



**PRODUKSI DAN PURIFIKASI PARSIAL SELULASE ASAL *Aspergillus*  
sp. VT12 MELALUI FERMENTASI PADAT KULIT LUNAK BUAH KOPI**

**SKRIPSI**

Oleh  
**Farah Salma Elida**  
**161810401035**

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

**2020**



**PRODUKSI DAN PURIFIKASI PARSIAL SELULASE ASAL *Aspergillus*  
sp. VT12 MELALUI FERMENTASI PADAT KULIT LUNAK BUAH KOPI**

**SKRIPSI**

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

Oleh

**Farah Salma Elida**

**NIM 161810401035**

**JURUSAN BIOLOGI**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**

**UNIVERSITAS JEMBER**

**2020**

## PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Ayah Muhammad Irfan dan Ibu Evin Hesti Elida tercinta yang telah membesarkan saya dengan penuh kasih sayang, kesabaran dan kerja keras, serta terima kasih atas doa yang senantiasa tercurah sehingga skripsi ini dapat diselesaikan.
2. Adik Atha Mahdi Muhammad, Kakek Sudarmono, dan Nenek Mashita, terima kasih atas motivasi, dukungan, kasih sayang, dan doa yang menjadi kekuatan dalam hidup saya.
3. Guru, dosen, dan pendidik yang telah memberikan ilmu dan pengetahuan sejak bangku taman kanak-kanak sampai dengan perguruan tinggi.
4. Almamater Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember

## MOTO

Karena sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan. Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan (terjemahan Surat *Al-Insyirah* ayat 5-6)<sup>\*)</sup>

Wahai orang-orang yang beriman, bersabarlah kamu dan kuatkanlah kesabaranmu dan tetaplah bersiap-siaga dan bertawakal kepada Allah agar kamu beruntung (terjemahan Surat *Ali Imran* ayat 200)<sup>\*)</sup>

Apa yang menjadi milikmu tidak akan pernah melewatkanmu  
(Ali bin Abi Thalib)<sup>\*\*)</sup>

---

<sup>\*)</sup> Departemen Agama Republik Indonesia. 2010. *Al Qur'an dan Terjemah*. Bandung: Hilal

<sup>\*\*)</sup> Ash-Shalabi, A. M.. 2012. *Biografi Ali bin Abi Thalib*. Jakarta: Pustaka Al-Kautsar

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Farah Salma Elida

NIM : 161810401035

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Produksi dan Purifikasi Parsial Selulase Asal *Aspergillus* sp. VT12 melalui Fermentasi Padat Kulit Lunak Buah Kopi” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi. Penelitian ini didanai oleh Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan, Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi Republik Indonesia, 2020.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia menadapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 28 Juli 2020

Yang menyatakan,

Farah Salma Elida

161810401035

**SKRIPSI**

**PRODUKSI DAN PURIFIKASI PARSIAL SELULASE *Aspergillus* sp.  
VT12 MELALUI FERMENTASI PADAT KULIT LUNAK BUAH KOPI**

Oleh

**Farah Salma Elida**

**NIM 161810401035**

Pembimbing

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

Dosen Pembimbing Anggota : Drs. Siswanto, M. Si.

**PENGESAHAN**

Skripsi yang berjudul “Produksi dan Purifikasi Parsial Selulase Asal *Aspergillus* sp. VT12 melalui Fermentasi Padat Kulit Lunak Buah Kopi” telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas  
Jember

Tim Penguji :

Ketua,

Dr. Kahar Muzakhar, S.Si.  
NIP 196805031994011001

Anggota I,

Drs. Sutoyo, M. Si.  
NIP 196610141992031002

Sekretaris,

Drs. Siswanto, M.Si.  
NIP196012161993021001

Anggota II,

Dr. Esti Utarti, S. P., M. Si.  
NIP 197003031999032001

Mengesahkan  
Dekan,

Drs. Achmad Sjaifullah, M. Sc., Ph.D.  
NIP 195910091986021001

## RINGKASAN

**Produksi dan Purifikasi Parsial Selulase Asal *Aspergillus* sp. VT12 melalui Fermentasi Padat Kulit Lunak Buah Kopi;** Farah Salma Elida; 161810401035; 2020; 49 halaman; Program Studi Sarjana Biologi, Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Selulase merupakan enzim ekstraseluler yang dihasilkan oleh kapang, bakteri, protozoa, dan actinomycetes. Salah satu kapang yang mampu menghasilkan selulase yaitu *Aspergillus* sp. Kapang yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *Aspergillus* VT12. *Aspergillus* sp. VT12 mampu memproduksi enzim selulase dengan menghasilkan gula reduksi sebesar 10,18 µg/ml pada substrat TKKS, oleh karena itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai kemampuan *Aspergillus* sp. VT12 dalam memproduksi enzim selulase pada substrat berselulosa yang lain. Kandungan selulosa yang cukup tinggi pada *pulp* kopi berpotensi untuk dimanfaatkan dalam bidang biokonversi, salah satunya sebagai substrat dalam produksi enzim selulase. Hal ini dapat menjadi alternatif untuk mengolah limbah *pulp* kopi sebagai substrat sehingga produksi selulase dapat dilakukan secara ekonomis dan ramah lingkungan.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah fermentasi padat (SSF). Optimasi produksi dilakukan untuk mengetahui aktivitas selulase tertinggi dengan waktu inkubasi tercepat. Enzim selulase hasil produksi perlu dipurifikasi agar terpisah dari protein lainnya. Purifikasi yang dilakukan dalam penelitian ini yaitu purifikasi secara parsial melalui dialisis membran selofan dan DEAE *Cellulose* DE 52 *Chromatography*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa selulase yang dihasilkan oleh *Aspergillus* sp. VT12 memiliki waktu inkubasi optimum pada jam ke-120 dengan aktivitas enzim 0,52 U/ml. Aktivitas spesifik selulase setelah proses purifikasi semakin bertambah menjadi 0,055 U/g, sedangkan kadar protein semakin berkurang yaitu menjadi 3,67 ml. Hal ini menunjukkan bahwa proses purifikasi berhasil memisahkan selulase dengan protein atau pengotor lainnya sehingga tingkat kemurnian meningkat menjadi 5,5 kali lipat setelah proses purifikasi. Namun demikian, perlu dilakukan purifikasi lanjutan agar enzim yang

diperoleh semakin murni



## PRAKATA

Alhamdulillah rabbil'alamin atas segala nikmat, kesabaran, dan kekuatan yang telah diberikan Allah SWT sehingga dengan izin-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul "**Produksi dan Purifikasi Parsial Selulase Asal *Aspergillus* sp. VT12 melalui Fermentasi Padat Kulit Lunak Buah Kopi**". Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Program Studi Sarjana Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penulis menyadari bahwa terselesaikannya skripsi ini berkat campur tangan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih yang tiada terhingga kepada:

1. Allah SWT yang telah memberi kesehatan, kesabaran, dan kekuatan kepada penulis selama proses penyelesaian skripsi ini;
2. Orang tua, saudara, dan seluruh keluarga yang telah memberikan motivasi, nasehat dan do'a yang tiada hentinya;
3. Dr. Kahar Muzakhar, S. Si., selaku Dosen Pembimbing Utama dan Drs. Siswanto, M. Si. selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran, tenaga serta perhatian untuk memberikan ilmu, bimbingan, arahan, kekuatan, dan motivasi demi terselesaikannya penulisan skripsi ini;
4. Drs. Sutoyo, M. Si. dan Dr. Esti Utarti, S. P., M. Si., selaku Dosen Penguji yang telah berkenan untuk menguji skripsi ini, meluangkan waktu, pikiran, tenaga, dan memberikan masukan serta saran untuk perkembangan diri penulis dan skripsi ini;
5. Dr. Hidayat Teguh, M.Pd. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing selama penulis menjadi mahasiswa;
6. Purwatiningsih, S. Si, M. Si, Ph. D selaku Ketua Jurusan Biologi dan Dr. Esti Utarti, S. P., M. Si. selaku Kepala Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember yang telah memberi ijin penulis untuk melakukan penelitian;

7. Seluruh dosen Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember yang telah mengajarkan ilmu pengetahuan yang berguna selama penulis menjadi mahasiswa;
8. Ir. Endang Soesetyaningsih, selaku Teknisi Laboratorium Mikrobiologi yang telah bersedia dengan sabar memberikan banyak bantuan selama menempuh penelitian ini;
9. Rendy Setiawan, S. Si., M. Si., Dra. Susantin Fajariyah, M. Si., dan Syubbanul Wathon, S. Si., M. Si, selaku tim Kombi, serta Pak Daniel yang telah membantu proses administrasi dalam penyelesaian skripsi ini;
10. Syafiq Ubaidillah, Azizah, dan Ummi Wasilah terima kasih atas bimbingan dan pengetahuannya selama penulis berada di laboratorium;
11. Sahabat-sahabatku, Nabilah Imlah Sunarto, Atiqotul Irsyadah, Dwi Wardatul Rizkiyah, Nada Nisrina Maulidya, Riana Agatha Listiani, dan Fenny Indriani, terima kasih untuk semua dukungan, semangat, motivasi, canda tawa, dan kebersamaan sejak penulis menjadi mahasiswa;
12. Teman-temanku seperjuangan TA, Reni Rusdianti, Nabilah Imlah Sunarto, Okta Novalia Gasani, Atim Ainul Hidayah, Novita Nur Kumala, Tia Fitri, Gadang Mukti Safarino, Mustofa Thoha, dan Ahmad Rifan Muzaki, terima kasih telah membantu penulis selama penelitian serta untuk semangat dan kebersamaan dalam keadaan senang maupun susah;
13. Teman-temanku satu kost, Reni Rusdianti, Nabilah Imlah Sunarto, Okta Novalia Gasani, dan Saniyah Fatkhul Alim yang telah membantu, mendukung, dan menemani penulis dalam menyelesaikan skripsi ini;
14. Teman-teman angkatan 2016 BANANA terima kasih atas kekeluargaan, persaudaraan, dan pengalaman yang telah diberikan kepada penulis;
15. Bapak satpam yang telah memberi rasa keamanan saat penulis dan teman-teman bermalam di laboratorium;
16. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat

bermanfaat.

Jember, Juli 2020

Penulis,



DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>i</b>
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN.....</b>	<b>ii</b>
<b>HALAMAN MOTO .....</b>	<b>iii</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN.....</b>	<b>iv</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN .....</b>	<b>vi</b>
<b>RINGKASAN .....</b>	<b>vii</b>
<b>PRAKATA .....</b>	<b>ix</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>xi</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>xiv</b>
<b>DAFTAR TABEL.....</b>	<b>xv</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>xvi</b>
<b>BAB 1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Latar Belakang.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Rumusan Masalah .....</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Batasan Penelitian .....</b>	<b>3</b>
<b>1.4 Tujuan Penelitian.....</b>	<b>3</b>
<b>1.5 Manfaat Penelitian.....</b>	<b>3</b>
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Selulosa dan Selulase .....</b>	<b>4</b>
<b>2.2 <i>Aspergillus</i> sp. VT12 .....</b>	<b>6</b>
<b>2.3 Kulit Lunak Buah Kopi .....</b>	<b>8</b>
<b>2.4 <i>Solid State Fermentation</i> (SSF) .....</b>	<b>9</b>
<b>2.5 Purifikasi Parsial .....</b>	<b>10</b>
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>12</b>
<b>3.1 Tempat dan Waktu.....</b>	<b>12</b>
<b>3.2 Alat dan Bahan.....</b>	<b>12</b>
<b>3.3 Rancangan Penelitian .....</b>	<b>13</b>
<b>3.4 Prosedur Penelitan.....</b>	<b>13</b>

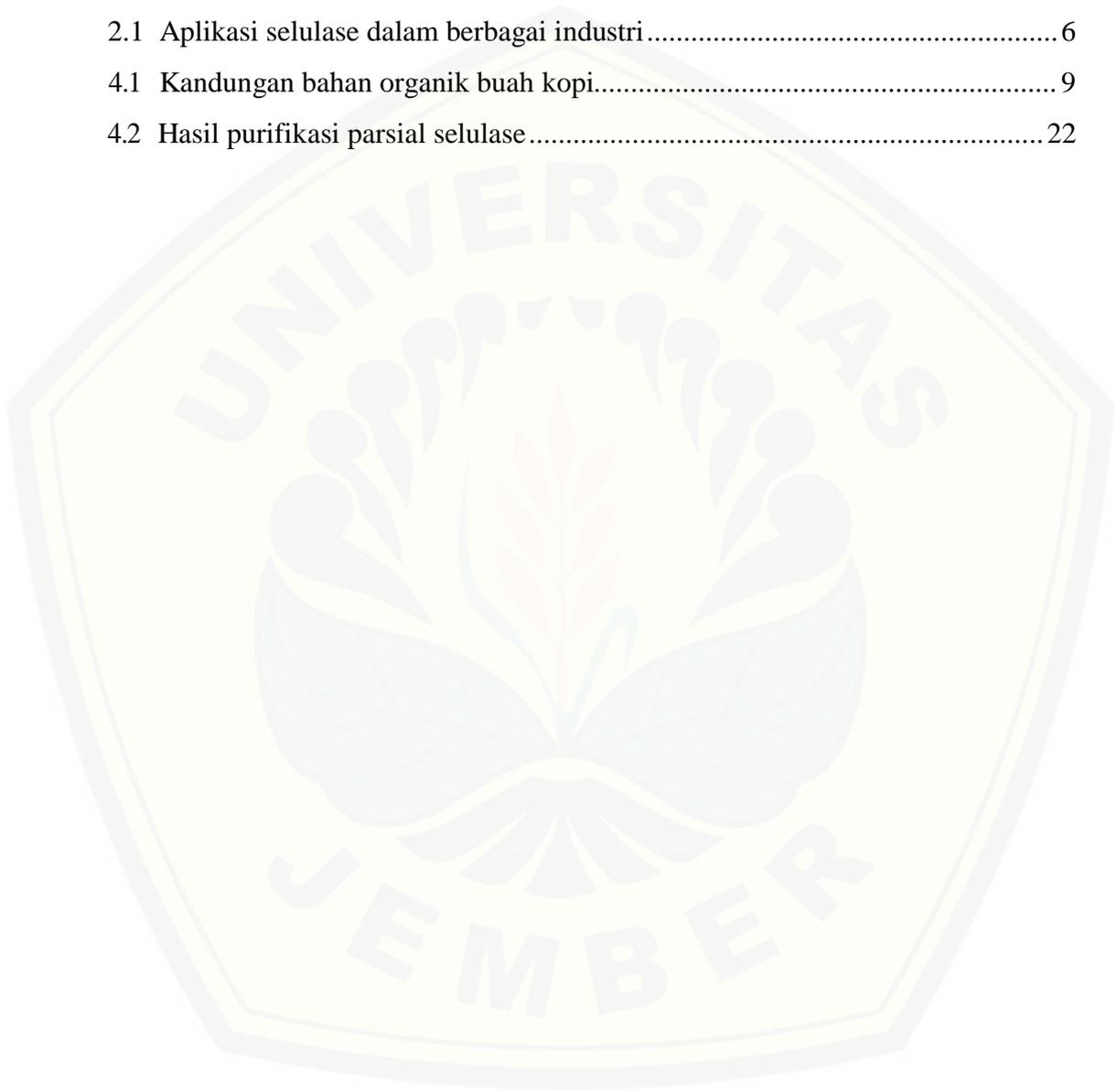
3.4.1	Persiapan Penelitian.....	13
3.4.2	Produksi Ekstrak Kasar Enzim .....	15
3.4.3	Purifikasi Parsial Ekstrak Kasar Enzim .....	17
<b>3.5</b>	<b>Analisis Data.....</b>	<b>18</b>
<b>BAB 4.</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>19</b>
<b>4.1</b>	<b>Produksi Ekstrak Kasar Enzim .....</b>	<b>19</b>
<b>4.2</b>	<b>Purifikasi Parsial Ekstrak Kasar Enzim .....</b>	<b>21</b>
<b>BAB 5.</b>	<b>PENUTUP .....</b>	<b>23</b>
<b>5.1</b>	<b>Kesimpulan.....</b>	<b>23</b>
<b>5.2</b>	<b>Saran .....</b>	<b>23</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA</b>	<b>.....</b>	<b>24</b>
<b>LAMPIRAN</b>	<b>.....</b>	<b>29</b>

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Struktur selulosa.....	4
2.2 Hidrolisis selulosa menjadi glukosa.....	5
2.3 <i>Aspergillus</i> sp. VT12.....	7
2.4 Penampang buah kopi .....	8
3.1 Alur rancangan penelitian .....	13
4.1 Optimasi produksi selulase <i>Aspergillus</i> sp. VT12 pada waktu inkubasi 0-168 jam.....	19
4.2 Grafik perbandingan aktivitas selulase dengan nilai absorbansi protein 280 nm setelah purifikasi menggunakan DEAE <i>Cellulose</i> DE-52 ( <i>gradient stepwise</i> 0-0,6 M NaCl).....	21

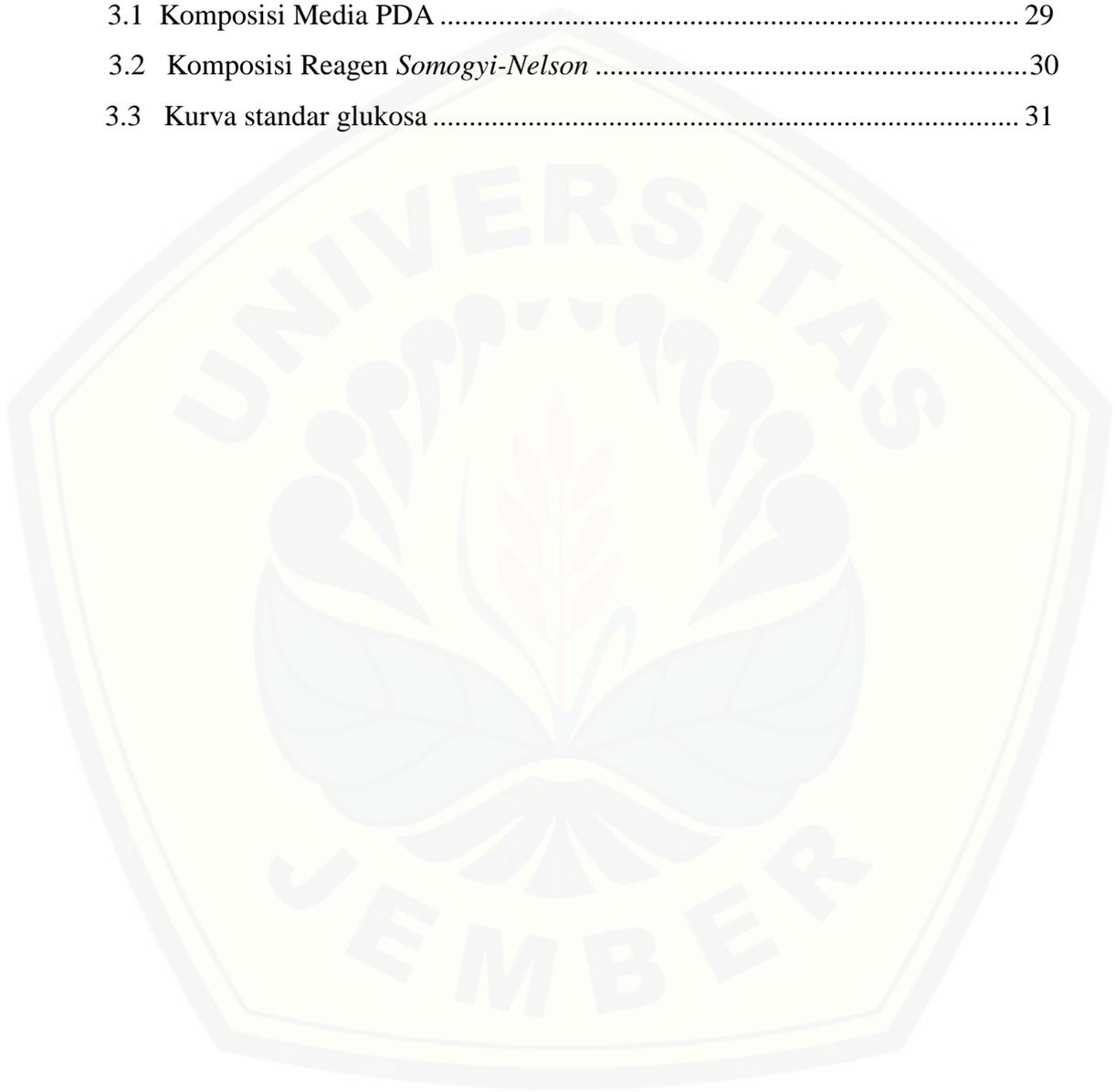
**DAFTAR TABEL**

	Halaman
2.1 Aplikasi selulase dalam berbagai industri.....	6
4.1 Kandungan bahan organik buah kopi.....	9
4.2 Hasil purifikasi parsial selulase.....	22



**DAFTAR LAMPIRAN**

	Halaman
3.1 Komposisi Media PDA .....	29
3.2 Komposisi Reagen <i>Somogyi-Nelson</i> .....	30
3.3 Kurva standar glukosa .....	31



## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Selulase merupakan kompleks enzim yang mampu menguraikan molekul selulosa menjadi monomer-monomer glukosa (Campbell dan Reece, 2008). Selulase saat ini menempati urutan ketiga dalam industri enzim pasar dunia setelah amilase dan protease. Selulase semakin sering digunakan untuk berbagai industri, diantaranya industri tekstil, industri pulp dan kertas, dan bahan tambahan dalam deterjen maupun pakan ternak (Zhang dan Zhang, 2013). Hal tersebut menyebabkan permintaan selulase semakin meningkat sehingga diperlukan produksi dalam skala industri. Biaya yang tinggi dan hasil yang rendah menjadi hambatan utama produksi selulase dalam skala industri, oleh karena itu banyak penelitian yang dilakukan untuk memproduksi selulase secara efisien dan ekonomis (Vaishnav et al., 2018).

Selulase merupakan enzim ekstraseluler yang dihasilkan oleh kapang, bakteri, protozoa dan *actinomycetes* (Vaishnav et al., 2018; Zhang dan Zhang, 2013). Salah satu kapang yang mampu menghasilkan selulase yaitu *Aspergillus* sp. Hampir seluruh kapang dari genus *Aspergillus* sp. mampu menghasilkan selulase, sehingga genus ini sering digunakan dalam industri enzim (Peij et al., 1998). Kapang yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *Aspergillus* sp. VT12. Menurut Yuniar (2013), *Aspergillus* sp. VT12 mampu memproduksi enzim selulase dengan menghasilkan gula reduksi sebesar 10,18 µg/ml pada substrat tandan kosong kelapa sawit, oleh karena itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai kemampuan *Aspergillus* VT12 dalam memproduksi enzim selulase pada substrat berselulosa lainnya.

Enzim selulase merupakan enzim yang berperan penting dalam proses biokonversi limbah-limbah organik berselulosa menjadi glukosa. Pemanfaatan limbah berselulosa seperti limbah pertanian dan perkebunan menjadi permasalahan yang menarik untuk diteliti saat ini dan di masa depan. Salah satu tanaman perkebunan yang paling banyak diproduksi dan menghasilkan limbah

yang banyak pula adalah kopi. Hasil pemrosesan basah kopi diantaranya berupa kulit lunak buah kopi (*pulp*) (Kumakura dan Kaetsu, 1978).

Kandungan bahan organik utama pada kulit lunak buah kopi yaitu selulosa (63%), protein, dan juga mengandung tanin, kafein, dan polifenol dalam jumlah yang cukup banyak (Roussos *et al.*, 1995). Kandungan selulosa yang cukup tinggi berpotensi untuk dimanfaatkan dalam bidang biokonversi, salah satunya yaitu sebagai substrat dalam produksi enzim selulase (Khoshnevisan *et al.*, 2011). Hal ini dapat menjadi jalan alternatif untuk mengolah limbah kulit lunak buah kopi sebagai substrat sehingga produksi selulase dapat dilakukan secara ekonomis dan ramah lingkungan.

Salah satu metode yang sering digunakan dalam produksi enzim selulase adalah fermentasi padat (*Solid State Fermentation*). SSF sering digunakan dalam laboratorium karena memiliki beberapa kelebihan antara lain produk fermentasi yang dihasilkan tinggi, dapat menggunakan berbagai jenis kapang, dan tidak mudah terkontaminasi karena SSF membutuhkan kelembaban yang rendah. Metode SSF merupakan metode yang paling cocok diterapkan untuk proses fermentasi yang melibatkan organisme yang membutuhkan sedikit kelembaban seperti kapang (40-60%) (Perdani *et al.*, 2019). Enzim selulase hasil produksi belum bersifat murni, sehingga perlu dilakukan purifikasi agar terpisah dari enzim dan protein lainnya (Megha *et al.*, 2015). Purifikasi parsial yang dilakukan pada penelitian ini yaitu dialisis menggunakan membran selofan dan kromatografi menggunakan DEAE *Cellulose* DE-52.

## 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini yaitu bagaimana aktivitas enzim selulase hasil produksi dan purifikasi parsial melalui fermentasi padat menggunakan kulit lunak buah kopi oleh *Aspergillus* sp. VT12.

### 1.3 Batasan Penelitian

Batasan penelitian ini antara lain aktivitas enzim melalui uji gula reduksi dengan metode *Somogyi-Nelson* serta purifikasi parsial dengan metode dialisis membran selofan dan *DEAE Cellulose* DE-52.

### 1.4 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk memperoleh aktivitas enzim selulase hasil produksi dan hasil purifikasi secara parsial melalui fermentasi padat kulit lunak buah kopi oleh *Aspergillus* sp. VT12.

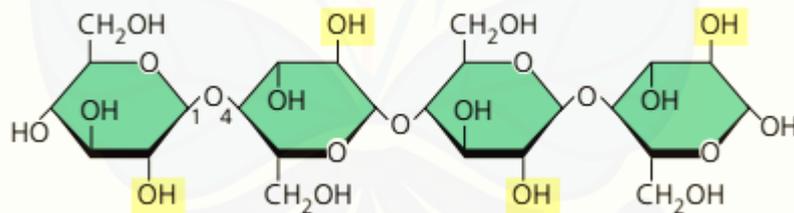
### 1.5 Manfaat

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat menjadi terobosan baru untuk memproduksi enzim selulase melalui pemanfaatan kulit lunak buah kopi sehingga produksi selulase dapat dilakukan secara ekonomis dan ramah lingkungan.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Selulosa dan Selulase

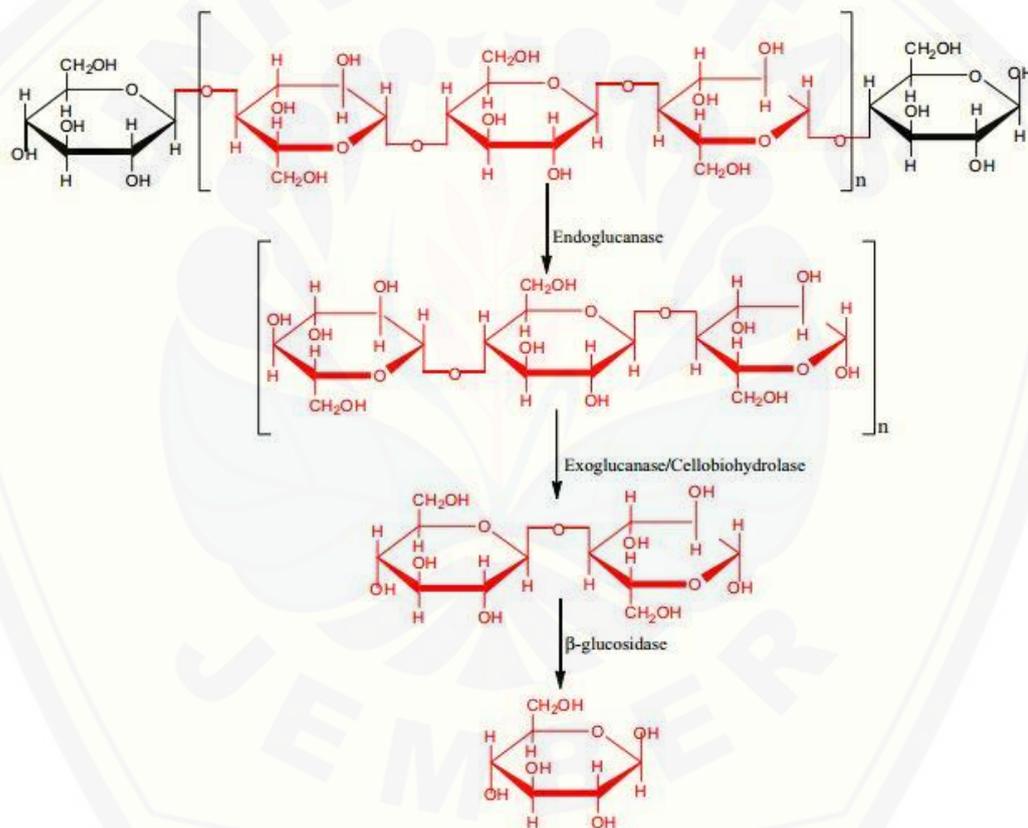
Selulosa adalah komponen senyawa organik utama yang menyelubungi sel tumbuhan. Tumbuhan menghasilkan sekitar 100 miliar ton selulosa per tahun, oleh karena itu selulosa termasuk salah satu senyawa organik paling melimpah di bumi. Selulosa merupakan polisakarida yang terdiri atas beberapa monomer glukosa yang digabungkan oleh ikatan 1-4 glikosidik melalui reaksi dehidrasi. Semua monomer glukosa pada selulosa merupakan konfigurasi  $\beta$ , sehingga setiap monomer glukosa terbalik atas-bawah dibandingkan monomer di kanan-kirinya (Gambar 2.1). Molekul selulosa sebagian besar berbentuk lurus dan tidak bercabang. Beberapa hidrogen dalam gugus hidroksil pada monomer glukosanya, bebas berikatan dengan hidroksil dari molekul selulosa lain yang terletak paralel dengan molekul selulosa tersebut. Selulosa dihidrolisis oleh enzim selulase yang mampu menguraikan molekul selulosa menjadi monomer-monomer glukosa (Campbell dan Reece, 2008).



Gambar 2.1 Struktur selulosa (Sumber: Campbell dan Reece, 2008)

Selulase merupakan enzim ekstraseluler yang dihasilkan oleh kapang, bakteri, protozoa, actinomycetes, tumbuhan, maupun hewan (Vaishnav *et al.*, 2018; Zhang dan Zhang, 2013). Selulase adalah kompleks enzim yang terdiri atas tiga enzim yaitu endoselulase, eksoselulase, dan  $\beta$ -glukosidase (Singh *et al.*, 2017). Enzim–enzim penyusun kompleks selulase bekerja secara sinergis dan memiliki peran yang berbeda dalam proses penguraian rantai polimer selulosa menjadi glukosa sebagai sumber karbon untuk kebutuhan siklus hidup dan pertumbuhan mikroorganisme (Agustini *et al.*, 2017; Falkoski *et al.*, 2012). Berikut ini merupakan macam dari kompleks enzim selulase beserta fungsinya (Gambar 2.2):

- Endo-1,4- $\beta$ -glukanase, berperan dalam menghidrolisis ikatan internal 1,4- $\beta$  glikosidik secara acak pada daerah amorf selulosa yang menghasilkan rantai panjang oligomer (ujung non reduksi).
- Ekso-1,4-glukanase atau selobiohidrolase, berperan dalam mengurai ikatan glikosidik pada ujung kedua sampai keempat unit selulosa yang dihasilkan oleh endoglukanase menjadi disakarida selobiosa.
- $\beta$ -glukosidase atau selobiase berperan dalam mengurai selobiosa menjadi gugus glukosa (Juturu dan Wu, 2014; Kuhad *et al.*, 2011).



Gambar 2.2 Hidrolisis selulosa menjadi glukosa (Sumber: Juturu dan Wu, 2014)

Saat ini selulase menjadi bagian yang penting bagi industri enzim di pasar dunia (Zhang dan Zhang, 2013). Enzim ini banyak digunakan di berbagai industri karena dapat diaplikasikan dalam berbagai tujuan. Selulase banyak digunakan di berbagai industri termasuk pengolahan pakan ternak, produksi makanan dan bir, pengolahan tekstil, produksi deterjen, pembuatan bubur kertas (*pulp*), produksi

biofuel dan bahan kimia dari sumber daya yang dapat diperbarui (Tabel 2.1) (Juturu dan Wu, 2014).

Tabel 2.1 Aplikasi selulase dalam berbagai industri

Industri	Aplikasi
Pertanian	Sebagai pengendali patogen dan penyakit pada tumbuhan; meningkatkan perkecambahan biji dan sistem perakaran; meningkatkan pertumbuhan dan perkembangan tumbuhan; meningkatkan kualitas tanah; mengurangi ketergantungan terhadap pupuk mineral
Biokonversi	Mengonversi bahan selulosa menjadi etanol, asam organik maupun protein sel tunggal, dan lipid; sebagai pakan ternak yang berenergi tinggi; meningkatkan kualitas nutrisi dari pakan ternak; meningkatkan kinerja dalam pencernaan ruminansia; meningkatkan absorpsi makanan dalam pencernaan
Deterjen	Sebagai bahan dasar deterjen; melakukan pembersihan tanpa merusak serat; meningkatkan kecerahan warna dan menghilangkan kotoran; melembutkan kain katun; tidak mengendapkan partikel tinta
Fermentasi	Meningkatkan <i>malting</i> dan <i>mashing</i> ; meningkatkan tekanan dan ekstraksi warna dari anggur; meningkatkan aroma wine; meningkatkan fermentasi dan kualitas bir
Makanan	Melepaskan antioksidan dari buah dan sayur pomace; meningkatkan hasil ekstraksi pati dan protein; meningkatkan maserasi, tekanan, dan ekstraksi warna buah dan sayur; meningkatkan tekstur dan kualitas roti; meningkatkan viskositas sup buah; meningkatkan tekstur, rasa, dan aroma buah dan sayur; mengontrol kegetiran buah jeruk
<i>Pulp</i> dan kertas	Sebagai bahan tambahan dalam proses <i>bleaching pulp</i> ; berperan dalam pembuatan <i>pulp</i> secara biomekanik; meningkatkan efektivitas pengeringan; menghilangkan tinta secara enzimatik; mengurangi penggunaan klorin; meningkatkan kecerahan serat dan kebersihan <i>pulp</i> ; sebagai bahan untuk produksi kardus, handuk kertas, dan kertas samitasi
Tekstil	Berperan dalam proses <i>biostoning</i> jeans; <i>biopolishing</i> serat tekstil; meningkatkan stabilitas kain; memulihkan kecerahan warna; melembutkan pakaian; mengurangi pewarnaan yang berlebih
Lainnya	Meningkatkan ekstraksi karotenoid; meningkatkan oksidasi dan stabilitas warna kartenoid; meningkatkan ekstraksi minyak zaitun; meningkatkan kualitas minyak zaitun

(Sumber: Kuhad *et al.*, 2011)

## 2.2 *Aspergillus sp.* VT12

Kapang berfilamen digunakan sebagai mikroorganisme untuk produksi selulase karena kapang memiliki kemampuan yang tinggi dalam produksi dan sekresi protein (Vaishnav *et al.*, 2018; Wakai *et al.*, 2019). Beberapa jenis kapang dapat mengurai selulosa, sehingga membantu siklus unsur-unsur kimia dalam ekosistem bumi (Campbell dan Reece, 2008). *Aspergillus sp.* merupakan salah satu kapang yang menghasilkan enzim selulase (Sukumaran *et al.*, 2005). Genus ini berpotensi dominan dalam industri enzim karena hampir seluruh kapang dari

genus *Aspergillus* menghasilkan selulase. *Aspergillus* dikenal efisien dalam produksi selulase (Peij *et al.*, 1998).

Ciri khas morfologi *Aspergillus* adalah memiliki struktur bantalan spora yang disebut konidiofor, dengan cabang hifa tegak dan semakin besar di ujungnya membentuk vesikel. Vesikel memproduksi fialid yang menghasilkan rantai panjang konidia atau konidiofor. Ukuran dan bentuk vesikel, maupun struktur, warna, serta ukuran konidia menjadi karakteristik yang sangat penting untuk keperluan identifikasi. Karakteristik penting lainnya yaitu tipe seriat pada vesikel. Vesikel yang memiliki dua lapis sel (fialid dan metula) disebut biseriat, sedangkan vesikel yang menghasilkan satu lapisan fialid disebut uniseriat (Klich, 2002; Sari *et al.*, 2017).

Kapang yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Aspergillus* sp. VT12. Kapang ini merupakan hasil isolasi dari proses vermikomposting Tandan Kosong Kelapa Sawit. Hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Yuniar (2013) menunjukkan bahwa *Aspergillus* sp. VT12 memiliki aktivitas selulolitik cukup tinggi pada substrat CMC dan TKKS yaitu dengan menghasilkan gula reduksi berturut-turut sebesar 10,18  $\mu\text{g/ml}$  dan 4,4  $\mu\text{g/ml}$ . *Aspergillus* sp. VT12 memiliki warna koloni coklat dengan permukaan atas seperti bubuk atau tepung dan *reverse* berwarna kuning. Koloni kapang ini secara makroskopis terlihat seperti terpecah-pecah dengan tepi rata dan tanpa garis radial atau konsentris. *Aspergillus* sp. VT12 memiliki eksudat berwarna kuning. Hifa kapang ini berseptata dan konidia berbentuk bulat (Gambar 2.3).

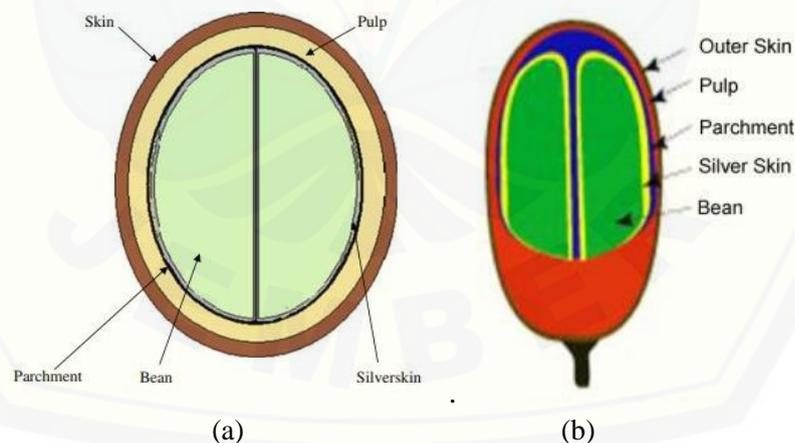


Gambar 2.3 *Aspergillus* sp. VT12 (Sumber: Yuniar, 2013)

### 2.3 Kulit Lunak Buah Kopi

Kopi merupakan komoditas perdagangan dunia terbesar kedua setelah minyak (Mussatto *et al.*, 2011). Produksi kopi di Indonesia pada tahun 2018 menempati peringkat empat dunia setelah Brazil, Vietnam, dan Columbia yaitu sebesar 612.000 ton (ICO, 2019). Jember merupakan salah satu kota penghasil kopi terbesar di Jawa Timur. Produksi kopi di Jember dalam satu dekade terakhir mengalami peningkatan yang signifikan dan menempati urutan ke-2 setelah Banyuwangi yaitu sebesar 11.863 ton (BPS Provinsi Jawa Timur, 2018). Produksi kopi yang semakin meningkat akan menghasilkan limbah yang meningkat pula.

Kopi sebanyak lima ton yang diproses, akan menghasilkan limbah sekitar tiga ton (Chanakya dan De Alwis, 2004). Kulit luar dan sebagian kulit lunak buah yang berlendir (eksokarp dan sebagian dari mesokarp biji kopi) dihasilkan selama pemrosesan basah (Gambar 2.4) (Fan *et al.*, 2003). Limbah kulit lunak buah kopi (*pulp*) yang tidak diproses terlebih dahulu akan sulit didekomposisi karena kulit kopi bersifat keras, serta kandungan kafein dan tanin dalam kulit lunak buah kopi akan menjadi agen toksik sehingga mencemari lingkungan (Corro *et al.*, 2013).



(a) Penampang melintang buah kopi; (b) Penampang membujur buah kopi

Gambar 2.4 Penampang buah kopi (Sumber: Mussatto *et al.*, 2011; Murthy dan Naidu, 2012)

Kandungan bahan organik dalam kulit lunak buah kopi antara lain selulosa (63%), lignin (17%), protein (11,5%), hemiselulosa (2,3%), tanin (1,8-8,56%),

pektin (6,5%), gula reduksi (12,4%), gula non reduksi (2%), kafein (1,3%), dan asam klorogenik (2,6%) (Tabel 2.2) (Pandey *et al.*, 2000; Mussatto *et al.*, 2011; Franca *et al.*, 2009). Kandungan selulosa yang tinggi pada kulit lunak buah, mendukung penggunaannya sebagai substrat untuk fermentasi padat, selain itu juga mengurangi limbah berbahaya karena kandungan kafein dalam kulit lunak buah lebih tinggi dari bagian kopi yang lain. Penelitian yang dilakukan oleh Muzakhar *et al.* (2017) berhasil membuktikan bahwa kulit lunak buah kopi dapat dijadikan substrat untuk produksi selulase dengan bantuan kapang *Aspergillus* sp. melalui fermentasi padat.

Tabel 2.2 Kandungan bahan organik buah kopi

Komponen (%)	<i>Coffee pulp</i>	<i>Coffee husk</i>	<i>Silver skin</i>
Selulosa	63,0 ± 2,5	43,0 ± 8,0	17,8 ± 6,0
Hemiselulosa	2,3 ± 1,0	7,0 ± 3,0	13,1 ± 9,0
Protein	11,5 ± 2,0	8,0 ± 5,0	18,6 ± 4,0
Lemak	2,0 ± 2,6	0,5 ± 5,0	2,2 ± 1,9
Total serat	60,5 ± 2,9	24 ± 5,9	62,4 ± 2,5
Total polifenol	1,5 ± 1,5	0,8 ± 5,0	1,0 ± 2,0
Total gula	14,4 ± 0,9	58,0 ± 20,0	6,65 ± 10
Pektin	6,5 ± 1,0	1,6 ± 1,2	0,02 ± 1,0
Lignin	17,5 ± 2,2	9,0 ± 1,6	1,0 ± 2,0
Tanin	3,0 ± 5,0	5,0 ± 2,0	0,02 ± 0,1
Asam klorogenik	2,4 ± 1,0	2,5 ± 0,6	3,0 ± 0,5
Kafein	1,5 ± 1,0	1,0 ± 0,5	0,03 ± 0,6

(Sumber: Mussatto *et al.*, 2011; Franca *et al.*, 2009; Murthy dan Naidu, 2012)

#### 2.4 Solid State Fermentation (SSF)

*Solid State Fermentation* (SSF) didefinisikan sebagai fermentasi yang berlangsung pada kondisi tanpa atau hampir tanpa air bebas, sehingga mirip dengan lingkungan alami tempat mikroorganisme beradaptasi (Holker *et al.*, 2004; Pandey *et al.*, 2000a). Komposisi, konsentrasi media, dan kondisi fermentasi sangat memengaruhi pertumbuhan dan produksi enzim ekstraselular dari mikroorganisme. Faktor lain yang memengaruhi proses SSF yaitu suhu, pH, aerasi, dan aktivitas air (Perdani *et al.*, 2019).

SSF sering digunakan dalam skala laboratorium karena memiliki beberapa kelebihan antara lain produk fermentasi yang dihasilkan tinggi, dapat menggunakan berbagai jenis kapang, dan tidak mudah terkontaminasi karena SSF

mebutuhkan kelembaban yang rendah. SSF berkontribusi dalam menghasilkan produk yang lebih baik dibandingkan dengan *Sub-merged Fermentation* (SmF). Kelebihan SSF dibanding dengan SmF yaitu biomassa dan enzim yang dihasilkan lebih tinggi dan lebih tahan terhadap kerusakan protein (Gonzales *et al.*, 2003). Metode ini juga memiliki kelemahan yaitu suhu, pH, kelembaban, dan konsentrasi substrat selama fermentasi sulit dikontrol karena kesediaan air yang terbatas (Holker *et al.*, 2004)

Fermentasi padat atau *Solid State Fermentation* (SSF) menjadi metode yang sesuai untuk produksi selulase yang bersifat ekonomis. Produksi selulase dipengaruhi oleh substrat yang digunakan dalam fermentasi, oleh karena itu pemilihan substrat merupakan hal yang penting dalam meningkatkan hasil produksi selulase (Shruthi *et al.*, 2019). Limbah pertanian secara umum menjadi substrat paling baik untuk proses fermentasi padat (Vastrad dan Neelagund, 2011). Metode SSF merupakan metode yang paling cocok diterapkan untuk proses fermentasi yang melibatkan organisme yang membutuhkan sedikit kelembaban seperti kapang (40-60%) (Perdani *et al.*, 2019).

## 2.5 Purifikasi Parsial

Purifikasi merupakan proses pemisahan senyawa aktif (protein) dengan senyawa aktif lain atau pengotor yang ada (Sudirman, 2005). Purifikasi parsial yang dilakukan pada penelitian ini yaitu dialisis menggunakan membran selofan dan kromatografi menggunakan DEAE *Cellulose* DE-52. Dialisis merupakan salah satu metode pemurnian untuk memisahkan molekul enzim dari pengotor atau protein lain. Dialisis *tubing* yang digunakan dalam penelitian ini yaitu membran selofan yang berukuran 12-14 kDa. Membran selofan merupakan membran semipermeabel yang membatasi pergerakan molekul enzim untuk masuk dan keluar dari membran dialisis, sehingga enzim tetap berada dalam membran, sedangkan partikel-partikel kecil yang berukuran kurang dari 12-14 kDa dapat keluar dari membran. Partikel-partikel kecil akan berdifusi keluar membran, sehingga molekul enzim yang berada dalam membran terbebas dari partikel kecil tersebut (Kusumadjaja dan Dewi, 2005; Suryadi *et al.*, 2019).

DEAE (*Diethylaminoethyl Cellulose Chromatography*) merupakan salah satu metode purifikasi protein dengan prinsip pertukaran ion. Parameter kromatografi dalam kolom DEAE seperti pH dan kekuatan ion dari ikatan bufer, serta konsentrasi gradien dan laju kecepatan dari bufer pengelusi dapat dikontrol untuk mengikat atau mengelusi molekul tertentu sehingga memisahkan selulase dari kotoran dan protein lainnya secara efisien (Nooralabettu, 2014). Ion bufer dalam matriks DEAE ditukar dengan ion negatif dari protein, sehingga ion bufer dengan protein yang bermuatan positif akan terelusi keluar dari kolom. Saat elusi bertahap (*stepwise* 0-0,6 M NaCl) dilakukan, protein yang memiliki ikatan lemah pada matriks akan dilepaskan dan diganti oleh dengan ion garam yang konsentrasinya lebih tinggi (Suryadi *et al.*, 2019).

## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari 2020 sampai Juli 2020. Tempat penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember.

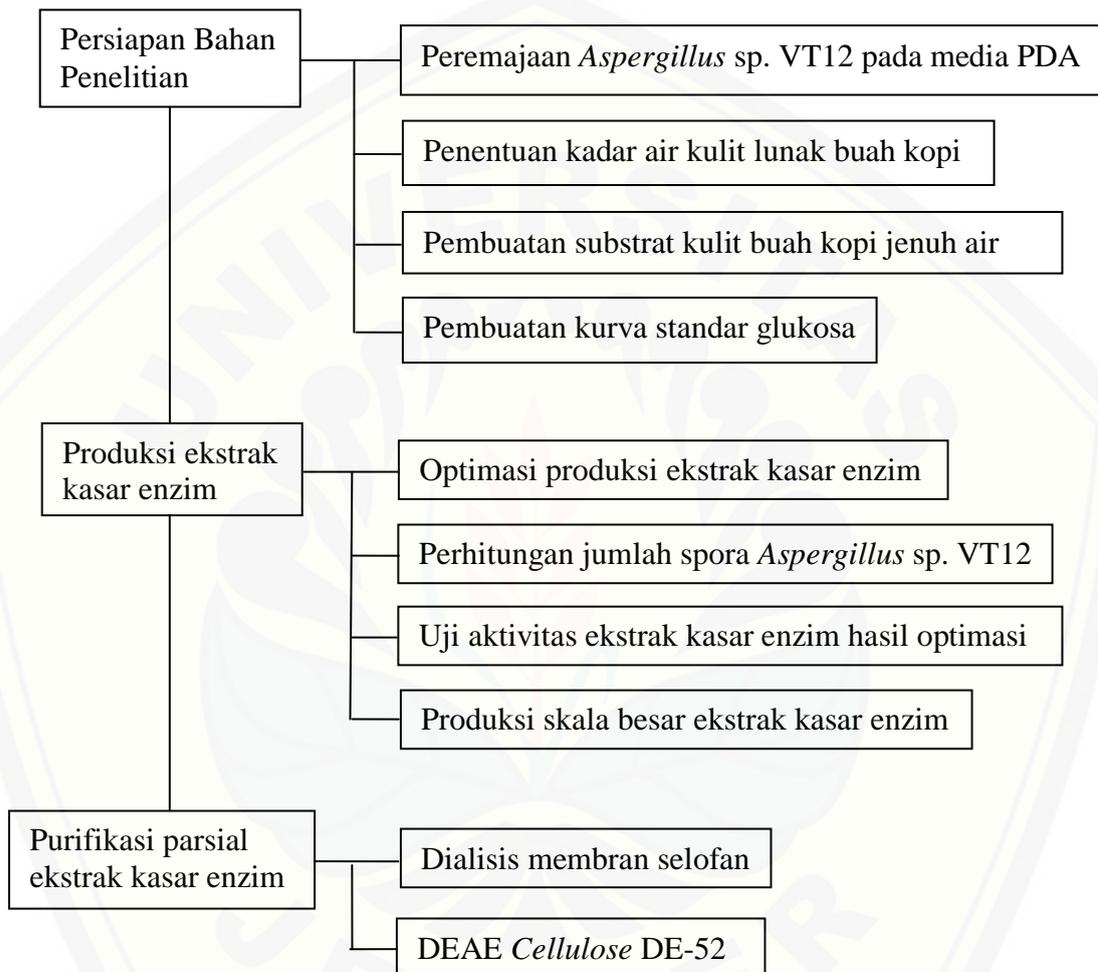
### 3.2 Alat dan Bahan

Alat kaca yang digunakan dalam penelitian ini yaitu tabung reaksi, labu erlenmeyer, batang pengaduk, gelas ukur, dan gelas beker. Neraca yang digunakan untuk menimbang bahan yaitu neraca analitik. Alat yang digunakan untuk membuat media kultur yaitu *magnetic stirrer* dan *hot plate*. Alat yang digunakan saat inokulasi dalam *laminar air flow* yaitu bunsen, jarum ose, pipet volume, mikropipet, dan rak tabung. Alat untuk menghitung kepadatan spora yaitu *haemocytometer* dan mikroskop *motoc B1 series*. Uji gula reduksi dilakukan dengan alat *mikro tube*, vorteks, *sentrifuge*, dan spektrofotometer UV/VIS 5200 METASH. Membran yang digunakan untuk dialisis yaitu membran selofan. Semua alat dan bahan yang digunakan dalam keadaan steril, disterilisasi menggunakan autoklaf.

Substrat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu serbuk kulit lunak buah kopi. Kapang yang digunakan yaitu *Aspergillus* sp. VT12 dalam media *Potato Dextrose Agar* (PDA) miring. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini yaitu alkohol 70%, larutan bufer asetat 20 mM pH 5, larutan *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) dalam bufer asetat 20 mM pH 5, Natrium hidroksida, Asam asetat, Natrium klorida, Natrium Azida, dan Reagen *Somogyi-Nelson*. Matriks kromatografi yang digunakan untuk purifikasi yaitu matriks DEAE *Cellulose* DE-52.

### 3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian terdiri atas 3 tahapan utama, yaitu persiapan penelitian, produksi ekstrak kasar enzim, dan purifikasi parsial. Berikut ini merupakan alur rancangan penelitian.



Gambar 3.1 Alur rancangan penelitian

### 3.4 Prosedur Penelitian

#### 3.4.1 Persiapan Penelitian

##### a. Peremajaan *Aspergillus* sp. VT12

*Aspergillus* sp. VT12 diremajakan pada media PDA miring. Kultur dalam stok lama diinokulasikan pada media PDA miring dengan metode gores (komposisi PDA pada lampiran 3.1). Kultur kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama 3x24 jam (Ubaidillah dan Muzakhar, 2019).

#### b. Penentuan Kadar Air Kulit Lunak Buah Kopi

Penentuan kadar air dilakukan dengan cara memasukkan 5 gram serbuk halus kulit buah kopi ke dalam kantong teh dan direndam dalam akuades selama 2 jam. Kantong teh tersebut kemudian digantung selama 12 jam sampai tidak ada air yang menetes lalu ditimbang untuk mengetahui berat basahanya. Serbuk halus kulit lunak buah kopi dalam kantong teh dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C selama 7 jam dan ditimbang. Perlakuan pengeringan dalam oven dan penimbangan dilakukan berulang kali sampai diperoleh berat konstan dengan tujuan untuk mengetahui berat keringnya. Kadar air kulit buah kopi ditentukan dari nilai selisih antara berat basah dan berat kering (Khofiya *et al.*, 2019).

#### c. Pembuatan Substrat Kulit Lunak Buah Kopi Jenuh Air

Substrat kulit lunak buah kopi jenuh air digunakan sebagai media fermentasi padat. Serbuk halus kulit kopi ditimbang sebanyak 5 gram dan dimasukkan ke labu Erlenmeyer 250 ml. Media fermentasi padat dibuat sebanyak 16 erlenmeyer untuk jam ke-0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, dan 168 dengan masing-masing 2 ulangan. Labu Erlenmeyer yang berisi serbuk halus kulit kopi ditambah akuades sesuai dengan hasil perhitungan kadar air jenuh kulit kopi, kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf (Mrudula dan Murugammal, 2011).

#### d. Pembuatan Kurva Standar Konsentrasi Glukosa

Kurva standar glukosa dibuat berdasarkan analisis gula reduksi menggunakan metode *Somogy-Nelson*. Stok glukosa konsentrasi 100 µg/ml dibuat menjadi 0 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, 60 µg/ml, 80 µg/ml, dan 100 µg/ml. Sebanyak 500 µl diambil dari masing-masing konsentrasi glukosa kemudian diinkubasi 37°C dalam *waterbath* selama 20 menit. Reagen *Somogy* ditambahkan sebanyak 500 µl pada masing-masing sampel dan dididihkan dalam penangas air selama 15 menit. Sampel larutan didinginkan kemudian masing-masing tabung ditambah dengan reagen *Nelson* sebanyak 500 µl dan akuades filtrasi sebanyak 2,5 ml. Larutan sebanyak 1,3 ml diambil dari masing-masing sampel dan dimasukkan ke eppendorf kemudian disentrifuge 8000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang dihasilkan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 500 nm sebanyak 3 kali ulangan tiap sampel. Data

konsentrasi larutan glukosa dan nilai absorbansi tiap konsentrasinya digunakan untuk membuat kurva standar glukosa (Sabilla dan Susanti, 2019).

### 3.4.2 Produksi Ekstrak Kasar Enzim

#### a. Optimasi Produksi Ekstrak Kasar Enzim Selulase

Optimasi dilakukan dengan metode fermentasi padat atau *solid state fermentation*. Umur kapang yang digunakan yaitu 72 jam pada media PDA. *Aspergillus sp.* VT12 disuspensikan dengan akuades sebanyak 5 ml. Spora dikerik hingga terlepas dari media dan dikumpulkan dalam satu wadah kemudian dihomogenkan. Sebanyak 1 ml suspensi spora kepadatan  $10^8$  spora/ml diinokulasikan ke media SSF (5 g serbuk halus kulit lunak buah kopi dengan kadar air 9,2 ml). Kultur diinkubasi pada suhu  $30^\circ\text{C}$  selama 1-7 hari. Pemanenan ekstrak kasar enzim dilakukan setiap 24 jam sekali dari hari ke-0 sampai hari ke-7 (Perdani *et al.*, 2019). Pemanenan terdiri dari 2 tahap yaitu preparasi dan ekstraksi ekstrak kasar enzim. Preparasi dilakukan dengan cara melarutkan 0,01% Natrium azide dan 1% NaCl dalam 400 ml akuades. Larutan tersebut dimasukkan sebanyak 10 ml ke dalam media SSF yang berisi inokulum yang akan dipanen kemudian diinkubasi *shaker* selama 12 jam. Sampel difiltrasi menggunakan kain sintetis lalu filtrat yang dihasilkan disentrifuge 8000 rpm selama 5 menit. Supernatan yang dihasilkan merupakan ekstrak kasar enzim dan selanjutnya diuji aktivitasnya (Khofiya *et al.*, 2019).

#### b. Perhitungan Jumlah Spora *Aspergillus sp.* VT12

Perhitungan jumlah spora *Aspergillus sp.* VT12 dilakukan secara langsung menggunakan *Haemocytometer*. Perhitungan jumlah spora dilakukan setelah diinokulasikan ke media SSF. Sampel diambil sebanyak 20  $\mu\text{l}$  lalu dimasukkan ke *haemocytometer* dan dihitung jumlah spora pada bidang hitung *haemocytometer* dengan 3 kali ulangan (Purwanto *et al.*, 2016). Jumlah spora yang diperoleh kemudian dihitung dengan rumus:

$$S = \frac{n}{L \times t \times d} \times 10^3$$

Keterangan:

S = Jumlah spora/ml

- n = Jumlah spora yang dihitung  
L = Luas kotak bidang hitung ( $0,2 \times 0,2 = 0,04 \text{ mm}^2$ )  
t = Kedalaman bidang hitung (0,1 mm)  
d = Faktor pengenceran  
 $10^3$  = volume suspensi yang diambil ( $1 \text{ ml} = 10^3 \text{ mm}^3$ )

#### c. Uji Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Selulase

Uji aktivitas ekstrak kasar enzim dilakukan dengan analisis gula reduksi menggunakan metode *Somogy-Nelson*. Substrat CMC 0,5% dalam 20 mM bufer asetat pH 5 sebanyak 500  $\mu\text{l}$  dimasukkan dalam tabung uji dan diinkubasi dalam *waterbath* pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 20 menit. Uji aktivitas ini dibagi menjadi 2 kelompok yaitu kelompok uji dan kontrol masing-masing berjumlah 4 tabung. Ada 2 erlenmeyer yang berisi ekstrak kasar enzim setiap kali panen, dan setiap erlenmeyer dibuat ulangan sebanyak 2 kali. Ekstrak kasar enzim sebanyak 50  $\mu\text{l}$  ditambahkan pada tabung kelompok uji sedangkan kelompok kontrol tidak, kemudian diinkubasi dalam *waterbath* pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 2 jam. Reagen *Somogy* sebanyak 500  $\mu\text{l}$  ditambahkan pada kelompok uji dan kontrol kemudian dididihkan pada suhu  $100^\circ\text{C}$  selama 15 menit. Penambahan ekstrak kasar enzim sebanyak 50  $\mu\text{l}$  pada kelompok kontrol dilakukan saat sampel dididihkan pada penangas. Sampel larutan ditunggu hingga dingin kemudian masing-masing sampel ditambah dengan reagen *Nelson* sebanyak 500  $\mu\text{l}$  dan akuades filtrasi sebanyak 2,5 ml. Sampel disentrifuge 8000 rpm selama 10 menit kemudian supernatan yang dihasilkan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 500 nm sebanyak 3 kali ulangan tiap sampel uji. Hasil absorbansi kemudian dihitung menggunakan persamaan regresi kurva standar glukosa yang telah dibuat sehingga menghasilkan nilai gula reduksi (Azizah *et al*, 2014; Ubaidillah dan Muzakhar, 2019).

#### d. Produksi Skala Besar Ekstrak Kasar Enzim

Produksi ekstrak kasar enzim dilakukan dengan menggunakan 40 g serbuk kulit buah kopi dan akuades sebanyak 73,6 ml dalam erlenmeyer 2000 ml. Waktu inkubasi media SSF yang akan digunakan untuk produksi ekstrak kasar enzim disesuaikan dengan hasil optimasi yang telah dilakukan yaitu 120 jam. Enzim

dipanen dengan metode sama seperti *point* 3.4.c. Ekstrak kasar enzim yang dihasilkan kemudian disimpan pada suhu 4°C (Dewi dan Muzakhar, 2018).

### 3.4.3 Purifikasi Parsial Ekstrak kasar enzim

#### a. Dialisis membran selofan

Dialisis dilakukan menggunakan membran selofan yang berukuran 12-14.000 Da. Enzim hasil produksi skala besar sebanyak 50 ml dimasukkan ke dalam membran selofan kemudian direndam dalam bufer asetat 20 mM pH 5 sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer* selama 24 jam. Bufer diganti setiap 12 jam. Hasil dialisis diuji aktivitasnya berdasarkan gula reduksi yang dihasilkan menggunakan metode *Somogy-Nelson* dan diukur nilai absorbansinya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 500 nm. Kuantitas protein diukur pada panjang gelombang 280 nm (Sriwahyuni *et al.*, 2015).

#### b. DEAE *Cellulose* DE-52

Enzim dari hasil dialisis membrane selofan yang memiliki aktivitas tertinggi diambil sebanyak 20 ml dan diaplikasikan pada kolom DEAE *Cellulose Chromatography* yang telah disetimbangkan dengan penambahan bufer asetat 20 mM pH 5. Pengaplikasian enzim pada kolom DEAE *Cellulose Chromatography* dilakukan dengan menambahkan enzim sebanyak 20 ml pada matriks DEAE. Protein yang tersisa dalam matriks dibersihkan dengan metode *stepwise* pada *gradient mixer* menggunakan berbagai konsentrasi larutan NaCl 0 M; 0,1 M; 0,2 M; 0,3 M; 0,4 M; 0,5 M, dan 0,6 M dalam bufer asetat 20 mM pH 5. Kecepatan eluen diatur sebesar 0,5 ml/menit. Eluat dari masing-masing konsentrasi kemudian ditampung sebanyak 5 ml tiap fraksi. Kuantitas protein tiap fraksi diukur pada panjang gelombang 280 nm dan gula reduksi diuji dengan metode *Somogy-Nelson* kemudian diukur pada panjang gelombang 500 nm (Abdullah *et al.*, 2014; Dewi dan Muzakhar, 2018; Megha *et al.*, 2015; Muzakhar, 2019)

### 3.5 Analisis Data

Hasil penelitian dilakukan melalui analisis deskriptif berdasarkan grafik dan data yang diperoleh.



## BAB 5. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Produksi selulase asal *Aspergillus* sp. VT12 dalam fermentasi padat menggunakan kulit lunak buah kopi memiliki waktu inkubasi optimal pada jam ke-120 dengan aktivitas sebesar 0,52 U/ml. Enzim ekstrak kasar setelah dipurifikasi dengan metode dialisis membran selofan dan kromatografi DEAE *Cellulose 52* mengalami peningkatan kemurnian hingga 5,5 kali lipat, serta peningkatan aktivitas spesifik pada setiap tahapan pemurnian. Sehingga pemurnian yang dilakukan berhasil memisahkan selulase dengan protein *non-target* lainnya.

### 5.2 Saran

Sebaiknya perlu dilakukan purifikasi lanjutan agar enzim selulase yang diperoleh semakin murni serta penelitian lanjutan tentang karakterisasi pH dan suhu dari enzim selulase asal *Aspergillus* sp. VT12.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, Q. L., M. H. Al-Jibrori, S. B. Al-Arriji. 2014. Extraction, Purification, and Characterization of Lipoxygenase from *Pleurotus ostreatus*. *Iraqi Journal of Science*. 55(1): 61-69.
- Agustini, L., R. S. B. Irianto, M. Turjaman, S. A. Faulina, R. Ariantari, S. Stepahandra, H. Yuniar, Aryanto, Najmulah, dan A. Yani. 2017. Pengaruh Kondisi Kultur pada Aktivitas Selulase Isolat *Pycnoporus* sp. dan *Phlebiopsis* sp. *Jurnal Selulosa*. 7(2): 79-90.
- Alami, N. H., N. D. Kuswytasari, E. Zulaika, dan M. Shovitri. 2017. Optimization of Cellulase Production by *Candida* G3.2 from the Rhizosphere of Gunung Anyar Mangrove Surabaya. *Proceeding of International Conference on Green Technology*. 8(1): 399-406.
- Azizah, S. N., K. Muzakhar, dan S. Arimurti. 2014. Skrining Bakteri Selulolitik Asal *Vermicomposting* Tandan Kosong Kelapa Sawit. *Jurnal Berkala Sainstek*. 2(1): 26-30.
- BPS (Badan Pusat Statistik) Jawa Timur. 2018. *Produksi Kopi Berbagai Kota di Jawa Timur*. [jatim.bps.go.id](http://jatim.bps.go.id). [Diakses pada 29 November 2019]
- Campbell, N. A. dan Reece J. B. 2008. *Biology*. Eight Edition. London: Pearson Education. Terjemahan oleh D. T. Wulandari. 2010. *Biologi*. Edisi 8, Jilid 1. Jakarta: Erlangga.
- Chanakya, H. N. dan A. A. P. De Alwis. 2004. Environmental Issues and Management in Primary Coffe Processing. *Process Safety and Environmental Protection*. 82(B4): 291-300.
- Corro, G., L. Paniagua, U. Pal, F. Banuelos, dan M. Rosas. 2013. Generation of Biogas from Coffe-Pulp and Cow-Dung Co-Digestion: Infrared Studies of Postcombustion Emissions. *Energy Conversion and Management* 74: 471-481.
- Das. A., T. Paul, S. K. Halder, C. Maity, P. K. D. Mohapatra, B. R. Pati, dan K. C. Mondal. 2013. Study on Regulation of Growth and Biosynthesis of Cellulolytic Enzymes from Newly Isolated *Aspergillus fumigatus* ABK9. *Polish Journal of Microbiology*. 62(1): 31-43.
- Dewi, R. F. dan K. Muzakhar. 2018. Purification and Characterization of Cellulase of Mold Isolated from Vermicomposting Process of Palm Oil Empty Fruit Bunches. *Jurnal Biodjati*. 3(1): 1-7.

- Falkoski, D. L., V. M. Guimarães, M. N. de Almeida, A. C. Alfenas, J. L. Colodette, dan S. T. de Rezende. 2012. Characterization of Cellulolytic Extract from *Pycnopus sanguineus* PF-2 and Its Application in Biomass Saccharification. *Appl Biochem Biotechnol* 166: 1586-1603.
- Fan L., A. T. Soccol, A. Pandey, dan C. R. Soccol. 2003. Cultivation of *Pleurotus* Mushrooms on Brazilian Coffe Husk and Effects of Caffeine and Tannic Acid. *Micologia Aplicada International*. 15(1): 15-21.
- Franca, A. S., L. S. Oliveira, dan M. E. Ferreira. 2009. Kinetics and Equilibrium Studies of Methylene Blue Adsorption by Spent Coffe Grounds. *Desalination* 249: 267-272.
- Griebeler, N., A. E. Polloni, D. Remonato, F. Arbter, R. Vardanega, J. L. Cechet, M. D. Luccio, D. Oliveira, H. Treichel, R. L. Cansian, E. Rigo, and J. L. Ninow. 2011. Isolation and Screening of Lipase-Producing Fungi with Hydrolytic Activity. *Food Bioprocess Technol*. 4: 578-586.
- Herrera, L. M., V. Brana, L. F. Fraguas, dan S. C. Sowinski. 2019. Characterization of the Cellulase-Secretome Produced by the Antarctic Bacterium *Flavobacterium* sp. AUG42. *Microbiological Reseachr*. 223(225): 13-21.
- ICO (*International Coffe Organization*). 2019. *Total Production by All Exporting Countries*. [www.ico.org](http://www.ico.org). [Diakses pada 27 September 2019]
- Isrami, F. dan Aminin A. L. N. 2014. Aktivitas Selulase dan Xilanase dari Komplek Enzim Lignoselulolitik Termostabil Hasil Penguraian Batang Pisang. *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*. 17(2): 17-22.
- Juturu, V. dan J. C. Wu. 2014. Microbial Cellulases: Engineering, Production, and Application. *Renewable and Suistanable Energy Reviews*. 33: 188-203.
- Khofiya, Z. N., R. Winarsa, dan K. Muzakhar. 2019. Hidrolisis Kulit Buah Kopi oleh Kapang *Pestalotiopsis* sp. VM9 seta Pemanfaatan Hidrolisatnya sebagai Medium Produksi Protein Sel Tunggal *Saccharomyces cerevisiae*. *Jurnal Berkala Sainstek*. 7(1): 19-23.
- Khoshnevisan, K., A. K. Bordbar, D. Zare, D. Davoodi, M. Noruzi, M. Barkhi, dan M. Tabatabaei. 2011. Immobilization of Cellulase Enzyme on Superparamagnetic Nanoparticles and Determination of Its Activity dan Stability. *Chemical Engineering Journal* 171: 669-673.
- Klich, M. A. 2002. *Identification of Common Aspergillus sp.* Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- Kuhad, R. C., R. Gupta, dan A. Singh. 2011. Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. *Enzim Research* 2011: 1-10.

- Kumakura, M. dan I. Kaetsu. 1978. Radiation-Induced Degradation and Subsequent Hydrolysis of Waste Cellulose Materials. *International Journal of Applied Radiation and Isotopes* 30: 139-141.
- Kusumadjaja, A. P. dan R. P. Dewi. 2005. Penentuan Kondisi Optimum Enzim Papain dari Pepaya Burung Varietas Jawa (*Carica papaya*). *Indo. J. Chem.* 5(2): 147-151.
- Megha, S. V., S. Maragathavalli, S. Brindha, V. Karthikeyan, B. Annadurai, dan S. K. Gangwar. 2015. Isolation and Purification of Cellulase. *International Journal of Science and Nature.* 6(3): 474-479.
- Mrudula, S. dan R. Murugammal. 2011. Production of Cellulase by *Aspergillus niger* under Submerged and Solid State Fermentation Using Coir Waste as a Substrate. *Brazilian Journal of Microbiology* 42: 1119-1127.
- Murthy, P. S. dan M. M. Naidu. 2012. A Suitable Management of Coffee Industry by-Product and Value Addition-A Review. *Resources, Conservation, and Recycling* 66: 45-58.
- Mussatto, S. I., E. M. S. Machado, S. Martins, dan J. A. Teixeira. 2011. Production, Composition, and Application of Coffee and Its Industrial Residues. *Food Bioprocess Technol* 4: 661-672.
- Muzakhar, K. 2019. A Consortium of Three Enzymes: Xylanase, Arabinofuranosidase, and Cellulase from *Aspergillus* sp. which Liquefied Coffee Pulp Wastes. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* 546: 1-8.
- Muzakhar, K., Sutoyo, dan Siswoyo. 2014. Sugar Production by Digesting of Oil Palm Empty Fruit Bunch Using Extracellular Enzymes from *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei* for Ethanol Production. *International Journal of Biosciences and Biotechnology.* 2(1): 32-38.
- Muzakhar, K., W. Yuniar, S. Ubaidillah, L. Ikhrimah, S. H. Solehah, L. Hikmawati, dan N. Imamah. 2017. Examination of Coffee Pulp Waste for Medium in Cellulase Production by *Aspergillus* sp. *Proceeding of the 7<sup>th</sup> Annual Basic International Conference.*
- Nochure, S.V., M.F. Roberts, and A.I Demai. 1993. True Cellulase Production by *Clostridium thermocellum* Grown on Different Carbon Sources. *Journal of Biotech Letters* 15: 641-646.
- Nooralabettu, K. P. 2014. Effective Anion Exchange Chromatographic Purification of Hepatopancreatic Alkaline Phosphatase of Red Shrimp, *Solenocera choprai*. *Int J Anal Bio-Sci.* 2(2): 41-51.

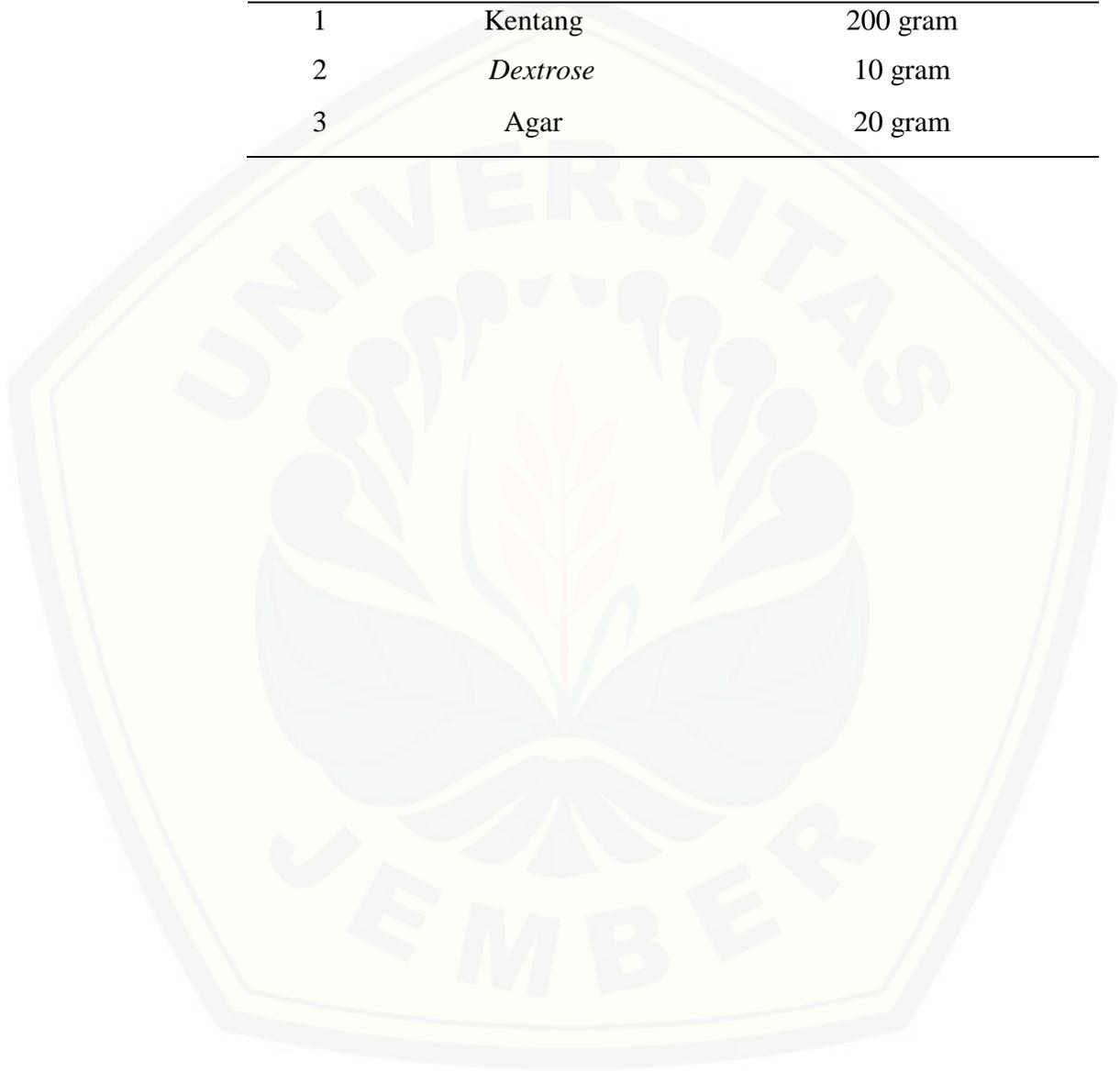
- Nopiani, Yandri, A. S., dan Sutopo H. 2016. Peningkatan Kestabilan Enzim Lipase dari *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dengan Amobilisasi Menggunakan Bentonit. *Jurnal Analis Kesehatan*. 5(1): 504-510.
- Pandey, A., C.R. Soccol, P. Nigam, D. Brand, R. Mohan, dan S. Roussos. 2000. Biotechnological Potential of Coffe Pulp and Coffe Husk for Bioproces. *Biochemical Engineering Journal* 6: 153-162.
- Peij, N. M. E. V., M. M. C. Gielkens, R. P. D. Vries, J. Visser, dan L. H. D. Graaff. 1998. The Transcriptional Activator XInR Regulates Both Xylanolytic and Endoglucanase Gene Expression in *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(10): 3615-3619.
- Perdani, M. S., G. Margaretha, M. Sahlan, dan H. Hermansyah. 2019. Solid State Fermentation Method for Production of Laccase Enzyme with Bagasse, Cornstalk and Rice Husk as Substrates for Adrenaline Biosensor. *6th International Conference on Energy and Environment Research*. University of Aveiro, Portugal.
- Purwanto, M. I., I. Lakani, dan Asrul. 2016. Uji Efektivitas *Trichoderma* spp. untuk Menekan Perkembangan Jamur *Ganodermaboninense* Pat. pada Media Pelepah Kelapa Sawit. *Jurnal Agrotekbis*. 4(4) : 403-411.
- Roussos, S., M. A. Aquifihuatl, M. R. T. Hernandez, I. G. Perraud, E. Favela, M. Ramakrishna, M. Raimbault, dan G. V. Gonzalez. 1995. Biotechnological Management of Coffee Pulp- isolation, Screening, Characterization, Selection of Caffeine-Degrading Fungi and Natural Microflora Present in Coffee Pulp and Husk. *Appl Microbial Biotechnol*. 42: 756-762.
- Sabilla, I. A. dan E. Susanti. 2019. Pemurnian Parsial Ekstrak Kasar Selulase *Bacillus circulans* dengan Metoda Pengendapan Aseton. *Jurnal Kimia Riset*. 4(1): 40-48.
- Sari, A. R., E. Kusdiyantini, dan M. G. I. Rukmi. 2017. Produksi Selulase oleh Kapang *Aspergillus* sp. Hasil Isolasi dari Limbah Pengolahan Sagu (*Metroxylon* sp.) dengan Variasi Konsentrasi Inokulum pada Fermentasi Terendam Statis. *Jurnal Biologi*. 6(1): 11-20.
- Shanmugapriya, K., P. S. Saravana, Krishnapriya, M. Manoharan, A. Mythili, dan S. Joseph. 2012. Isolation, Screening, and Partial Purificaiton of Cellulase from Cellulase Producing Bacteria. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*. 3(1): 509-514.
- Singh, A., M. Adsul, N. Vaishnav, A. Mathur, dan R. R. Singhanian. 2017. Improved Cellulase Production by *Penicillium janthinellum* Mutant. *Indian Journal of Experimental Biology* 55: 436-440.

- Singhania, R. R., A. K. Patel, C. R. Soccol, dan A. Pandey. 2009. Recent Advances in Solid State Fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 44: 13-18.
- Sriwahyuni, L., T. D. Rosahdi, dan A. Supriadin. 2015. Isolasi dan Karakterisasi Amilase dari Biji Durian (*Durio* sp.). *Jurnal al Kimiya*. 2(1): 18-23.
- Sukumaran, R. K., R. R. Sianghania, dan A. Pandey. 2005. Microbial Cellulase-Production, Application, and Challenges. *Journal of Scientific and Industrial Reseacrh* 64: 832-844.
- Suryadi, H., Sutriyo, Mi'rajunnisa, dan Y. P. I. Lestari. 2019. Potential of Cellulase of *Penicillium vermiculatum* for Preparation and Characterization of Microcrystalline Cellulose Produced from  $\alpha$ -Cellulose of Kapok Pericarpium (*Ceiba petandra*). *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 11(4): 92-97.
- Ubaidillah, S. dan K. Muzakhar. 2019. Sugar-Rich Hydrolyzated from Coffe Pulp Waste which Produced under Solid State Fermentation by *Pestalotiosis* sp. VM9 and *Aspergillus* sp. VTM5, and Its Efficiency as Medium for Single Cell Protein *Saccharomyces cerevisiae*. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* 546: 1-8.
- Vaishnav, N., A. Singh, M. Adsul, P. Dixit, S.K. Sandhu, A. Mathur, S.K. Puri, dan R.R. Singhania. 2018. *Penicillium*: The Next Emerging Champion for Cellulase Production.
- Wakai, S., N. Nakashima, C. Ogino, H. Tsutsumi, Y. Hata, dan A. Kondo. 2019. Modified Expression of Multi-Cellulases in a Filamentous Fungus *Aspergillus oryzae*. *Bioresource Technology* 276: 146-153.
- Yuniar, W. 2013. Skrining dan Identifikasi Kapang Selulolitik pada Proses Vermikomposting Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS). *Skripsi*. Jember: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.
- Zhang, X. Z. dan Y. H. P. Zhang. 2013. Cellulases: Characteristic, Sources, Production, and Applications. *Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers, First Edition*. John Wiley & Sons, Inc

**LAMPIRAN**

**Lampiran 3.1 Komposisi Media PDA**

<b>No</b>	<b>Bahan</b>	<b>Jumlah/L</b>
1	Kentang	200 gram
2	<i>Dextrose</i>	10 gram
3	Agar	20 gram



**Lampiran 3.2 Komposisi Reagen Somogyi-Nelson**

## 3.2.1 Komposisi Reagen Somogyi

No	Bahan	Jumlah/Liter
1	$\text{Na}_2\text{CO}_3$	24 gram
2	$\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6\text{H}_2\text{O}$	12 gram
3	$\text{NaHCO}_3$	16 gram
4	$\text{CUSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 10 %	40 ml
5	$\text{Na}_2\text{SO}_4$	180 gram
6	Akuades	1000

## 3.2.2 Komposisi Reagen Nelson

No	Bahan	Jumlah/Liter
1	$(\text{NH}_4)_2\text{MO}_7\text{O}_{24}$	50 gram
2	$\text{H}_2\text{SO}_4$	46 gram
3	$\text{NaHSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	6 gram
4	Akuades	1000 ml

## Lampiran 3.3 Kurva Standart Glukosa

Konsentrasi ( $\mu\text{g/ml}$ )	Absorbansi
0	0,000
20	0,026
40	0,067
60	0,105
80	0,154
100	0,203

