



**DEKOMPOSISI KARBOHIDRAT BUNGKIL BIJI JARAK PAGAR
OLEH ENZIM EKSTRASELULER *Aspergillus niger***

SKRIPSI

Oleh

**Sri Wahyuningsih
NIM 101810401028**

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





**DEKOMPOSISI KARBOHIDRAT BUNGKIL BIJI JARAK PAGAR
OLEH ENZIM EKSTRASELULER *Aspergillus niger***

SKRIPSI

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

Oleh

**Sri Wahyuningsih
NIM 101810401028**

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

PERSEMBAHAN

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

1. Allah Swt, tempatku berlindung dan berserah diri;
2. ayahanda M. Munairi, ibunda Syafiah, mbah lakek dan mbah binik, adek tercinta M. Hendrik beserta keluarga besar atas do'a dan dukungannya;
3. guru – guru dari taman kanak – kanak sampai perguruan tinggi yang telah banyak memberikan ilmu bermanfaat;
4. Almamater tercinta, Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

MOTTO

Adakah sama orang-orang yang mengetahui dengan orang-orang yang tidak mengetahui? Sesungguhnya orang yang berakallah yang dapat menerima pelajaran.
(QS. Az-Zumar [39] : ayat 9)*)

Barang siapa yang menempuh jalan yang padanya ia menuntut ilmu maka Allah menempuhkannya jalan ke surga
(HR. Muslim dari Abu Hurairah)**)

*) Departemen Agama Republik Indonesia. 2008. *Al Quran dan Terjemahannya*. Depok: Penerbit Al-Qur'an Tajwid.

***) <https://www.ibnuabbas.com/2013/kurmamotivation/posts>.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Sri Wahyuningsih

NIM : 101810401028

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Dekomposisi Karbohidrat Bungkil Biji Jarak Pagar Oleh Enzim Ekstraseluler *Aspergillus niger*” 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 adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 19 Mei 2015

Yang menyatakan,

Sri wahyuningsih

NIM 101810401028

SKRIPSI

**DEKOMPOSISI KARBOHIDRAT BUNGKIL BIJI JARAK PAGAR
OLEH ENZIM EKSTRASELULER *Aspergillus niger***

Oleh

Sri Wahyuningsih
NIM 101810401028

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dr. Kahar Muzakhar, S. Si

Dosen Pembimbing Anggota : Drs. Rudju winarsa, M. Kes

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Dekomposisi Karbohidrat Bungkil Biji Jarak Pagar Oleh Enzim Ekstraseluler *Aspergillus niger*” 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,

Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M. Agr. Sc.
NIP 195510221982121001

Drs. Siswanto, M.Si.
NIP 196012161993021001

Mengesahkan
Dekan,

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

RINGKASAN

Dekomposisi Karbohidrat Bungkil Biji Jarak Pagar Oleh Enzim Ekstraseluler *Aspergillus niger*; Sri Wahyuningsih, 101810401028; 2015: 29 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Ekstraksi minyak biji jarak pagar menghasilkan limbah berupa bungkil biji jarak pagar (BBJP). Menurut Nopitasari *et al.*, (2013), setiap pengolahan 4-5 ton biji kering pertahun, 1 ton biji kering menghasilkan 200-300 liter minyak, dengan limbah berupa bungkil biji jarak pagar sebanyak 700-800 kg. Jumlah biomassa dari hasil samping biji jarak pagar ini lebih besar dari pada minyak yang dihasilkan sehingga apabila tidak ditangani akan menimbulkan dampak negatif terhadap lingkungan. Menurut Staubmann, *et al.*, (1997) komponen utama BBJP adalah selulosa 20,3% dan lignin 19,46%. Pemecahan rantai polimer dari limbah lignoselulosa dapat dipercepat dengan bantuan mikroorganisme, *Aspergillus niger* merupakan salah satu mikroorganisme yang berpotensi menghasilkan beberapa enzim ekstraseluler (Wina, 2005). Berdasarkan hal tersebut, maka perlu dilakukan penelitian mengenai kondisi optimal dekomposisi BBJP oleh enzim ekstraseluler *Aspergillus niger* menggunakan metode analisis gula reduksi *Somogy Nelson*.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari (i) persiapan bahan penelitian meliputi sampel dan subkultur, substrat alkali ekstrak, reagen *Somogyi* dan *Nelso*, substrat BBJP jenuh air, kalibrasi kurva glukosa, dilanjutkan (ii) produksi enzim ekstrak kasar meliputi perhitungan kepadatan spora optimum, optimasi produksi enzim ekstrak kasar berdasarkan waktu inkubasi, uji aktivitas enzim ekstrak kasar, produksi enzim ekstraseluler (*large scale*) dan diakhiri dengan (iii) analisis kondisi optimum degradasi BBJP oleh enzim ekstrak kasar *A. niger* yang meliputi

penentuan stabilitas pH dan pH optimum, penentuan stabilitas suhu dan suhu optimum, serta analisis kemampuan dekomposisi BBJP secara maksimal oleh enzim ekstraseluler *A. niger*.

Hasil penelitian menunjukkan kepadatan spora *A. niger* dalam media BBJP 1 % optimum pada hari ke 6 ($9,5 \times 10^6$ sel/ml). Optimasi produksi enzim menunjukkan waktu inkubasi terbaik untuk produksi enzim oleh *A. niger* pada media BBJP adalah 4 hari dengan hasil gula reduksi sebesar 57,87 $\mu\text{g/ml}$. Aktivitas enzim diketahui stabil pada rentang pH 3 - pH 8 dan aktivitas optimum pada pH 5 sebesar 35,056 $\mu\text{g/ml}$. Sedangkan pada variasi suhu, aktivitas enzim stabil pada rentang suhu 35°C - 50°C dan aktivitas optimum pada suhu 40°C sebesar 77,873 $\mu\text{g/ml}$. Proses hidrolisis BBJP oleh *crude enzyme A. niger* menghasilkan gula reduksi sebesar 250,41 $\mu\text{g/ml}$ dicapai setelah 36 jam yang diinkubasi pada suhu 37 °C.

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah Swt. atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi yang berjudul “Dekomposisi Karbohidrat Bungkil Biji Jarak Pagar Oleh Enzim Ekstraseluler *Aspergillus niger*”. 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. Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M.Agr.Sc., Esti Utarti, S.P. M.Si. dan Drs. Siswanto, M.Si. selaku Dosen Penguji I dan II yang banyak memberikan saran dan masukan demi kesempurnaan skripsi ini;
3. Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M.Agr.Sc., Esti Utarti, S.P. M.Si. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang senantiasa memberikan arahan dan bimbingan selama penulis menjadi mahasiswa;
4. Ir. Endang Soesetyaningsih, selaku teknisi Laboratorium Mikrobiologi banyak membantu selama penelitian;
5. bapak, ibu, mbah lakek dan mbah binik, adekku tersayang M. Hendrik serta seluruh keluarga yang telah memberikan motivasi, materi, tenaga, pikiran dan doa;
6. teman-teman di Laboratorium Mikrobiologi, Bak Nier, Citra, Laras, bak Iphe, Syafiq, Anis, Rion, Dhini, Tiffani, Lay, Bagus dan lainnya yang tak bisa saya

sebutkan satu persatu 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

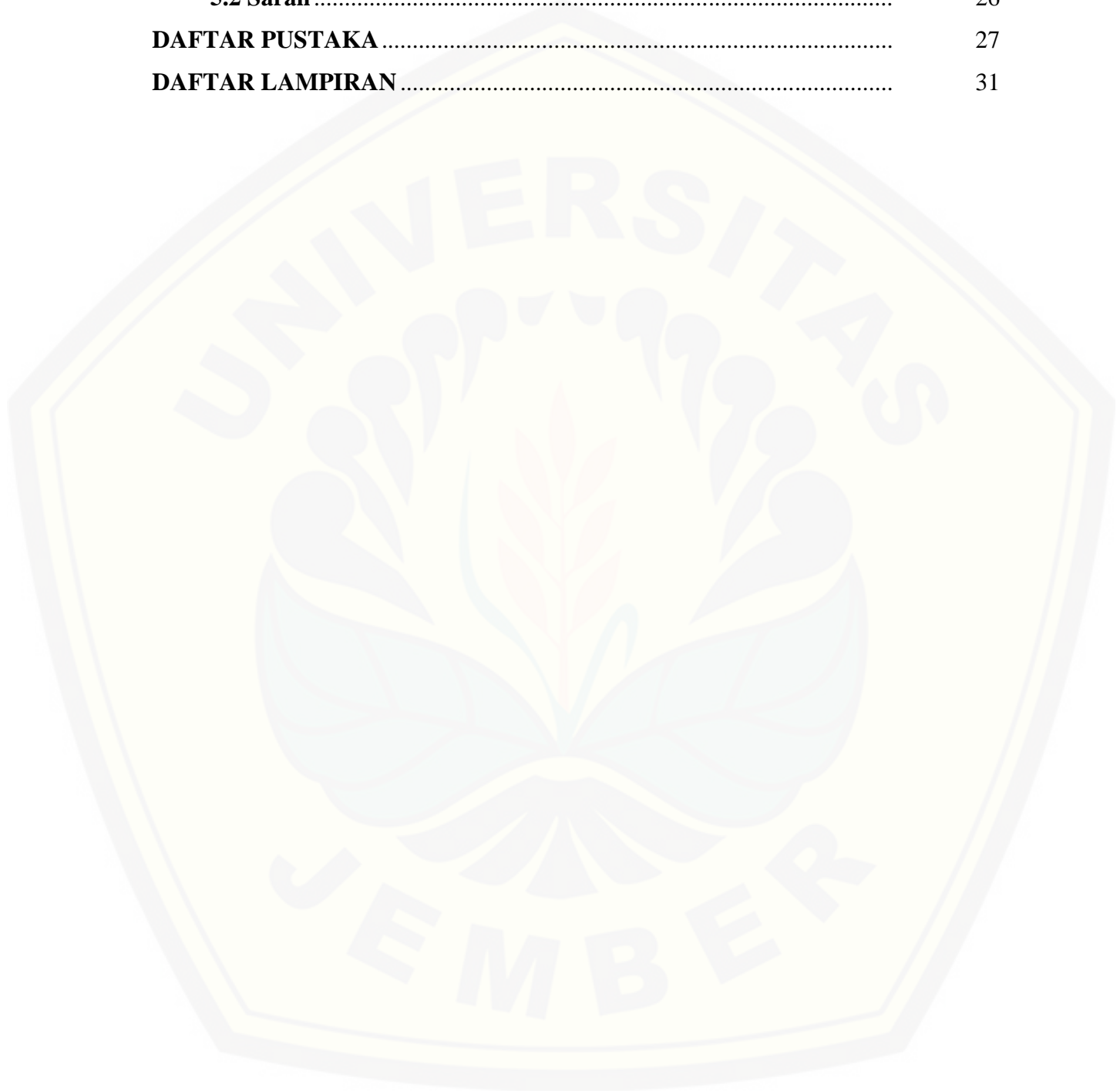
Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PENGESAHAN	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Ruang Lingkup Penelitian	3
1.4 Tujuan	3
1.5 Manfaat	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Bungkil Biji Jarak Pagar (BBJP)	4
2.2 Dekomposisi Bahan Organik oleh Mikroorganisme	5
2.3 <i>Aspergillus niger</i> dan Karakteristik Enzim	6
BAB 3. METODE PENELITIAN	10
3.1 Waktu dan Tempat	10
3.2 Alat dan Bahan	10

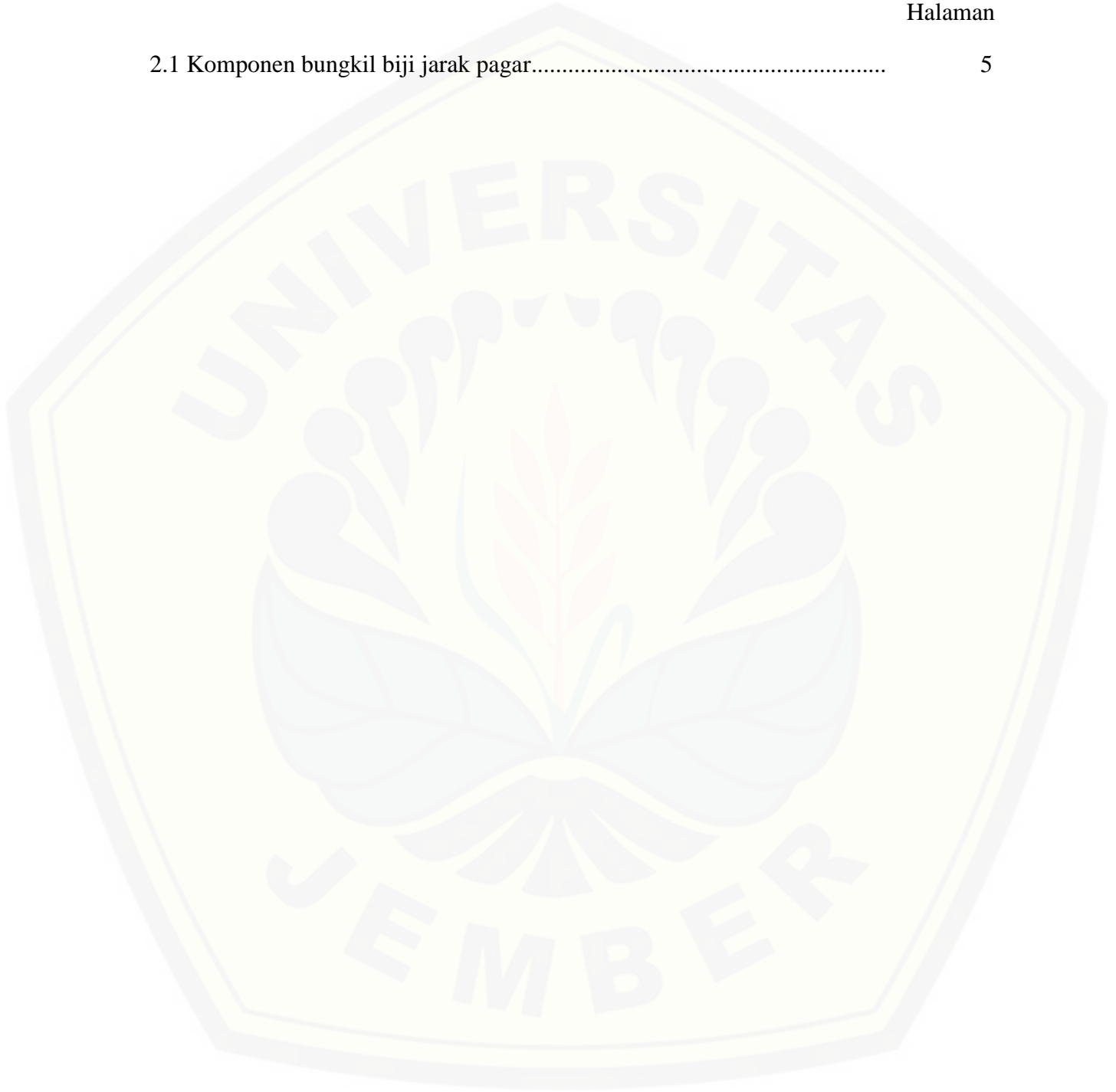
3.3 Prosedur Penelitian	10
3.3.1 Persiapan Bahan-Bahan Penelitian.....	10
3.3.1.1 Persiapan Sampel dan Subkultur.....	10
3.3.1.2 Pembuatan Substrat Alkali Ekstrak.....	11
3.3.1.3 Pembuatan Reagen <i>Somogyi</i> dan <i>Nelson</i>	11
3.3.1.4 Pembuatan Substrat BBJP Jenuh Air	12
3.3.1.5 Pembuatan Kalibrasi Kurva Glukosa	12
3.3.2 Produksi Enzim Eksrak Kasar	13
3.3.2.1 Pembuatan Subkultur	13
3.3.2.2 Perhitungan Jumlah Spora.....	13
3.3.2.3 Optimasi Produksi Enzim Ekstrak Kasar	13
3.3.2.4 Uji Aktivitas Enzim Ekstrak Kasar	14
3.3.2.5 Produksi Enzim Ekstraseluler	14
3.3.3 Degradasi BBJP oleh Enzim Ekstrak Kasar <i>A. niger</i>	15
3.3.3.1 Penentuan stabilitas pH dan pH optimum.....	15
3.3.3.2 Penentuan stabilitas suhu dan suhu optimum.....	15
3.3.4 Dekomposisi BBJP Secara Maksimal oleh Enzim Ekstraseluler <i>A. niger</i>	16
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	17
4.1 Jumlah Kepadatan Spora Optimum <i>A. niger</i>	17
4.2 Produksi Enzim Ekstraseluler <i>A. niger</i>	18
4.3 Kondisi Optimum Degradasi BBJP oleh Enzim Ekstrak Kasar <i>Aspergillus niger</i>	20
4.3.1 Penentuan stabilitas pH dan pH optimum	20
4.3.2 Penentuan stabilitas suhu dan suhu optimum.....	22
4.4 Dekomposisi BBJP Secara Maksimal oleh Enzim Ekstraseluler <i>A. niger</i>	23
BAB 5. PENUTUP	26

5.1 Kesimpulan.....	26
5.2 Saran.....	26
DAFTAR PUSTAKA.....	27
DAFTAR LAMPIRAN.....	31



DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Komponen bungkil biji jarak pagar.....	5



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.3 Mekanisme dekomposisi selulosa secara enzimatis	7
4.1 Jumlah spora dengan waktu pertumbuhan spora <i>A. niger</i>	17
4.2 Produksi gula reduksi oleh enzim <i>a.niger</i> selama fermentasi BBJP.....	19
4.3.1 Stabilitas dan optimum pH aktivitas enzim ekstraseluler <i>A. niger</i>	21
4.3.2 Stabilitas dan optimum suhu aktivitas enzim ekstraseluler <i>A. niger</i>	22
4.3 Hidrolisis BBJP oleh <i>crude enzyme A. niger</i>	24

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Komposisi Media <i>Potato Dextrose agar</i> (PDA)	31
B. Komposisi Substrat Alkali Ekstrak BBJP	31
C. Komposisi Media Agar Miring BBJP 1 %	31
D. Komposisi Buffer Phosphat dan Asetat	31
E. Komposisi NaCl 1 % dan Na azide 0,01 %	31
F. Jumlah Spora Optimum <i>Aspergillus niger</i>	32
G. Kurva Standart Glukosa	32



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Produk utama tanaman jarak pagar (*Jatropha curcas* L.) berupa minyak yang terdapat dalam inti biji. Minyak biji jarak pagar banyak dimanfaatkan sebagai pengganti minyak bumi (bahan bakar). Ekstraksi minyak biji jarak pagar menghasilkan limbah berupa bungkil biji jarak pagar (BBJP). Menurut Nopitasari *et al.*, (2013), setiap pengolahan 4-5 ton biji kering pertahun, 1 ton biji kering menghasilkan 200-300 liter minyak, dengan limbah berupa bungkil biji jarak pagar sebanyak 700-800 kg. Jumlah biomassa dari hasil samping biji jarak pagar ini lebih besar dari pada minyak yang dihasilkan sehingga apabila tidak ditangani akan menimbulkan dampak negatif terhadap lingkungan.

Bungkil biji jarak pagar mengandung beberapa komponen penting yang dapat didegradasi menjadi senyawa yang lebih sederhana. Komponen kandungan dalam BBJP menurut Staubmann *et al.*, (1997), terdiri dari Abu (6,03 %); lemak (6,40 %); pati (0,63 %); protein (24,54 %); gula (0,71 %); hemiselulosa (5,55 %); lignin (19,46 %); dan selulosa (20,3 %). Bungkil biji jarak pagar saat ini digunakan sebagai pupuk organik (kompos), biogas, dan juga pakan ternak namun di dalam BBJP terdapat racun *curcin* dan *phorbolester* sehingga penggunaannya sangat terbatas sebagai pakan (Sumiati *et al.*, 2010).

Alternatif lain untuk penanganan limbah BBJP dapat dilakukan dengan memanfaatkan mikroorganisme sebagai dekomposer untuk mempercepat proses dekomposisi BBJP. Dekomposisi merupakan proses perombakan atau terurainya bahan organik sisa tanaman (hemiselulosa, selulosa, dan lignin) menjadi senyawa yang lebih sederhana oleh mikroorganisme yang mampu menghasilkan enzim ekstraseluler (Saraswati *et al.*, 2010).



Dalam penelitian ini memanfaatkan *Aspergillus niger* (*A. niger*) sebagai dekomposer BBJP. *A. niger* termasuk kelompok kapang atau fungi yang menunjukkan kemampuan lebih baik dibanding bakteri dalam mengurai bahan organik sisa-sisa tanaman (hemiselulosa, selulosa, dan lignin). Perombakan komponen-komponen pada BBJP erat kaitannya dengan peranan enzim ekstraseluler yang dihasilkan oleh *A. niger*. Penelitian sebelumnya *A. niger* mampu memproduksi enzim ekstraseluler dan membantu mempercepat dekomposisi berbagai limbah, di antaranya penelitian oleh Sanjaya *et al.*, (2010), enzim selulase dari *A. niger* memiliki temperatur optimum sebesar 50°C dan pH optimum sebesar 3,0 dan aktivitas enzim selulase sebesar 1,6807 IU/ml dengan memanfaatkan jerami padi sebagai substrat. *A. niger* juga mampu memproduksi enzim protease menggunakan sisik ikan sebagai substrat oleh penelitian yang dilakukan Rebecca *et al.*, (2012). Selain itu *A. niger* mampu memproduksi enzim -glucosidase - 11,28, endo-1.4- -glukanase - 11,8 dan endo-1.4- -xilanase - 84,8 (Bratkowska, 2003) dan lipase untuk fermentasi bungkil inti sawit (Supriyati *et al.*, 1998). *A. niger* mudah dikembangbiakan, mampu tumbuh lebih baik dibandingkan jenis fungi lainnya (Wina, 2005).

Menurut Alleorerung (2010), pemanfaatan mikroorganisme dekomposer untuk mempercepat proses dekomposisi bahan organik telah banyak dihasilkan, namun belum ada informasi mikroorganisme dekomposer tersebut dapat efektif dalam merombak BBJP. Oleh sebab itu pemanfaatan *A. niger* sebagai dekomposer diharapkan mempunyai prospek yang baik untuk digunakan dalam proses dekomposisi BBJP.

1.2 Rumusan Masalah

Jumlah biomassa BBJP lebih tinggi dari pada minyak yang dihasilkan. Salah satu komponen penting dalam BBJP adalah karbohidrat, namun karbohidrat sulit terdekomposisi dengan cepat. Salah satu fungi yang mampu mendegradasi dengan baik, yaitu *A. niger* yang mampu menghasilkan enzim ekstraseluler terkait dengan dekomposisi karbohidrat antara lain selulase, xylanase, glukosidase, -amilase.

1.3 Ruang Lingkup Penelitian

Penelitian ini terbatas pada aktivitas enzim ekstraseluler dari *A. niger* terkait dekomposisi karbohidrat dalam mendegradasi komponen, yaitu karbohidrat pada BBJP. Indikator yang digunakan untuk mengukur degradasi BBJP yaitu kemampuan menghasilkan gula reduksi.

1.4 Tujuan

Penelitian bertujuan untuk mengetahui kondisi optimum dekomposisi karbohidrat yang terkandung dalam BBJP oleh enzim ekstraseluler dari *A. niger*.

1.5 Manfaat

Dari penelitian ini diharapkan dapat diketahui potensi enzim ekstraseluler *A. niger* dalam membantu proses dekomposisi BBJP. Memberikan informasi baru mengenai potensi *A. niger* B10 MCC-00135-1 dalam mendegradasi BBJP.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bungkil Biji Jarak Pagar (BBJP)

Jarak pagar (*Jatropha curcas L.*) merupakan tanaman semak berkayu yang banyak ditemukan di daerah tropik dan tersebar luas di beberapa wilayah di Indonesia. Menurut (Nopitasari *et al.*, (2013) tanaman jarak pagar dapat tumbuh baik di hampir semua jenis tanah, lahan marginal, maupun lahan-lahan bekas tambang. Tanaman jarak pagar merupakan salah satu sumber energi (minyak nabati) bahan bakar alternatif potensial yang terbarukan, baik yang langsung digunakan (bahan bakar) maupun melalui proses lanjutan (Biodiesel) (Santoso *et al.*, 2010).

Tanaman ini menghasilkan biji jarak pagar yang terdiri atas 60% berat kernel (daging buah) dan 40% berat kulit. Inti biji (kernel) jarak pagar mengandung sekitar 40-45% minyak sehingga dapat diekstrak menjadi minyak jarak dengan cara mekanis ataupun ekstraksi. Proses pembuatan biodiesel dari tanaman jarak pagar akan menghasilkan limbah berupa bungkil biji jarak pagar (Sari, 2012). Dari 1 ha tanaman jarak pagar, biji kering yang dihasilkan dapat mencapai 4-5 ton per tahun. Satu ton biji kering akan menghasilkan 200-300 liter minyak, dengan produk samping (limbah) yaitu berupa bungkil biji jarak pagar sebesar 700-800 kg. Biomassa limbah yang sangat besar tersebut membutuhkan penanganan dalam hal ini secara biologi dengan memanfaatkan peran mikroorganisme untuk membantu mempercepat proses dekomposisi atau pelapukan. Hal ini sekaligus mengatasi masalah lingkungan yang timbul akibat limbah bungkil biji jarak pagar.

Limbah bungkil biji jarak pagar merupakan bahan buangan yang masih mengandung bahan organik dan dapat dimanfaatkan kembali dengan memecah senyawa-senyawa organik yang dikandungnya. Kandungan N, P₂O₅, dan K₂O limbah



buah dan biji jarak pagar masing-masing sebesar 4,44%; 2,09%; dan 1,68% (Hartono, *et al.*, 2007). Komponen yang terkandung dalam bungkil biji jarak pagar dapat dilihat pada tabel 2.1(Hidayat *et al.*, 2014).

Tabel 2.1 Komponen bungkil biji jarak pagar

Komponen	% Berat Kering
Kadar Abu	6,1
Protein	28,4
Lemak	12,0
Serat kasar	25,9
Lainnya *	27,6

* lignin, hemicellulose dan extractives.

Lignoselulosa merupakan komponen organik di alam yang berlimpah dan terdiri dari tiga tipe polimer, yaitu selulosa, hemiselulosa dan lignin. Selulosa adalah polimer glukosa dengan ikatan β -1,4-glikosidik. Bungkil biji jarak pagar merupakan jenis limbah padat dengan kandungan lignoselulosa yang sukar terdekomposisi dengan cepat di lingkungan (Safitri *et al.*, 2012).

2.2 Dekomposisi Bahan Organik oleh Mikroorganisme

Dekomposisi adalah proses penguraian materi organik menjadi senyawa yang lebih sederhana melalui reaksi biologis mikroorganisme secara aerobik dalam kondisi terkendali. Penguraian sendiri merupakan proses penguraian senyawa-senyawa yang terkandung dalam sisa-sisa bahan organik (seperti jerami, daun-daunan, sampah rumah tangga, dan sebagainya) dengan bantuan mikroorganisme baik itu bakteri ataupun fungi yang mampu menghasilkan enzim sebagai biokatalisator (Sutanto, 2002). Enzim merupakan katalisator dalam reaksi biokimia dan setiap enzim memiliki kemampuan spesifik untuk merubah molekul tertentu. Sebagai katalisator, enzim hanya meningkatkan kecepatan reaksi dan sangat spesifik untuk reaksi yang dikatalisnya. Terdapat dua tipe enzim, yaitu enzim ekstraseluler atau *eksoenzim*, yaitu enzim yang diekskresikan melalui dinding sel dan dapat berfungsi di luar sel dan intraseluler atau *endoenzim*, yaitu enzim yang dihasilkan dan bekerja di

dalam sel (Aisah, 2009). Beberapa kelompok fungi seperti *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Neurospora*, dan *Fusarium* mempunyai aktivitas tinggi dalam menghasilkan enzim tertentu untuk mendegradasi bahan organik (Chandel *et al.*, 2011). 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 (Sanjaya, *et al.*, 2010).

2.3 *Aspergillus niger* dan Karakteristik Enzim

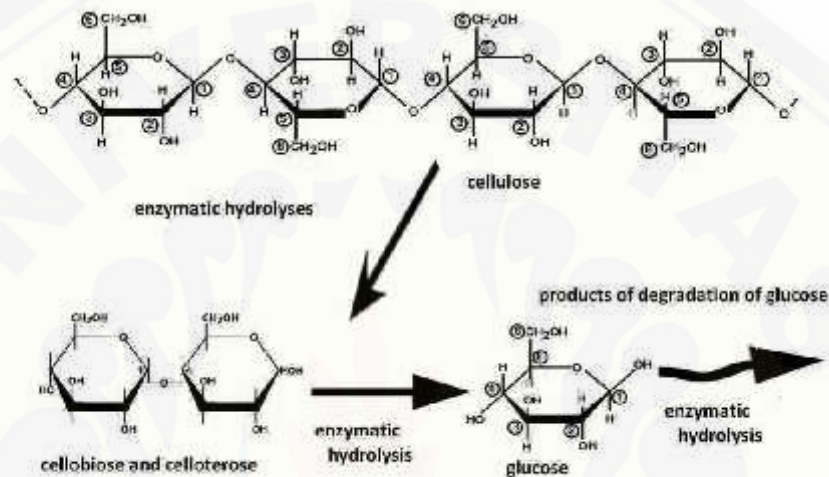
A.niger merupakan fungi dari kelompok *Ascomycota* yang berfilamen, memiliki hifa bercabang-cabang dan bersekat. *A. niger* memiliki warna dasar putih atau kuning dengan lapisan konidiospora yang tebal berwarna hitam. *A. niger* hidup didaerah tropis dan subtropis secara aerob, serta mudah diisolasi dari bermacam substrat termasuk biji-bijian. *A.niger* dapat tumbuh pada suhu 35⁰C-37⁰C (optimum), 6⁰C-8⁰C (minimum), 45⁰C-47⁰C (maksimum). Kisaran pH yang dibutuhkan 2,8-8,8 dengan kelembaban 80-90%. dapat hidup pada suhu 6⁰C - 47⁰C dan pH 1.4 - 9.8. Pada larutan garam dan gula dengan konsentrasi tinggi, *A. niger* mampu untuk tetap hidup (Putri, 2012). Fungi ini mudah dikembangbiakan, dan mampu tumbuh lebih baik dibandingkan jamur lain (Wina, 2005).

Menurut tinjauan umum *A.niger* diklasifikasikan sebagai berikut:

Divisi	: Fungi
Kelas	: Ascomycetes
Ordo	: Eurotiales
Famili	: Euroticeae
Genus	: <i>Aspergillus</i>
Spesies	: <i>Aspergillus niger</i> (Inggrid <i>et al.</i> , 2012)

A.niger telah dikenal sebagai salah satu mikroba yang memiliki kemampuan yang tinggi untuk produksi berbagai enzim yang penting penerapannya dalam industri.

Enzim ekstraseluler yang dihasilkan oleh *A.niger* antara lain selulase, α -amilase, pektin depolimerase, lipase, xilanase, rhamdosidase, pektinase, glukamilase, inulinase, dan protease. *A.niger* memiliki kelebihan dibanding fungi lainnya, yaitu mampu menghasilkan enzim selulase khususnya glukosidase dalam jumlah tinggi (Yusak, 2004).



Gambar 2.3 Mekanisme Hidrolisis Selulosa Secara Enzimatis (Kasmiran, *et al* 2012)

Enzim Sellulase merupakan enzim hidrolase yang dapat mengkatalis reaksi hidrolisis ikatan β -1,4 glukano hidrolase. Enzim sellulase sangat penting karena enzim sellulase dapat dimanfaatkan untuk mengatasi lingkungan dari limbah sellulosa. Enzim sellulase menguraikan sellulosa menjadi golongan kecil yang kemudian dapat diuraikan lebih lanjut menjadi monomer dari glukosa. Enzim sellulase juga dapat menguraikan ikatan lignosellulosa yang terdapat pada limbah pertanian dan perkebunan. Enzim sellulase termasuk enzim ekstraseluler yang mempunyai kemampuan besar dalam mengdegradasi limbah organik, terutama limbah pertanian dan limbah industry (Kasmiran, *et al* 2012).

Beberapa penelitian terdahulu mengenai produksi dan potensi enzim ekstraseluler yang dihasilkan oleh *A.niger*, antara lain oleh Sa'adah *et al.*, (2010),

A.niger mampu memproduksi enzim selulase dengan aktivitas enzim tertinggi 7,29 gram glukosa/liter yang memanfaatkan substrat jerami dengan aktivitas enzim paling optimum diperoleh pada waktu fermentasi 96 jam. (Acharya *et al.*, (2008) juga melakukan penelitian menggunakan serbuk kayu sebagai substrat dekomposisi oleh *A.niger* dihasilkan aktivitas selulase tertinggi 0,1813 IU/ml pada suhu optimum 28⁰C dan pH optimum 4 - 4,5. Penelitian lainnya oleh Sanjaya *et al.*, (2013) memanfaatkan jerami padi yang menghasilkan enzim selulase oleh *A. niger* dengan aktivitas ezim selulase sebesar 1,6807 IU/ml. *A. niger* juga mampu menghasilkan enzim -glucosidase, endo-1.4- -glukanase, dan endo-1.4- -xilanase dengan memanfaatkan substrat Pectin apel, kecambah, wijen yang dilakukan oleh Bratkowska *et al.*, (2003). Enzim protease mampu dihasilkan oleh *A.niger* dari penelitan yang dilakukan oleh Rebecca *et al.*, (2012) dengan menggunakan substrat sisik ikan. Berikut aktivitas protease: *A. niger* wild type, Day 5 0.204 ; Day 6 1.282 ; and Day 7 2.496 , *A. niger* AB30 0.076 ; 0.51 ;and 1.826 *A. niger* AB60: 0.942 1.482, 2.122. *A. niger* mampu menghasilkan enzim lipase yang memanfaatkan bungkil inti sawit sebagai substrat yang menghasilkan adanya penurunan kadar lemak dalam bungkil inti kelapa sawit (Supriyati *et al.*, 1998). Norita, S.(2005), melakukan penelitian produksi mannan oleh *A. niger* selama fermentasi biji labu, dengan kesimpulan enzim mampu memecah hemiselulosa-manan. Enzim -amilase yang dihasilkan oleh *A. niger* menggunakan substrat onggok dan dedak dinyatakan enzim tersebut mampu memecah ikatan a-1,4 glikosida dari molekul pati menjadi maltosa (Sebayang, 2005). Selain itu peneliti lainnya oleh Nasrullah, (2009) memanfaatkan pati ubi jalar sebagai substrat dengan enzim -amilase, glukoamilase dan pectin depolimerase yang dihasilkan oleh *A. niger* disimpulkan sinergisme ketiga enzim memecah pati dengan cara menurunkan viskositas pati dan meningkatkan sakarifikasi pati. Rahmawati, (2010) dalam peneliatiannya *A. niger* memproduksi enzim -amilase dan glukoamilase dengan memanfaatkan kulit ubi kayu dan kulit nanas sebagai substrat, dimana Sinergisme kedua enzim mampu mengurai pati menjadi glukosa. Penambahan molase dapat meningkatkan pertumbuhan *A. niger*. Enzim mampu

mendegradasi xilan menjadi xilosa dan xilo-oligosakarida yang menggunakan jerami padi sebagai substrat (Pangesti *et al.*, 2012). Thanapimmethaa *et al.*, (2012) dalam penelitiannya memanfaatkan limbah jarak pagar sebagai substrat untuk produksi protease oleh *A.oryzae* terbukti layak. Berdasarkan metode Taguchi, aktivitas protease meningkat sampai 14.273 U GDM-1. Penelitian yang dilakukan oleh Bavimane *et al.*, (2014), *Aspergillus versicolor* CJS-98 dapat memproduksi lipase dan protease secara optimum melalui proses SSF limbah BBJP pada kondisi pH 7.0, suhu 25 °C, dan waktu inkubasi 96 jam, dengan aktivitas lipase 1288 U/g dan protease 3366 U/g.

Bungkil biji jarak pagar mempunyai potensi besar sebagai substrat dalam produksi berbagai enzim ekstraseluler oleh *A.niger* yang digunakan secara luas dalam industri sehingga penelitian ini penting untuk dilakukan. Dalam penelitian ini, diharapkan dapat memperoleh kondisi optimum dari variabel yang telah ditentukan sehingga dapat mengurangi biaya produksi enzim ekstraseluler dan menambah nilai ekonomi bungkil biji jarak pagar.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Waktu pelaksanaan penelitian dimulai pada bulan Juli 2014 sampai Maret 2015 di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengeahuan Alam Universitas Jember.

3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian terdiri dari spektrofotometer, *sentrifuge*, autoklaf, *shaker*, oven, mikropipet, pipet tetes, vortek, neraca analitik, penangas air, *laminar air flow* (LAF), pengaduk *DC motor*, inkubator, kertas saring, mikroskop, *haemocytometer*, pH meter, *water bath*.

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah sampel bungkil biji jarak pagar, biakan *A. niger* B10 MCC-00135-1, garam fisiologis (NaCl 1 %), *Potato Dextrose Agar* (PDA), NaCl 1 %, Natrium azide, reagen *Somagyi* dan *Nelson*, akuades, alkohol 70 %, NaOH, NaOH 2 M, buffer fosfat, buffer asetat, dan etanol.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Persiapan Bahan-Bahan Penelitian

a. Persiapan Sampel dan Subkultur

Sampel berupa ampas atau bungkil biji jarak pagar hasil pengepresan. Sampel yang diperoleh ditumbuk sampai halus dan diayak sehingga diperoleh bubuk BBJP. Biakan kapang yang digunakan dalam penelitian ini adalah *A. niger* B10 MCC-00135-1 yang diperoleh dari Badan Pengkajian Penerapan Teknologi (BPPT) Tangerang Selatan. Subkultur dibuat dengan menginokulasi satu ose biakan ke dalam media PDA miring dan diinkubasi pada suhu 30° C selama 3 hari.



b. Pembuatan Substrat Alkali Ekstrak

Sampel bungkil biji jarak pagar (BBJP) digerus sampai halus dan diayak. Sehingga diperoleh bubuk BBJP. Selanjutnya, 20% BBJP disuspensikan dan dihidrolisis secara kimiawi dengan 2 M NaOH yg dilarutkan dalam 1000 ml akuades serta di homogenkan dengan shaker selama 24 jam. NaOH berfungsi untuk memotong rantai polisakarida BBJP sehingga lebih sederhana dan dapat larut. Kemudian setelah 24 jam, ditambahkan asam asetat sedikit demi sedikit sampai mendapatkan pH 7. Hasil hidrolisis tersebut difiltrasi menggunakan kertas saring dan diperoleh filtrat kemudian disentrifuge 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 diresuspensikan dengan etanol agar terbebas dari sisa gula, lalu dikeringkan pada suhu 50° C sehingga didapatkan bubuk yang selanjutnya disebut sebagai substrat alkali ekstrak bungkil biji jarak pagar (Muzakhar, 2011).

c. Pembuatan Reagen *Somogyi* dan *Nelson*

Menurut *Somogyi* (1952) reagen somogy berfungsi menghentikan reaksi enzimatik dari enzim dalam menghidrolisis substrat. Reagen *Somogyi* dibuat menggunakan campuran 4 larutan. Larutan 1 terdiri dari 24 gr Na₂CO₃ dan 12 gr potassium sodium yang dilarutkan dalam 240 ml aquades. Larutan 2 terdiri dari 1 gr CuSO₄ dan 5H₂O 10 % dilarutkan dalam 40 ml aquades dan ditambahkan 16 gr NaHCO₃. Larutan 3 dibuat dengan mencampurkan antara larutan 1 dan larutan 2. Sebanyak 180 gr Na₂SO₄ dilarutkan sedikit demi sedikit dalam 300 ml aquades sambil dipanaskan hingga mendidih sebagai larutan 4. Selanjutnya larutan 3 dihomogenkan dengan larutan 4 dan ditambahkan aquades hingga mencapai volume 1000 ml. Diinkubasi pada suhu 37⁰C dalam botol gelap selama 24 jam kemudian disimpan pada suhu 20-40⁰C.

Reagen *Nelson* berfungsi mengikat dan mewarnai gula reduksi hasil hidrolisis substrat oleh enzim. Reagen *Nelson* dibuat menggunakan campuran 2 larutan. Larutan 1 dibuat dengan cara menambahkan sebanyak 50 gr $(\text{NH}_4)_2\text{MO}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ dengan 500 ml aquades dan 46 ml sulfanic acid. Larutan 2 berupa 6 gr $\text{NaHSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ditambahkan dengan 25 ml aquades. Selanjutnya larutan 1 dan 2 dihomogenkan secara perlahan dan ditambahkan aquades sampai volume mencapai 1000 ml. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dalam botol gelap dan disimpan pada suhu $20-40^\circ\text{C}$ (*Nelson*, 1944).

d. Pembuatan Substrat BBJP Jenuh Air

Substrat BBJP jenuh air merupakan media yang digunakan untuk produksi enzim ekstraseluler *A. niger*. 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. Substrat jenuh air dibuat dengan cara menambahkan air sebanyak kadar air yang diketahui pada 10 gr bubuk BBJP kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf. Sehingga diperoleh media produksi enzim dengan kondisi jenuh air.

e. Pembuatan Kalibrasi Kurva Glukosa

Penentuan standar glukosa diuji menggunakan metode yang sama dengan metode analisa gula reduksi yaitu metode *Somogyi-Nelson*. Stok glukosa dengan konsentrasi 100 $\mu\text{g/ml}$ dibuat seri pengenceran sehingga didapatkan konsentrasi glukosa sebanyak 5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 15 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, dan 75 $\mu\text{g/ml}$. Pada masing-masing konsentrasi glukosa ditambahkan reagen *Somogyi* sebanyak 0,5 ml dan dipanaskan dalam air mendidih selama 15 menit. Setelah dingin, ditambahkan reagen *Nelson* sebanyak 0,5 ml lalu ditambahkan akuades sebanyak 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

a. Pembuatan Subkultur

Biakan *A. niger* diinokulasikan pada media agar miring yang mengandung alkali ekstrak BBJP 1 % dan diinkubasi pada suhu 30⁰C selama 72 jam sebagai kultur sumber inokulum.

b. Perhitungan Jumlah Spora

Sebanyak 8 tabung kultur *A. niger* dalam media agar miring yang mengandung alkali ekstrak BBJP 1 % diinkubasi pada suhu 30⁰C selama 1-8 hari. Setiap interval waktu 24 jam selama 8 hari dilakukan perhitungan jumlah spora dengan cara menambahkan 1 ml aquades pada tabung biakan dan dikerik secara merata. Selanjutnya suspensi biakan dituang dalam 9 ml aquades dan dihitung jumlah spora menggunakan *Haemocytometer*. Tahap ini bertujuan untuk mengetahui waktu inkubasi terbaik dalam memperoleh spora optimum dari *A. niger*.

c. Optimasi Produksi Enzim Ekstrak Kasar Berdasarkan Waktu Inkubasi

Optimasi produksi enzim ekstraseluler bertujuan untuk mengetahui waktu inkubasi terbaik *A. niger* yang mampu menghasilkan enzim ekstrak kasar secara optimal. Produksi enzim diawali dengan pembuatan prekultur *A. niger* dalam media agar yang mengandung BBJP 1% dengan waktu inkubasi sesuai hasil penentuan jumlah spora optimum. Sebanyak 1 ml suspensi biakan *A. niger* dalam media agar BBJP 1% diinokulasikan secara aseptis pada 10 gr media BBJP jenuh dan diinkubasi selama 7 hari pada suhu 30⁰C, dilakukan preparasi dan ekstraksi enzim selulase 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 dan difiltrasi dengan menggunakan kertas saring dan disentrifuge 8000 fpm selama 10 menit. sentrifugasi 8000 rpm selama 10 menit dan enzim disimpan pada suhu 4⁰C. Sehingga diperoleh enzim ekstrak kasar *A. niger* hasil produksi hari ke-1

sampai hari ke-7. Selanjutnya uji aktivitas enzim secara serempak dengan metode *Somogyi-Nelson*. Hasil aktivitas enzim terbaik akan digunakan sebagai waktu inkubasi pada produksi enzim ekstrak kasar skala besar. Produksi enzim ekstrak kasar skala besar bertujuan untuk mendapatkan enzim dengan jumlah banyak, menggunakan 50 gr substrat BBJP jenuh air. Metode produksi yang digunakan sama dengan metode optimasi produksi enzim dengan dua kali pengulangan sehingga dihasilkan enzim ekstrak kasar dan disimpan pada lemari pendingin (4°C).

d. Uji Aktivitas Enzim Ekstrak Kasar

Enzim ekstrak kasar yang dihasilkan, selanjutnya diuji aktivitas enzim ekstraseluler terhadap substrat bungkil biji jarak. Uji aktivitas enzim ekstraseluler dilakukan dengan mengukur gula reduksi yang terbentuk menggunakan *Somogyi-Nelson*. Sebanyak 0,5 % substrat dalam 500 µl buffer dengan pH 7 50 mM dimasukkan dalam inkubator (37°C) selama 15 menit. Kemudian ditambahkan ekstrak enzim kasar sebanyak 100 µl dan diinkubasi dalam inkubator selama 2 jam. Pada perlakuan kontrol penambahan enzim dilakukan setelah penambahan reagen *Somogyi*. Setelah inkubasi 2 jam dikeluarkan dari inkubator, ditambahkan reagen 0,5 ml *Somogyi* dan divortek hingga homogen, kemudian dididihkan dalam penangas air selama 15 menit. Reagen *Somogyi* berfungsi untuk menghentikan reaksi enzimatik (*Somogyi*, 1952). Kemudian ditambahkan reagen 0,5 ml *Nelson* dengan 2,5 ml akuades. Kadar gula reduksi diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 500 nm. Reagen *Nelson* berfungsi mengikat gula reduksi hasil hidrolisis substrat sehingga dapat terwarnai dan terbaca nilai absorbansinya (*Nelson*, 1944). Pengukuran dibuat dengan dua kali pengulangan dan hasil uji aktivitas dibandingkan dengan kalibrasi kurva glukosa yang telah dibuat sebelumnya.

e. Produksi Enzim Ekstraseluler

Produksi enzim ekstraseluler dilakukan dengan menginokulasikan suspensi biakan *A. niger* sebanyak 1 ml pada 50 gr media BBJP jenuh air dengan 2 ulangan

dan diinkubasi pada suhu 30°C selama waktu inkubasi optimum. Dilanjutkan dengan preparasi dan ekstraksi enzim seperti pada metode optimasi produksi enzim. Sehingga diperoleh enzim ekstrak kasar dan disimpan pada lemari pendingin (4°C).

3.3.3 Analisis Kondisi Optimum Degradasi BBJP oleh Enzim Ekstrak Kasar *A. niger*.

a. Penentuan stabilitas pH dan pH optimum

Penentuan stabilitas pH bertujuan untuk mengetahui rentang pH stabil bagi enzim *A.niger* dalam mendegradasi BBJP. Untuk mengetahui stabilitas dan optimum 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, 8, 8,5, dan 9. 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 buffer tersebut dengan 500 µl substrat AE 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 AE 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 Suhu dan Suhu Optimum

Penentuan stabilitas suhu dilakukan untuk mengetahui aktivitas enzim *A. niger* stabil pada rentang suhu tertentu. Untuk mengetahui stabilitas dan optimum 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. 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 rentang suhu dengan aktivitas enzim ekstraseluler *A. niger* stabil dalam mendegradasi BBJP.

Penentuan suhu optimum bertujuan untuk mengetahui aktivitas tertinggi enzim ekstraseluler *A. niger* dalam mendegradasi BBJP. Penentuan suhu optimum dilakukan menggunakan 100 µl *crude enzim* dalam buffer pH optimum direaksikan dengan 500 µl substrat AE 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 *A. niger* tertinggi dalam mendegradasi BBJP.

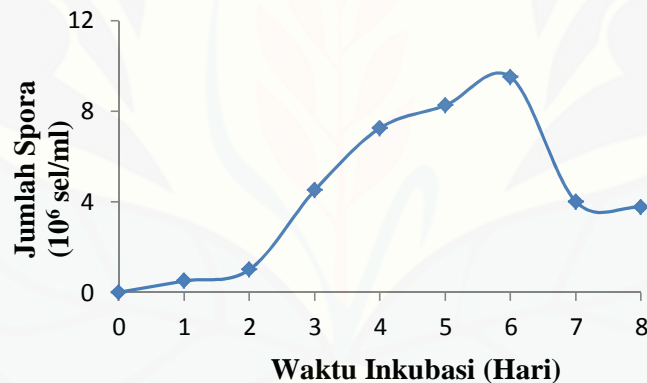
c. Analisis Kemampuan Dekomposisi BBJP Secara Maksimal oleh Enzim Ekstraseluler *A. niger*.

Analisis kemampuan dekomposisi BBJP secara maksimal oleh enzim ekstraseluler *A. niger* B10 MCC-00135-1 dilakukan dengan menganalisis waktu optimum aktivitas enzim ekstraseluler *A. niger* berdasarkan gula reduksi yang terbentuk. Bubuk BBJP 5% dalam *crude enzim A. niger* ditambahkan dengan 500 µl Natrium azide 0,1% kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 36 jam. Selanjutnya dilakukan sampling pada jam ke 0, 1, 2, 3, 6, 12, 18, 24, 30, dan 36 dengan cara mengambil sebanyak 1 ml 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*.



BAB. 4 HASIL DAN PEMBAHASAN**4.1 Jumlah Kepadatan Spora Optimum *Aspergillus niger***

Perhitungan jumlah spora optimum *A. niger* bertujuan untuk mengetahui fase pertumbuhan optimum *A. niger* dalam media BBJP dengan kisaran jumlah spora 10^6 – 10^8 sel/ml (Hidayat, 2008). Jumlah spora *A. niger* ditentukan pada kurva pertumbuhannya, yaitu saat berada pada fase eksponensial yang ditandai terjadinya periode pertumbuhan yang cepat. seperti yang ditunjukkan pada gambar 4.1



Gambar 4.1 Jumlah spora dengan waktu inkubasi (hari)

Berdasarkan gambar 4.1 waktu pertumbuhan optimum diperoleh pada fase eksponensial dimana jumlah spora *A.niger* mengalami peningkatan mulai hari kedua hingga mencapai puncaknya pada hari ke enam dengan jumlah spora dari *A. niger*, yaitu $9,5 \times 10^6$ sel/ml. Setelah hari ketujuh jumlah spora *A. niger* mulai mengalami penurunan namun relatif masih stabil sampai hari kedelapan dengan jumlah spora $4,25 \times 10^6$ sel/ml dan $3,75 \times 10^6$ sel/ml, hal ini kemungkinan dikarenakan siklus hidup

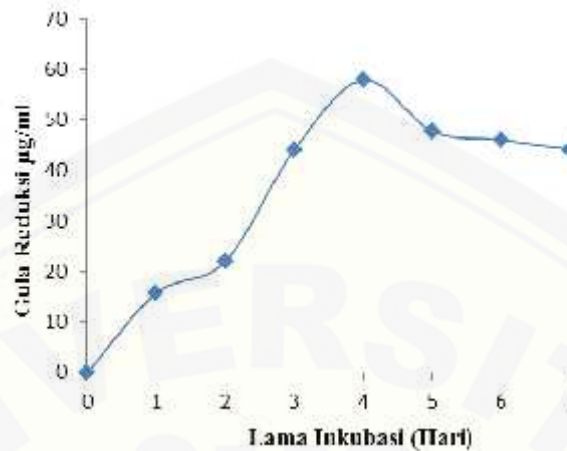


fungi, dimana tiap spora yang tumbuh semakin lama spora tersebut akan berkecambah dengan membentuk hifa dan miselium selanjutnya tumbuh menjadi individu baru (Hidayat, 2012). Jumlah spora *A.niger* $9,5 \times 10^6$ sel/ml pada hari ke 6 tersebut digunakan sebagai sumber inokulum pada media BBJP dalam produksi enzim ekstrak kasar. Tujuan tahap ini adalah mengadaptasikan sel terhadap media fermentasi, sehingga mempersingkat *lag phase* (fase adaptasi) dan pertumbuhan *A. niger* pada medium produksi akan maksimum dalam waktu yang relatif singkat.

4.2 Optimasi Produksi Enzim Ekstraseluler *Aspergillus niger*

Enzim merupakan senyawa protein yang dapat mengkatalisis seluruh reaksi kimia dalam sistem biologis. Mikroorganisme dapat menghasilkan enzim ekstraseluler yang mampu mendegradasi senyawa – senyawa yang terkandung dalam sisa – sisa bahan organik dalam hal ini limbah BBJP dengan bantuan *A.niger*. Produksi enzim ekstrak kasar *A. niger* dilakukan pada fermentasi media padat menggunakan BBJP jenuh air (71%). Proses produksi enzim melalui substrat fermentasi padat atau *Solid State Fermentation* (SSF) lebih menarik karena SSF memberikan produktivitas tinggi, biaya yang dibutuhkan lebih rendah, tidak membutuhkan tempat yang luas, penggunaan alat lebih sedikit dan proses lebih mudah dibanding proses *Submerged Fermentation* (SmF) (Suresh, 2010).

Optimasi produksi enzim ekstraseluler selama fermentasi dilakukan dengan mengukur aktivitas enzim terhadap substrat alkali ekstrak BBJP. Pengukuran aktivitas enzim tersebut didasarkan pada banyaknya gula reduksi yang dihasilkan terhadap substrat alkali ekstrak BBJP. Pengukuran aktivitas enzim dilakukan setiap interval 24 jam selama 7 hari. Optimasi produksi enzim ekstraseluler oleh kapang *A. niger* pada substrat alkali ekstrak BBJP terdapat pada gambar 4.2.



Gambar 4.2 Produksi gula reduksi oleh enzim *A.niger* selama fermentasi BBJP

Gambar 4.2 menunjukkan bahwa semakin lama waktu proses fermentasi, aktivitas enzim meningkat hingga mencapai waktu fermentasi optimum yang menghasilkan gula reduksi sebesar 57,87 µg/ml pada hari ke empat, di luar waktu optimum aktivitas enzim mengalami penurunan namun masih relatif stabil hingga hari ke tujuh. Hal ini selaras dengan penelitian Gunam *et al* (2010), yang menyatakan bahwa produksi enzim selama fermentasi dapat mencapai maksimum dalam jangka waktu tertentu, kemudian mengalami penurunan secara cepat atau lambat, karena beberapa faktor diantaranya zat-zat nutrisi dalam media yang sudah berkurang, serta adanya hasil metabolisme yang mungkin beracun sehingga dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme (Fardiaz, 1988). Menurut Kusumaningrat *et al* (2011), nutrisi yang terkandung dalam media fermentasi akan habis selama berlangsungnya proses fermentasi sampai dihasilkan aktivitas enzim yang maksimal, kemudian dengan berkurangnya nutrisi akan mengakibatkan aktivitas produksi enzim dan pertumbuhan kapang (*A. niger*) semakin menurun.

Penelitian yang dilakukan oleh Sa'adah *et al* (2008) dan Oyeleke *et al.*, (2010), menunjukkan aktivitas enzim selulase tertinggi diperoleh setelah hari ke empat fermentasi kapang *Aspergillus* sp. Enzim ekstraseluler pada hari ke empat inilah

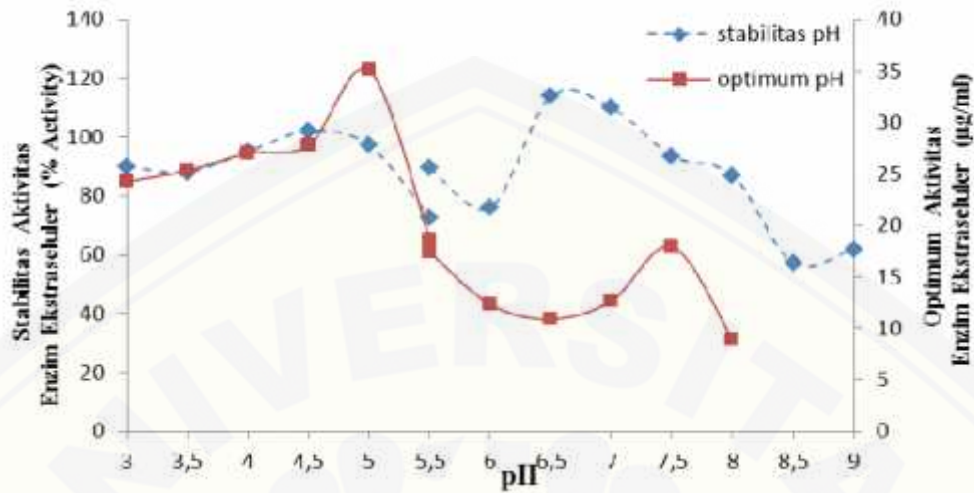
yang akan dijadikan sebagai sumber *crude enzyme* dalam proses hidrolisis dan analisis produknya.

4.3 Kondisi Optimum Degradasi BBJP oleh Enzim Ekstrak Kasar *Aspergillus niger*.

Kondisi optimum degradasi BBJP oleh enzim ekstrak kasar *A. niger* dilakukan dengan menentukan stabilitas pH dan pH optimum serta menentukan stabilitas suhu dan suhu optimum. Stabilitas dalam hal ini menunjukkan kondisi enzim stabil pada *range* pH, waktu dan pada suhu tertentu. Sedangkan optimum ialah menunjukkan aktivitas enzim tertinggi dalam pH, waktu, dan suhu tertentu.

4.3.1 Penentuan stabilitas pH dan pH optimum

Penentuan stabilitas pH bertujuan mengetahui rentang pH stabil bagi enzim ekstrak kasar *A. niger* dalam mendegradasi BBJP. Enzim merupakan senyawa protein yang dapat mengkatalisis seluruh reaksi kimia dalam sistem biologis. Lingkungan dimana enzim akan mengkatalisis suatu reaksi harus berada pada kondisi optimum enzim. Zona ini diberikan oleh parameter derajat keasaman (pH). Setiap enzim memiliki karakter yang berbeda dimana kondisi optimum pH lingkungan akan spesifik untuk setiap enzim. Kondisi pH yang jauh dari kondisi spesifik akan menyebabkan inaktivasi enzim karena enzim akan mengalami kerusakan struktur protein (Lehninger, 1995). Kondisi pH yang optimum akan membantu enzim dalam mengkatalisis suatu reaksi dengan baik. Hasil penentuan stabilitas dan optimum aktivitas enzim ekstraseluler *A. niger* terhadap nilai pH dapat dilihat pada Gambar 4.3.1.



Gambar 4.3.1 Stabilitas dan optimum aktivitas enzim ekstraseluler *A. niger* terhadap pH

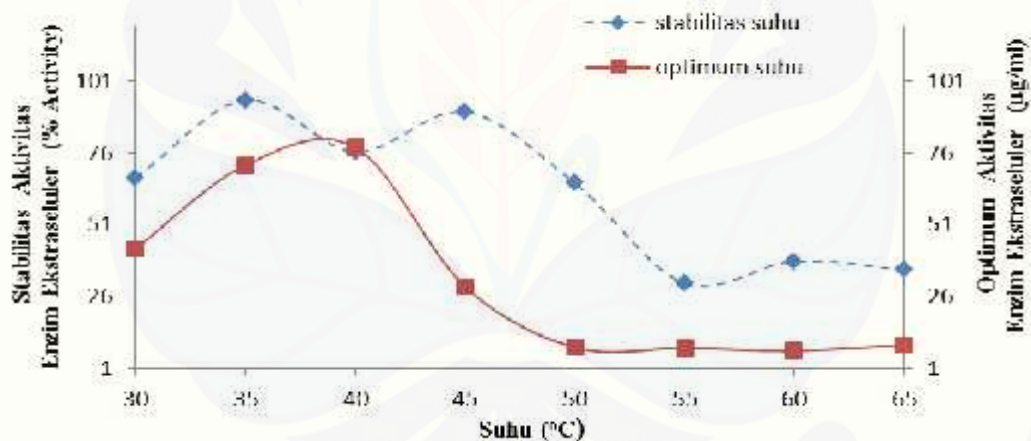
Berdasarkan Gambar 4.3.1 menunjukkan bahwa aktivitas enzim ekstraseluler yang dihasilkan oleh *A. niger* dalam mendegradasi BBJP mampu bekerja pada kisaran pH yang luas antara 3-8 (aktivitas relatif lebih dari 80%), aktivitas optimum pada pH 5 dengan kadar gula reduksi sebesar 35,056 µg/ml, dan semakin menurun pada kondisi basa, karena pada umumnya kapang (*A. niger*) menyenangi pH di bawah 7 (Mufarrikha, 2014). Pengaruh pH pada sintesis bioenzyme telah dilaporkan oleh banyak peneliti, di antaranya ialah pH 4-5,5 dilaporkan untuk *A. terreus* dan *A. niger* (Garg *et al*, 1981), pengaruh pH pada aktivitas enzim yang dihasilkan oleh *A. niger*, pH optimum untuk studi ini yang dilakukan oleh Oyeleke *et al*, (2010), tercatat pada pH 5 dengan konsentrasi 0.87 mg/ml. Puri *et all*, (2013) melaporkan aktivitas enzim amilase dan glucoamilase oleh *A. niger* dicapai tertinggi pada pH 5 sebesar 2,72 IU -amilase dan 4,02 IU aktivitas glucoamilase.

Kondisi pH yang jauh dari kondisi spesifik akan menyebabkan inaktivasi enzim karena enzim akan mengalami kerusakan struktur protein. Kondisi pH lingkungan medium yang optimum akan mendukung produksi enzim yang lebih maksimum. Fermentasi sangat bergantung pada sel dan akan tumbuh baik pada pH 5 karena enzim-enzim yang bekerja untuk metabolisme tumbuh baik pada pH 5.

Pentingnya penentuan stabilitas pH dan pH optimum karena enzim adalah molekul protein yang peka terhadap lingkungannya. Tingkat keasaman media sangat mempengaruhi aktivitas enzim. Oleh karena itu, perubahan muatan karena pH akan berdampak pada stabilitas struktur dan kelarutan enzim (Haliza, 2007).

4.3.2 Penentuan stabilitas Suhu dan Suhu optimum

Kerja enzim tergantung kondisi lingkungan seperti halnya pH, temperatur juga mempengaruhi kerja enzim dalam mengkatalisis suatu reaksi. Laju reaksi akan meningkat seiring dengan peningkatan temperatur sampai batas optimumnya, yang kemudian akan menurun karena enzim akan mengalami denaturasi. Selain itu suhu yang terlalu rendah juga akan menghambat aktivitas enzim, namun laju inaktivasi enzim berjalan lambat dan sangat rendah, sehingga dapat diabaikan. Hasil penentuan stabilitas dan optimum aktivitas enzim terhadap suhu dapat dilihat pada Gambar 4.3.2.



Gambar 4.3.2 Stabilitas dan optimum aktivitas enzim ekstraseluler *A. niger* terhadap suhu

Aktivitas enzim ekstraseluler *A. niger* yang ditunjukkan pada Gambar 4.3.2 terhadap suhu mampu bekerja pada kisaran suhu 30°C-50°C (aktivitas relatif lebih dari 60%), dengan aktivitas optimum pada suhu 40°C sebesar 77,873 µg/ml. Ketika suhu 30 C aktivitas enzim tidak tinggi, disebabkan tidak semua substrat berikatan dengan sisi aktif enzim. Saat bertambah sampai suhu optimum yaitu 40 C, kecepatan

reaksi enzim naik karena energi kinetik bertambah. Hal ini memperbesar peluang enzim dan substrat bereaksi untuk menghasilkan produk yang maksimal. Adanya perubahan suhu juga akan mempengaruhi sisi aktif dari enzim yang akan berikatan dengan substrat.

Penelitian sebelumnya mengenai pengaruh suhu terhadap beberapa aktivitas enzim oleh *Aspergillus*, di antaranya ialah *A. niger* temuan Devi *et al*, (2008) dan Palaniyappan *et al*, (2009) yang melaporkan suhu optimum 45°C untuk spesies *Aspergillus* dalam produksi pektinase. Suresh *et al*, (2010) menyatakan aktivitas enzim pektinase meningkat dan aktivitas pektinase maksimum sebesar 141,50 U / ml ditemukan pada suhu 40°C. Pengaruh suhu pada aktivitas amilase dan glukoamilase oleh *Aspergillus* sp. dipelajari dengan memvariasikan suhu dari 20 °C - 40 °C dan hasilnya suhu 30 °C ditemukan enzim glukoamilase dan - amilase memiliki aktivitas terbaik sebesar 4,23 IU untuk glukoamilase dan 2,76 IU untuk - amylase (Puri *et al*, 2013). Oyeleke *et al*, (2010) melaporkan bahwa peningkatan suhu menyebabkan peningkatan aktivitas enzim tetapi ada batasan untuk peningkatan aktivitas karena suhu yang lebih tinggi menyebabkan penurunan secara drsatis dalam aktivitas enzim. Hal ini bisa disebabkan oleh denaturasi struktur protein.

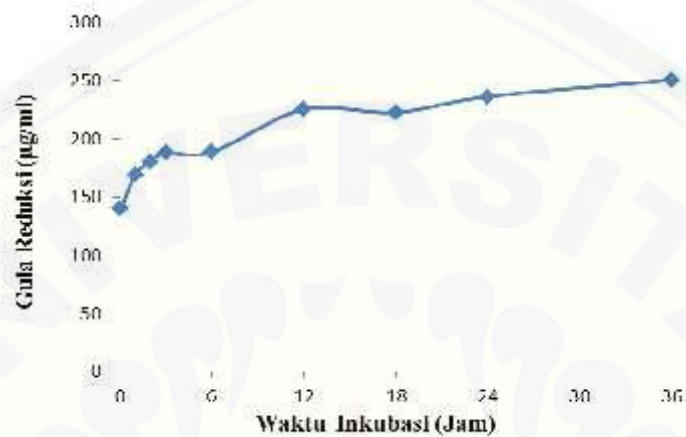
4.4 Kemampuan Dekomposisi BBJP Secara Maksimal oleh Enzim Ekstraseluler

A. niger

Dekomposisi adalah proses penguraian materi organik menjadi senyawa yang lebih sederhana melalui reaksi biologis mikroorganisme secara aerobik dalam kondisi terkendali. Penguraian sendiri merupakan proses penguraian senyawa-senyawa yang terkandung dalam sisa-sisa bahan organik dengan bantuan mikroorganisme baik itu bakteri ataupun jamur yang mampu menghasilkan enzim sebagai biokatalisator (Sutanto, 2002).

Analisa kemampuan dekomposisi BBJP secara maksimal oleh enzim ekstraseluler *A. niger* B10 MCC-00135-1 dilakukan dengan menganalisis waktu

optimum saat enzim dapat menghidrolisis BBJP secara maksimal. Hasil hidrolisis BBJP oleh *crude enzyme A. niger* terhadap lama inkubasi dapat dilihat pada Gambar 4.3.



Gambar 4.3 Hidrolisis BBJP oleh *crude enzyme A. niger*

Proses hidrolisis BBJP oleh *crude enzyme A. niger* berdasarkan pada Gambar 4.3 menghasilkan gula reduksi sebesar 250,41 µg/ml dicapai setelah 36 jam yang diinkubasi pada suhu 37 °C. Semakin lama waktu inkubasi semakin tinggi kemampuan *crude enzyme A. niger* dalam menghidrolisis BBJP. Peningkatan kadar gula pereduksi pada hidrolisis enzim disebabkan oleh adanya proses berkelanjutan pemecahan molekul yang terkandung dalam BBJP oleh keberadaan enzim – enzim yang diproduksi *A. niger* selama proses fermentasi, yang dalam hal ini belum teridentifikasi seluruhnya dan perlu diadakan kajian dan penelitian lebih lanjut.

Menurut Selvakumar *et al*, (1996), *A. niger* merupakan jenis kapang yang dikenal sebagai penghasil asam sitrat, anilin, pektinase, selulase, -1,4 glikan hidrolase, protease, -amilase, glukoamilase, maltase, -galaktosidase, -glukosidase, -glukosidase, asam glukonat, glukosa oksidase, asam oksalat, fosfodiesterase, ribonuklease, pupulan 4-glukanohidrolase, -xilosidase, xilanase dan lipase. Kemungkinan keberadaan beberapa enzim inilah yang menyebabkan *A. niger*

ini mampu menghidrolisis komponen – komponen dalam BBJP menjadi senyawa yang lebih sederhana, dalam penelitian ini berupa gula pereduksi seperti glukosa.





BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Optimasi produksi enzim ekstraseluler *A. niger* dalam mendegradasi komponen bungkil biji jarak pagar menghasilkan gula reduksi sebesar 57,87 µg/ml dalam waktu inkubasi 4 hari.
2. Degradasi optimum bungkil biji jarak pagar oleh enzim ekstrak kasar *A. niger* dihasilkan aktivitas optimum enzim dengan kadar gula reduksi sebesar 77,87 µg/ml pada suhu 40 °C dan pH 5.
3. Kemampuan dekomposisi bungkil biji jarak pagar secara maksimal oleh enzim ekstraseluler *A. niger* menghasilkan gula reduksi sebesar 250,41 µg/ml dicapai setelah 36 jam yang diinkubasi pada suhu 37 °C. Semakin lama waktu inkubasi semakin tinggi kemampuan *crude enzyme A. niger* dalam menghidrolisis BBJP.

5.2 Saran

Diperlukan pemurnian karakterisasi lebih lanjut mengenai enzim ekstraseluler yang dihasilkan oleh *A. niger*. Penelitian yang lebih lanjut perlu dilakukan detoksifikasi senyawa racun yang terkandung dalam bungkil biji jarak pagar.





DAFTAR PUSTAKA

- Acharya, P. B., D. K. Acharya, and H. A. Modi. 2008. Optimization For Cellulase Production By *Aspergillus niger* Using Saw Dust As Substrate. *African Journal of Biotechnology Vol. 7 (22)*, pp. 4147-4152, 19 November, 2008. 1684–5315 © 2008 Academic Journals
- Alleorerung, D. 2010. *Formulasi Biodekomposer yang Efektif Mempercepat Dekomposisi Limbah Jarak Pagar (< 3 Minggu) Dengan Kapasitas 50 Kg/Hari. Program Intensif Riset Terapan*. Bogor: Kementerian Pertanian Badan Penelitian Dan Pengembangan Pertanian Pusat Penelitian Dan Pengembangan Perkebunan
- Anwar, N., Widjaja, A., dan Winardi, S. 2010. Peningkatan Unjuk Kerja Hidrolisis Enzimatik Jerami Padi Menggunakan Campuran Selulase Kasar dari *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger*. *Makara, Sains*. Vol. 14 (2): 113-116.
- Bavimane, M., Veerabhadrapa, Shivakumar, S. B., and Devappa, S. 2014. Solid-State Fermentation of *Jatropha* Seed Cake for Optimization of Lipase, Protease and Detoxification of Anti-Nutrients In *Jatropha* Seed Cake Using *Aspergillus versicolor* CJS-98. *Journal of Bioscience and Bioengineering* Vol. 117 No. 2
- Bratkowska, Halina, Rita, Py , and Jadwiga Sójka-Ledakowicz. 2003. Biosynthesis Of Enzymes By *Aspergillus niger* IBT-90 And An Evaluation Of Their Application In Textile Technologies. *FIBRES & TEXTILES in Eastern Europe* October / December 2003, Vol. 11, No. 4 (43)
- Chandel, A.K., Chan., Rudravaram, Narasu, L.V., Rao, dan Ravindra. 2011. Economics and Environmental impact of Bioetanol Production Technologies : An Appraisal. *Biotechnology and Molecular Biology Review*. Vol. 2 (1): 14-32
- Devi, M.K., Banu, A.R., Gnanaprabhal, G.R., Pradeep B.V. and Palaniswamy M. 2008. Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. *Indian Journal of Science Technology*, 1: 7
- Hapsari, Tribuana. 2008. Efek Pemberian Bungkil Biji Jarak Pagar (*Jatropha Curcas* L.) Produk Fermentasi *Rhizopus oryzae* Dalam Ransum Terhadap Reproduksi Mencit (*Mus Musculus*). *Skripsi* Bogor: Program Studi Ilmu Nutrisi Dan Makanan Ternak Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor



- Hartono, Joko, Yeyen Prestyaning Wanita, dan Budi Hariyono. 2007. *Teknik Pengolahan Limbah Bungkil Jarak Pagar (Jatropha Curcas L.) Menjadi Kompos*. Malang: Balai Penelitian Tanaman Tembakau dan Serat
- Hidayat, Nur. 2012. Kuliaah Kapang: Materi Kuliaah Minggu 3 Mikrobiologi. Pdf
- Hidayat, H. E.R.P. Keijsers, U. Prijanto, J.E.G. van Dam, H.J. Heeres. 2014. Preparation and properties of binderless boards from *Jatropha curcas*L. seed cake. *Industrial Crops and Products* 52 (2014) 245– 254
- Inggrid, M. dan Suharto. 2012. Fermentasi Glukosa oleh *Aspergillus niger* menjadi Asam Glukonat. *Artikel*. No: III/LPPM/2012-02/22-P
- Kasmiran, A., Tarmizi. 2012. *Aktivitas Enzim Sellulase Dari Kapang Selulolitik Pada Substrat Ampas Kelapa*. Lentera : Vol.12, No.1
- Mufarrikha, Iftakhul., Roosdiana, Anna., and Prasetyawan, S. 2014. Optimasi Kondisi Produksi Pektinase Dari *Aspergillus niger*. *kimia.studentjournal*: Vol. 2, No. 1, pp. 393 -399
- Muzakhar, K. *Substrat Alkali Ekstrak TKKS*. Universitas Jember. Jember, 2014
- Nelson, N. 1944. A Photometric Adaptation of The Somogy Method for The Determination of Glucose. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 153: 375-380
- Nopitasari, S., Widiyastuti, T., dan Sutardi, Rahardjo, T. 2013. Pengujian Kecernaan Bungkil Biji Jarak Fermentasi Ditinjau Dari Produksi Vfa Dan N-Nh3 Secara In Vitro. 1(2): 446 – 454
- Nufus, H. 2013. Pengaruh Konsentrasi Inokulum *Monascus purpureus* Terhadap Produksi Pigmen Pada Substrat Tepung Biji Durian. *Skripsi*.Bandung: Universitas Pendidikan Indonesia
- Oyeleke, S. B., Egwim, E. C. And Auta, S. H. 2010. Screening of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus fumigatus* strains for extracellular protease enzyme production. *Journal: Journal of Microbiology and Antimicrobials*
- Palaniyappan, M., Vijayagopal, V., Viswanathan1, R. Viruthagiri, T. 2009. Screening of natural substrates and optimization of operating variables on the production of pectinase by submerged fermentation using *Aspergillus niger* MTCC 281, *African Journal of Biotechnology* 8 (4), pp. 682–686

- Puri, S., Arora. And Sarao, L. 2013. Production and optimization of amylase and glucoamylase using *Aspergillus oryzae* under solid state fermentation. *Original Article: International Journal of Research in Pure and Applied Microbiology Universal Research Publications*. All rights reserved
- Putri, P.R. 2012. Produksi Dan Pemurnian Enzim Glukosa Oksidase (Ec 1.1.3.4) Dari Isolat *Aspergillus niger* (Ipbcc.08.610). *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor: Bogor
- Rebecca, L. Jeyanthi , S. Sharmila, Merina Paul Das and F. Abraham Samuel. 2012. Production And Analysis Of Protease From *Aspergillus niger* Using Fish Scales As Substrate. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 4(10):4597-4600
- Sa'adah, Z., Ika, N. S., dan Abdullah. 2010. Produksi Enzim Selulase oleh *Aspergillus niger* Menggunakan Substrat Jerami dengan Sistem Fermentasi Padat. *Artikel Ilmiah2*. Semarang: Jurusan Teknik Kimia Fakultas Teknik UNDIP Semarang
- Safitri, R., Dewi, S.V., dan Rossiana, N. 2012. *Biodegradasi Limbah Tandan Kosong Kelapa Sawit (Elaeis Guineensis Jacq.) Oleh Jamur Lignoselulolitik*. Sumedang: Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu pengetahuan Alam Universitas Padjadjaran
- Sanjaya, W., dan Adrianti, S. 2010 Optimasi Hidrolisis Jerami Padi Menjadi Glukosa Untuk Bahan Baku Biofuel Menggunakan Selulase Dari *Trichoderma reesei* Dan *Aspergillus niger*. *Skripsi*. Surabaya: Jurusan Teknik Kimia FTI-ITS
- Santoso, B.B., dan Nurrachman. 2001. Potensi Jarak Pagar (*Jatropha Curcas L.*) Sebagai Komponen Agroforestry Dalam Upaya Mitigasi Perubahan Iklim. Mataram: *Prosiding Seminar Nasional Agroforestri II Perluasan promosi Agroforestri dalam mendukung mitigasi perubahan iklim di Asia Tenggara*. 234-245
- Saraswati, R., Santosa, E., dan Yuniarti, E. 2010 *Organisme Perombak Bahan Organik*.
- Sari, P.D. 2012. Pendugaan Komposisi Kimia Biji Jarak Pagar (*Jatropha curcas L.*) Ip-3p Dengan Metode Near Infrared (Nir). *Skripsi* Bogor: Fakultas Teknologi Pertanian Institut Pertanian Bogor
- Selvakumar, P., L. Ashkumary, A. Helen and P. Ashok. 1996. Purification and Characteristic of Glucoamylase Produced by *Aspergillus niger* in Solid State Fermentation. *Appl. Microbiol* 23;403-406

- Selvakumar, P., L. Ashkumary, A. Helen and P. Ashok. 1996. *Purification and Characteristic of Glucoamylase Produced by Aspergillus niger in Solid State Fermentation*. Appl. Microbiol 23;403-406.
- Sihwandini. 2007. Pemanfaatan Jerami Padi sebagai Media Produksi Xilanase dari *Aspergillus Niger*. Biologi – FMIPA: Universitas Jember
- 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 Biochemist~, and Biotechnology* Vol. 63-65.
- Sumiati, Astuti, D.A, dan Suharti,S. 2010. Pemanfaatan Bungkil Bill Jarak Pagar (*Jatropha Curcas*) Terfermentasi Sebagai Pakan Ayam Kampung. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*, Vol.15 No.2
- Supriyati, T. Pasaribu, H. Hamid, Dan A. Sinurat. 1998. Fermentasi Bungkil Inti Sawit Secara Substrat Padat Dengan Menggunakan *Aspergillus niger*. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 3 (3): 165-170.
- Suresh, B., and Viruthagiri, T. 2010. Optimization and kinectics of pectinase enzyme using *Aspergillus niger* by solid-state fermentation. *Journal : Indian Journal of Science and Technology* Vol. 3 No. 8 (Aug 2010)
- Wina, Elisabet. 2005. Teknologi Pemanfaatan Mikroorganisme Dalam Pakan Untuk Meningkatkan Produktivitas Ternak Ruminansia di Indonesia: Sebuah Review. *Wartazoa*. Vol. 15 (4)
- Yusak, Yuniarti. 2004. Pengaruh Suhu dan pH Bufer Asetat terhadap Hidrolisa CMC ioleh Enzim *Aspergillus niger* dalam Media Campuran Onggok dan Dedak. *Jurnal Sains Kimia*. Vol 8. No (35-37)





LAMPIRAN

A. Komposisi Media *Potato Dextrose agar* (PDA)

Bahan	Jumlah
Kentang	10 gr
Dextrose	0,5 gr
Agar	0,85 gr
Akuades	200 ml

B. Komposisi Substrat Alkali Ekstrak Bungkil Biji Jarak Pagar (BBJP)

Bahan	Jumlah
Bubuk BBJP	200 gr
NaOH	80 gr
Akuades	1000 ml
Ethanol	
Asam asetat	

C. Komposisi Media Agar Miring Bngkil Biji Jarak Pagar (BBJP) 1 %

Bahan	Jumlah
Alkali Ekstrak BBJP	1 gr
Agar	1,5 gr
Akuades	100 ml

D. Komposisi Buffer Phospat dan Asetat

Bahan	Jumlah
1 M K_2HPO_4	22,822 gr
1 M KH_2PO_4	13,6 gr
Akuades	200 ml
1 M CH_3COOH	57,18 ml
1 M NaOH	4 gr
Akuades	100 ml

E. Komposisi NaCl 1 % dan Na azide 0,01 %

Bahan	Jumlah
Na azide	1 gr
NaCl	0,01 gr
Akuades	100 ml



F. Jumlah Spora Optimum *Aspergillus niger*

Hari	Jumlah Spora (sel/ml)
0	0
1	5×10^5
2	1×10^6
3	$4,5 \times 10^6$
4	$7,25 \times 10^6$
5	$8,25 \times 10^6$
6	$9,5 \times 10^6$
7	$4,25 \times 10^6$
8	$3,75 \times 10^6$

G. Kurva Standart Glukosa

