



**KARAKTERISTIK PEMBENTUKAN ENZIM TANNASE
OLEH *Aspergillus niger* SECARA FERMENTASI KULTUR
TERENDAM (SUBMERGED FERMENTATION)**

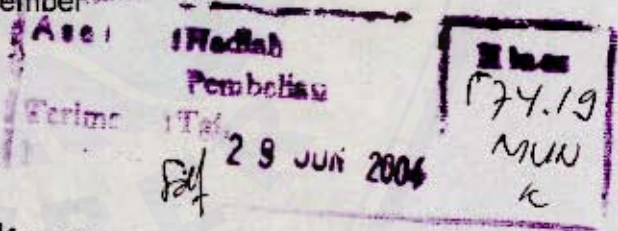
**KARYA ILMIAH TERTULIS
(SKRIPSI)**

Diajukan Guna Memenuhi Salah Satu Syarat Untuk
Menyelesaikan Pendidikan Program Strata Satu
Jurusan Teknologi Hasil Pertanian
Fakultas Teknologi Pertanian
Universitas Jember

Oleh :

Akhmad Munir

NIM : 001710101014



**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER**

2004

Diterima oleh :
Fakultas Teknologi Pertanian
Universitas Jember
Sebagai Karya Ilmiah Tertulis (Skripsi)

Dipertahankan Pada :

Hari : Kamis
Tanggal : 17 Juni 2004
Tempat : Fakultas Teknologi Pertanian

Tim Penguji

Ketua,



Ir. Giyanto, MSc.
NIP : 132 052 412

Anggota I



Ir. Mukhammad Fauzi, MSi.
NIP : 131 865 702

Anggota II



Ir. Susijahadi, MS.
NIP : 130 287 109

Mengetahui,

Dekan Fakultas Teknologi Pertanian




Ir. Hj. Siti Hartanti, MS
NIP : 130 350 763

MOTTO

Sesungguhnya Allah tidak akan mengubah keadaan suatu kaum, sehingga mereka mengubah apa yang ada dalam diri mereka sendiri (QS 13: 11)

Boleh Jadi kamu membenci sesuatu padahal ia (akibatnya) amat baik bagimu, dan boleh jadi kamu menyukai sesuatu padahal ia (akibatnya) amat buruk bagimu. Allah mengetahui sedangkan kamu tidak mengetahui (QS 2: 216).

Jangan bergembira melampau batas terhadap apa yang dianugerahkan kepadamu. Sesungguhnya Allah tidak menyukai orang-orang yang sombong lagi membanggakan diri (QS 57: 23)

Janganlah kebencianmu terhadap suatu kaum mendorong kamu untuk tidak berbuat adil! Berlaku adillah. karena adil itu lebih dekat kepada taqwa (QS 5: 8)

Bukti Pengetahuan seseorang adalah menjawab (dengan jawaban) "saya tidak tahu" (Sabda Nabi).

If you experience defeat don't desperats but take the experiance to blass your consciousness for combats.

PERSEMBAHAN

Tulisan ini secara khusus saya persembahkan Untuk :

Ibunda
tercinta yang telah mencurahkan kasih sayangnya serta
Ayahanda
yang telah memberikan segalanya untuk ananda.

Kakak-kakakku, Neng Ila, Neng Ida serta Adikku tercinta Samsul
semoga selalu dalam perlindungan Allah serta dalam naungan Ridlo-
Nya.

Indah Lindartiana
yang selalu memotivasi aku sekaligus menemani serta menghiasi hatiku,
Semoga Allah mempertemukan kita.

UCAPAN TERIMA KASIH

IR. HJ. SITI HARTANTI, MS.

sebagai dekan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember yang telah memberi kesempatan penulis dalam berkiprah dalam organisasi kemahasiswaan selama di Fakultas Teknologi Pertanian.

IR. SUSIJAHADI, MS.

sebagai ketua Jurusan Teknologi Hasil Pertanian yang telah memberikan ijin dalam penggunaan fasilitas jurusan selama masa studi, sekaligus sebagai Dosen Pembimbing Anggota yang memberikan masukan dalam penulisan karya ilmiah ini serta membantu beberapa permasalahan yang muncul selama penulis melakukan penelitian sampai dengan penulisan.

DR. IR. SONNY SUWASONO, MAPP.SC.

sebagai ketua Laboratorium Pengendalian Mutu yang atas ijinnya sehingga penulis dapat melaksanakan penelitian serta kemudahan menggunakan semua fasilitas yang ada dalam laboratorium tersebut.

DR. IR. ACHMAD SUBAGIO, M.AGR.

sebagai ketua laboratorium biokimia yang telah memberikan masukan yang berkaitan dengan penganalisaan serta atas pemberian ijinnya dalam penggunaan alat yang ada dalam laboratorium tersebut.

IR. GIYARTO, MSC.

selaku Dosen Pembimbing Utama dalam pelaksanaan penelitian sekaligus penulisan karya ilmiah tertulis ini serta dalam pembiayaan penelitian, sehingga tidaklah cukup jika ucapan terima kasih semoga apa yang beliau telah beliau lakukan selalu mendapatkan kemudahan dari Allah.

IR. MUKHAMMAD FAUZI, MSI.

sebagai Dosen Pembimbing Anggota, yang telah memberikan koreksi dalam perhitungan serta saran-sarannya berkaitan dengan penelitian. Semoga c.Bios bersama Bapak selalu sukses.

DR. IR. TEJASARI, MSC.

sebagai dosen wali yang telah membimbing serta memotivasi dalam meghadapi permasalahan selama studi.

DR.IR. JAYUS

Terima kasih atas nasehat serta masukan yang diberikan selama penelitian dan dorongan semangat dalam menghadapi semua permasalahan penelitian

MTAK WIDI, MTAK KETUT, MTAK SARI, PAK MIN, PAK MISTAR, MTAK WIM, MAS DIAN DAN MAS TASOR

sebagai teknisi yang sangat membantu selama penelitian.

PARA KARYAWAN FTP BAGIAN ADMINISTRASI, AKADEMIK SERTA KEMAHASIWAAN

yang selalu sabar meskipun saya banyak melontarkan kritikan.

INDAH LINDARTIANA

terima kasih atas kesabaran dan kasih sayangnya serta pinjaman bukunya semoga penelitiannya cepat selesai.

DONO, YOYOK, FEET@, NANI, NANING, SUBKHAN, RENI, UTAMI, NINIK, IKSAN

kalian adalah sahabat terbaikku. terima kasih hadiah baju putihnya.

WINDY, WIWIED, ERIK, DEVI, FITRI, IKA, ANDY, DKK

Terimakasih untuk semuanya, doakan aku ya !!

TEMAN-TEMEN SATU ATAP, WAHYU, ZUHDI, LUTFI, ISTIJAB, JALAL DAN SOFI

yang turut berbagi dalam suka ataupun duka di kontrakan.

AL-FATH KALIMANTAN IV

Umi (sudah tak tulis lho), Yunita, Eva, Indri (nitip Indahku), Deden + Ita (koston depan) dan semua penghuni didalamnya, terima kasih atas dukungannya.

A'ANG, DONI SEKELUARGA, PAIMO DAN KAWAN-KAWAN

Terimakasih yang telah memberikan warna tersendiri selama di rumah.

TEMAN-TEMAN DPM, BEM

yang selalu memberikan dukungan serta pengertiannya atas segala permasalahan yang saya hadapi berkaitan dengan pelaksanaan penelitian ini.

TEMAN-TEMAN ANGKATAN 2000

yang memberikan dukungan kiprah saya dalam ormawa serta selama masa studi. Semoga kesuksesan beserta kita.

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT, atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya, penulis dapat menyelesaikan karya ilmiah tertulis dengan judul *Karakteristik Pembentukan Enzim Tannase Oleh Aspergillus niger Secara Fermentasi Kultur Terendam (Submerged Fermentation)*, dan salam sejahtera semoga selalu tercurah pada junjunganku Nabi Muhammad SAW.

Pada Tulisan ini penulis sampaikan hal-hal yang berkaitan dengan kajian tentang pembentukan Enzim tannase dengan sumber karbon senyawa tannin oleh *Aspergillus niger* secara fermentasi kultur terendam. Isi karya tulis ini meliputi latar belakang, perumusan masalah, tujuan penelitian serta kumpulan teori dasar atau referensi yang berkaitan dengan topik penelitian, metodologi yang digunakan dalam penelitian, hasil-hasil yang diperoleh, kesimpulan dan saran.

Selama penelitian dan penulisan Karya tulis ini, penulis sebagai manusia yang tidak terlepas dari segala kekurangan sering kali mengalami beberapa kesulitan baik itu yang berhubungan dengan pelaksanaan penelitian maupun dalam penulisan. Sehingga baik secara langsung atau tidak langsung telah melibatkan banyak pihak untuk memberikan masukan serta pendapatnya untuk menyempurnakan hasil penelitian ini. Oleh karenan itu penulis menyampaikan terima kasih kepada pihak-pihak yang telah membantu dalam penelitian dan penulisan karya ilmiah tertulis ini.

Adapun karya ilmiah tertulis ini tentu saja masih banyak kekurangannya, oleh karena itu sungguh merupakan suatu kebahagiaan tersendiri bagi penulis jika ada pihak-pihak yang memberikan masukan, kritik yang berkaitan dengan penulisan skripsi sehingga dapat memperbaiki pemahaman saya dalam penulisan-penulisan selanjutnya.

Demikian apa yang dapat penulis sampaikan, atas perhatiannya penulis ucapkan terima kasih.

Jember, Juni 2004

Penulis

DOSEN PEMBIMBING :

Ir. Giyarto, MSc.
(Dosen Pembimbing Utama)

Ir. Mukhammad Fauzi, MSi.
(Dosen Pembimbing Anggota I)

Ir. Susijahadi, MS.
(Dosen Pembimbing Anggota II)

2.3	Fermentasi	7
2.3.1	Media Fermentasi	7
2.3.2	Tipe Fermentasi Produksi Enzim.....	9
2.4	Tannin	11
2.5	Asam Gallat	12
2.6	<i>Aspergillus niger</i>	13
2.7	Fermentasi Kapang.....	17
2.8	Hipotesa	18
III. METODOLOGI PENELITIAN		
3.1	Bahan dan Alat Penelitian	19
3.1.1	Bahan Penelitian	19
3.1.2	Alat Penelitian	19
3.2	Tempat dan Waktu Penelitian	19
3.3	Metode Penelitian	19
3.4	Pelaksanaan Penelitian	20
3.4.1	Tahapan Persiapan Bahan Baku Media	20
3.4.2	Tahapan Pembuatan Media	20
3.4.3	Persiapan Kultur <i>Aspergillus niger</i>	20
3.4.4	Inokulasi	21
3.4.5	Produksi Enzim Tannase	21
3.5	Prosedur Pengamatan	21
3.5.1	Aktivitas Enzim	21
3.5.2	Nilai pH	22
3.5.3	Kadar Protein Terlarut.....	22
3.5.4	Kadar Tanin Sisa.....	22

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

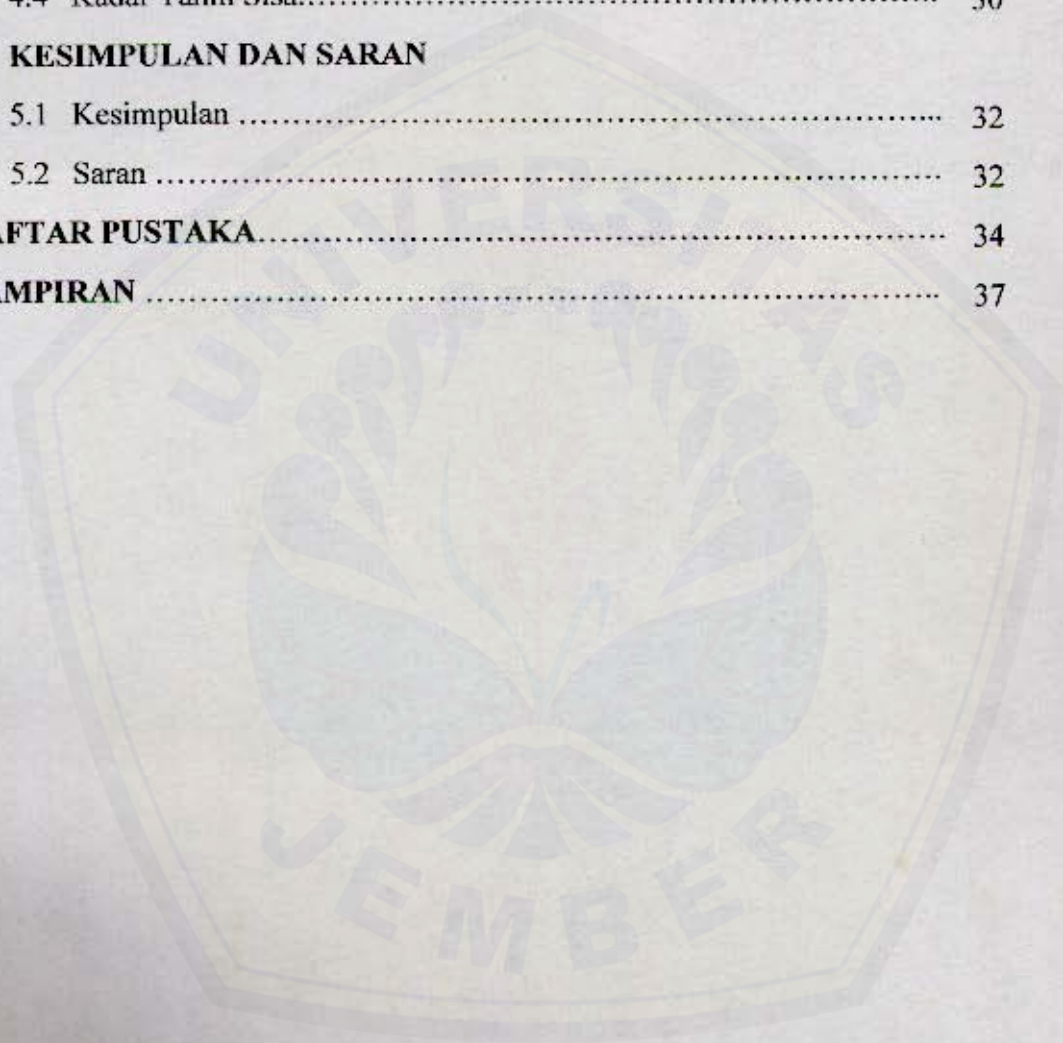
4.1	Aktivitas Enzim Tannase	25
4.2	Nilai pH Filtrat Media Fermentasi.....	27
4.3	Kadar Protein Terlarut Filtrat Enzim Tannase Kasar.....	28
4.4	Kadar Tanin Sisa.....	30

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1	Kesimpulan	32
5.2	Saran	32

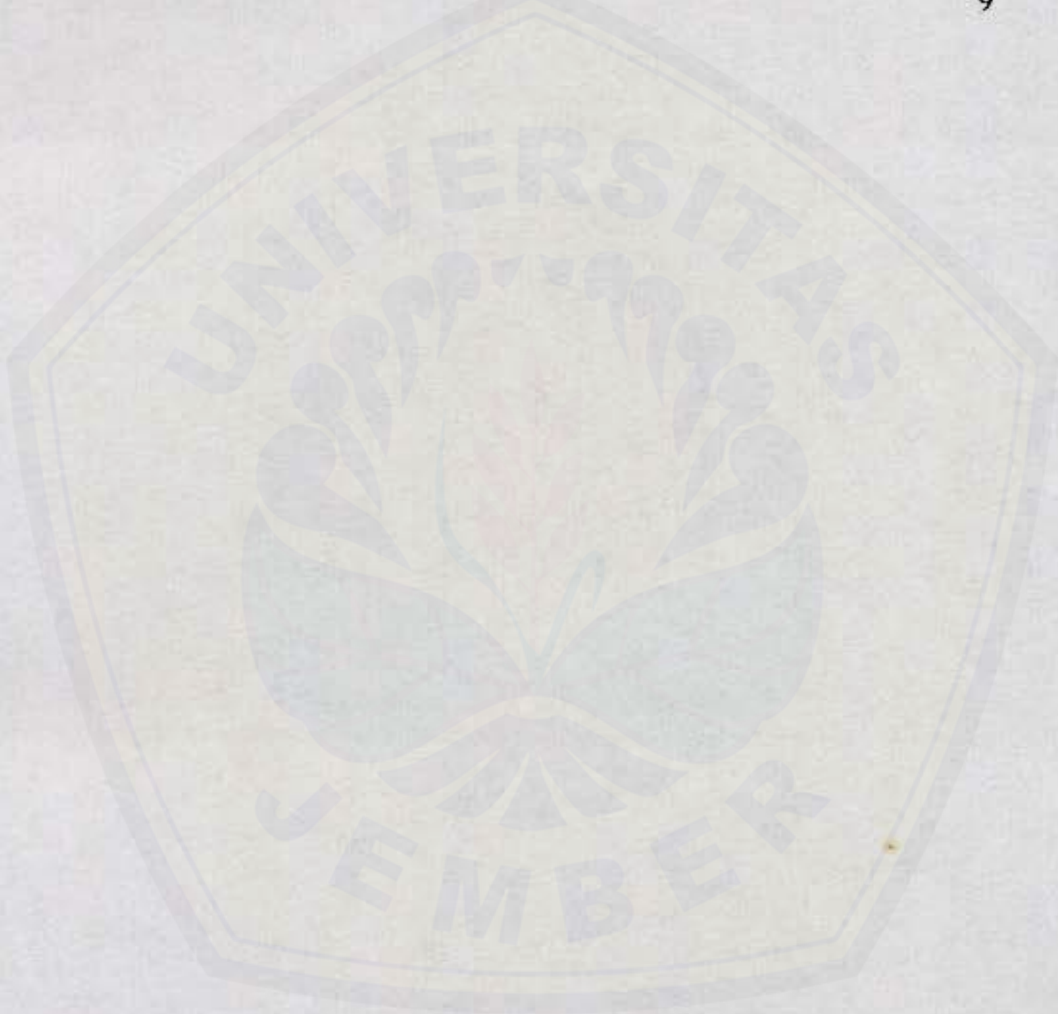
DAFTAR PUSTAKA.....	34
----------------------------	-----------

LAMPIRAN	37
-----------------------	-----------



DAFTAR TABEL

	Hal
Tabel 1. Kisaran Konsentrasi Mineral yang Sering ditambahkan ke dalam Media Fermentasi	9



DAFTAR GAMBAR

	Hal
Gambar 1. Struktur Bangun Asam Tannin.....	11
Gambar 2. Struktur Bangun Asam Gallat	13
Gambar 3. <i>Aspergillus niger</i>	14
Gambar 4. Struktur Morfologi <i>Aspergillus niger</i>	15
Gambar 5. Diagram Alir Produksi Enzim Tannase	24
Gambar 6. Aktivitas Enzim Tannase Kasar yang Terbentuk Selama Masa Fermentasi.....	25
Gambar 7. Nilai pH Filtrat Media Fermentasi Selama Pembentukan Enzim Tannase	27
Gambar 8. Kadar Protein Terlarut Filtrat Media Fermentasi Selama Produksi Enzim Tannase.....	29
Gambar 9. Penurunan Kadar Tannin Filtrat Media Selama Produksi Enzim Tannase	31

DAFTAR LAMPIRAN

	Hal
Lampiran 1. Kurva Standart Aktivitas Enzim Tannase.....	37
Lampiran 2 Kurva Standart Kadar Protein Terlarut Metode Lowry dengan BSA (<i>Bovine Serum Albumin</i>).....	38
Lampiran 3. Kurva Standart Kadar Tannin	39
Lampiran 4. Data Pengamatan Aktivitas Enzim Tannase	40
Lampiran 5. Data Pengamatan pH Filtrat Media Fermentasi	40
Lampiran 6. Data Pengamatan Kadar Protein Terlarut Filtrat Media Fermentasi.....	41
Lampiran 7. Data Pengamatan Kadar Tannin Sisa Filtrat Media Fermentasi	41
Lampiran 8. Cara Pembuatan Reagen Mix Lowry.....	42
Lampiran 9. Contoh Perhitungan yang Digunakan	42

Akhmad Munir (001710101014) Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember “**Karakteristik Pembentukan Enzim Tannase oleh *Aspergillus niger* Secara Fermentasi Kultur Terendam (*Submerged Fermentation*)**”, Ir. Giyarto, MSc., Ir. Mukhammad Fauzi, MSi, Ir. Susijahadi, MS.

RINGKASAN

Tannase merupakan jenis enzim yang spesifik menghidrolisa asam tannin menjadi glukosa dan asam gallat. Enzim ini banyak dibutuhkan dalam industri penyamakan kulit dan produksi asam gallat, yang sangat banyak digunakan dalam industri farmasi serta industri teh instan. Namun produksi jenis enzim ini belum banyak dilakukan secara besar. Secara alami enzim ini dapat diproduksi oleh kelompok mikrobial tanah salah satunya adalah *Aspergillus niger*. Jenis kapang ini mampu memanfaatkan tannin sebagai sumber karbon dimana senyawa tersebut keberadaannya dalam tanaman sebagai zat *recalcitrant* yang dapat menurunkan daya cerna protein. Oleh karena itu informasi tentang bagaimana enzim tannase itu dihasilkan sangat diperlukan, termasuk tipe fermentasi yang dapat digunakan.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui karakteristik pembentukan enzim tannase oleh *Aspergillus niger* secara fermentasi kultur terendam (*submerged fermentation*). Penelitian dilakukan dengan menumbuhkan *Aspergillus niger* pada media fermentasi kultur terendam dengan menggunakan sumber karbon utama tannin yang kemudian diamati selama masa inkubasi 0, 2, 4, 6, 8, dan 10 hari. Karakteristik pembentukan enzim tannase yang diamati meliputi aktivitas enzim tannase, perubahan pH, kadar protein terlarut dan kadar tannin sisa pada media fermentasi selama masa inkubasi.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa enzim tannase dapat dihasilkan dari *Aspergillus niger* secara *Submerged Fermentation*. Masa inkubasi yang baik untuk memproduksi enzim adalah antara 2 sampai 6 hari dengan aktivitas enzim antara 1,320 sampai 1,439 μmol asam gallat/ml enzim/menit ; perubahan pH media fermentasi antara 4,04 sampai 4,21 ; peningkatan kadar protein terlarut antara 7,92 sampai 33,15 mg/ml, dan penurunan kadar tannin antara 2,40 mg/ml-0,46 mg/ml.

I. PENDAHULUAN



1.1 Latar Belakang

Enzim merupakan protein yang berfungsi sebagai katalisator organik atau biokatalisator yang dihasilkan oleh sel. Enzim telah diproduksi secara komersial sebelum tahun 1900 dan saat ini telah dikenal dan dimanfaatkan lebih dari 20 jenis enzim untuk menunjang kebutuhan industri, baik industri pangan, sandang, farmasi, bahan kimia, hingga untuk pengendalian lingkungan (Suharto, 1995). Setiap tahun tidak kurang dari USD 160 juta dikeluarkan oleh industri pangan dan industri deterjen (sabun cuci) untuk pembelian enzim (Winarno, 2002).

Pemanfaatan enzim dalam dunia industri mempunyai keuntungan, antara lain dapat mengurangi biaya produksi dan mengurangi kekomplekkan proses produksi (Suharto, 1995). Sebagai biokatalisator maka enzim dapat mempercepat reaksi, tetapi enzim itu sendiri tidak ikut bereaksi. Beberapa jenis enzim yang penting dalam industri antara lain: enzim hidrolase, protease, katalase, laktase, lipase, selulase dan lain sebagainya (Winarno, 2002). Namun saat ini jenis enzim yang diproduksi dalam skala besar masih didominasi oleh enzim pangan dan industri deterjen.

Salah satu jenis enzim yang belum banyak diproduksi secara besar adalah enzim tannase. Tannase spesifik menghidrolisa senyawa tanin menjadi asam gallat dan glukosa. Enzim ini banyak dibutuhkan dalam industri penyamakan kulit dan produksi asam gallat, yang sangat banyak digunakan dalam industri farmasi, serta industri teh instan. Dan dalam pengendalian lingkungan digunakan sebagai pendegradasi senyawa tannin yang terdapat dalam bahan limbah hasil industri pertanian, seperti upaya penanganan dan pemanfaatan limbah industri kopi.

Secara alami enzim tannase dapat diproduksi oleh kelompok mikrobia. Hal ini disebabkan senyawa tannin merupakan salah satu kelompok senyawa anti-nutrisi yang banyak terkandung dalam limbah hasil pertanian. Banyak jenis mikrobia yang diketahui dapat menghasilkan enzim tannase, diantaranya *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, bakteri, dan khamir. Spesies dari genus

Aspergillus diketahui terdapat dimana-mana dan hampir dapat tumbuh pada semua substrat.

Tannin merupakan senyawa *recalcitrant* (anti nutrisi) yang banyak terdapat pada beberapa jenis tanaman seperti teh, kopi, pisang dan sebagainya. Tannin terdiri atas kelompok senyawa yang dapat larut dan atau yang terikat. Umumnya tannin larut dalam air dan bila teruraikan akan dihasilkan molekul glukosa dan asam gallat.

Sebagai senyawa *recalcitrant*, keberadaannya dalam suatu bahan hasil pertanian dapat membatasi penggunaannya, seperti pada kulit buah kopi yang digunakan sebagai bahan pakan ternak. Hal ini disebabkan senyawa tersebut mengakibatkan rendahnya daya cerna hewan yang mengkonsumsinya. Disamping itu juga dapat menyebabkan pencemaran lingkungan. Namun di sisi lain senyawa tannin dimungkinkan dapat didayagunakan sebagai sumber karbon (substrat) bagi mikrobia yang menghasilkan enzim tannase.

Dalam menghasilkan enzim umumnya dilakukan proses fermentasi baik menggunakan media bentuk padat (*solid state fermentation* = SSF) atau fermentasi media cair (*submerged fermentation* = SmF). Untuk fermentasi dengan menggunakan kapang lebih banyak dilakukan dalam media padat. Penggunaan media padat mempunyai kelemahan utama adalah dibutuhkan ruang fermentasi yang luas, volume substrat besar dan efisiensi pemakaian bahan substrat rendah. Pada beberapa kasus penggunaan tipe SmF dimungkinkan dapat mengeliminasi kelemahan dari SSF. Untuk itu informasi atau pengetahuan tentang cara memproduksi enzim dengan menggunakan mikroba dalam berbagai tipe fermentasi sangat diperlukan, seperti dalam memproduksi enzim tannase.

Namun demikian, informasi tentang produksi enzim tannase dengan menggunakan senyawa tannin secara fermentasi kultur terendam (*submerged fermentation*) oleh kapang belum banyak diketahui. Hasil dari kajian ini akan bermanfaat sebagai dasar untuk menghasilkan enzim tannase dengan menggunakan media padat alami yang mengandung senyawa tannin, seperti kulit buah kopi. Potensi ini sangat didukung oleh jenis mikrobia yang digunakan yaitu

Aspergillus niger, yang diketahui mempunyai ketahanan hidup yang baik meskipun pada kondisi kurang optimal.

1.2 Rumusan Masalah

Tannin banyak terdapat dalam berbagai bentuk yang terdapat dalam bahan hasil pertanian. Tannin sebagai senyawa *recalcitrant* dapat menghambat proses pencernaan. Keterbatasan potensi penggunaan senyawa tannin dapat dikurangi dengan menguraikannya secara fermentasi dengan bantuan mikroorganisme.

Salah satu pemanfaatan senyawa tannin tersebut adalah menjadikan tannin sebagai media produksi enzim tannase dengan menggunakan *Aspergillus niger* secara *Submerged Fermentation*. Namun demikian, bagaimana karakteristik dari pembentukan enzim tannase tersebut masih belum banyak diketahui, termasuk pada waktu inkubasi mana produksi enzim yang optimal, dengan harapan akan diketahui lebih banyak informasi tentang karakter produksi enzim tannase menggunakan *Aspergillus niger*.

Berdasarkan uraian diatas, maka perlu dilakukan penelitian tentang karakteristik produksi enzim tannase oleh *Aspergillus niger* dengan menggunakan tipe fermentasi kultur terendam (*submerged fermentation*).

1.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui karakteristik produksi enzim tannase oleh *Aspergillus niger* secara fermentasi kultur terendam (*Submerged Fermentation* = SmF), dan mengetahui waktu inkubasi optimal sehingga dihasilkan aktivitas enzim yang tertinggi..

Sedangkan hasil dari penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat sebagai informasi pengembangan industri bioteknologi dan kemungkinan pengembangan lebih lanjut dalam memproduksi enzim tannase serta memberikan alternatif dasar teknologi penanganan bahan hasil pertanian yang mengandung senyawa anti nutrisi tannin secara fermentasi sehingga dapat mengurangi pencemaran lingkungan.



II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Enzim

Enzim merupakan protein yang berfungsi sebagai katalisator organik atau biokatalisator yang dihasilkan oleh sel. Enzim secara umum dapat dihasilkan oleh beberapa macam bakteri, kapang, sel tanaman dan hewan. Sebagai biokatalisator maka enzim dapat mempercepat reaksi, tetapi enzim itu sendiri tidak ikut bereaksi (Winamo, 1983). Enzim berasal dari kata Yunani (*En* = dalam dan *Zym* = bahan adonan roti) yang berarti *in yeast* atau yang terdapat dalam ragi (Toha, 2001).

2.1.1 Produksi Enzim

Pada umumnya enzim berdasarkan letak enzim yang dihasilkan dibedakan menjadi 2 yaitu intraseluler dan ekstraseluler.

Enzim intraseluler adalah enzim yang aktivitasnya berada dalam sel sehingga dalam proses isolasi enzim intraseluler dilakukan dengan cara: pemisahan sel dengan cairan fermentasi, penghancuran atau kerusakan dinding sel dan pemisahan enzim dengan bagian-bagian sel lain yang ikut terekstraksi. Beberapa enzim intraseluler kemungkinan terdapat pada bagian periplasmik sel dan hampir semua menyerang substrat yang mempunyai berat molekul rendah (Rahayu, 1991)

Lebih lanjut Rahayu (1991) menerangkan bahwa enzim intraseluler dapat dibedakan atas dua kategori yaitu: a) enzim yang mempunyai peranan penting dalam proses metabolisme untuk pertumbuhan sel yang biasanya dihasilkan dalam jumlah besar dan b) enzim yang dihasilkan dalam jumlah kecil pada bagian periplasmik sel.

Sedangkan enzim ekstraseluler adalah enzim yang aktivitasnya berada di luar sel. Hampir semua enzim ekstraseluler yang diproduksi tergolong dalam kelompok enzim hidrolase, yang dapat menyerang substrat dengan berat molekul yang lebih besar. Produksi enzim ekstraseluler memerlukan senyawa polimer

sebagai inducer baik yang diperlukan untuk biosintesa maupun untuk sekresi enzim.

Umumnya enzim ekstraseluler yang diproduksi mempunyai fungsi fisiologis sebagai penghasil nutrisi dari polimer-polimer biologik, yang dapat digunakan untuk pertumbuhan sel. Enzim ekstraseluler yang telah dikeluarkan dari sel tidak dapat dikendalikan oleh sel dan biasanya dihasilkan dalam jumlah besar. Enzim yang diproduksi secara fermentasi substrat padat maupun semi padat dari kapang adalah enzim hidrolase ekstraseluler yang dapat dipisahkan hanya melalui filtrasi atau ultrafiltrasi (Rahayu, 1991).

2.1.2 Aktivitas Enzim

Di dalam reaksi enzimatik, enzim bekerja menaikkan kecepatan reaksi dengan menurunkan energi aktivasi. Energi aktivasi adalah energi yang dibutuhkan untuk mencapai konfigurasi aktif (*activated state*). Pada setiap reaksi enzimatik sebelum terbentuk suatu produk selalu dibentuk senyawa kompleks antara katalisator (enzim) dengan substrat, yang sering disebut kelompok enzim substrat.

Aktivasi enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya konsentrasi substrat dan enzim, pH, kelembaban, adanya zat penghambat (inhibitor), adanya zat induksi (induktor). Pada hakekatnya segala sesuatu yang dapat mempengaruhi struktur tersier protein enzim akan dapat mempengaruhi laju reaksi enzim. Diantara beberapa faktor tersebut yang paling berpengaruh adalah suhu dan pH (Page, 1997).

Berdasarkan persetujuan internasional, bahwa 1 unit aktifitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menyebabkan perubahan 1 μmol (10^{-6} mol) substrat per menit pada 25°C dalam keadaan pengukuran optimal (Lehninger, 1982).

2.1.2.1 Pengaruh Suhu dan pH Terhadap Aktifitas Enzim

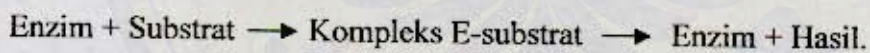
Menurut Page (1997), pengaruh reaksi sebagian besar naik dengan naiknya suhu sampai batas tertentu. Tiap naik 10°C maka kecepatan reaksinya naik dua

kali. Suhu mempunyai dua pengaruh yang saling berlawanan terhadap aktifitas enzim. Pertama naiknya suhu akan menaikkan aktivitas enzim sebaliknya juga mendenaturasi enzim. Sedangkan Kuswanto (1988) berpendapat banyak enzim yang berfungsi optimal dalam batas antara 35 – 37°C.

Secara umum kebanyakan enzim mampu aktif pada kisaran pH 7, namun beberapa enzim mempunyai aktifitas maksimal pada pH tinggi atau rendah. Hal ini tergantung pada keadaan bekerjanya enzim. Enzim di dalam pH yang ekstrem akan menjadi tidak aktif (Page, 1997). Menurut Palezar (1986), setiap enzim yang dihasilkan oleh sel memiliki pH optimal bagi aktifitas dan produksinya.

2.1.2.2 Pengaruh Konsentrasi Enzim dan Substrat terhadap Aktifitas Enzim

Akibat konsentrasi enzim terhadap laju suatu reaksi yang dikatalisasikan oleh enzim akan memberikan gambaran laju peningkatan yang linear dengan bertambahnya konsentrasi enzim selama konsentrasi enzim jauh lebih sedikit daripada substrat. Konsentrasi substratnya berpengaruh terhadap aktifitas berbagai enzim. Laju reaksi yang dikatalis mula-mula mengalami peningkatan dengan bertambahnya konsentrasi substrat. Dalam hal reaksi yang sebelum reaksi kimia yang menyangkut substrat berlangsung. Hal ini sesuai dengan bentuk persamaan reaksi enzimatik umum, sebagai berikut (Page, 1997):



2.2 Enzim Tannase

Enzim tannase (*tannin acil hydrolase*) mampu mengkatalisis hidrolisa tannin. Enzim ini dikenal karena kerjanya yang spesifik dalam menghidrolisa senyawa tannin sehingga disebut dengan tannase. Enzim tannase menghidrolisa asam tannat menghasilkan glukosa dan asam gallat (Libuchi *et al.*, 1972 dan Bradoo *et al.*, 1997), dengan menyerang ikatan ester antara molekul gula dan asam gallat (Bajpai *et al.*, 1997). Pada umumnya tannase adalah suatu protein asam dengan pH dan suhu optimal sekitar 5,5 dan 30°C, memiliki berat molekul yang

bervariasi antara 186.000 sampai 300.000 dalton serta kebanyakan dihasilkan secara ekstraseluler atau diekskresikan ke luar sel (Bradoo *et. al.*, 1996).

Tannase banyak digunakan secara luas dalam pengolahan teh instan, pembuatan wine, produksi asam gallat dan bahan tinambah pakan (Lekha and Lonsane, 1997) serta memiliki potensi untuk digunakan dalam industri makanan, farmasi dan obat-obatan (Descamps and Lebeebaut, 1984).

2.3 Fermentasi

Kata fermentasi pada awalnya berasal dari bahasa latin *fervere* yang berarti " mendidih ". Mendidih di sini merupakan akibat dari aktivitas khamir pada sari buah-buahan atau pada biji malt, dimana buih yang terbentuk merupakan gelembung karbondioksida hasil katabolisme anaerobik dari gula-gula yang ada dalam sari buah.

Pada awalnya, kata fermentasi memiliki makna yang berlainan bagi para ahli biokimia dan ahli mikrobiologi industri. Bagi para ahli biokimia, fermentasi berarti pembentukan energi melalui proses katabolisme senyawa organik, sedangkan bagi ahli mikrobiologi industri berarti suatu proses untuk menghasilkan suatu produk dengan memanfaatkan kultur mikroorganisme.

Proses fermentasi dapat diklasifikasikan menjadi empat grup besar yaitu : proses fermentasi yang menghasilkan produk sel mikroorganisme (biomassa), proses fermentasi yang menghasilkan produk enzim mikroorganisme, proses fermentasi yang menghasilkan produk metabolit mikroorganisme, dan proses fermentasi yang memodifikasi suatu senyawa yang ditambahkan dalam proses fermentasi menjadi senyawa lain (Suwasono, dkk. 2000). Proses produksi tannase sendiri merupakan salah satu bentuk proses fermentasi yang masuk dalam grup yang kedua karena dalam proses tersebut nantinya akan dihasilkan suatu produk enzim mikroorganisme yang berupa enzim yaitu tannase.

2.3.1 Media Fermentasi

Formulasi media merupakan tahapan yang sangat penting bagi semua proses fermentasi berbagai skala. Menurut Suwasono,dkk (2000) kandungan

media harus memenuhi kebutuhan dasar bagi pembentukan sel biomassa dan produk sehingga media harus mampu mensuplai energi bagi proses biosintesa dan pemeliharaan sel. Formulasi media biasanya dilakukan menggunakan sistem stokiometri untuk pertumbuhan dan pembentukan produk.

Sumber C (energi) + Sumber N + Komponen lain \longrightarrow Sel biomassa + Produk + CO_2 + H_2O + Panas.

Pengetahuan tentang komposisi dasar setiap unsur mikroorganisme harus diketahui, termasuk C, H, O, N, S, P, dan K serta Mg. Hal ini dapat memudahkan dalam menghitung jumlah minimal dari setiap komponen yang harus ada dalam sebuah resep media awal. Sejumlah kecil unsur lainnya (*trace element*) mungkin juga diperlukan dalam jumlah yang sangat kecil seperti Fe, Zn, Cu, Mn, Co, Mo, dan B.

Menurut jenis medianya proses fermentasi dibagi menjadi beberapa golongan yaitu fermentasi padat, media semi padat dan media cair. Fermentasi padat merupakan proses fermentasi yang substratnya tidak larut dan tidak mengandung air bebas tetapi cukup banyak mengandung air untuk keperluan mikrobia. Sedangkan fermentasi media cair adalah proses fermentasi yang substratnya larut atau tersuspensi di dalam fase cair (Chalal, 1985).

Pemilihan media fermentasi yang tepat adalah faktor kritis dalam media produksi tannase. Dalam hal ini dibutuhkan defisiensi nutrisi logam-logam seperti Mn, Fe, Zn, Cu, dan Fosfat. Efek-efek yang ditimbulkan oleh logam-logam ini saling terkait sedemikian hingga konsentrasi yang tepat dari suatu logam bergantung pada konsentrasi logam-logam lainnya yang tergabung dalam media. Amonium nitrat (NH_4NO_3) Magnesium Sulfat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) dan Kalium Fosfat (KH_2PO_4) biasanya ditambahkan pada media cair (Said, 1987).

Menurut Suwasono, dkk (2000), dalam banyak media fermentasi unsur Mg, P, K, S, Ca dan Cl merupakan unsur esensial dan biasanya ditambahkan dalam jumlah yang lebih besar dari unsur lainnya. Unsur lainnya seperti Co, Cu, Fe, Mo, Mn, juga bersifat penting namun hanya tersedia dalam jumlah yang sangat kecil seperti terlihat pada **Tabel 1**.

Tabel 1. Kisaran konsentrasi mineral yang sering ditambahkan kedalam media fermentasi.

Komponen	Konsentrasi (g/ L)
KH_2PO_4	1,0 – 4,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,25 – 3,0
KCl	0,5 – 12,0
CaCO_3	5,0 – 17,0
$\text{FeSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0,01 – 0,1
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,01 – 0,1
$\text{CaSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,003 – 0,01
$\text{ZnSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$	0,1 – 1
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,01 – 0,1

2.3.2 Tipe Fermentasi Produksi Enzim

Secara komersial tipe produksi enzim yang sering digunakan adalah fermentasi substrat padat (*Solid State Fermentation = SSF*) dan fermentasi kondisi substrat terendam (*Submerged Fermentation = SmF*) (Lekha and Lonsane, 1997). Sistem fermentasi yang cocok untuk proses pengkomposan dan pakan ternak dari limbah padat adalah fermentasi keadaan substrat padat (Murthy, *et. al*, 1993).

a. SSF (*Solid State Fermentation*)

Solid state fermentation didefinisikan sebagai suatu proses dimana mikrobia tumbuh pada substansi padat dalam keadaan tanpa atau mendekati tanpa adanya air bebas (Cannel and Moo-Young, 1980). Kemudian definisi lebih tepat telah diungkapkan oleh Aidoo. *et al.*, (1982), bahwa SSF adalah suatu proses fermentasi yang berada pada suatu substrat padat atau semi padat (SmF) atau yang terjadi dalam suatu sistem nutrisi sediaan.

Pada sistem SSF mikroba tumbuh dan pembentukan produk fermentasi terjadi pada permukaan bahan padatan hampir tanpa adanya air bebas (Sargantanis, *et. al.*, 1993). Beberapa tipe bioreaktor SSF yang umum digunakan dalam industri antara lain tipe rak, drum dan sebagainya (Murthy, *et. Al.*, 1993).

SSF juga telah digunakan dalam sistem labu statik maupun sistem labu goyang (Lindenfelser and Cilger, 1975).

Proses fermentasi tipe SSF telah banyak digunakan luas untuk mengeksploitasi pada produksi enzim yang dihasilkan oleh kelompok kapang (Lonsane *et.al.*, 1985). Selain itu juga digunakan untuk meningkatkan kandungan protein, memproduksi metabolit sekunder dan spora kapang atau inokulum (Christen, *et. al.*, 1994). Kelebihan fermentasi tipe ini adalah lebih mudahnya dalam mengontrol sporulasi kapang. Karena bahan padat merupakan habitat alami dari kapang, pengkonservasian dan pengontrolan secara morfologi dari siklus kapang lebih mudah (Viniegra- Gonzalez, 1997).

Menurut Hesseltine (1977) keuntungan dari proses fermentasi tipe SSF adalah media cukup sederhana, tidak memerlukan tempat yang luas, menggunakan mikroba alami, resiko kontaminasi rendah, kondisi fermentasi mirip yang terjadi di alam, penanganan produk mudah, proses aerasi mudah dan produknya merupakan produk langsung dapat digunakan. Tetapi proses fermentasi jenis ini mempunyai kelemahan seperti: terbatasnya jumlah mikroba, *heat transfer* terbatas, masalah teknis pengawasan, masalah transfer massa dan proses inokulasi mikrobanya.

Namun cara SSF masih akan menjadi pilihan untuk aplikasi yang berorientasi bisnis (*profit-economic*), seperti produksi makanan fermentasi, enzim, asam organik dan senyawa flavor. Penerapan SSF dalam bidang sosial ekonomi termasuk pada produksi kompos dan pakan dari limbah padat (Ramana Murthy *et. al.*, 1993).

Dalam proses fermentasi SSF terjadi tiga fase yaitu: fase matriks padatan (organik, mineral atau sintesis), fase cairan terikat oleh bahan padat dan fase gas. Mikroba berada dalam sela-sela diantara fase-fase tersebut (Durand, *et. al.*, 1997).

b. SmF (*Submerged Fermentation*)

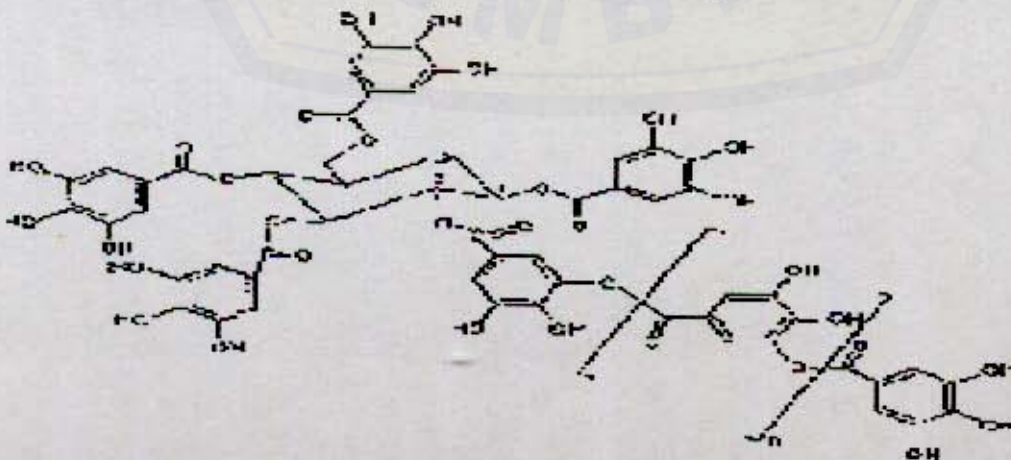
Tipe *Submerged Fermentation* (Fermentasi Kultur Terendam) didefinisikan sebagai proses fermentasi yang dilakukan pada substrat dalam keadaan terendam atau semua nutrisi yang dibutuhkan mikrobia tersedia dalam

keadaan terendam, dimana keadaan tersebut menguntungkan mikrobia dalam pemenuhan kebutuhan nutrisi (Aidoo, *et al.*, 1982).

Menurut Le Mense, *et al.*, (1994) beberapa zat antibiotik dapat diproduksi dengan menggunakan fermentasi kultur terendam dalam bentuk yang sederhana. Pada fermentasi tipe SmF semua material yang dibutuhkan dilarutkannya dalam suatu wadah kemudian dilakukan sterilisasi, namun demikian proses tersebut harus diperhatikan sesuai dengan karakteristik masing-masing bahan. Selain itu pada media harus dilakukan pengadukan. Hal tersebut agar diperoleh suatu media dalam kondisi aerobik dimana kondisi tersebut dibutuhkan dalam proses memproduksi enzim. Sedangkan beberapa keuntungan yang dapat diperoleh dengan penggunaan tipe fermentasi Smf adalah jumlah inokulum yang diperlukan relatif sedikit bila dibandingkan dengan tipe SSF, serta relatif mudah dalam pengontrolan kondisi lingkungan pertumbuhan mikrobia.

2.4 Tannin

Secara kimia tannin (gallotannic acid) terdiri atas dua jenis yaitu tannin dapat larut (*hydrosable tannins*) dan tannin terikat (*condensed tannins*) (Neville and Webster, 1995). Sedangkan Shahidi dan Naczk (1995) membagi tannin menjadi tannin dapat larut dan proantho-cyanidin. Tannin yang dapat larut, seperti gallotannin adalah polimer dengan unit dasar 3,4,5-*trihydroxybenzoic acid* (asam gallat) yang mengikat molekul gula dengan ikatan ester (Neville and Webster, 1995). Adapun rumus bangun asam tannin dapat dilihat pada **Gambar 1**.



Gambar 1. Struktur Bangun Asam Tannin (Lekha and Lonsane, 1997)

Tannin mempunyai berat molekul yang bervariasi dari 500 sampai lebih dari 2000. Umumnya tannin larut dalam air (Haslam, 1989) dan bila teruraikan akan dihasilkan glukosa dan asam gallat (Neville and Webster, 1995).

Tannin terdiri atas berbagai penyusun, dimana tannin secara umum mempunyai rumus empirik $C_{76}H_{52}O_{46}$. Dalam bentuk padat asam tannin berwarna kuning pucat; yang diyakini merupakan glukosida yang masing-masing merupakan kelompok yang terdiri dari ikatan *hydroxyl* yang terdiri dari glukosa dan asam gallat. Tannin dapat juga digunakan untuk penyamakan kulit hewan dalam proses pembuatan kulit. Dimana tannin tersebut nantinya akan menguraikan komposisi protein tertentu yang merupakan komposisi penyusun dalam kulit (Anonim, 2004)

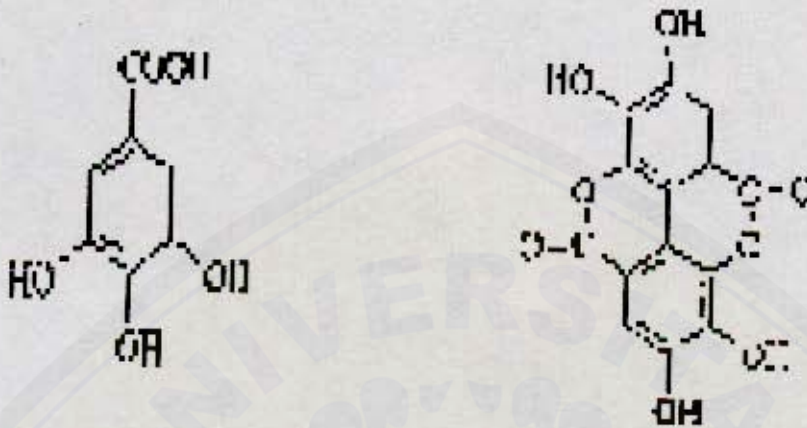
Asam tannin atau asam gallotannat, produk astringent (zat pengerut) sayuran ditemukan dalam banyak varietas tanaman, seperti *oak*, *hemlock*, *chestnut*, dan *mangrove*; *sumacs*; dan sebagainya. Tannin juga terdapat dalam teh, kopi, dan *walnuts* (Harvey, 1998). Umpamanya Kandungan tannin dari pulp kopi berkisar antara 1,80 sampai 8,56 % berat kering.

Banyak cara telah dilakukan untuk mengeliminasi bahan anti nutrisi baik dengan cara mekanik maupun khemis seperti ekstraksi cair, ekstraksi alkalin, penggilingan dan dengan panas. Namun cara-cara tersebut hanya mampu mereduksi sebagian kecil senyawa anti fisiologis itu (Gomes, 1979). Cara yang bersifat mikrobiologis atau enzimatik rupanya memberikan alternatif pemecahan yang lebih efisien. Disamping lebih efisien juga akan diperoleh produk lain yang bernilai ekonomi tinggi, seperti enzim dan metabolit lainnya. Juga dapat mengurangi pencemaran lingkungan.

2.5 Asam Gallat

Asam gallat (*3,4,5-trihydroxybenzoic acid*, $C_6H_2(OH)_3CO_2H$), merupakan kelompok asam organik yang berbentuk kristal bening, ditemukan pada *gallnuts*, *sumach*, daun teh, kulit pohon oak, dan tanaman lainnya, baik dalam bentuk bebas maupun sebagai bagian dari molekul tannin. Bila asam gallat terdapat dalam grup hidroksil dan sebuah grup asam karbosiklis dalam molekul yang sama, maka 2

molekul tersebut dapat bereaksi satu dengan yang lainnya untuk membentuk suatu ester, *digallic acid*. Struktur bangun asam gallat terlihat pada Gambar 2.



Asam Gallat (*Gallic Acid*)

Asam Ellagic (*Ellagic Acid*)

Gambar 2. Struktur Bangun Asam Gallat (*gallic Acid*) (Lemmens and Wulijarni, 1991)

Asam gallat diperoleh dengan menghidrolisis asam tannat menggunakan asam sulfat. Jika dipanaskan di atas 220°C , asam gallat akan kehilangan karbondioksida untuk membentuk *pyrogallol*, atau 1,2,3-trihydroxybenzene, $\text{C}_6\text{H}_3(\text{OH})_3$, yang mana banyak digunakan dalam produksi *azo dyes* dan pengembang fotografik dan dalam laboratorium untuk penyerap oksigen (Anonim, 2004)

2.6 *Aspergillus niger*

Beberapa jenis mikroorganisme telah diketahui dapat mendegradasi senyawa tannin sebagai sumber karbon, baik dari kelompok fungi, bakteri atau khamir. Dari 50 fungi yang telah dilakukan skrining diketahui bahwa mikroba tersebut mampu menghasilkan enzim tannase secara ekstraseluler, di antaranya adalah *Aspergillus niger* dan *Aspergillus japonicus*.

Spesies dari genus *Aspergillus* diketahui terdapat dimana-mana dan hampir dapat tumbuh pada semua substrat. Taksonomi *Aspergillus* saat ini menampilkan kira-kira 150 spesies dengan 30 spesies diantaranya telah didefinisikan. Beberapa spesies tertentu dari *Aspergillus* banyak dimanfaatkan

untuk berbagai keperluan manusia antara lain jenis *Aspergillus niger* (Pitt and Hockey, 1997).

Menurut Wibowo (1991) *Aspergillus niger* merupakan golongan kapang dengan ukuran 50-75 μm yang pada umumnya dicirikan dengan pembentukan konidiofora (pembentukan spora tanpa pelindung) dengan stupa yang berdinding tebal dan ujung membesar yang disebut vesikel. Vesikel atau vesikula yang dilapisi oleh phialida atau metula dan phialida, dengan ciri semua phialida dibentuk secara bersamaan dan akan membentuk konidia setelah matang.

Sedangkan menurut Dwidjoseputro (1987), *Aspergillus niger* digolongkan ke dalam phylum *Eumophyta* dalam kelas *Ascomycetes*. Selengkapnya taksonomi *Aspergillus niger* adalah :

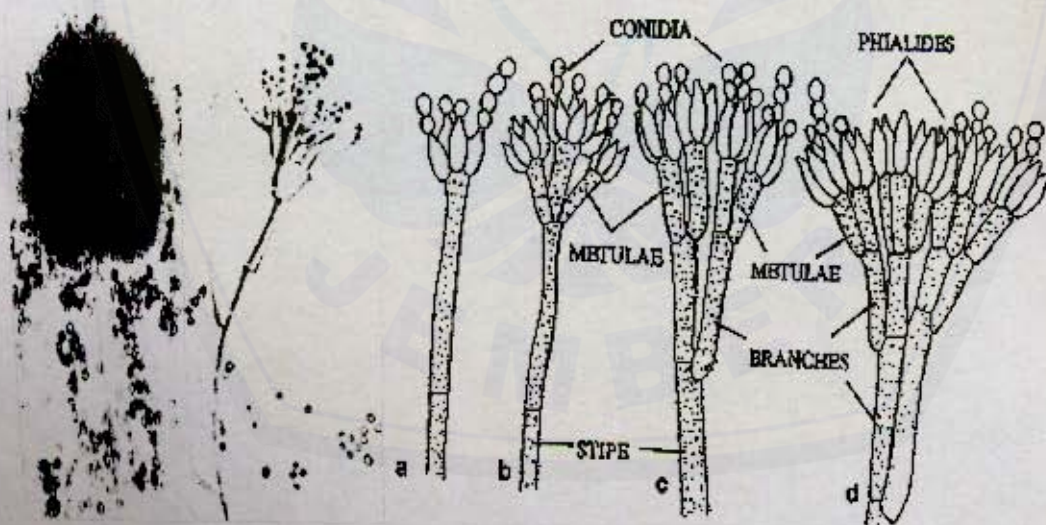
Kerajaan	: <i>Plantae</i>
Divisi	: <i>Mycota</i>
Sub divisi	: <i>Eumocytina</i>
Klas	: <i>Ascomycetes</i>
Ordo	: <i>Eritiales</i>
Family	: <i>Eurithiaceae</i>
Genus	: <i>Aspergillus</i>
Spesies	: <i>Aspergillus niger</i>



Gambar 3. *Aspergillus niger* (Anonim, 2004)

Kapang ini mempunyai misellium yang bersekat-sekat. Pembiakan secara vegetatif dilakukan dengan konidia sedangkan pembiakan secara generatif dilakukan oleh spora yang dibentuk dalam askus. Beberapa askus terdapat dalam suatu bagian tubuh buah pada umumnya askus itu suatu ujung hifa yang mengandung 4-8 buah spora seperti yang terlihat pada **Gambar 3**. Kapang ini banyak terdapat dimana sebagai saprofit. Koloni yang sudah menghasilkan spora warnanya menjadi coklat kehitaman. Misellium yang semula berwarna putih sudah tidak nampak lagi (Dwidjoseputro, 1987).

Pertumbuhan koloni *Aspergillus niger* menutup seluruh permukaan media dengan kepala konodia berwarna hitam, hijau kehitaman atau coklat kehitaman. Konidiafor tumbuh dari hifa permukaan memiliki panjang 1,0 – 3,0 μm dengan vesikula berbentuk glukosa, permukaan halus atau pada beberapa spesies terdapat granula atau bintik-bintik berdinding tebal berwarna coklat (Sudarmadji, 1989). Struktur morfologi *Aspergillus niger* dapat dilihat pada **Gambar 4**.



Gambar 4. Struktur Morfologi *Aspergillus niger*

Pertumbuhan *Aspergillus niger* memerlukan unsur-unsur utama seperti, karbon, fosfor, dan sulfur serta unsur-unsur pembantu yang dibutuhkan dalam jumlah kecil. *Aspergillus niger* bersifat aerobik sehingga dalam pertumbuhan memerlukan oksigen dalam jumlah yang cukup, sedangkan suhu untuk

pertumbuhan sekitar 25 - 35°C dan pH media sebesar 2,5 - 6,0 (Frazier and Weshoff, 1988).

Faktor-faktor yang berpengaruh terhadap pertumbuhan *Aspergillus niger* antara lain :

a. Suhu

Aspergillus niger seperti kebanyakan kapang termasuk dalam grup mesofilik, yaitu dapat tumbuh pada suhu pada umumnya antara 25 - 30°C. Suhu dibawah suhu minimal atau di atas suhu maksimal dapat mengakibatkan terjadi denaturasi enzim sehingga mikroorganismenya ini tidak dapat tumbuh dengan baik. *Aspergillus niger* ini juga tergolong xerofil dengan $A_w = 0,77$ (Pitt and Hockey, 1997)

Menurut Rahayu (1991) beberapa mikroorganismenya termasuk *Aspergillus niger* mempunyai suhu optimal yang berbeda dengan suhu optimal pembentukan enzim. Suhu pembentukan enzim secara ekstraseluler lebih rendah dibandingkan dengan suhu optimal pertumbuhannya.

Dalam metabolisme pertumbuhan kapang diperlukan sumber karbon yang cukup banyak. Pada umumnya sumber karbon diperoleh dari kelompok karbohidrat dan atau senyawa turunannya. Selain itu sebagian besar kapang biasanya baik tumbuh pada berbagai media padat (*Solid State Fermentation*) atau yang disingkat SSF (Judoamidjojo, 1990). Namun demikian untuk tujuan tertentu banyak juga kapang yang ditumbuhkan dalam media kultur terendam (*Submerged Fermentation* atau disingkat SmF).

b. Nilai. pH

Kegiatan fisiologis mikroorganismenya sangat dipengaruhi oleh aktivitas enzim dan aktifitas enzim dipengaruhi oleh pH substrat. Pitt dan Hockey (1997) menerangkan bahwa *Aspergillus niger* mempunyai kisaran pH 3 - 8,5, selama proses fermentasi pH pertumbuhan ini berpengaruh pada laju pertumbuhannya

2.7 Fermentasi Kapang

Faktor lingkungan sangat berpengaruh pada proses fermentasi menggunakan jamur sebagai pelaku fermentasi, seperti: bentuk sporulasi jamur, faktor pertumbuhan intrinsik dan ekstrinsik. Perbedaan kebiasaan jamur dalam kemampuannya mengkonsumsi substrat akan berpengaruh pada pertumbuhannya.

Kondisi pH substrat selama fermentasi akan mengalami perubahan sebagai hasil dari penggunaan nutrient selama pertumbuhan dan akibat akumulasi produk metabolit sekunder. Perubahan nilai pH dalam media tampaknya mempengaruhi kecepatan pertumbuhan jamur dan juga dapat memungkinkan terbentuknya metabolit sekunder tertentu (Bull and Trinci, 1977). Jamur cenderung untuk menggunakan kondisi lingkungan yang asam untuk aktivitas metaboliknya (seperti respirasi dan ekskresi).

Jamur membutuhkan air untuk mengambil nutrisi dan umumnya sangat tidak menyukai untuk kondisi yang sangat basah (cairan). Kadar air bahan padat merupakan faktor pembatas penting dari SSF. Kadar air harus dijaga tetap rendah sehingga udara dapat mudah mengisi ruangan dalam bahan (Bull and Trinci, 1977).

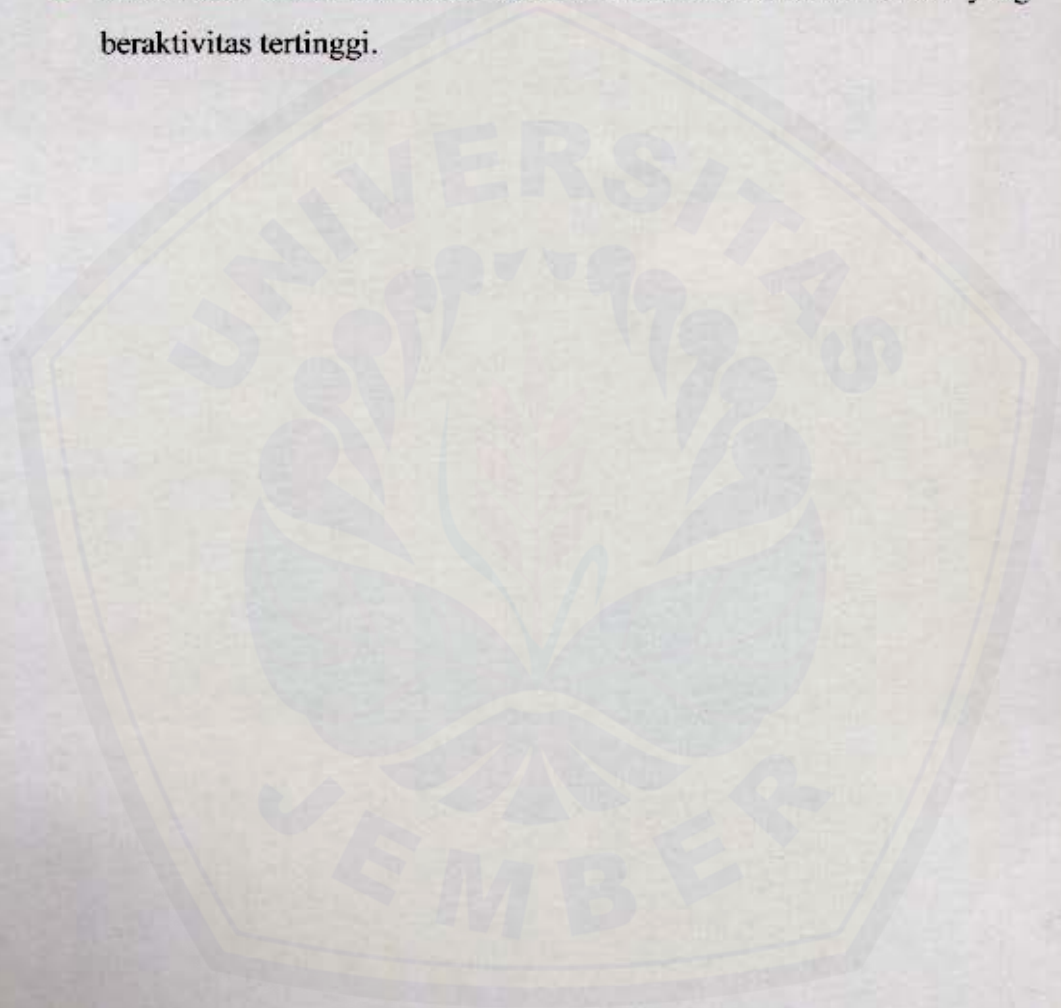
Satu faktor kritis dalam SSF (*Solid State Fermentation*) adalah aliran udara dalam media. Aerasi diperlukan untuk membantu penyediaan oksigen dan transfer panas. Kekurangan suplai oksigen selama pertumbuhan dapat mengakibatkan rendahnya kecepatan pertumbuhan miselia. Selain itu penurunan kesediaan oksigen dapat mendorong terjadinya akumulasi metabolit sekunder dalam media (Bull and Trinci, 1977). Neville dan Webster (1995) melaporkan bahwa enzim ekstraseluler mampu melakukan penetrasi kedalam substrat padat tetapi kedalaman dari penetrasi tersebut tergantung pada kecukupan aerasinya.

Konsentrasi nutrien dalam substrat menurun dengan nyata ketika kolonisasi berlangsung. Keadaan ini mempunyai dampak langsung pada kecepatan pertumbuhan jamur (Griffin, 1994). Umumnya jamur mempunyai afinitas yang tinggi terhadap nutrien esensial, tetapi keterbatasan nutrisi mengakibatkan menurunnya kecepatan pertumbuhan.

2.8 Hipotesa

Hipotesa yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperti tersebut di bawah ini :

1. Produksi enzim tannase oleh *Aspergillus niger* dapat dilakukan secara fermentasi kultur terendam (*Submerged Fermentation*).
2. Pada suatu lama fermentasi tertentu dihasilkan enzim tannase yang beraktivitas tertinggi.



III. BAHAN DAN METODE PENELITIAN



3.1 Bahan Dan Alat Penelitian

3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan dasar yang digunakan dalam penelitian ini adalah tannin dan isolat *Aspergillus niger* yang berasal dari koleksi Laboratorium Pengendalian Mutu, Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember.

Bahan kimia yang digunakan adalah glukosa, NaCl, Kalium Permanganat, H_2SO_4 , PDA, NaOH, NH_4NO_3 , KH_2PO_4 , $CaCl_2$, Buffer K-ptalat pH 5,5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, Membrane filter, alkohol, Larutan 0,2 % Tween 80 %, Aquadest.

3.1.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah, Spectrometer Spectonic 21 D Milton Ray, penangas air Cmere 2, water bath, neraca analitis Ohaus, shaker inkubator, botol film, termometer, pompa vakum, autoklaf, jarum ose, bunsen, haemocytometer, pH meter Jenway, Vortex Maxi-MiX tipe 16700, Magnetic stirrer SM 24 Stuart Scientific, shaker water bath, mikroskop, refrigerated centrifuge merk " Selecta " dan alat-alat gelas.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Pengendalian Mutu, Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember, pada bulan Februari hingga April 2004.

3.3 Metode Penelitian

Produksi enzim tannase dilakukan dengan menggunakan biakan *Aspergillus niger* dan substrat tannin yang ditambahkan larutan mineral-mineral dalam suatu proses fermentasi tipe kultur terendam (*submerged fermentation* / SmF). Kemudian media yang telah diinokulasikan dengan *Aspergillus niger*

diinkubasikan pada suhu 30 °C, selama 10 hari, dan dilakukan pengambilan sampel setiap 2 (dua) hari, yaitu hari ke-: 0, 2, 4, 6, 8, dan 10 hari. Selanjutnya dilakukan pengujian karakteristik enzim yang meliputi: aktivitas enzim tannase, pH, kadar tanin media, dan kadar protein enzim.

Hasil penelitian yang disajikan dalam bentuk tabel data dan grafik data yang meliputi: aktivitas enzim, pH, kadar tanin tersisa dan kadar protein terlarut dalam media fermentasi.

3.4 Pelaksanaan Penelitian

Penelitian dilaksanakan melalui beberapa tahap yaitu, persiapan bahan baku media, pembuatan media SmF (*Submerged Fermentation*) dan persiapan kultur *Aspergillus niger*, inokulasi, produksi enzim tannase, dan pengujian karakteristik enzim yang dihasilkan.

3.4.1 Tahapan persiapan bahan baku media

Tannin dipersiapkan sesuai dengan yang telah ditentukan, yaitu 0.25%, dan disterilkan dengan menggunakan penyaringan dengan membran filter yang berpori-pori 0,45 µm.

3.4.2 Tahapan pembuatan media

Mencampurkan mineral dengan komposisi 1% NH_4NO_3 , 0,5% KH_2PO_4 , 0,25% glukosa, 0,12% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,001% KCl, 0,002% $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,01% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,001 % $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ yang telah disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C, selama 15 menit sebanyak 15 mL dalam erlenmeyer 50 mL yang telah berisi substrat tannin, dan dikocok merata.

3.4.3 Persiapan kultur *Aspergillus niger*

Kultur *Aspergillus niger* diperbanyak pada media PDA dengan teknik agar miring. Goresan spora tersebut diinkubasikan selama 3 – 4 hari pada suhu 30°C.

Selanjutnya spora biakkan *Aspergillus niger* pada agar miring tersebut diperbanyak lagi dalam media PDA dengan metode taburan dalam erlenmeyer 50 ml selama 3 – 4 hari pada suhu 30°C (sebagai inokulan).

3.4.4 Inokulasi

Inokulan diperoleh dengan cara mensuspensikan spora dari setiap erlenmeyer 50 mL dengan 10 ml aquadest steril. Suspensi tersebut kemudian diambil 1,5 ml dan dimasukkan dalam media yang telah disiapkan.

3.4.5 Produksi enzim Tannase

Media yang telah diinokulasikan dengan spora *Aspergillus niger* selanjutnya diinkubasikan pada suhu kamar 28 – 30 °C di atas shaker dengan lama fermentasi sesuai dengan perlakuan yaitu 0, 2, 4, 6, 8, dan 10 hari. Setelah inkubasi selesai kemudian dilakukan separasi enzim dengan cara mengencerkan media fermentasi dengan larutan buffer phospat/ aquadest steril kemudian dilakukan penyaringan dan dihasilkan filtrat enzim tannase kasar. Filtrat enzim tannase kasar yang diperoleh, kemudian disentrifugasi dingin suhu 4°C dengan kecepatan 4000 rpm selama 20 menit yang selanjutnya dilakukan pengujian karakteristik yang meliputi aktivitas enzim, pH, kadar protein terlarut pada media dan kadar tanin sisa.

3.5 Prosedur Pengamatan

Pengamatan yang dilakukan terhadap sampel media fermentasi enzim tannase yang dihasilkan meliputi aktivitas enzim, pH, kadar protein dan kadar tannin tersisa.

3.5.1 Aktivitas Enzim (Bajpai, 1997)

Aktivitas enzim yang ada pada filtrat kasar enzim tannase diamati berdasarkan kandungan asam gallat yang dihasilkan dari hidrolisis senyawa tanin pada proses fermentasi oleh enzim tannase. Aktivitas enzim tersebut diamati dengan menggunakan reagen khusus yang mampu mengikat asam gallat yang ada pada larutan filtrat enzim kasar. 50 µl filtrat enzim kasar ditambah dengan 0,3 mM larutan asam tanin pada buffer asetat pH 5. Kemudian diinkubasikan selama 30 menit, setelah itu reaksi dihentikan dengan ditambahkan HCl 2M sebanyak 0,2 ml. tahapan ini dilakukan dengan pengulangan. Hasil hidrolisa tersebut di sentrifus selama 10 menit. Kemudian supernatan diambil sebanyak 100 µl dan

direaksikan dengan Rhodanine 150 μ l dan divortek. Setelah 5 menit campuran larutan tersebut ditambahkan dengan 2,25 ml KOH kemudian didiamkan selama 20 menit selanjutnya dibaca pada gelombang 520 nm. Untuk mengetahui besarnya aktivitas enzim yang dihasilkan pada filtrat enzim kasar dihitung dengan menggunakan persamaan kurva standart aktivitas enzim dimana penentuan besar aktivitas enzim berdasarkan konsentrasi asam gallat hasil hidrosilat enzimatis enzim tannase..

3.5.2 Nilai pH (Sudarmadji, 1997)

Pengukuran pH media dilakukan dengan menggunakan pH meter terhadap filtrat hasil penyaringan media fermentasi pembentukan enzim tannase untuk setiap waktu pengamatan.

3.5.3 Kadar Protein Terlarut(Sudarmadji, 1997)

Kadar protein yang ada pada filtrat enzim kasar diamati berdasarkan kadar protein terlarut dalam cairan media filtrat enzim tannase kasar. Kadar protein terlarut tersebut diamati dengan metode Lowry (Sudarmadji, 1997). 50 μ l filtrat enzim kasar ditambah dengan 250 μ l NaOH 2N, dipanaskan 10 menit, setelah dingin ditambahkan mix Lowry 2,5 ml, dibiarkan 10 menit selanjutnya ditambahkan pereaksi folin 250 μ l, divortex dan dibiarkan 30 menit berikutnya ditambahkan aquadest sebanyak 1.950 μ l dan dibaca absorbansinya pada 750 nm.

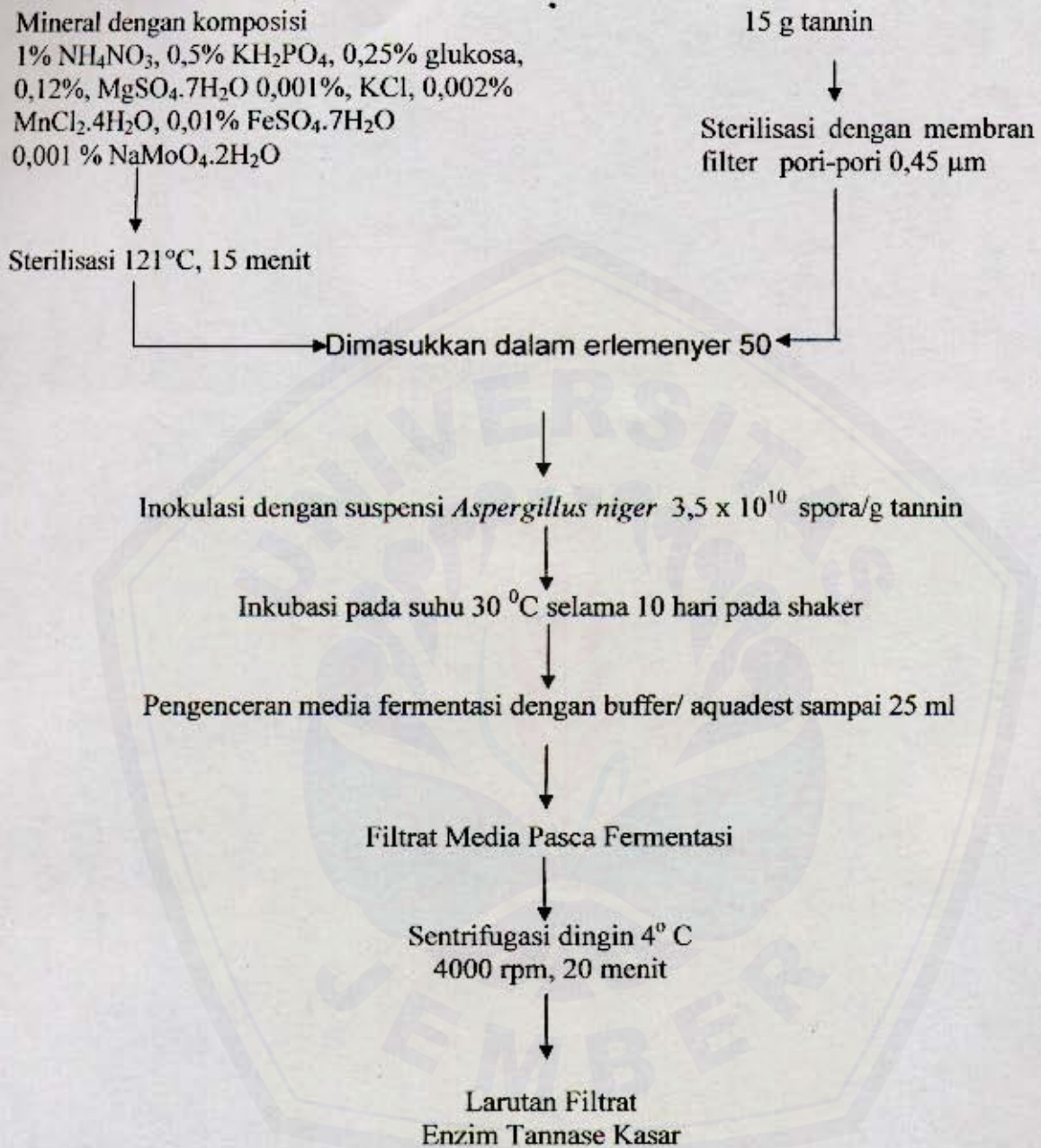
Untuk mengetahui kadar protein terlarutnya dihitung dengan persamaan kurva standar yang dibuat dari hubungan konsentrasi *BSA* dan absorbansi.

3.5.4 Kadar Tanin.(Waterman P.G, 1994)

Kadar tannin yang diamati yaitu kadar tannin yang ada dalam media , dimana nantinya dari perhitungan kadar tannin ini dapat diketahui seberapa besar kadar tannin yang digunakan sebagai substrat selama proses fermentasi berlangsung. 50 μ l filtrat media fermentasi diambil kemudian ditambahkan dengan 1 ml etanol dan aquades sebanyak 6,95 ml serta 0,5 ml folin. Kemudian dibiarkan selama 5 menit setelah itu ditambahkan NaCO_3 5 % dan divortex. Setelah 60 menit dibaca absorbannya pada panjang gelombang 725 nm. Kadar

tannin dapat yang ada pada media fermentasi dapat dihitung berdasarkan persamaan dari kurva standart.





Gambar 5. Diagram alir Produksi Enzim Tannase

V. KESIMPULAN DAN SARAN



5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian tentang karakteristik pembentukan enzim tannase oleh *Aspergillus niger* dengan menggunakan media kultur terendam atau *Submerged Fermentation* dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

- a. Enzim tannase dapat diproduksi oleh *Aspergillus niger* dengan menggunakan tannin sebagai sumber karbon secara kultur terendam atau *Submerged Fermentation*.
- b. Peningkatan masa inkubasi pada media kultur terendam (SmF) dalam pembentukan enzim tannase akan menurunkan aktivitas enzim, pH filtrat, tetapi meningkatkan kadar protein terlarut pada filtrat media fermentasi.
- c. Aktivitas enzim tannase dari *Aspergillus niger* yang dihasilkan secara *Submerged Fermentation* yang paling tinggi diperoleh pada lama fermentasi antara 2 sampai 6 hari, dimana aktivitas enzim mencapai 1,320 sampai 1,439 μmol asam gallat/ml./min., pH filtrat media fermentasi yang dihasilkan sebesar 4,04 sampai 4,21 dan dengan kadar protein terlarut tertinggi 81,07 mg/ml. dan pada media saat akhir masa inkubasi tersisa kadar tannin sebesar 0,04 mg/ml.

5.2 Saran

1. Untuk melengkapi data dan menyempurnakan data dari karakteristik pembentukan enzim tannase oleh *Aspergillus niger* menggunakan media terendam diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai kombinasi penggunaan dan pengaruh dari berbagai sumber karbon.
2. Untuk meningkatkan kecepatan pertumbuhan *Aspergillus niger* perlu ditambahkan suplemen sumber karbon yang mudah dikonsumsi untuk memacu pertumbuhan masa adaptasi. Selain itu kondisi kandungan air substrat juga perlu diperhatikan, agar tercipta kondisi lingkungan yang baik untuk pertumbuhan jamur.

3. Agar semakin jelas karakteristik •pembentukan enzim tannase oleh *Aspergillus niger* secara kultur terendam maka perlu diperkecil periode masa inkubasinya.
4. Untuk memperlengkap informasi tentang karakteristik pembentukan enzim tannase maka perlu dilakukan pengamatan jumlah biomassa yang dihasilkan agar dapat diamati parameter-parameter lainnya.
5. Agar semakin jelas karakteristik pembentukan enzim tannase maka dalam proses fermentasi dilakukan penambahan sumber karbon secara bertahap.



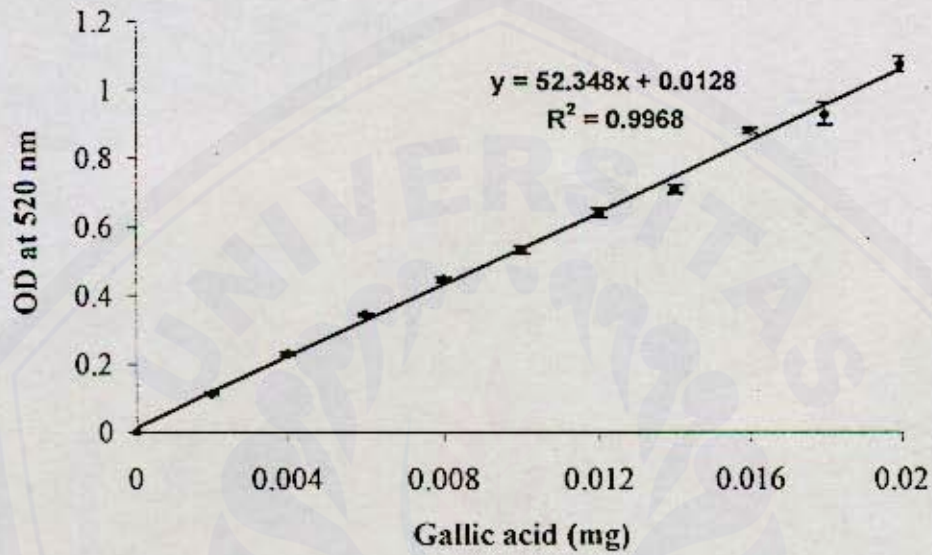
DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 2004, *Aspergillus niger*. <http://www.Mycology.ed>
- , 2004. *Columbia Encyclopedia*, sixth edition.
- Aidoo, K.E.R, Hendry and B.J.B. Wood. 1982. *Biotechnology Unit*. University of strathclyde, Glasgow, Scotland.
- Bajpai, B and S. Patil.1997. Induction of Tanin Acil Hydrolase (EC 3.1.1.20) Activity in Some Members of Fungi Imperfecti. *Enzyme and Microbial Technology*,20:612-614.
- Bradoo, S., R. Gupta and R.K Saxena. 1997. Parametric Optimation and Characterization of a Tannase from *Aspergillus japonicus*. *Process Biochemistry*, 32:135-139.
- Chalal, D.S 1985. *Solid State Fermentation with Trichoderma reesei for Selulose Production*. Appl. Environ. Microbiol. New York.
- Christian, W.F.K,1994. *Ghana Journal.Sciences*.31,15-37.
- Deschamps, A.M. dan J.M. Lebeault. 1984. Production of Gallic Acid from Tara Tanin by Bacterial Strains. *Biotechnology Letters*, 6:237-242.
- Dwidjoseputro, D. 1987. *Dasar-Dasar mikrobiologi*. Djambatan. Jakarta.
- Ellias, L.G. 1979. Chemical Composition of Coffe Berry By Product. In Coffe Pulp : *Composition, Tecnology and Utilization*. J.E. Braham and R. Bressani (Ed). Otawa : IDRC.
- Frazier, WC dan D.C.Westhoff, 1988, *Food Microbiology*, Edisi Keempat, McGraw Hill Book Co. Singapore.
- Harsanto, T. 2002. Laporan penelitian : *Produksi Enzim B-Galaktosidase Ekstraseluler dari Aspergillus niger dengan Subtrat Wheat Brand dan Wheat Pollard*. Jurusan Tekhnologi Hasil pertanian Fakultas Teknologi Pertanian. Universitas Jember. Jember.
- Havey, W. dan U.L. John. 1898. *Brazilium journal of microbiology*. Vol.32 no.1 Jan.Mar.2001
- Haseltine , C.W.1977. *Process Bio Chem*. 12:19,29-32.

- Haslam, E.1989. *Plant Polyphenols*. Cambridge University Press. Cambridge-UK.
- Judoamidjojo, RM.1990. *Teknologi Fermentasi*. Rajawali Press. Jakarta.
- Kuswanto, KR. 1988. *Isolasi dan Pengujian Aktivitas Enzim*. PAU Pangan dan Gizi UGM. Yogyakarta.
- Lekha, P.K. and B.K. Lonsane. 1997. Production and Application of Tanin Acyl Hydrolase : State of The Art. *Advances in Applied Microbiology*, 44:216-260.
- Lemmens, R.M.H.J.. and S.N. Wulijarni. 1991 *Plant Resources of South-East Asia, Dye and Tannin Producing Plants*, Wageningen. Pudoc.
- Le Mense, E.H.,1994. *Journal bacteriol.* 54(2),149-159
- Ludenfesler L.A.,dan A.Cieglar. 1975. *Solid Substrate Fermenter for Ocharotoxin A. Production*. *Appl. Micro.* 29: 323-327.
- Moo-Young. M and Channel.1980. *Process Biochem.* 14(10),38-40.
- Neville J.Dix dan J. Webster.1995. *Fungal Ecology*, 1st Ed. Chapman 7 Hall, London, pp 3-37.
- Page,D.S., 1997, *Prinsip-prinsip Biokimia*, Edisi Kedua, Erlangga, Jakarta.
- Pelezar, M.J dan E.C.S Chan. 1986. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. UI-Press. Jakarta.
- Pitt,J.J. and A.D Hockey. 1997. *Fungi and Food Spoilage*. Great Britain at the University. Press Cambridge.
- Rahayu, K. 1991. *Teknologi Enzim*. PAU Pangan dan Gizi UGM. Yogyakarta.
- Ramana Murthy, N.G. Karanth dan K.sS. Raghava rao.1993. Biochemical Enginering Aspects of Solid State Fermentation. *Advances Applied Microbiology*, 38:99-147.
- Said, E.G. 1987. *Bioindustri : Penerapan Teknologi Fermentasi*. PT. Media Utama Sarana Perkasa. Jakarta.
- Sargantani T., Karim M., V.Murphy .D Ryoo., 1993. *Effect of Operating Conditions on Solid Subtrat Fermentation*, *Biotechnol, Bioeng.* 42: 149-158.
- Sudarmadji. (1997). *Prosedur Analisa Untuk bahan Makanan Dan Pertanian* Liberty, Yogyakarta.

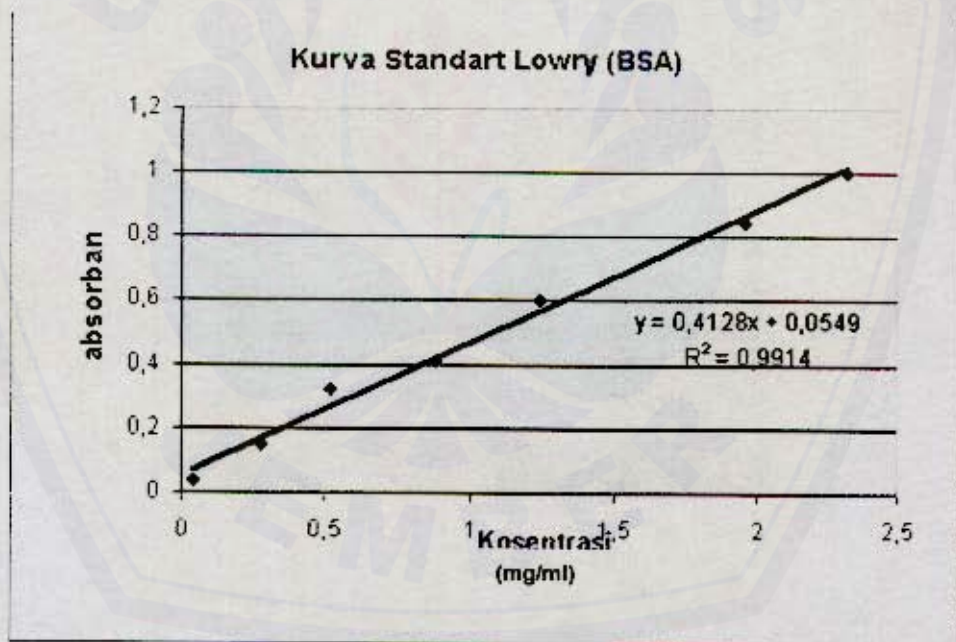
- Suharto, Ign. 1995. *Bioteknologi dalam dunia industri*. Andi offset. Yogyakarta.
- Toha, A.H.A, 2001. *Biokimia : Metabolisme Molekul*. Alfabeta. Bandung.
- Van de Lagemaat, J.,C. Augur dan D.L. Pyle.2000. Screening of Filamentopus Fungi for The Production of Extracelluler Tannase in Solid state Fermentation. In: Serra, T., C.R. Socol, A. Pandey and S. Russos (Ed) *Coffee Biotechnology and Quality*. Dordrecht. Kluwer Academic Publisher: 455-460.
- Waterman, PG., Mole. 1994. *Analysis of Phenolic Plant Metabolites*. Blackwell Scientific Publication, Oxford,UK.
- Wibowo. 1991. *Taksonomi Mikrobiologi Pangan*. PAU Pangan Dan Gizi UGM. Yogyakarta.
- Winarno, F.G, 1983. *Enzim Pangan*. Gramedia. Jakarta.
- , 2002. *Pengantar Bioteknologi*. M-Brio Press. Bogor.

Lampiran 1. Kurva Standart Kadar Asam Gallat



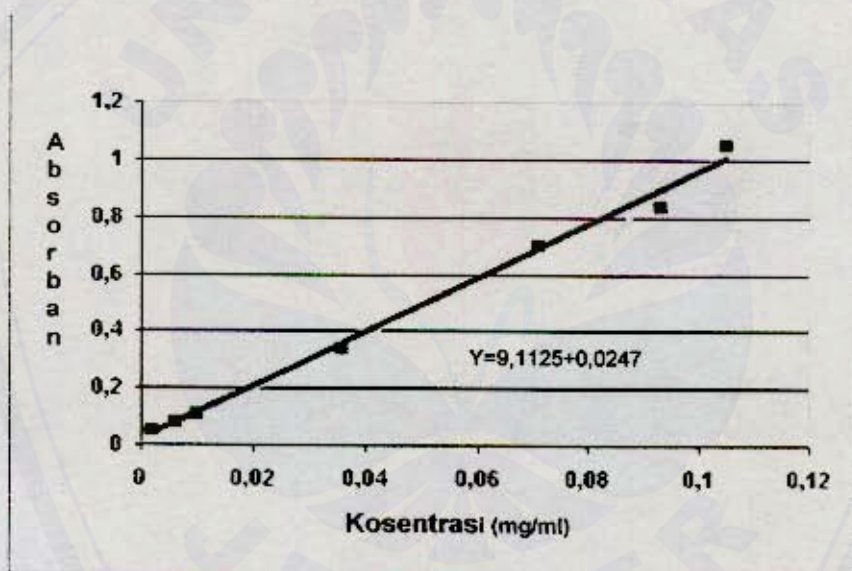
Lampiran 2. Kurva Standart Kadar Protein Terlarut Metode Lowry Dengan Bovine Serum Albumin (BSA)

konsentrasi mg/ml	absorban
0,04	0,035
0,28	0,15
0,52	0,325
0,88	0,413
1,24	0,602
1,96	0,848
2,32	1,000



Lampiran 3. Kurva Standart Kadar Tannin

konsentrasi(mg/ml)	absorban
0,002	0,05
0,006	0,076
0,01	0,11
0,036	0,34
0,071	0,7
0,093	0,83
0,105	1,05



Lampiran 4. Data Pengamatan Aktivitas Enzim Tannase

Inkubasi hari	Absorbansi			Aktivitas Enzim ($\mu\text{mol asam gallat/ml/min}$)		
	Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III	Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III
0	0	0	0	0	0	0
2	0,98	1,12	0,866	1,426	1,632	1,258
4	0,952	1,03	0,86	1,385	1,500	1,249
6	0,89	0,888	0,906	1,293	1,290	1,317
8	0,91	0,904	0,91	1,323	1,314	1,323
10	0,868	0,804	0,868	1,261	1,166	1,261
	jumlah			jumlah		
	rerata			rerata		
				4,015	20,096	1,338

Lampiran 5. Data Pengamatan pH Filtrat Media Fermentasi

Inkubasi hari	Ulangan			Jumlah	Rerata
	Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III		
0	5,07	5,12	5,12	15,31	5,10
2	4,06	4,03	4,03	12,12	4,04
4	3,94	3,94	3,92	11,80	3,93
6	3,81	3,99	3,99	11,79	3,93
8	4,21	4,42	4,00	12,63	4,21
10	4,44	4,53	4,47	13,44	4,48
	jumlah			77,09	25,70
	rerata			12,85	4,28

Lampiran 6. Data Pengamatan Kadar Protein Terlarut Filtrat Media Fermentasi

Inkubasi hari	Absorbansi			Kadar Protein Terlarut (mg/ml)			Jumlah (mg/ml)	Rerata (mg/ml)
	Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III	Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III		
0	0,074	0,068	0,13	1,93	1,32	7,58	10,83	3,61
2	0,099	0,098	0,203	4,45	4,35	14,95	23,75	7,92
4	0,209	0,148	0,249	15,56	9,40	19,59	44,55	14,85
6	0,38	0,383	0,387	32,82	33,12	33,52	99,46	33,15
8	0,576	0,53	0,768	52,60	47,96	71,98	172,54	57,51
10	0,84	0,836	0,898	79,25	78,85	85,11	243,21	81,07
jumlah							594,34	198,11
rerata							99,06	33,02

Lampiran 7. Data Pengamatan Kadar Tanin Sisa Filtrat Media Fermentasi

Inkubasi hari	Absorbansi			Kadar Tanin Sisa (mg/ml)			Jumlah (mg/ml)	Rerata (mg/ml)
	Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III	Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III		
0	0,728	0,788	0,504	3,22	3,49	2,19	8,90	2,97
2	0,54	0,662	0,447	2,36	2,91	1,93	7,20	2,40
4	0,357	0,537	0,254	1,52	2,34	1,05	4,91	1,64
6	0,147	0,144	0,088	0,56	0,55	0,29	1,39	0,46
8	0,04	0,037	0,067	0,07	0,06	0,19	0,32	0,11
10	0,037	0,036	0,027	0,06	0,05	0,01	0,12	0,04
jumlah							22,84	7,61
rerata							3,81	1,27

Lampiran 8. Cara Pembuatan Reagen Mix Lowry.**1. Mix Lowry**

Dicampurkan 100 ml larutan 2% Na_2CO_3 dengan 1 ml $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1% dan 1 ml natrium-kalium-tartarat 2%. Harus disiapkan baru (jangan disimpan)

2. Folin

Merupakan larutan asam phospho-tungstic-phospho-molybdic. Stok yang ada di pasaran perlu diencerkan dengan air (1:1)

Lampiran 9. Contoh Perhitungan Yang Digunakan**!. Perhitungan Kadar Protein**

Untuk sampel kadar protein terlarut filtrat kasar enzim tannase pada masa inkubasi hari pertama ulangan 1.

Dari data tersebut diperoleh kadar protein sebesar 1,93 mg/ml filtrat enzim kasar. Yang diperoleh dari 15 ml sampel murni ditambahkan aquadest hingga 25 ml kemudian diambil 1ml diencerkan hingga 25 ml dan diambil sebanyak 75 μl setelah mengalami perlakuan diperoleh absorbansi sebesar 0,074. Dengan menggunakan persamaan regresi linear yang terdapat pada kurva standart protein terlarut metode lowry (BSA) maka dapat diperoleh kadar protein seperti berikut :

Persamaan regresi linear:

$$Y = 0,4128x + 0,0549$$

Y = absorbansi

X = kadar protein

Dari pembacaan absorbansi diperoleh 0,074, sehingga protein terlarutnya adalah :

$$\begin{aligned} X &= (y - 0,0549) : 0,4128 \\ &= (0,074 - 0,0549) : 0,4128 \\ &= 0,046/75\mu\text{l mg/ml} \end{aligned}$$

dari pengambilan 75 μ l setelah mengalami beberapa kali pengenceran maka jumlah protein yang ada dalam filtrat kasar enzim tannase adalah :

$$= 0,046 \text{ mg/ml} \times 25 \times 25/15$$

$$= 1,93 \text{ mg/ml. filtrat kasar enzim tannase.}$$

2. Perhitungan Kadar Tannin Sisa

Untuk sampel kadar tannin terlarut filtrat kasar enzim tannase pada masa inkubasi hari pertama ulangan 1.

Dari data tersebut diperoleh kadar tannin sebesar 3,22 mg/ml filtrat enzim kasar. Yang diperoleh dari 15 ml sampel murni ditambahkan aquadest hingga 25 ml kemudian diambil 1ml diencerkan hingga 25 ml dan diambil sebanyak 50 μ l setelah mengalami perlakuan diperoleh absorbansi sebesar 0,728. Dengan menggunakan persamaan regresi linear yang terdapat pada kurva standart tannin terlarut maka dapat diperoleh kadar tannin seperti berikut :

Persamaan regresi linear:

$$Y = 9,1125x + 0,0247$$

Y =absorbansi

X =kadar tannin terlarut

Dari pembacaan absorbansi diperoleh 0,074, sehingga tannin terlarutnya adalah :

$$X = (y - 0,0247) : 9,1125$$

$$= (0,728 - 0,0247) : 9,1125$$

$$= 0,077/50 \mu\text{l mg/ml}$$

dari pengambilan 75 μ l setelah mengalami beberapa kali pengenceran maka jumlah tannin yang ada dalam filtrat kasar enzim tannase adalah :

$$= 0,077 \text{ mg/ml} \times 25 \times 25/15$$

$$= 3,22 \text{ mg/ml. filtrat kasar enzim tannase.}$$

3. Perhitungan Aktivitas Enzim Filtrat Kasar Enzim Tannase

Untuk sampel aktivitas enzim filtrat kasar enzim tannase pada masa inkubasi hari pertama ulangan 1.

Dari data tersebut diperoleh aktivitas enzim sebesar 1,352 mg/ml filtrat enzim kasar. Yang diperoleh dari 15 ml sampel murni ditambahkan aquadest hingga 25ml kemudian diambil 1ml diencerkan hingga 25 ml dan diambil sebanyak 25 μ l setelah mengalami perlakuan diperoleh absorbansi sebesar 0,93. Dengan menggunakan persamaan regresi linear yang terdapat pada kurva standart asam gallat maka dapat aktivitas enzim seperti berikut :

Persamaan regresi linear:

$$Y = 52,348x + 0,0128$$

Y =absorbansi

X = jumlah asam gallat terhidrolisis

Dari pembacaan absorbansi diperoleh 0,93 sehingga jumlah asam gallat terlarutnya adalah :

$$\begin{aligned} X &= (y - 52,348) : 0,0128 \\ &= (0,93 - 0,0128) : 52,348 \\ &= 0,018 / 25\mu\text{l mg/ml} \end{aligned}$$

dari pengambilan 25 μ l setelah mengalami beberapa kali pengenceran maka jumlah asam gallat yang ada dalam filtrat kasar enzim tannase adalah :

$$\begin{aligned} &= 0,018 \text{ mg/ml} \times 25 \times 25/15 \\ &= 0,75 \text{ mg/ml. filtrat kasar enzim tannase.} \end{aligned}$$

Untuk mengetahui aktivitas enzim filtrat kasar enzim tannase adalah μ mol asam gallat/ml/30 menit. :

$$\begin{aligned} \text{Mol} &= (0,75 \times 10^{-3}) : 188 \\ &= 3,9 \times 10^{-6} \text{ mol} \\ &= 3,9 \mu\text{mol/ml} : 30 \text{ menit} \\ &= 0,13 \mu\text{mol/ml/min.} \end{aligned}$$

