukan bahwa *T. viride* berpotensi memproduksi beberapa jenis enzim ekstraseluler yang aktif mendegradasi substrat. Enzim mempengaruhi laju suatu reaksi, kecepatan reaksi tersebut dapat diukur berdasarkan berkurangnya substrat atau penumpukan hasil reaksi (produk). Perubahan substrat menjadi produk oleh enzim tergantung pada konsentrasi enzim maupun substrat, kondisi pH dan suhu (Bintang, 2010). Pada penelitian ini dilakukan analisis kemampuan degradasi BBJP 5% oleh enzim *T. viride* pada waktu tertentu. Kemampuan *T. viride* dalam mendegradasi BBJP diukur berdasarkan gula reduksi yang terbentuk pada waktu inkubasi selama 12 jam, menggunakan metode *Somogyi-Nelson*.



Gambar 4.5 Degradasi BBJP oleh enzim ekstraseluler *T. viride*

Berdasarkan Gambar 4.5 diketahui bahwa degradasi substrat BBJP oleh enzim ekstraseluler *T. viride* meningkat dengan bertambahnya waktu inkubasi, ditandai dengan meningkatnya gula reduksi yang dihasilkan. Gula reduksi tersebut diduga merupakan hasil degradasi komponen selulosa dan hemiselulosa yang terkandung pada BBJP. Peningkatan kadar gula reduksi selama waktu inkubasi

menunjukkan bahwa enzim ekstraseluler *T. viride* mampu mendegradasi komponen polisakarida BBJP hingga waktu inkubasi 12 jam, dengan persen aktivitas mencapai 2,4% dari total komponen BBJP dan gula reduksi yang terbentuk sebesar 1197,8 µg/ml. Hasil ini lebih rendah dibandingkan dengan hasil penelitian Sugiyono *et al.* (2012), yang menyatakan bahwa kemampuan *T. viride* menghidrolisis limbah industri agar sebanyak 12,5% dapat mencapai 5,4 % dengan gula reduksi sebesar 6,47 mg/ml. Perbedaan hasil tersebut dikarenakan perbedaan konsentrasi substrat dan waktu hidrolisis yang digunakan serta perbedaan jumlah komponen polisakarida yang terkandung pada substrat. Aktivitas enzim juga dipengaruhi oleh konsentrasi substrat dan enzim, peningkatan konsentrasi substrat dan enzim dapat meningkatkan laju aktivitas enzim (Wilbraham dan Matta, 1992). Alleorerung (2010) menyatakan bahwa degradasi bahan organik juga dipengaruhi oleh kadar C/N ratio. C/N ratio merupakan perbandingan antara unsur karbon dan nitrogen dari suatu bahan organik. Menurut Chandra *et al.* (2010) C/N ratio pada BBJP berkisar 12,7%. Keseimbangan antara karbon dan nitrogen akan memicu pertumbuhan mikroorganisme secara optimal dan meningkatkan degradasi bahan organik (Kadir *et al.*, 2013).



## BAB 5. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Hasil penentuan kepadatan spora *T. viride* dalam media agar miring yang mengandung substrat BBJP 1% menunjukkan jumlah spora optimum, yaitu  $4,25 \cdot 10^7$  sel/ml dengan waktu inkubasi 6 hari. Optimasi produksi enzim menunjukkan waktu inkubasi terbaik untuk produksi enzim oleh *T. viride* pada media BBJP adalah 6 hari dengan aktivitas enzim sebesar 72,3  $\mu\text{g/ml}$ . Aktivitas enzim diketahui stabil pada rentang pH 5 sampai pH 7 dan optimum pada pH 6 (37,7  $\mu\text{g/ml}$ ). Sedangkan pada variasi suhu, aktivitas enzim stabil pada rentang suhu 30°C sampai 55°C dan optimum pada suhu 45°C (38,7  $\mu\text{g/ml}$ ). Degradasi BBJP oleh enzim ekstraseluler *T. viride* menunjukkan peningkatan aktivitas hingga waktu inkubasi 12 jam, dengan persen aktivitas degradasi sebesar 2,4% dari total potensial komponen BBJP dan menghasilkan gula reduksi sebesar 1197,8  $\mu\text{g/ml}$ .

### 5.2 Saran

Pada proses produksi enzim ekstrak kasar sebaiknya menggunakan substrat BBJP kasar atau tidak ditumbuk halus, untuk memudahkan proses filtrasi selama panen enzim dan mendapatkan *crude* enzim yang lebih baik.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Alleorerung, D. 2010. Formulasi Biodekomposer yang Efektif Mempercepat Dekomposisi Limbah Jarak Pagar (< 3 Minggu) Dengan Kapasitas 50 Kg/Hari. *Program Intensif Riset Terapan*.
- Amira Dayana, Roshanida, A.R., dan Rosli, M.I. 2012. Effects of Xylanase and Cellulase Production during Composting of EFB and POME using Fungi. *World Academy of Science, Engineering and Technology* Vol. 6.
- Anbu, P., Subash, C. B., dan Gopinath. 2013. Microbial Enzymes and Their Application in Industries and Medicine. *BioMed Research International*, Vol. 2013 :2-4.
- Arafadi, F., Wardhana, S., dan Titin, W. 2013. Pengujian Bahan Pakan Bungkil Biji Jarak Fermentasi Secara *In Vitro* Ditinjau Dari Kecernaan Protein Kasar Dan Serat Kasar. *Jurnal Ilmiah Peternakan* 1(2): 437- 445.
- Arnata, I W. 2009. Teknologi Bioproses Pembuatan Bioetanol dari Ubi Kayu Menggunakan *Trichoderma viride*, *Aspergillus niger* dan *Saccharomyces cerevisiae*. *Thesis Master*. Bogor: IPB
- Azocar, L., Gustavo Ciudad., Hermann J., Heipieper dan Rodrigo Navia. 2011. Biotechnological Processes For Biodiesel Production Using Alternative Oils. *Appl Microbiol Biotechnol* 88: 621–636.
- Bennet, W., Wunch, K., dan Fasion, D. 2002. *Use of Fungi Biodegradation*. Washington D.C: ASM Press
- Bintang, M. 2010. *Biokimia Teknik Penelitian*. Jakarta: Erlangga
- Chandel, A.K., Chan., Rao, dan Ravindra. 2007. Economics and Environmental impact of Bioetanol Production Technologies : An Appraisal. *Biotechnology and Molecular Biology Review*. 2 (1): 14-32.
- Chandra, R., Vijay, V., Dan Subbarao, P. 2006. A Study On Biogas Generation From Non-Edible Oil Seed Cakes : Potential And Prospects In India 2 . Prospects Of Non-Edible Oil Seeds Utilization. *Joint International Conference on Sustainable Energy and Environment*.



- Cheng, J. J., & Timilsina, G. R. (2011). Status And Barriers Of Advanced Biofuel Technologies: a Review. *Renewable Energy*, 36. 3541-3549.
- Druzhinina, I. R., Kopchinskiy, A. G. 2006. The First 100 *Trichoderma* Species Characterized By Molecular Data. *Mycoscience* 47:55-64.
- Gautam, S. P. *et al.*, 2010. Optimazation Of The Medium For The Production Of Cellulose By The *Trichoderma viride* Using Submerged Fermentation. *International Journal of Environmental Sciences*. 1 (4): 0976 – 4402.
- Gianfreda, L., dan Rao. 2004. Potential of Extra Cellular Enzymes in Remediation of Polluted Soils a Review. *Enzyme microb Tech*, 35: 339-354.
- Goyal, Meenakshi., K.L. Kalra., V.K. Sareen., G. Soni. 2008. Xylanase Production With Xylan Rich Lignocellulosic Wastes By A Local Soil Isolate Of *Trichoderma viride*. *Braz Journal Microbiol*, 39 (3).
- Gubitz, G.M., M.Mittelbach and M.Trabi. 1999. Exploitation Of The Tropical Seed Plant *Jatropha curcas* L. *Bioresource Technology*. 67.
- Hariadi. 2005. Budidaya Tanaman Jarak (*Jatropha curcas*) Sebagai Sumber Bahan Alternatif Biofuel. *Pros. Seminar Fokus Grup Diskusi (FGD) Tema Prospektif Sumberdaya Lokal Bioenergi Pada Deputi Bidang Pengembangan Sisteknas*.
- Ikram-ul-Haq, S., Muhammad, M. J., Zafar, S.and Tehmina, S. 2005. Triggering of - Glucosidase Production in *Trichoderma viride* with Nutritional and Environmental Control. *Journal of Applied Sciences Research*, 2: 884-889.
- Kadir, J., Hailmi, M.S., Rahim, A., dan Nazihah, M.D. 2013. Effect of Carbon and Nitrogen Sources and Carbon to Nitrogen on Production of *Exserobillum longirostratum*. *Journal Agrobiotech*, 4: 56-66.
- Kamara, D. S., Saadah Diana dan Shabarni, G. 2007. Degradasi Enzimatik Selulosa Dari Batang Pohon Pisang Untuk Produksi Glukosa Dengan Bantuan Aktivitas Selulolitik *Trichoderma viride*. *Laporan Penelitian Dasar (LITSAR): Lembaga Penelitian Universitas Padjadjaran*
- Kandari, V., Irshita, V., Deepak, K., dan Sanjay, G. 2013. Cellulase and - Glucosidase Production by *Trichoderma viride* and *Aspergillus wentii* in Sub-Merged Fermentation Utilizing pretreated Lignocellulosic Biomass. *Journal MicroBiotech Research*, 3 (5): 63-78.

- Kumhar, K. C., Azariah, B., Mitali, B., dan Ashif, A. 2014. Evaluation of Culture Media For Biomass Production of *Trichoderma viride* (KBN 24) and Their Production Economics. *American Journal of Agriculture and Forestry*, 2 (6): 317-320.
- Lieckfeldt, Samuels, Nirenberg, dan Petrini. 1999. A Morphological and Molecular Perspective of *Trichoderma viride*. *Applied And Environmental Microbiology*, 65 (6): 2418–2428.
- Luis, C.A., Silva., Talita, L., Honorato., Rosane, S., Telma, T. 2012. Effect of pH and Temperature on Enzyme Activity of Chitosanase Produced Under Solid Stated Fermentation by *Trichoderma* spp. *Indian Journal Microbiol*, 52(1):60–65.
- Makkar, H.P.S, Aderibigbe, A. dan Becker, K. 1998. Comparative Evaluation of Non-Toxic and Toxic Varieties of *Jatropha Curcas* for Chemical Composition, Digestibility, Protein Degradability and Toxic Factors. *Food Chem*, 62: 207-215.
- Makkar, H.P.S., and Becker, K. 1999. Plant Toxins and Detoxification Methods to Improve Feed Quality of Tropical Seed. *Asian-Australian Journal of Animal Sciences*, 12 : 467 - 480.
- Manpreet, S., Sawraj, S., Pankaj, S., Banerje dan Sachin, D. 2005. Influence of Process Parameter on the Production of Metabolites in Solid-State Fermentation. *Malaysian Journal of Microbiology*. 1 (2).
- Mojsov Kiro. 2010. Application of Solid-State Fermentation for Cellulase Enzyme Production Using *Trichoderma viride*. *Perspectives of Innovations, Economics & Business*, 5 (2).
- Mukherjee, P., Alok Varshney T., Sudhakar Johnson., dan Timir Baran Jha. 2011. *Jatropha curcas* a Review on Biotechnological Status and Challenges. *Plant Biotechnol Rep*, 5:197–215.
- Raimbault Maurice. 1998. General And Microbiological Aspects of Solid Substrate Fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*, 1(3).
- Rajesh, M. J., Leelavathy, R., dan Lakew, W. A. Optimization of Solid State Fermentation Conditions for the Production of Cellulase by Using *Trichoderma Reesei*. *European Journal of Applied Engineering and Scientific Research*, 1 (4): 196-200.

- Simkovic, M., Anita Kurucova., Martina Hunova., and Ludovit Varecka. 2008. Induction Of Secretion Of Extracellular Proteases From *Trichoderma viride*. *Acta Chimica Slovaca*, 1(1): 250 – 264.
- Sivaramanan, S. 2013. Biodeterioration of Cotton by Cellulolytic Fungi. *International Journal of Science and Research (IJSR)*, 2.
- Sriharti dan Salim, T. 2011. Pengaruh Komposisi Bahan Terhadap Karakterisasi Briket Limbah Biji Jarak Pagar (*Jatropha Curcas* Linn). *Jurnal Teknologi Indonesia*, 34.
- Staubmann, R., Gabriele Foidl., Nikolaus Foidl., Georg M. Gubitz., Roserr M. Lafferry., Victoria M. Valencia Arbizu., and Walter Steiner. 1997. Biogas Production from *Jatropha curcas* Press-Cake. *Apphed Biochernist and Biotechnology* Vol. 63-65.
- Sugiyono, Sari, R., dan Assadad, L. 2013. Optimasi Waktu Proses Hidrolisis dan Fermentasi Dalam Produksi Bioetanol dari Limbah Pengolahan Agar (*Gracilaria* sp.) Industri. *JPB Perikanan*, 8 (2): 133-142.
- Sutanto, R. 2002. *Penerapan Pertanian organik: Pemasarakatan dan Pengembangannya*. Jogjakarta: Kaninus
- Tribak, M., J.A.Ocampo, I. Garcia-Romera. 2002. Production of Xyloglucanolytic Enzymes By *Trichoderma viride*, *Paecilomyces farinosus*, *Wardomyces inflatus*, and *Pleurotus ostreatus*. *Mycologia*, 3: 404-410.
- Ul-Haq, I., Javed, M. M., Khan, T. S., and Siddiq, Z. 2005. Cotton Saccharifying Activity of Cellulases Produced by Co-culture of *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride*. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 1(3): 241-245.
- Widyastuti, S. M., Sumardi dan Harjono. 1999. Pengendalian Hayati Penyakit Akar Merah pada Akasia dengan *Trichoderma*. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia*, 4(2): 65-72.
- Wilbraham, A. C dan Matta, M. S. *Pengantar Kimia Organik dan Hayati*. Terjemahan Achmadi, S. 1992. ITB
- Windari, S.A., Sutrisno., Dan Anna Roosdiana. 2014. Penentuan Waktu Fermentasi Optimum Produksi Xilanase Dari *Trichoderma viride* Menggunakan Substrat Kulit Kedelai Dan Kulit Kacang Hijau Melalui Fermentasi Semi Padat. *Kimia Student Journal*, 1(1).

Yates, I. E., Meredith, F., Smart, W. 1999. *Trichoderma viride* Suppresses Fumonisin B1 Production by *Fusarium moniliforme*. *Journal of Food Protection*, 62(11): 1326-32.



**Lampiran**

**A. Komposisi Bahan**

**A.1 Komposisi Media PDA**

Komposisi	Jumlah
Kentang	200 gr
Dextrosa	10 gr
Agar	17 gr
Aquades	1000 ml

**A.2 Komposisi Media Agar Alkali Ekstrak BBJP**

Komposisi	Jumlah
Alkali Ekstrak BBJP	10 gr
Agar	17 gr
Aquades	1000 ml

**A.3 Komposisi Media Produksi Enzim**

Komposisi	Jumlah
Bubuk BBJP	550 gr
Aquades	1000 ml

**A.4 Komposisi Media Alkali Ekstrak BBJP**

Komposisi	Jumlah
Alkali Ekstrak BBJP 0,5%	0,5 gr
Aquades	100 ml

**A.5 Komposisi Buffer Phospat 1 M**

Komposisi	Jumlah
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	228 gr



Komposisi	Jumlah
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136 gr
Komposisi	Jumlah
Aquades	1000 ml

#### A. 6 Komposisi Buffer Asetat 1 M

Komposisi	Jumlah
CH <sub>3</sub> COOH	57,18 ml
Aquades	1000 ml

#### A. 7 Komposisi Reagen Somogyi

Komposisi	Jumlah
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	24 gr
C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> KNaO <sub>6</sub> H <sub>2</sub> O ( <i>Potassium Sodium Tartrate Tetrahydrat</i> )	12 gr
NaHCO <sub>3</sub>	16 gr
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O 10 %	40 ml
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	180 gr
Aquades	1000 ml

#### A. 8 Komposisi Reagen Nelson

Komposisi	Jumlah
(NH <sub>4</sub> ) MO <sub>7</sub> O <sub>24</sub> . 4H <sub>2</sub> O	50 gr
<i>Sulfuric acid</i>	46 ml
NaHSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	6 gr
Aquades	1000 ml

**B. Kurva Kalibrasi Glukosa**

