



**AKTIVITAS ENZIM EKSTRASELULER *Aspergillus niger*  
DALAM MENGHIDROLISIS TANDAN KOSONG KELAPA SAWIT**

**SKRIPSI**

Oleh

**Ainul Latifah  
NIM 101810401034**

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





**AKTIVITAS ENZIM EKSTRASELULER *Aspergillus niger*  
DALAM MENGHIDROLISIS TANDAN KOSONG KELAPA SAWIT**

**SKRIPSI**

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

Oleh

**Ainul Latifah  
NIM 101810401034**

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

**PERSEMBAHAN**

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. kakak-kakakku tercinta, Taufik Shobaro, Rika Diana Safitri, Mudhofir, Romi Zulaikha, Tito Bramantyo Aji, dan Asmaul Chusna atas untaian doa yang tiada henti, kasih sayang, kesabaran, dan nasihat-nasihatnya;
2. mas Didik Suwarsono dan Keluarga Bapak Sutrisno di Madiun atas doa dan motivasi yang diberikan;
3. guru-guru sejak taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi, yang telah banyak memberikan ilmu dan bimbingan;
4. Almamater Jurusan Biologi FMIPA Universitas Jember, SMAN 3 Blitar, SMPN 1 Blitar, SDN Karangsari 2 Blitar, dan TK Al-Hidayah Blitar.

**MOTO**

Katakanlah: adakah sama orang-orang yang mengetahui dengan orang-orang yang tidak mengetahui?. Sesungguhnya orang yang berakallah yang dapat menerima pelajaran.

(terjemahan Surat *Az-Zumar* ayat 9)\*)

Kelebihan seorang alim (ilmuwan) terhadap seorang ‘abid (ahli ibadah) ibarat bulan purnama terhadap seluruh bintang.

(HR. Abu Daud)\*\*)

Educating the mind without educating the heart is no education at all.

(Aristotle)

---

\*<sup>)</sup> Departemen Agama Republik Indonesia. 2005, *Al Qur'an dan Terjemahannya*. Bandung: CV Penerbit Jumanatul ‘Ali-Art (J-ART).

\*\*<sup>)</sup> Al-Bani, Muhammad, Nashiruddin. Tanpa Tahun. *Shahih Sunan Abu Daud*. Jilid 3. Jakarta: Penerbit Pustaka Azzam.

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Ainul Latifah

NIM : 101810401034

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Aktivitas Enzim Ekstraseluler *Aspergillus niger* dalam Menghidrolisis Tanda Kosong Kelapa Sawit” adalah benar-benar hasil karya ilmiah sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya dan skripsi ini belum pernah diajukan pada institusi manapun serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 30 April 2015

Yang menyatakan,

Ainul Latifah

NIM 101810401034

**SKRIPSI**

**AKTIVITAS ENZIM EKSTRASELULER *Aspergillus niger*  
DALAM MENGHIDROLISIS TANDAN KOSONG KELAPA SAWIT**

Oleh  
Ainul Latifah  
NIM 101810401034

Pembimbing

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

Dosen pembimbing Anggota : Drs. Rudju Winarsa, M.Kes.

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul "Aktivitas Enzim Ekstraseluler *Aspergillus niger* dalam Menghidrolisis Tandan Kosong Kelapa Sawit" telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember pada:

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas  
Jember.

Tim Penguji :

Ketua,

Sekretaris,

Dr. Kahar Muzakhar, S.Si.  
NIP 196805031994011001

Drs. Rudju Winarsa, M.Kes.  
NIP 196008161989021001

Anggota I,

Anggota II,

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

Drs. Siswanto, M.Si.  
NIP 196012161993021001

Mengesahkan  
Dekan,

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

## RINGKASAN

**Aktivitas Enzim Ekstraseluler *Aspergillus niger* dalam Menghidrolisis Tandan Kosong Kelapa Sawit**; Ainul Latifah, 101810401034; 2015: 36 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Tandan kosong kelapa sawit (TKKS) merupakan limbah padat produksi kelapa sawit yang menempati jumlah terbesar dan pemanfaatannya masih terbatas. Limbah ini dapat terdekomposisi secara alami namun diperlukan waktu yang cukup lama, yaitu 6-12 bulan karena adanya kandungan lignoselulosa seperti selulosa 41,30 – 46,50 %, hemiselulosa 25,30 – 33,80 %, dan lignin 27,60 – 32,50% serta dengan nisbah C/N sebesar 70-100. Proses dekomposisi yang terlalu lama dapat memberikan dampak negatif terhadap lingkungan namun pemanfaatan yang tepat dari limbah ini dapat dimanfaatkan lebih lanjut sebagai pupuk, pakan ternak, maupun difermentasi menjadi bioetanol. Oleh karena itu, perlu adanya proses mempercepat dekomposisi TKKS salah satunya dengan hidrolisis enzimatis. *Aspergillus niger* merupakan kapang yang mampu menghasilkan berbagai macam enzim ekstraseluler seperti selulase, hemiselulase, pektinase, lipase, mananase, dan inulinase. Tujuan dari penelitian ini adalah pemanfaatan enzim ekstraseluler yang dihasilkan oleh *Aspergillus niger* dalam menghidrolisis komponen TKKS dan mengetahui aktivitas enzimnya berdasarkan gula pereduksi yang terbentuk metode Somogyi-Nelson.

Penelitian ini dilaksanakan terdiri dari beberapa tahapan antara lain: (i) persiapan bahan *Aspergillus niger* dan TKKS untuk media produksi enzim dan media uji, serta pembuatan larutan uji Somogyi-Nelson; (ii) optimasi waktu produksi enzim, dilanjutkan produksi *crude enzim* skala besar; (iii) karakterisasi aktivitas enzim berdasarkan stabilitas dan optimum: pH dan suhu; dan (iv) pengukuran kemampuan hidrolisis TKKS oleh *crude enzim* pada beberapa waktu inkubasi.

Hasil penelitian diperoleh bahwa waktu produksi terbaik untuk mendapatkan *crude enzim Aspergillus niger* menggunakan media TKKS adalah empat hari. Kondisi lingkungan untuk mempertahankan agar enzim tidak mengalami perubahan di lingkungan yaitu pada rentang pH 4.5 sampai 9 dan suhu ruang ( $2\pm 28^{\circ}\text{C}$ ) sampai suhu  $45^{\circ}\text{C}$ . Sedangkan analisis kemampuan hidrolisis TKKS oleh *crude enzim* menunjukkan bahwa reaksi optimum jika menggunakan pH 7.5, suhu  $40^{\circ}\text{C}$ , dan waktu inkubasi 6 jam. Gula pereduksi yang dihasilkan sebesar  $756\ \mu\text{g/ml}$  dan kemampuan hidrolisis sebesar 1.5%.

## PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, taufik dan hidayahNya sehingga penulis dapat menyusun dan menyelesaikan skripsi yang berjudul “Aktivitas Enzim Ekstraseluler *Aspergillus niger* dalam Menghidrolisis Tandan Kosong Kelapa Sawit”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Dr. Kahar Muzakhar, S.Si., selaku Dosen Pembimbing Utama dan Drs. Rudju Winarsa, M.Kes., selaku Dosen Pembimbing Anggota yang dengan penuh kesabaran memberikan bimbingan, pengarahan, bantuan, dan nasihat kepada penulis sampai skripsi ini terselesaikan;
2. Dr. rer. nat. Kartika Senjarini, M.Si. dan Drs. Siswanto, M.Si., selaku Dosen Penguji yang telah memberikan saran dan kritik untuk kesempurnaan skripsi ini;
3. kakak-kakakku dan seluruh keluarga besar di Blitar dan Madiun yang telah mencurahkan segalanya, memberikan dorongan semangat dan sebagai sumber inspirasi;
4. Ir. Endang Soesetyaningsih, Sutrisno, Laras, Citra, Sri, Rosita, dan Yuniar yang telah membantu penulis selama melakukan penelitian;
5. seluruh teman-teman Laboratorium Mikrobiologi dan BOLU atas kebersamaan yang telah tercipta;
6. semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis juga menerima kritik dan saran demi kesempurnaan skripsi ini serta berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat untuk perkembangan ilmu pengetahuan bagi semua pihak yang membacanya.

Jember, 30 April 2015

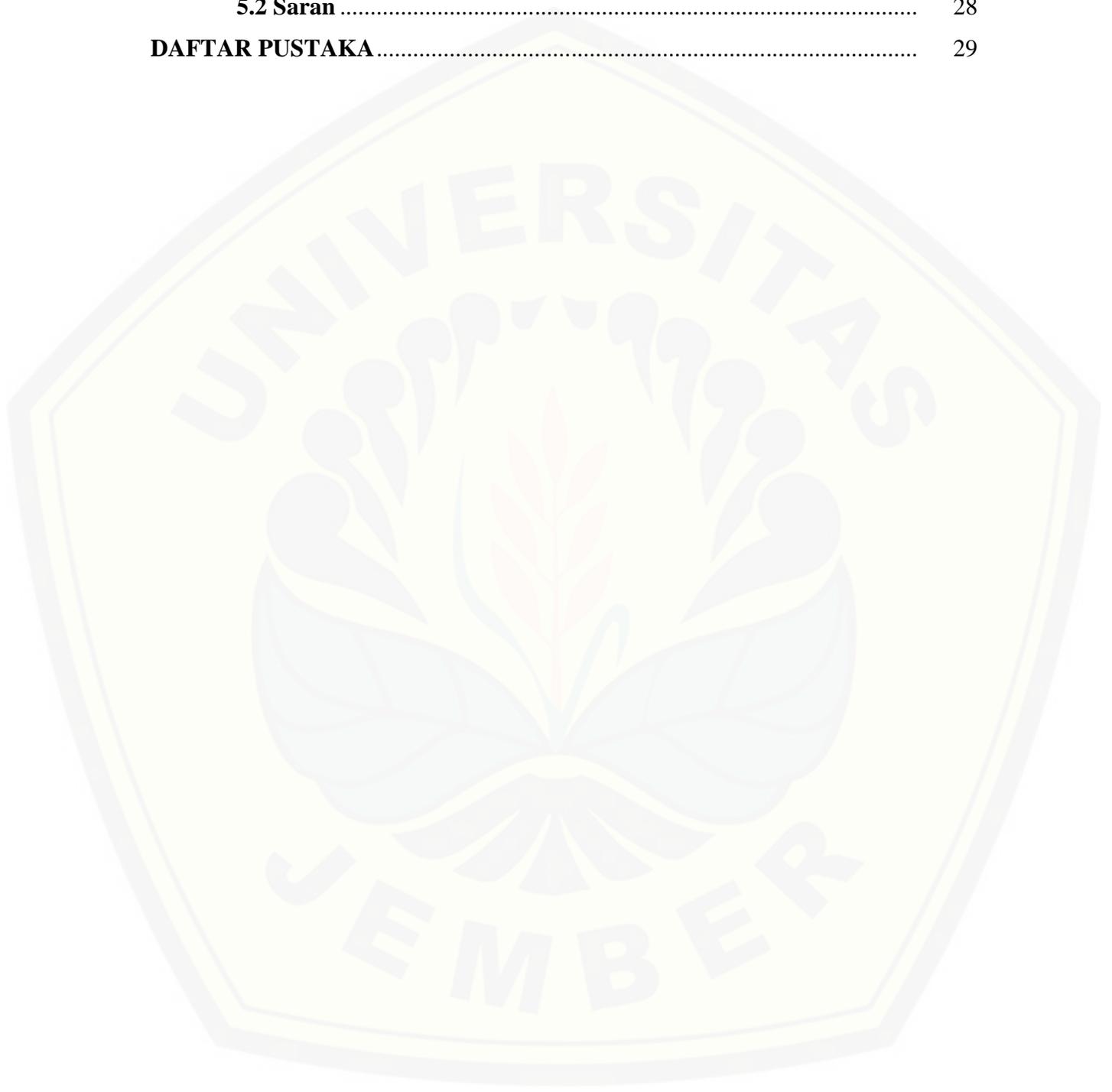
Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	ii
<b>HALAMAN MOTO</b> .....	iii
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	iv
<b>HALAMAN PEMBIMBINGAN</b> .....	v
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	vi
<b>RINGKASAN</b> .....	vii
<b>PRAKATA</b> .....	ix
<b>DAFTAR ISI</b> .....	x
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xiii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xiv
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xv
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
<b>1.1 Latar belakang</b> .....	1
<b>1.2 Rumusan masalah</b> .....	3
<b>1.3 Batasan Masalah</b> .....	3
<b>1.3 Tujuan</b> .....	3
<b>1.4 Manfaat</b> .....	4
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	5
<b>2.1 Tandan Kosong Kelapa Sawit</b> .....	5
<b>2.2 <i>Aspergillus niger</i></b> .....	8
<b>2.3 Dekomposisi Bahan Organik</b> .....	10
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN</b> .....	12
<b>3.1 Tempat dan Waktu Penelitian</b> .....	12
<b>3.2 Bahan dan Alat</b> .....	12

<b>3.3 Prosedur Penelitian</b> .....	12
3.3.1 Persiapan Bahan.....	13
3.3.1.1 Peremajaan Isolat.....	13
3.3.1.2 Pembuatan Substrat Alkali Ekstrak TKKS .....	13
3.3.1.3 Persiapan Media Produksi Enzim.....	14
3.3.1.4 Pembuatan Reagen Somogyi dan Nelson .....	14
3.3.1.5 Pembuatan Kurva Kalibrasi.....	15
3.3.2 Produksi Enzim Ekstraseluler Ekstrak Kasar ( <i>Crude Enzim</i> ). .....	16
3.3.2.1 Penentuan Kepadatan Spora <i>Aspergillus niger</i> .....	16
3.3.2.2 Optimasi Waktu Produksi Enzim .....	16
3.3.2.3 Produksi Enzim.....	18
3.3.3 Analisis Kuantitatif Aktivitas <i>Crude Enzim Aspergillus niger</i> dalam Menghidrolisis TKKS Berdasarkan Terbentuknya Gula Pereduksi Metode Somogyi-Nelson .....	18
3.3.3.1 Karakterisasi Kemampuan Hidrolisis Berdasarkan Stabilitas dan Optimum : pH dan Suhu .....	18
3.3.3.2 Pengukuran Kemampuan Hidrolisis TKKS oleh <i>Crude Enzim Aspergillus niger</i> pada Beberapa Waktu Inkubasi .....	19
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	20
<b>4.1 Kepadatan Spora <i>Aspergillus niger</i> pada Media TKKS Agar 0.1%</b> .....	20
<b>4.2 Waktu Optimum Produksi Enzim</b> .....	21
<b>4.3 Karakterisasi Kemampuan Hidrolisis TKKS oleh Enzim Ekstraseluler <i>Aspergillus niger</i> Berdasarkan pH dan Suhu</b> .....	23
<b>4.4 Kemampuan Hidrolisis TKKS oleh <i>Crude Enzim Aspergillus niger</i> pada Beberapa Waktu Inkubasi</b> .....	26
<b>BAB 5. PENUTUP</b> .....	28

<b>5.1 Kesimpulan.....</b>	<b>28</b>
<b>5.2 Saran .....</b>	<b>28</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>29</b>



**DAFTAR TABEL**

	Halaman
2.1 Komponen TKKS .....	6
2.2 Kandungan hara pada TKKS .....	6
4.1 Persentase aktivitas enzim ekstraseluler <i>Aspergillus niger</i> terhadap kontrol pada penentuan stabilitas pH dan suhu serta kadar gula pereduksi pada penentuan optimum pH dan suhu.....	24

**DAFTAR GAMBAR**

	Halaman
2.1 Tandan kosong kelapa sawit .....	5
2.2 Proses hidrolisis selulosa .....	7
2.3 Struktur sel <i>Aspergillus niger</i> .....	9
4.1 Jumlah kepadatan spora <i>Aspergillus niger</i> terhadap waktu Inkubasi (hari) ..	20
4.2 Hasil gula reduksi selama optimasi waktu produksi <i>crude enzim</i> <i>Aspergillus niger</i> .....	22
4.3 Kurva penentuan stabilitas dan optimum: (a) Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim ekstraseluler <i>Aspergillus niger</i> ; (b) Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim ekstraseluler <i>Aspergillus niger</i> .....	25
4.4 Pengaruh waktu inkubasi terhadap jumlah gula pereduksi yang dihasilkan dari hidrolisis TKKS oleh <i>crude enzim Aspergillus niger</i> .....	26

**DAFTAR LAMPIRAN**

	Halaman
A. Komposisi bahan kimia.....	34
A.1. Komposisi bahan kimia untuk media.....	34
A.2. Komposisi bahan kimia untuk larutan.....	34
B. Kurva standart glukosa.....	35
C. Perhitungan jumlah spora <i>Aspergillus niger</i> .....	35
D. Kadar gula pereduksi pada penentuan waktu produksi enzim ekstraseluler <i>Aspergillus niger</i> .....	36
E. Kadar gula pereduksi pada analisis kemampuan hidrolisis TKKS oleh <i>crude enzim Aspergillus niger</i> .....	36



## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Perkebunan kelapa sawit di Indonesia baik milik swasta maupun negara kini telah berkembang pesat jumlahnya. Dari data Angka Sementara (ASEM) yang dikeluarkan oleh Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian (Pusdatin) tahun 2000 luas areal kelapa sawit di Indonesia seluas 4 juta ha dan pada tahun 2011 mencapai 8,91 juta ha yang meliputi luas areal Perkebunan Besar Swasta (PBS) sebesar 4,65 juta ha (52,22%), luas areal Perkebunan Rakyat (PR) sebesar 3,62 juta ha (40,64%), dan luas areal Perkebunan Besar Negara (PBN) sebesar 0,64 juta ha (7,15%) (Pusdatin, 2011). Produksi kelapa sawit yang meningkat, meningkatkan pula jumlah limbah sisa produksi mengingat basis satu ton tandan buah segar akan dihasilkan minyak sawit kasar sebanyak 0,21 ton (21%), minyak inti sawit sebanyak 0,05 ton (5%) dan sisanya merupakan limbah (Darnoko, 1992). Selanjutnya limbah tersebut disetarakan (jumlah bahan kering) dengan 1.132 kg lumpur sawit, 514 kg bungkil kelapa sawit dan 2.681 kg serat perasan dan 3.386 kg tandan kosong (Sinurat *et al.*, 2012).

Tandan kosong kelapa sawit (TKKS) merupakan limbah padat produksi kelapa sawit yang menempati jumlah terbesar dan pemanfaatannya masih terbatas. TKKS biasanya dibakar dalam *incinerator*, dibiarkan terurai dengan sendirinya untuk selanjutnya dijadikan pupuk, atau dijadikan mulsa (Departemen Pertanian, 2006). Meskipun limbah ini dapat terdekomposisi secara alami namun diperlukan waktu yang cukup lama, yaitu 6-12 bulan (Hasibuan, 2005). Hal tersebut disebabkan oleh kandungan lignoselulosa pada dinding sel sekunder tanaman yang menyebabkan lamanya waktu dekomposisi (Beguin *et al.*, 1992). TKKS memiliki komponen antara lain selulosa 41,30 – 46,50 %, hemiselulosa 25,30 – 33,80 %, dan lignin 27,60 –



32,50 % (Hermiati *et al.*, 2010), dengan nisbah C/N sebesar 70-100 yang menyebabkan TKKS sulit terdekomposisi (Hasibuan, 2005). Proses dekomposisi yang terlalu lama dapat memberikan dampak negatif terhadap lingkungan seperti pencemaran udara oleh bau, tertutupnya pori-pori tanah oleh padatan tersuspensi, serta mengundang vektor penyakit seperti lalat.

Penanganan TKKS dapat dilakukan dengan menurunkan daya cemar limbah, mengurangi jumlah limbah dan meningkatkan nilai ekonomi limbah (Said, 1996). Pemanfaatan yang tepat dari limbah ini akan menghilangkan pencemaran dan mengubahnya menjadi produk yang lebih berguna (Milala *et al.*, 2005). Hal ini karena TKKS dapat dimanfaatkan lebih lanjut sebagai pupuk, pakan ternak, maupun difermentasi menjadi bioetanol (Departemen Pertanian, 2006).

Proses dekomposisi TKKS dapat dibantu dengan menambahkan mikroorganisme pengurai. Mikroorganisme ini mampu menghasilkan enzim-enzim yang mampu menghidrolisis secara enzimatik komponen polisakarida menjadi monomer glukosa yang kemudian dapat digunakan sebagai sumber karbon dan nutrisi bagi mikroba (Stevenson, 1986). Mikroorganisme pengurai dapat berupa bakteri, aktinomisetes dan fungi. *Aspergillus niger* termasuk golongan fungi berfilamen yang lebih banyak digunakan secara komersial dalam industri karena tingkat produksi enzim ekstraselulernya yang lebih tinggi daripada produksi enzim yang dihasilkan oleh bakteri. Enzim ekstraseluler yang dihasilkan oleh *Aspergillus niger* antara lain selulase, hemiselulase, amyloglukosidase, -amilase, glucose oxidase, -galaktosidase, dan xylanase (Schuster, 2002). Fungi ini juga memiliki sejumlah karakteristik antara lain mudah dikembangbiakan dan pertumbuhannya lebih cepat mendominasi dibandingkan jamur lain (Wina, 2005).

Beberapa penelitian-penelitian yang pernah dilakukan sebelumnya menunjukkan bahwa *Aspergillus niger* mampu menghasilkan berbagai macam enzim ekstraseluler dan berpotensi untuk membantu proses dekomposisi limbah pertanian diantaranya: enzim selulase untuk hidrolisis selulosa pada media limbah jeruk

(Omajasola *et al.*, 2008); enzim selulase, pektinase, dan galaktomananase untuk degradasi selulosa, pektin, dan galaktomanan serta mampu menambah kadar protein kasar bahan produk fermentasi (Akhadiarto, 2009); enzim lipase untuk menurunkan kadar lemak dalam bungkil inti sawit (Supriyati *et al.*, 1998); enzim mananase menggunakan sekam padi (Ibrahim *et al.*, 2012); serta enzim inulinase dari umbi dahlia untuk hidrolisis inulin menjadi fruktosa (Saryono, 2008). Berdasarkan latar belakang diatas maka perlu dilakukan pemanfaatan enzim ekstraseluler yang dihasilkan oleh *Aspergillus niger* untuk membantu proses hidrolisis TKKS.

## 1.2 Rumusan Masalah

TKKS merupakan limbah padat terbanyak dari produksi kelapa sawit dan pemanfaatannya masih terbatas. TKKS memiliki kandungan selulosa, hemiselulosa, dan lignin yang tinggi sehingga sulit terdekomposisi dan menimbulkan dampak negatif terhadap lingkungan. *Aspergillus niger* dapat menghasilkan berbagai macam enzim ekstraseluler namun pemanfaatan enzim tersebut dalam membantu proses dekomposisi TKKS belum banyak dilakukan.

## 1.3 Ruang Lingkup Penelitian

Ruang lingkup penelitian meliputi analisis aktivitas enzim ekstraseluler ekstrak kasar *Aspergillus niger* dalam menghidrolisis TKKS pada pH, suhu dan waktu inkubasi optimum berdasarkan terbentuknya gula pereduksi metode Somogyi-Nelson.

## 1.4 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas enzim ekstraseluler *Aspergillus niger* dalam menghidrolisis TKKS berdasarkan terbentuknya gula pereduksi metode Somogyi-Nelson.

### **1.5 Manfaat**

Diharapkan dari hasil penelitian ini potensi *Aspergillus niger* dalam membantu proses dekomposisi bisa dijadikan sebagai salah satu alternatif penanganan limbah TKKS.





## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS)

Perkebunan kelapa sawit memiliki peran yang penting dalam pembangunan nasional karena sebagai salah satu penyumbang devisa Negara. Kelapa sawit dapat diolah menjadi minyak sawit dan di Indonesia sebagian besar minyak sawit diekspor dalam bentuk *crude palm oil* (CPO). Upaya mencukupi ketersediaan komoditas non migas ini mampu terlaksana dengan ditingkatkannya areal perkebunan yang pada tahun 2011 mencapai 8,91 juta ha (Pusdatin, 2011).

Kelapa sawit dipanen dari perkebunan dan dibawa ke sebuah pabrik kelapa sawit dalam bentuk tandan buah segar (TBS). Sebuah pabrik mampu mengolah TBS berkisar 30 ton/jam dengan lama kerja 20 jam/hari. Dalam proses pengolahannya dapat dihasilkan limbah padat, cair dan gas. Komponen limbah padat terbesar berupa TKKS dan berkisar 120 ton/hari dengan asumsi pengolahan 600 ton tandan buah segar/hari (Wahyuni, 2004). Menurut Hermiati *et al.* (2010) TKKS memiliki kandungan selulosa 41,30 – 46,50 %, hemiselulosa 25,30 – 33,80 %, dan lignin 27,60 – 32,50%.



Gambar 2.1 Tandan kosong kelapa sawit (Dokumentasi pribadi)



Selulosa dalam TKKS berperan sebagai kekuatan tarik sedangkan lignin berperan dalam memberikan kekuatan tekan dan mencegah pelipatan mikrofibril. Selulosa dan lignin diikat dengan hemiselulosa membentuk lignoselulosa. Komponen TKKS dan kandungan hara TKKS seperti terlihat pada Tabel 2.1 dan Tabel 2.2 (Irawadi, 1991).

Tabel 2.1 Komponen TKKS

Komponen	Jumlah (%)
Kadar air	55
Selulosa	45,95
Hemiselulosa	22,84
Lignin	16,49
Abu	1,25

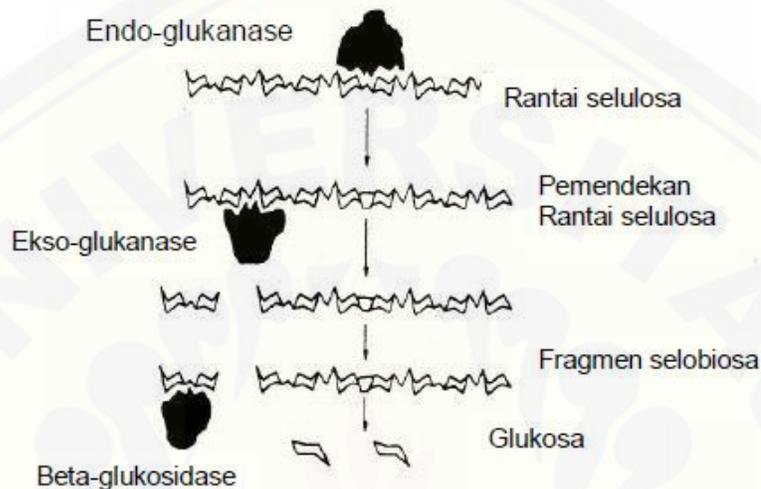
Tabel 2.2 Kandungan Hara Pada TKKS

Kandungan hara	K	Ca	Mg	Mn	Na	Fe	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
Jumlah (%)	2,13	0,18	0,17	0,05	0,63	0,59	0,14

Selulosa merupakan penyusun utama dinding sel tanaman, terdiri atas monomer-monomer glukosa dengan ikatan  $\beta$ -1,4 glikosida. Selulosa terbentuk dari adanya struktur kristalin dan amorf yang membentuk ikatan mikrofibril. Struktur-struktur tersebut yang menyebabkan selulosa sulit untuk terdegradasi. Struktur kristalin merupakan berkas-berkas gugusan hidroksil yang teratur dan rapat susunannya, tidak mudah larut dan sulit terdegradasi oleh enzim (Terri *et al.*, 1998). Sedangkan struktur amorf tidak teratur dan lebih renggang susunannya serta mudah larut.

Ikatan mikrofibril mempunyai daya tarik yang tinggi. Berdasarkan analisis sinar-X, selulosa berupa rantai-rantai panjang sejajar yang terikat menjadi satu oleh ikatan hidrogen. Hal ini yang menyebabkan selulosa berbentuk serat-serat panjang. Degradasi selulosa dapat berlangsung melalui hidrolisis rantai polisakarida menjadi

molekul sederhana, yang menghasilkan monomer glukosa atau produk degradasi seperti asam-asam organik maupun alkohol (Schuller, 1980 dalam Cahyono *et al.*, 1995 ).



Gambar 2.2 Proses hidrolisis selulosa (Shofiyanto, 2008 dalam Safaria *et al.*, 2013)

Hemiselulosa merupakan polisakarida yang membangun dinding sel tanaman yang bergabung dengan selulosa dalam jaringan lignin. Hemiselulosa merupakan suatu rantai dengan struktur amorf dan biasanya terdiri dari residu gula sebagai rangkanya seperti arabinosa, galaktosa, glukosa, mannanosa dan xilosa. Rantai hemiselulosa lebih mudah dihidrolisis menjadi komponen gula penyusunnya dibandingkan dengan selulosa. Molekul hemiselulosa lebih mudah menyerap air, bersifat plastis dan mempunyai kontrol antar serat yang lebih luas sehingga dapat memperbaiki ikatan antar serat. Hidrolisis hemiselulosa menghasilkan tiga jenis monosakarida yaitu xilosa, arabinosa dan glukosa (Gong *et al.*, 2001).

Lignin merupakan komponen non karbohidrat dan berupa polimer unit *phenylpropene*. Menurut Samsuri *et al.* (2007) lignin pada jaringan tanaman berfungsi sebagai bahan pengawet dan bersifat memperlentasi masing-masing serat. Selain itu, lignin juga berperan dalam membentuk dinding sel yang keras dan kaku.

Di alam lignin diketahui merupakan bagian yang terbenam di dalam polimer matrik dari selulosa hemiselulosa dalam dinding sel tanaman.

Proses biologi untuk menguraikan bahan organik seperti selulosa dan hemiselulosa menjadi glukosa dapat menggunakan enzim ekstraseluler melalui hidrolisis enzimatis. Hidrolisis adalah proses peruraian suatu senyawa oleh enzim atau oleh air baik dalam suasana asam, basa, atau netral tergantung pada senyawa yang bereaksi. Hidrolisis secara enzimatis mampu memecah bahan organik lebih efisien, diperoleh produk bernilai ekonomi tinggi (misal enzim), mengurangi pencemaran, derajat konversi yang tinggi, pembentukan hasil samping yang minimal, kebutuhan energi yang rendah, dan kondisi operasi yang mudah dicapai (Sun *et al.*, 2002).

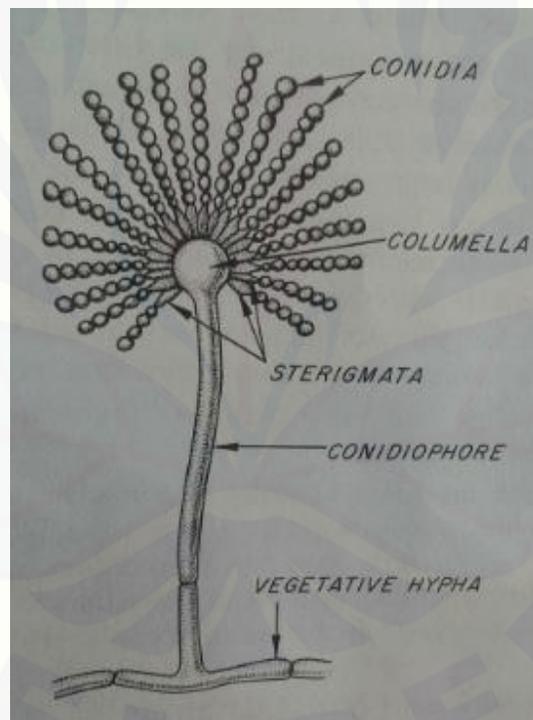
## **2.2 *Aspergillus niger***

*Aspergillus niger* merupakan kapang mesofilik yang tumbuh pada suhu 35°C-37°C (optimum), 6°C-8°C (minimum), 45°C-47°C (maksimum), pH 2.2-8.8, kelembaban 80-90%, dan memerlukan oksigen yang cukup (aerobik) (Ratledge, 1994).

*Aspergillus niger* mempunyai warna gelap yang menghasilkan hifa septate putih dan bercabang banyak (Shahlaei *et al.*, 2013). Kepala konidia dari *Aspergillus niger* berwarna hitam, bulat, dan akan memisah menjadi bagian-bagian yang lebih longgar seiring dengan bertambahnya umur. Menurut Raper *et al.* (1977) tinjauan umum *Aspergillus niger* diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom	: Fungi
Divisi	: Eumycophyta
Kelas	: Deuteromycetes
Ordo	: Moniliales
Famili	: Moniliaceae
Genus	: <i>Aspergillus</i>
Spesies	: <i>Aspergillus niger</i>

*Aspergillus niger* merupakan jamur berfilamen dan mikroorganisme penting di dunia biologi. Golongan jamur berfilamen lebih banyak digunakan secara komersial dalam industri karena tingkat produksi enzim eksternalnya yang lebih tinggi daripada produksi enzim yang dihasilkan oleh bakteri. 4 kelas enzim juga telah diidentifikasi dari genus *Aspergillus* (De Vries *et al.*, 2001). *Aspergillus niger* dapat memproduksi asam sitrat, asam glukonat dan berbagai enzim yang telah mendapatkan validasi bahwa produk *Aspergillus niger* aman atau GRAS (*Generally Recognized As Safe*) dari *the United States Food and Drug Administration* and is excused from the *Federal Food, Drug, and Cosmetic Act food additive tolerance requirements* (Schuster *et al.*, 2002).



Gambar 2.3 Struktur sel *Aspergillus niger* (Seeley *et al.*, 1972)

Penelitian-penelitian tentang produksi dan potensi enzim ekstraseluler yang dihasilkan oleh *Aspergillus niger* pada bahan berlignoselulolitik sudah banyak dilakukan. Enzim-enzim tersebut antara lain: selulase, seperti pada penelitian Qurat-

ul-ain *et al.* (2012) tentang produksi selulase menggunakan sekam padi dan limbah gergaji. Aktivitas enzim optimum pada pH 5 dan suhu 40°C serta menggunakan konsentrasi substrat sebanyak 2.5%; untuk degradasi selulosa pada berbagai limbah pertanian menggunakan metode *solid state fermentation* dan *submerged fermentation* (Sharada *et al.*, 2013); selulase dan pektinase yang diproduksi dari tongkol jagung. Produksi selulase optimum pada hari ke-4 dan aktivitas selulase optimum pada pH 4 serta suhu 50°C (Oyeleke *et al.*, 2012); untuk hidrolisis selulosa pada media limbah jeruk (Omajasola *et al.*, 2008); untuk hidrolisis selulosa pada *palm oil effluent solid* menggunakan isolat lokal *Aspergillus niger* EB5 and *Trichoderma* sp.EB6 (Mun *et al.*, 2008).

Selain itu, enzim inulase yang diproduksi dari umbi dahlia mampu menghidrolisis inulin menjadi fruktosa. Aktivitas inulinase optimum pada pH 4.6, suhu inkubasi 45°C dan lama inkubasi 15 jam (Saryono, 2008). Produksi mananase menggunakan sekam padi. Aktivitas mananase optimum pada suhu ruang (28±2°C) dan menggunakan inokulum berkepadatan spora 6x10<sup>6</sup> spores/ml (Ibrahim *et al.*, 2012). Lipase pada fermentasi bungkil inti sawit sehingga terjadi penurunan kadar lemak kasar dari 9.60% menjadi 6.70% (Supriyati *et al.*, 1998).

### 2.3 Dekomposisi Bahan Organik

Bahan-bahan organik di alam seperti limbah sisa tanaman atau hewan dapat terdekomposisi dengan adanya mikroorganisme pengurai. Dalam proses dekomposisi, semua bahan organik akan diurai terlebih dahulu menjadi unit-unit penyusunnya dan akhirnya terbentuk CO<sub>2</sub> dan H<sub>2</sub>O yang bebas dalam bentuk anorganik (Tan, 1994). Karbon digunakan sebagai sumber energi dan pembangun protoplasma sel mikroorganisme.

Menurut Rao (1982), proses dekomposisi berlangsung 3 proses secara bersamaan, yaitu:

1. dekomposisi bahan organik oleh enzim yang dihasilkan mikroorganisme, yang menyebabkan terjadinya perubahan dari kompleks organik menjadi anorganik (mineralisasi);
2. peningkatan biomassa mikroorganisme sebagai hasil penggunaan polisakarida dan protein, meliputi pengambilan nutrient seperti nitrogen, fosfor dan belerang (immobilisasi);
3. penimbunan atau pembebasan senyawa-senyawa proses nitrifikasi dan denitrifikasi yang juga diperantarai oleh mikroorganisme.

Dari penelitian yang pernah dilakukan tentang potensi mikroorganisme dalam membantu proses degradasi TKKS seperti pada penelitian Nasrul *et al.* (2006), penambahan jamur pelapuk putih (*Phanerochaete chrysosporium*) dapat mempercepat proses dekomposisi TKKS dengan menurunkan nilai C/N menjadi 14.8 dalam waktu 3 bulan dengan dosis pemberian jamur pelapuk putih sebanyak 25 gr. Dapat dilihat bahwa proses degradasi yang terjadi ditandai dengan adanya penurunan nilai rasio C/N. Selain itu, proses degradasi juga dapat ditandai dengan adanya pembentukan gula reduksi. Menurut Srivisan (1973), gula reduksi adalah suatu glukosa atau karbohidrat yang merupakan monosakarida yang mengandung gugus aldehid dan keton yang dapat mereduksi ion-ion logam (seperti Cu dan Ag) dalam larutan basa.



## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini bertempat di Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember. Waktu penelitian dimulai pada bulan Juli 2014 sampai Februari 2015.

### 3.2 Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan meliputi Isolat murni *Aspergillus niger* B10 MCC-00135-1 koleksi Balai Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT) Tangerang Selatan. Media biakan antara lain *Potato Dextrose Agar* (PDA) dan tandan kosong kelapa sawit (TKKS). Akuades, *bacto peptone*, *glucose*, NaOH 1M, asam asetat, alkohol 97%, etanol, buffer asetat, buffer phosphate, buffer glycine, NaCl, natrium azide dan reagen Somogyi-Nelson serta alkohol 70%.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain mesin pencacah, ayakan tepung, neraca analitik, *aluminium foil*, pengaduk, gelas ukur, *beaker glass*, *hot plate*, tabung reaksi, kapas, pipet volumetrik, kertas kayu, autoklave, *DC motor*, pipet tetes, kertas lakmus, pinset, kertas saring, *ErlenMeyer*, corong, falkon, *sentrifuge*, inkubator, jarum ose, LAF, bunsen, *hand sprayer*, *Haemocytometer*, mikroskop, *vortex*, pipet mikro, tip, *shaker*, botol *shoot*, *eppendorf*, *waterbath* dan spektrofotometer.

### 3.3 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian tentang aktivitas enzim ekstraseluler *Aspergillus niger* dalam menghidrolisis TKKS yang akan dilakukan meliputi beberapa tahapan utama yaitu persiapan bahan, produksi enzim ekstraseluler ekstrak kasar (*crude enzim*)



*Aspergillus niger* dan analisis kuantitatif aktivitas *crude enzim Aspergillus niger* dalam menghidrolisis TKKS berdasarkan terbentuknya gula pereduksi metode Somogyi-Nelson.

### 3.3.1 Persiapan Bahan

#### 3.3.1.1 Peremajaan Isolat

Media yang digunakan untuk peremajaan isolat *Aspergillus niger* B10 MCC-00135-1 adalah media PDA miring. Isolat tersebut diinokulasikan sebanyak satu ose pada PDA miring dan diinkubasi pada suhu 30<sup>0</sup>C selama 72 jam.

#### 3.3.1.2 Pembuatan Substrat Alkali Ekstrak TKKS

Persiapan substrat alkali ekstrak TKKS dimulai dengan pembuatan bubuk TKKS. TKKS segar dikeringkan secara konvensional kemudian dihaluskan dengan mesin pencacah. Hasil cacahan TKKS selanjutnya diayak dengan pengayak ukuran  $\pm$  250 mesh sampai didapatkan bubuk yang paling halus. Bubuk tersebut kemudian dilakukan delignifikasi dengan NaOH untuk merusak struktur lignin, memisahkan sebagian lignin dan hemiselulosa serta menyebabkan pengembangan struktur selulosa (Gunam *et al.*, 2010).

Sebanyak 100 gr bubuk TKKS dihidrolisis dengan NaOH 1M dalam 1000 ml akuades dan dihomogenkan menggunakan *DC motor* selama 24 jam. Kemudian pH substrat dinetralkan dengan asam asetat sampai didapatkan pH 7. Hasil hidrolisis tersebut difiltrasi menggunakan kertas saring. Proses selanjutnya, filtrat diekstraksi menggunakan ekstraksi etanol dengan perbandingan V : V = 6 : 4 (etanol:filtrat). Hasil ekstraksi tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 10 menit dan akan menghasilkan pelet polisakarida. Pelet kemudian diresuspensi dengan etanol diatas kertas saring untuk menghilangkan sisa NaOH. Selanjutnya pelet dikeringkan dalam inkubator bersuhu 50<sup>0</sup> C selama 2-3 hari sehingga didapatkan bubuk yang

selanjutnya disebut sebagai substrat alkali ekstrak TKKS dan digunakan sebagai substrat saat uji aktivitas enzim.

### 3.3.1.3 Persiapan Media Produksi Enzim

Media produksi enzim menggunakan substrat TKKS jenuh air. Sebelumnya ditentukan terlebih dahulu berapa banyak air yang dibutuhkan untuk membuat substrat TKKS menjadi jenuh air. Sebanyak 5 gr serbuk kasar TKKS dalam akuades diinkubasi selama 2 jam. Substrat kemudian ditimbang diatas alumunium foil dan dihitung sebagai berat basah. Kemudian substrat dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C selama 24 jam dan ditimbang sebagai berat kering. Selain itu, dilakukan juga penimbangan terhadap berat aluminium foil. Substrat dikeringkan lagi pada suhu 50°C selama 6 jam sampai didapatkan berat konstan. Untuk mengetahui banyak air per gram serbuk kasar TKKS yaitu dengan mengurangkan berat basah dengan berat kering konstan sedang untuk mengetahui gram serbuk kasar TKKS yang digunakan yaitu dengan mengurangkan berat kering konstan dengan berat aluminium foil. Substrat TKKS sebanyak 10 gram dengan jenuh air nantinya dipergunakan untuk media produksi enzim.

### 3.3.1.4 Pembuatan Reagen Somogyi dan Nelson

#### a. Reagen Somogyi

Pembuatan reagen Somogyi dilakukan dengan cara membuat empat jenis larutan yaitu larutan A, B, C dan D. Larutan A berisi 24 gr  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  yang dilarutkan dalam 240 ml akuades kemudian ditambahkan 12 gr  $\text{C}_4\text{H}_4\text{KN}_a\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ . Sedangkan larutan B berisi 1 gr  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  yang dilarutkan dalam 40 ml akuades kemudian ditambahkan 16 gr  $\text{NaHCO}_3$ . Kedua larutan tersebut kemudian dicampur dan disebut sebagai larutan C. Kemudian dibuat larutan D yang berisi 180 gr  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  yang dilarutkan sedikit demi sedikit ke dalam 300 ml akuades sambil dipanaskan diatas *hot plate* hingga mendidih. Tahap selanjutnya yaitu dengan melarutkan larutan C dan

larutan D serta tera dengan akuades dalam labu ukur hingga volume total 1000 ml. Larutan kemudian diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 7 hari dalam botol gelap dan disimpan pada suhu ruang.

b. Reagen Nelson

Pembuatan reagen Nelson dilakukan dengan membuat dua jenis larutan yaitu larutan A dan larutan B. Larutan A berisi 500 ml akuades mengandung  $(\text{NH}_4)\text{MO}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  10% dan ditambahkan 46 ml asam sulfur. Sedangkan larutan B berisi 6 gr  $\text{NaHASO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  dalam 25 ml akuades. Kedua jenis larutan kemudian dicampur dan tera dengan akuades dalam labu ukur hingga volume total 1000 ml. Larutan kemudian diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam dalam botol gelap dan disimpan pada suhu ruang.

3.3.1.5 Pembuatan Kurva Kalibrasi

Pembuatan kurva diawali dengan membuat larutan glukosa konsentrasi 100  $\mu\text{g/ml}$  sebagai stok. Penentuan standar glukosa dilakukan pada konsentrasi 5  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ , 25  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$ , 75  $\mu\text{g/ml}$ , dan 100  $\mu\text{g/ml}$  ke dalam setiap tabung reaksi. Sedangkan blanko berisi 1 ml akuades. Pada masing-masing konsentrasi glukosa ditambahkan reagen Somogyi sebanyak 0.5 ml dan dididihkan dalam penangas air selama 15 menit. Setelah dingin, ditambahkan reagen Nelson sebanyak 0.5 ml lalu diencerkan dengan 2.5 ml akuades. Kadar gula reduksi diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 500 nm. Berdasarkan nilai absorbansi yang diperoleh dibuat kurva kalibrasi antara *Optical Density* (OD) dan kadar glukosa ( $\mu\text{g/ml}$ ).

### 3.3.2 Produksi Enzim Ekstraseluler Ekstrak Kasar (*Crude Enzim*)

#### 3.3.2.1 Penentuan Kepadatan Spora *Aspergillus niger*

Penentuan kepadatan spora *Aspergillus niger* bertujuan untuk mengetahui jumlah kepadatan spora yang digunakan untuk inokulum produksi enzim. Umumnya jumlah kepadatan spora *Aspergillus niger* sebagai inokulum degradasi bahan berlignoselulolitik adalah  $10^6 - 10^7$  sel/ml (Akhadiarto, 2009) dan berkisar antara 4-6 hari (Ibrahim *et al.*, 2012). Sebanyak 1 ose *Aspergillus niger* berumur 3 hari dari media PDA masing-masing ditumbuhkan pada 8 tabung reaksi berisi media TKKS agar 0.1% dan diinkubasi pada suhu  $30^{\circ}\text{C}$ .

Penentuan jumlah spora dilakukan dengan sampling setiap 24 jam selama 7 hari menggunakan metode *counting chamber* dan dihitung dibawah mikroskop. Sampling yang dilakukan yaitu isolat dikerik dengan 10 ml akuades steril dan hasilnya ditampung dalam tabung reaksi. Kemudian dilakukan pengenceran sampai didapatkan jumlah spora yang dikehendaki. Sampel lalu diambil sebanyak  $10\mu\text{l}$  dan diteteskan pada bidang hitung *Haemocytometer*. Spora yang dihitung adalah spora yang ada pada kotak sedang dan sebanyak 5 kali ulangan secara acak. Kemudian jumlah sel/ml sampel ditentukan berdasarkan persamaan berikut :

$$\text{Jumlah sel/ml} = \frac{n}{V} \times Fp$$

Keterangan :  $n$  = jumlah spora pada bidang hitung

$V$  = volume *Haemocytometer*

$Fp$  = faktor pengenceran

(Schlegel, 1994)

#### 3.3.2.2 Optimasi Waktu Produksi Enzim

##### a. Produksi Enzim

Optimasi waktu produksi enzim dilakukan dengan menginokulasikan secara aseptis 1 ml suspensi inokulum berkepadatan spora yang telah diketahui sebelumnya

ke 10 gr substrat TKKS jenuh air dan dibuat sebanyak 7 ulangan. Kemudian media diinkubasi selama 7 hari pada suhu 30<sup>0</sup> C. Setelah itu, dilakukan pemanenan *crude enzim* pada hari ke-1 sampai hari ke-7. Pemanenan meliputi preparasi dan ekstraksi *crude enzim*. Preparasi dilakukan dengan menggunakan 20ml akuades mengandung 1% NaCl dan 0.01 % natrium azide ke substrat TKKS jenuh air yang bertujuan sebagai pemecah sel dan penghambat selektif mikroorganisme yang tidak diinginkan. Substrat kemudian dishaker selama 12 jam dan difiltrasi dengan menggunakan kertas saring. Filtrat yang diperoleh kemudian disentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak enzim kasar (*crude enzim*). *Crude enzim* kemudian diuji menggunakan analisis kuantitatif gula pereduksi metode Somogyi-Nelson sehingga diketahui waktu optimum untuk produksi enzim.

b. Uji Aktivitas Enzim Berdasarkan Terbentuknya Gula Pereduksi Metode Somogyi-Nelson

Analisis kuantitatif gula pereduksi metode Somogyi-Nelson dilakukan dengan melarutkan 0.5% substrat dalam 0.5 ml buffer asetat pH 7 50mM. Kemudian direaksikan dengan 50 µl *crude enzim* dan diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 2 jam. Selanjutnya, ditambahkan 0.5 ml reagen Somogyi. Untuk kontrol dilakukan penambahan *crude enzim* setelah penambahan Somogyi. Hal ini bertujuan agar tidak terjadi reaksi antara substrat dengan enzim. Kemudian dididihkan dalam penangas air selama 15 menit untuk mempercepat reaksi enzimatis. Setelah dingin ditambahkan 0.5 ml reagen Nelson. Penambahan Reagen Somogyi (mengandung ion kupri) berfungsi untuk mengoksidasi glukosa membentuk kupri oksida dan mengendapkannya menjadi kupro oksida (CuO), kemudian kupro oksida ini dioksidasi kembali dengan reagen Nelson dan akan membentuk warna biru arsenomolibdat. Banyaknya CuO yang terbentuk berbanding lurus dengan jumlah glukosa (Bintang, 2010). Larutan kemudian diencerkan dengan 2.5 ml akuades dan kadar gula reduksi diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 500 nm.

### 3.3.2.3 Produksi Enzim

Produksi enzim dilakukan dengan menggunakan substrat sebanyak 50 gr substrat TKKS jenuh air dan inokulum sebanyak 10 ml berkepadatan spora yang telah diketahui sebelumnya. Untuk metode produksi yang digunakan sama dengan metode yang digunakan pada 3.3.2.2. *Crude enzim* yang dihasilkan disimpan pada suhu 4°C dan produksi dilakukan sebanyak dua kali ulangan.

### 3.3.3 Analisis Kuantitatif Aktivitas *Crude Enzim Aspergillus niger* dalam Menghidrolisis TKKS Berdasarkan Terbentuknya Gula Pereduksi Metode Somogyi-Nelson

#### 3.3.3.1 Karakterisasi Kemampuan Hidrolisis Berdasarkan Stabilitas dan Optimum: pH dan Suhu

Karakterisasi kemampuan hidrolisis TKKS oleh *crude enzim Aspergillus niger* berdasarkan stabilitas dan optimum: pH dan suhu dilakukan menggunakan substrat alkali ekstrak TKKS. Variasi pH yang digunakan meliputi pH 4; 4.5; 5; 5.5; 6; 6.5; 7; 7.5; 8; 8.5; dan 9 serta pada variasi suhu 28°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, dan 70°C.

Langkah pertama karakterisasi dilakukan pada variasi pH untuk menentukan rentang pH stabil yaitu mereaksikan 0.5 ml *crude enzim* dengan 0.5 ml buffer asetat/phosphate berdasarkan masing-masing variasi pH kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 4 jam. Setelah 4 jam, dilakukan pengujian menggunakan analisis kuantitatif gula pereduksi metode Somogyi-Nelson menggunakan 0.5% substrat dalam 0.5 ml buffer asetat pH 5 60mM. Sedang sebagai kontrol yaitu dengan mereaksikan 0.5 ml *crude enzim* dengan 0.5 ml akuades. Setelah diketahui rentang pH stabil dilanjutkan dengan pengukuran pH optimum. Pada penentuan pH optimum dilakukan uji kuantitatif gula pereduksi metode Somogyi-Nelson hanya pada rentang pH stabil yang telah diketahui tanpa inkubasi 4 jam. Metode yang sama dilakukan pula pada karakterisasi stabilitas dan optimum suhu.

### 3.3.3.2 Pengukuran Kemampuan Hidrolisis TKKS oleh *Crude Enzim Aspergillus niger* pada Beberapa Waktu Inkubasi

#### a. Hidrolisis TKKS oleh *Crude Enzim*

Analisis kemampuan hidrolisis TKKS oleh *crude enzim Aspergillus niger* berdasarkan waktu inkubasi 0, 1, 2, 3, 6, dan 12 jam dilakukan menggunakan substrat bubuk TKKS. Sebanyak 5% bubuk TKKS direaksikan dalam 30 ml *crude enzim* dan ditambahkan 300 µl natrium azide 0.1%. Sampel kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 12 jam dan dilakukan sampling sesuai waktu inkubasi yang telah ditentukan. Sampling dilakukan dengan cara mengambil 0.5 ml sampel hidrolisat pada *ependorf* kemudian dididihkan diatas penangas air selama 15 menit. Sampel kemudian disentrifuse pada kecepatan 4000 rpm selama 5 menit dan diambil supernatannya. Supernatan yang sudah dipisahkan dari peletnya ditampung dalam *ependorf* baru kemudian disimpan pada suhu -20°C (*freezer*). Masing-masing sampel diuji kadar gula pereduksinya menggunakan metode Somogyi-Nelson.

#### b. Uji Aktivitas Enzim Berdasarkan Terbentuknya Gula Pereduksi Metode Somogyi-Nelson

Sebanyak 0.1 ml sampel diencerkan dengan 0.4 ml akuades dan ditambahkan 0.5 ml reagen Somogyi. Sampel kemudian dididihkan diatas penangas air selama 15 menit. Setelah itu, sampel ditambahkan 0.5 ml reagen Nelson serta diencerkan dengan 2.5 ml akuades. Kadar gula reduksi diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 500 nm. Pengukuran dibuat dengan dua kali pengulangan. Setelah itu, nilai absorbansi dikalibrasikan ke kurva kalibrasi untuk mengetahui kadar gula pereduksi yang terbentuk. Hasil yang diperoleh selanjutnya dihitung persentase kemampuan hidrolisisnya berdasarkan rumus:

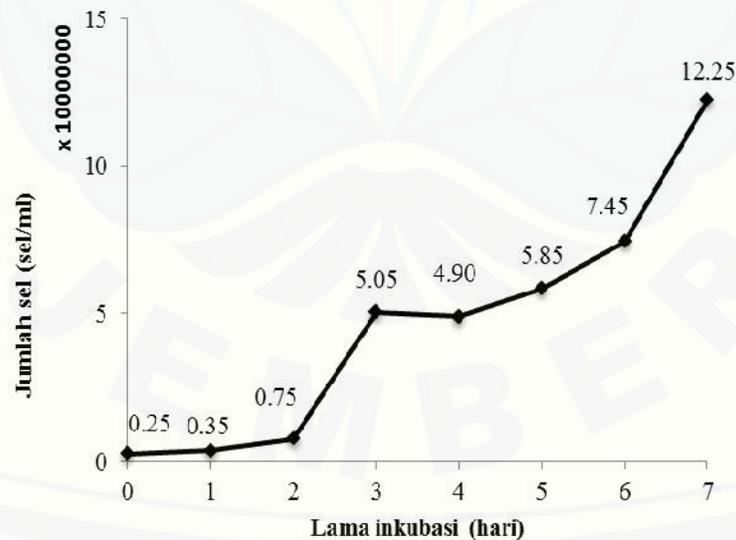
$$\text{Kemampuan hidrolisis (\%)} = \frac{\text{Gula Pereduksi Hasil Hidrolisis TKKS}}{\text{Total Substrat TKKS}} \times 100\%$$



## BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Kepadatan Spora *Aspergillus niger* pada Media TKKS Agar 0.1%

Hasil penentuan kepadatan spora dari *Aspergillus niger* selama waktu inkubasi 7 hari didapat kepadatan spora terus mengalami kenaikan dari hari ke-0 sampai hari ke-7 (Gambar 4.1). Terlihat pertumbuhan dua tahap antara hari ke-3 dan hari ke-4. Hal ini biasa terjadi pada media yang mengandung campuran nutrisi. Penambahan glukosa dan pepton berfungsi untuk menginduksi pembentukan enzim-enzim baru. Glukosa pertama-tama menginduksi sintesis enzim yang diperlukan untuk pengolahannya dan bersamaan dengan itu menekan sintesis enzim yang diperlukan untuk pengolahan TKKS. Enzim yang disebut terakhir ini baru dibentuk sesudah glukosa terpakai. Sedangkan pepton ditambahkan untuk mikroorganisme bertuntutan tinggi yang belum dikenal benar nutrisi yang dibutuhkannya (Schlegel, 1994).



Gambar 4.1 Jumlah Kepadatan Spora *Aspergillus niger* Terhadap Waktu Inkubasi (Hari)



Gambar 4.1 menunjukkan bahwa kepadatan spora meningkat cukup signifikan dari  $2.5 \times 10^6$  sel/ml pada hari ke-0 menjadi  $5.05 \times 10^7$  pada hari ke-3. Keadaan ini memperlihatkan terjadinya fase pertumbuhan pertama, yaitu saat sel menggunakan nutrisi sederhana glukosa sebagai sumber karbon. Kepadatan spora masih dalam jumlah yang hampir sama yaitu  $4,9 \times 10^7$  sel/ml pada hari ke-4. Hal ini menunjukkan bahwa glukosa telah habis digunakan. Selanjutnya, pada hari ke-5 *Aspergillus niger* memasuki fase pertumbuhan kedua sebagai penggunaan TKKS yang merupakan sumber karbon lainnya.

Kepadatan spora kembali meningkat pada hari ke-6 sampai hari terakhir inkubasi dan mencapai jumlah kepadatan spora tertinggi yaitu  $1.23 \times 10^8$  sel/ml. Pada waktu inkubasi 3 hari sampai 6 hari kepadatan spora sama-sama berkisar pada  $10^7$  sel/ml namun kematangan spora dan efisiensi waktu tentu menjadi faktor penting dalam produksi enzim nantinya sehingga waktu inkubasi 4 hari dipilih sebagai waktu inkubasi terbaik mendapatkan inokulum.

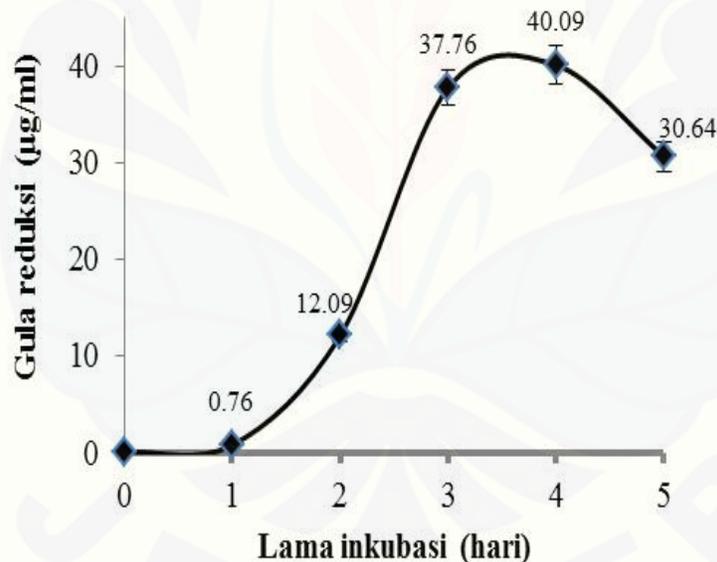
#### 4.2 Waktu Optimum Produksi Enzim

Produksi enzim dapat ditentukan dengan mengukur aktivitas enzim yang dihasilkan selama pertumbuhan sel. Dalam hal ini waktu inkubasi sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan sel sebagai penghasil utama *crude enzim*. Fardiaz (1987) menyatakan bahwa mikroba akan menghasilkan enzim ekstraseluler untuk menghidrolisis substrat yang digunakan. Berbagai macam enzim akan diproduksi oleh *Aspergillus niger* sebagai respon terhadap ketersediaan komponen dalam TKKS dan mengubahnya menjadi gula sederhana. TKKS mengandung komponen terbesar berupa selulosa yang mana perombakan selulosa menjadi glukosa dapat dimanfaatkan untuk menunjang pertumbuhan kapang itu sendiri.

Pengukuran aktivitas enzim dilakukan dengan mengukur gula pereduksi yang terbentuk dari reaksi hidrolisis antara *crude enzim Aspergillus niger* dengan substrat TKKS. Gula pereduksi yang terbaca oleh reagen Somogyi-Nelson berdasarkan keberadaan *reducing end*. *Reducing end* merupakan gugus bebas pada gula dan akan

mereduksi ion  $\text{Cu}^{2+}$  dalam suasana alkalis (Bintang, 2010). Semakin tinggi kadar gula pereduksi yang dihasilkan maka semakin tinggi aktivitas enzim.

Hasil penelitian pada Gambar 4.2 menunjukkan gula pereduksi yang dihasilkan pada hari ke-0 sampai hari ke-3 mengalami peningkatan. Besarnya perombakan komponen substrat terhadap lama waktu inkubasi meningkat seiring dengan pertumbuhan sel kapang kemudian menurun hingga sumber karbon yang dibutuhkan habis. Pada hari ke-4 kurva menunjukkan titik optimum produksi enzim yaitu ditandai dengan jumlah gula pereduksi tertinggi sebanyak  $40.09\mu\text{g/ml}$ . Gula pereduksi kebanyakan dari golongan monosakarida seperti glukosa, galaktosa, dan fruktosa serta golongan disakarida seperti maltose, laktosa, kecuali sukrosa. Sifat mereduksi disebabkan oleh adanya gugus aldehyd atau keton bebas dalam molekulnya (Yazid *et al.*, 2006).



Gambar 4.2 Hasil Gula Reduksi Selama Optimasi Waktu Produksi *Crude Enzim Aspergillus niger*

Gambar 4.2 diketahui bahwa setelah aktivitas enzim mencapai titik optimum pada hari ke-4 terjadi penurunan aktivitas enzim. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Suresh *et al.* (2010) dan Oyeleke *et al.* (2012) bahwa waktu

fermentasi optimal dari *Aspergillus niger* pada berbagai bahan berlignoselulolitik berkisar antara 96-100 jam dan setelah itu aktivitas enzimnya akan menurun. Penurunan aktivitas enzim diduga disebabkan oleh faktor lingkungan media produksi yang mengalami perubahan sejalan dengan pertumbuhan *Aspergillus niger* serta hambatan oleh produk akhir terhadap sintesis beberapa enzim baru. Selobiose dapat menghambat sintesis endoglucanase dan cellobiohydrolase yang berperan dalam proses perombakan selulosa menjadi glukosa (Sukumaran *et al.*, 2005).

Faktor-faktor yang mempengaruhi produktivitas enzim diantaranya adalah jumlah inokulum, jenis substrat, dan kondisi media. Pada penentuan waktu optimum produksi enzim digunakan media produksi berupa serat kasar TKKS. Serat kasar TKKS mengandung komponen selulosa dan hemiselulosa yang sukar dirombak. Penggunaan sumber karbon yang larut seperti laktosa, selobiosa dan hidrolisat selulosa untuk produksi enzim memungkinkan produktivitas yang tinggi tetapi aktifitas enzimnya kurang, sedangkan sumber karbon yang sukar dirombak, produktivitasnya rendah tetapi aktifitas enzimnya tinggi (Chen *et al.*, 1992).

Kondisi media juga disesuaikan agar inokulum mampu tumbuh baik, seperti dengan menjaga kelembaban relatif ( $a_w$ ) media. Kelembaban relative ( $a_w$ ) merupakan perbandingan larutan dalam air dan zat-zat padat dari segi airnya yang tersedia. Dengan diketahuinya kelembaban relatif dari substrat yang dipakai akan mendukung proses produksi enzim karena pertumbuhan kapang berada dalam kondisi yang optimal. Dalam penelitian didapatkan  $a_w$  sebesar 81%. Menurut Schlegel (1994), Genus *Aspergillus* dikenal mampu tumbuh baik pada  $a_w$  sebesar 0.8.

#### **4.3 Karakterisasi Kemampuan Hidrolisis TKKS oleh Enzim Ekstraseluler *Aspergillus niger* Berdasarkan pH dan Suhu**

Pada penentuan pH dan suhu stabil bertujuan untuk mengetahui pada rentang berapa saja enzim tidak menunjukkan penurunan atau kenaikan aktivitas (stabil) setelah direaksikan dengan substrat dan diuji kadar gula pereduksi yang terbentuk

dengan metode Somogyi-Nelson. Waktu inkubasi 4 jam dipilih sebagai waktu moderat enzim akan bereaksi terhadap pengaruh lingkungan dan dengan diketahuinya rentang stabil membantu dalam proses penyimpanan enzim karena faktor lingkungan dapat dipertahankan.

Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim diteliti dengan menggunakan tiga tipe buffer : asam asetat (range pH antara 4-5.5 50 mM), phosphate (range pH antara 5.5-8.5 50 mM), dan glycine (pH 9 50 mM). Hasil yang diperoleh menunjukkan aktivitas enzim stabil pada kisaran pH 4.5-9 dengan % aktivitas diatas 100% terhadap kontrol dengan asumsi gula pereduksi awal sebanyak 20.5µg/ml (Tabel 4.1). Kondisi stabil ini sangat penting dalam mencegah pergeseran aktivitas enzim.

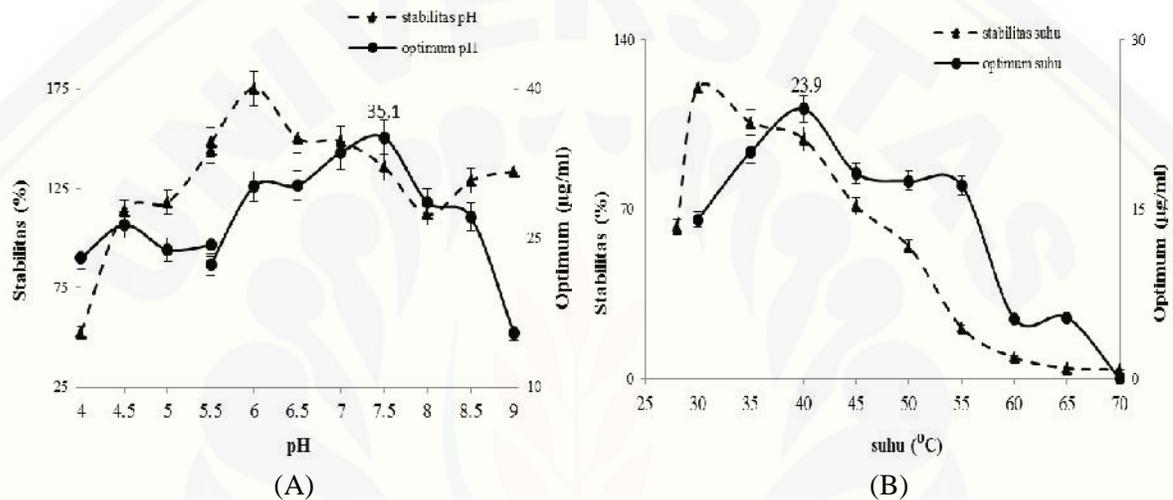
Tabel 4.1 Persentase aktivitas enzim ekstraseluler *Aspergillus niger* terhadap kontrol pada penentuan stabilitas pH dan suhu serta kadar gula pereduksi pada penentuan optimum pH dan suhu

	Perlakuan				
	pH		Suhu		
	Stabil* (% Aktivitas)	Optimum (Gula Pereduksi (µg/ml))	Stabil* (% Aktivitas)	Optimum (Gula Pereduksi (µg/ml))	
4	52.4	23	28 <sup>0</sup> C	62.6	-
4.5	113.5	26.3	30 <sup>0</sup> C	120.3	14.1
5	117.9	23.8	35 <sup>0</sup> C	106.0	20.1
5.5	144.4	24.3	40 <sup>0</sup> C	99.2	23.9
5.5	148.2	22.3	45 <sup>0</sup> C	71.3	18.2
6	175.2	30.2	50 <sup>0</sup> C	54.5	17.5
6.5	150.3	30.3	55 <sup>0</sup> C	21.0	17.1
7	148.7	33.6	60 <sup>0</sup> C	8.6	5.3
7.5	135.7	35.1	65 <sup>0</sup> C	4.2	5.4
8	111.9	28.6	70 <sup>0</sup> C	3.6	0
8.5	128.7	27.1			
9	133.6	15.4			

\* Gula pereduksi pada kontrol berkisar 17.09-20.5 µg/ml

Sedangkan pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim menunjukkan kondisi stabil pada kisaran suhu 28 °C (ruang) hingga suhu 45°C dengan % aktivitas diatas 70% terhadap kontrol dengan asumsi gula pereduksi awal 17.09 µg/ml (Tabel 4.1).

Peningkatan suhu inkubasi dari suhu 28<sup>0</sup>C menjadi 35<sup>0</sup>C menyebabkan tingkat hidrolisis yang diperoleh meningkat 2X lipat. Pada penggunaan suhu inkubasi rendah menyebabkan laju reaksi berjalan lambat sebagai akibat rendahnya reaksi melekatnya sisi aktif enzim pada substrat sehingga TKKS tidak terhidrolisis secara sempurna. Ketika temperatur meningkat proses denaturasi juga mulai berlangsung dan menghancurkan aktivitas molekul enzim.



Gambar 4.3 Kurva penentuan stabilitas dan optimum: (A) Pengaruh pH terhadap aktifitas enzim ekstraseluler *Aspergillus niger*; (B) Pengaruh suhu terhadap aktifitas enzim ekstraseluler *Aspergillus niger*

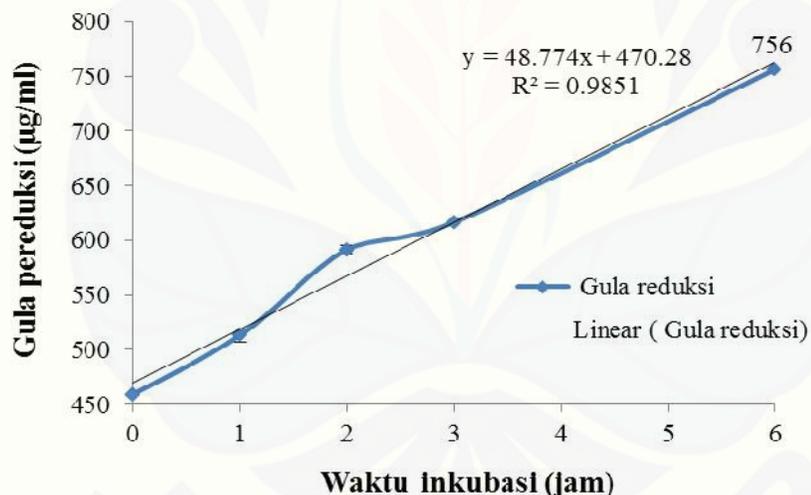
Kurva pengaruh pH (Gambar 4.3.A) berupa lonceng dengan satu titik puncak yang disebut titik pH optimum. Pada penelitian ini pH optimum berada pada pH 7.5 dengan jumlah gula pereduksi sebanyak 35.1 µg/ml. Dalam suatu reaksi kimia, pH untuk suatu enzim tidak boleh terlalu asam maupun terlalu basa karena akan menurunkan kecepatan reaksi dengan terjadinya denaturasi. Pada umumnya, pH optimum suatu enzim berkisar antara 4,5–8, dan pada kisaran pH tersebut enzim mempunyai kestabilan yang tinggi (Fieser *et al.*, 1992).

Suatu reaksi kimia juga dipengaruhi oleh faktor suhu yang digunakan karena reaksi kimia sangat peka terhadap perubahan suhu. Suhu optimum pada penelitian ini berada pada suhu 40<sup>0</sup>C dengan jumlah gula pereduksi sebanyak 23.9µg/ml (Gambar

4.3.B). Pada suhu diatas 45°C efek yang berlawanan yaitu denaturasi termal lebih dominan dan menjelang suhu 55°C molekul-molekul enzim rusak sehingga kehilangan spesifitasnya. Suhu yang tinggi akan menaikkan aktivitas enzim namun sebaliknya juga akan mendenaturasi enzim (Martoharsono, 1994).

#### 4.4 Kemampuan Hidrolisis TKKS oleh *Crude Enzim Aspergillus niger* pada Beberapa Waktu Inkubasi

Pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas *crude enzim* dalam menghidrolisis TKKS diamati selama 12 jam. Jumlah gula reduksi yang dihasilkan mengalami peningkatan secara linier sampai inkubasi 6 jam dengan koefisien regresi linier terbaik  $r^2=0.985$  (Gambar 4.4). Setelah 6 jam, aktivitas enzim mengalami penurunan dan sampai di akhir penelitian jumlah gula pereduksi juga turun.



Gambar 4.4 Pengaruh Waktu Inkubasi terhadap Jumlah Gula Pereduksi yang Dihasilkan dari Hidrolisis TKKS oleh *Crude Enzim Aspergillus niger*

Hubungan linier pada saat waktu inkubasi 6 jam mengindikasikan kemampuan aktivitas dari *crude enzim* berjalan optimal tanpa hambatan. Hambatan yang terjadi dapat disebabkan diantaranya karena sistem selulase tidak berjalan seimbang akibat ketidak-samaan jumlah masing-masing enzim pembentuk sistem selulase. Selulase dapat terdiri dari satu atau lebih cellobiohidrolase, endo- -1,4-

glucanase, atau  $\alpha$ -glucosidase tergantung jenis mikroba yang menghasilkan selulase tersebut (Sukumaran *et al.*, 2005). Genus *Aspergillus* dikenal memiliki aktivitas  $\alpha$ -glucosidase yang tinggi dibandingkan aktivitas cellobiohydrolase dan endo- $\beta$ -1,4-glucanase yang dihasilkannya (Mun *et al.*, 2008). Hal ini juga didukung oleh Criquet (2002) yang dalam penelitiannya menunjukkan hasil yang hampir sama yaitu kenaikan aktivitas selulase secara linier dapat terjadi apabila tidak adanya hambatan seperti proteolisis selulase oleh enzim protease.

Hasil pengukuran gula pereduksi dari hidrolisat TKKS menggunakan 5% substrat TKKS selama 6 jam sebesar 756  $\mu\text{g/ml}$  dan kemampuan hidrolisis sebesar 1.5%. Nilai ini tergolong kecil apabila dibandingkan dengan kemampuan hidrolisis *crude enzim Aspergillus niger* pada beberapa jenis limbah organik lainnya seperti pada penelitian Hasan (2004) yang menunjukkan kemampuan hidrolisis ampas tahu oleh *crude enzim Aspergillus niger* mencapai 37.2%. Hal ini terkait dengan nilai rasio C/N bahan organik yang mana semakin tinggi rasio C/N akan menurunkan tingkat pertumbuhan mikroorganisme sehingga menurunkan pula produktivitas enzim.

Rasio C/N merupakan perbandingan antara unsur karbon dan nitrogen. Karbon dibutuhkan mikroorganisme sebagai sumber energi sedangkan nitrogen merupakan penyusun senyawa untuk pertumbuhan sel. Rasio C/N yang rendah (kandungan unsur N yang tinggi) akan meningkatkan emisi dari nitrogen berupa ammonium yang akhirnya dapat menyebabkan proses pengasaman. Sedangkan rasio C/N yang tinggi (kandungan unsur N yang rendah) menjadi faktor pembatas dalam metabolisme mikroorganisme karena terjadi malnutrien. Ini ditunjukkan oleh rasio C/N dari TKKS sebesar 70-100 sehingga kemampuan dekomposisi hanya mencapai 1.5% sedangkan rasio C/N dari ampas tahu rata-rata sebesar 14 sehingga kemampuan dekomposisinya mencapai 37.2%. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa rasio C:N optimum pada proses biodegradasi adalah 20-40 (Polprasert, 1996). Namun meskipun demikian informasi dari hasil penelitian ini sangat berguna untuk proses pemuliaan lebih lanjut untuk mendapatkan enzim yang lebih produktif.



## BAB 5. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang diperoleh dari hasil penelitian ini adalah waktu produksi terbaik untuk mendapatkan *crude enzim Aspergillus niger* menggunakan media TKKS adalah empat hari. Kondisi *crude enzim* harus semaksimal mungkin dipertahankan agar tidak mengalami perubahan di lingkungan. Aktivitas *crude enzim Aspergillus niger* stabil pada rentang pH 4.5 sampai 9 dan suhu ruang ( $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) sampai suhu  $45^{\circ}\text{C}$ . Analisis kemampuan hidrolisis TKKS oleh *crude enzim* menunjukkan bahwa reaksi optimum jika menggunakan pH 7.5, suhu  $40^{\circ}\text{C}$ , dan waktu inkubasi 6 jam. Gula pereduksi yang dihasilkan sebesar  $756\ \mu\text{g/ml}$  dan kemampuan hidrolisis sebesar 1.5%, artinya kemampuan hidrolisis TKKS oleh *crude enzim Aspergillus niger* dapat menghasilkan gula pereduksi sebesar 1.5% dari total gula pereduksi dalam TKKS.

### 5.2 Saran

Perlu dilakukan optimalisasi produktivitas enzim seperti analisis kondisi pH, suhu, dan media produksi agar dapat diperoleh *crude enzim* secara optimum.



**Daftar Pustaka**

- Akhadiarto, S. 2009. Pemanfaatan Limbah Kulit Singkong, Kulit Pisang dan Kulit Kentang Sebagai Bahan Pakan Ternak Melalui Teknik Fermentasi. *J. Tek. Ling.* ISSN 1441-318X. Vol. 10 (3): 257-263.
- Beguin, P. & Aubert, J.P. 1992. The Biological Degradation of Cellulose. *FEMS Microbiol. Rev.* (13): 25-58.
- Bintang, Maria. 2010. *Biokimia: Teknik Penelitian*. Jakarta: Erlangga.
- Cahyono, W.W. & Bachruddin, Z. 1995. Pengaruh Pakan Serat Kasar dari Jerami Padi Terhadap Aktivitas Enzim Selulase dan Hemiselulase Cairan Rumen Ternak Ruminansia. *Terbitan Berkala. Penelitian Pasca Sarjana UGM. Yogyakarta*. Vol. 8 : 41-49.
- Chen, S. & M. Wayman. 1992. Novel Inducers Derived from Starch for Cellulase Production by *Trichoderma reesei*. *Process Biochemistry* (27): 327-334.
- Criquet, Steven. 2002. Measurement and Characterization of Cellulase Activity in Sclerophyllous Forest Litter. *Journal of Microbiological Methods*. (50): 165–173.
- Darnoko. 1992. Potensi Pemanfaatan Limbah Lignoselulosa Kelapa Sawit Melalui Biokonversi. *Berita Penelitian Perkebunan Puslitbun (Rispa) Medan*. Vol. 2 (2): 85-97.
- De Vries, R.P. & Visser, J. 2001. Aspergillus Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. *Microbiol Mol Biol Rev.* (65): 497-522.
- Departemen Pertanian. 2006. *Pedoman Pengelolaan Limbah Industri Kelapa Sawit*. Jakarta: Departemen Pertanian.
- Fardiaz, S. 1987. *Mikrobiologi Pangan I*. Bogor: Fakultas Teknologi Pertanian, Institut pertanian Bogor.
- Fieser, L. F. & Williamson, K. L. 1992. *Organic Experiments*. Seventh Edition. USA: D.C. Health and Company.
- Gong, C. S. & Tsao, G.T. 2001. *Cellulose and Biosynthesis Regulation. Annual Report on Fermentation Process*. New York: Academic Press.



- Gunam, I. B. W., Buda, K., & Guna, I. M. Y. S. 2010. Pengaruh Perlakuan Delignifikasi dengan Larutan NaOH dan Konsentrasi Substrat Jerami Padi Terhadap Produksi Enzim Selulase dari *Aspergillus niger* NRRL A-II, 264. *Jurnal Biologi*. ISSN:1410 5292. Vol. 14 (1): 55-61.
- Hasan, M. S. R. 2004. Pemanfaatan Hidrolisat Ampas Tahu Hasil Hidrolisis Enzim Ekstraseluler *Aspergillus niger* Sebagai Media Produksi Sel Khamir Osmotoleran. *Skripsi*. Universitas Jember. Jember.
- Hasibuan, Helena. 2005. Isolasi dan Uji Potensi Mikroorganisme Selulolitik Dalam Mendgradasi Limbah Tandan Kosong Kelapa Sawit. *Tesis*. Universitas Sumatera Utara. Medan.
- Hermiati, Mangunwidjaja, Sunarti, Suparno, & Prasetya. 2010. Pemanfaatan Biomassa Lignoselulosa Ampas Tebu Untuk Produksi Bioetanol. *Jurnal Litbang Pertanian*. Hal: 121-128.
- Ibrahim, Pitaloka, Rahim, & Hong. 2012. Characterization of Solid State Fermentation Culture Conditions for Growth and Mananase Production by *Aspergillus niger* USM F4 on Rice Husk in Tray System. *British Biotechnology Journal*. Vol. 2 (3): 133-145.
- Irawadi, T.T. 1991. Produksi Enzim Ekstraseluler (Selulosa dan Xilanase) dari *Neurospora Sitophila* Pada Substrat Limbah Sawit. *Disertasi*. Fakultas Pascasarjana IPB. Bogor.
- Martoharsono, Soeharsono. 1994. Biokimia 2. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Milala, Sughaba, Gidado, Ene, & Wafar. 2005. Studies on The Use of Agricultural Wastes for Cellulase Enzyme Production by *Aspergillus niger*. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*. Vol. 1 (4): 325-328.
- Mun, Rahman, Aziz, Sabaratman, & Hassan. 2008. Enzymatic Hydrolysis of Palm Oil Mill Effluent Solid Using Mixed Cultures From Locally Isolated Fungi. *Res. J. Microbiol*. ISSN. 1816-4935.
- Nasrul, Mulyati, S., & Fathanah, U. 2006. [On line]. <http://elib.pdii.lipi.go.id/katalog/index.php/searchkatalog/byld/51595>. [27 Maret 2015]

- Omajasola, P.F. & Jilani, O.P. 2008. Cellulase Production by *Trichoderma longi*, *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae* Cultured on Waste Materials from Orange. *Pak. J. Biol. Science*. Vol. 11 (20): 2382-2388.
- Oyeleke, Oyewole, Egwim, Dauda, & Ibeh. 2012. Cellulase and Pectinase Production Potentials of *Aspergillus niger* Isolated from Corn Cob. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, ISSN 2006 – 6996. Vol. 5 (1): 78 – 83.
- Polprasert, C. 1996. *Organic Waste Recycling*. 2<sup>nd</sup> ed. Inggris: John Wiley and Sons Ltd.
- Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian. 2011. [On line]. <http://pusdatin.setjen.pertanian.go.id/publikasi-186-informasi-ringkas-kelapa-sawit.html>. [20 Maret 2014]
- Qurat-ul-ain, Baig, S., & Saleem, M. 2012. Production and Characterization of Cellulases of *Aspergillus niger* by Using Rice Husk and Saw Dust As Substrates. *Pak. J. Bot.*, (44): 377-3825.
- Rao, S.N.S. 1982. *Biofertilizer in Agriculture*. New Delhi: Oxford and IBH Publishing CO.
- Raper, K. B. & Fennel, D. I. 1977. *The Genus Aspergillus*. New York: Krieger R.E. Publishing Com.
- Ratledge, C. 1994. *Biochemistry of Microbial Degradation*. London: Kluwer Academic Publishers.
- Said, E.G. 1996. *Penanganan dan Pemanfaatan Limbah pada Kelapa Sawit*. Cetakan I. Ungaran: PT. Trubus Agriwijaya.
- Safaria, S., Idiawati, N., & Zaharah, T.A. 2013. Efektivitas Campuran Enzim Selulase dari *Aspergillus niger* dan *Trichoderma reesei* dalam Menghidrolisis Substrat Sabut Kelapa. *JKK*. ISSN 2303-1077. Vol. 2 (1): 46-51.
- Samsuri, Gozan, Prasetya, & Nasikin. 2007. Sakarifikasi dan Fermentasi Bagas Menjadi Etanol Menggunakan Enzim Selulase dan Selobiase. *J. Teknologi FTUI*. 11(1): 17-24.
- Saryono. 2008. Isolasi dan Karakterisasi Inulinase dari *Aspergillus niger* Gmn11.1 Galur Lokal. *Jurnal Natur Indonesia*. ISSN 1410-9379. Vol. 11 (1): 19-23.

- Schlegel, H.G. & Schmidt, K. 1976. *Mikrobiologi Umum*. Edisi Keenam Terjemahan oleh Tedjo Baskoro. 1994. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Schuster, E., Coleman, N. D., & Frisvad. 2002. On Savety of *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol.* (59): 426-435.
- Seeley, H.W. & VanDemark, P.J. 1972. *Selected Exercises from Microbes in Action A laboratory Manual of Microbiology*. 2<sup>nd</sup> Edition. USA: W. H. Freeman And Company.
- Shahlaei, M. & Pourhossein, A. 2013. Biomass of *Aspergillus niger*: Uses and Applications. *Journal of Reports in Pharmaceutical Sciences*. Vol. 2(1): 67-73.
- Sharada, Venkateswarlu, Venkateshwar, & Rao. 2013. Production of Cellulase. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*. ISSN: 2249-9504. Vol. 3(4): 1070-1090.
- Sinurat, A. P., Mathius, I. W., & Purwadaria, T. 2012. *Pengolahan dan Pemanfaatan Hasil Samping Industri Sawit Sebagai Bahan Pakan*. Jakarta: IAARD Press.
- Srivisan, V. R. 1973. *Microbial Cellulose*. In *Hand Book of Microbiology. Microbial Product*. Edited by: A.L Laskin and H.A. Lechevalier. New Jersey: CRC Press Inc.
- Stevenson, F. J. 1986. *Humus Chemistry. Genesis, Composition, and Reaction*. New York: John Wiley and Sons. Inc.
- Sukumaran, R. K., Singhanian, R. R., & Pandey, A. 2005. Microbial Cellulases: Production, Applications and Challenges. *Journal of Scientific & Industrial Research*. Vol. 64 : 832 - 844.
- Sun, Y. & Cheng, J. 2002. Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for Ethanol Production: a Review. *Bioresource Technology*. (83): 1–11.
- Supriyati, T., Pasaribu, H., Hamid, & Sinurat. 1998. Fermentasi Bungkil Inti Sawit Secara Substrat Padat dengan Menggunakan *Aspergillus niger*. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*. Vol. 3 (3): 165-170.
- Suresh, B. & Viruthagiri. 2010. Optimization and Kinetics of Pectinase Enzyme using *Aspergillus niger* by Solid State Fermentation. *Indian Journal of Science and Technologi*. Vol. 3 (8): 867 – 870.

- Tan, H. 1994. *Environmental Soil Science*. USA: Marcel Dekker Inc.
- Teeri, Daniel, Christina, Struat, Alwyn, Anu, Markus, Jerry, Gend, & Jin. 1998. *Fungal Cellobiohydrolases and The Degradation of Crystalline Cellulose. Genetic, Biochemistry and Ecology of Cellulose Degradation. Proceeding of Mie Bioforum 98*. Tokyo: Uni Publisher Co. Ltd.
- Wahyuni, Mardiana. 2004. Laju Dekomposisi Aerob dan Mutu Kompos Tandan Kosong Kelapa Sawit Dengan Penambahan Mikroorganisme Selulolitik, Amandemen dan Limbah Cair Pabrik Kelapa Sawit. *Tesis*. Universitas Sumatera Utara. Medan.
- Wina, E. 2005. Teknologi Pemanfaatan Mikroorganisme Dalam Pakan Untuk Meningkatkan Produktivitas Ternak Ruminansia di Indonesia: Sebuah Review. *Wartazoa*. Vol. 15 (4).
- Yazid, E. & Nursanti, L. 2006. *Penuntun Praktikum Biokimia untuk Mahasiswa Analis*. Yogyakarta: ANDI.



**Lampiran**

**A. Komposisi Bahan Kimia**

**A.1 Komposisi Bahan Kimia untuk Media**

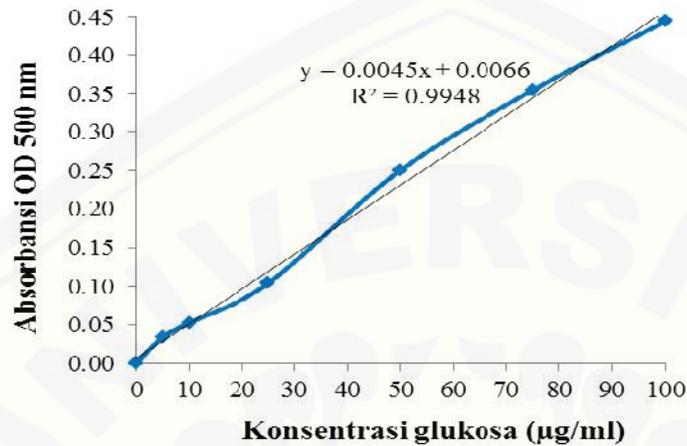
<b>Media</b>	<b>Bahan</b>	<b>Komposisi</b>
<i>Potato Dextrose Agar</i>	Kentang 20% (b/v)	200 gr
	<i>Dextrose</i> 1% (b/v)	10 gr
	<i>Bacto agar</i> 1.7% (b/v)	17 gr
	Akuades	1000 ml
TKKS agar 0.1%	Bubuk Alkali ekstrak TKKS 0.1% (b/v)	1 gr
	<i>Bacto Peptone</i> 0.1% (b/v)	1 gr
	<i>Glucose</i> 0.5% (b/v)	5 gr
	<i>Bacto agar</i> 1.7% (b/v)	17 gr
	Akuades	1000 ml
TKKS jenuh air $a_w = 81\%$	Serat kasar TKKS	10 gr
	akuades	42.5 ml

**A.2 Komposisi Bahan Kimia untuk Larutan**

<b>Larutan</b>	<b>Bahan</b>	<b>Komposisi</b>
<i>Reagen Somogyi</i>	$\text{Na}_2\text{CO}_3$	24 gr
	$\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$	12 gr
	$\text{NaHCO}_3$	16 gr
	$\text{CuO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 10% (b/v)	4 gr
	$\text{Na}_2\text{SO}_4$	180 gr
	Akuades	1000ml
<i>Reagen Nelson</i>	$(\text{NH}_4)\text{MO}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	50 gr
	<i>Sulfuric acid</i>	46ml
	$\text{NaHSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	6 gr
	Akuades	1000 ml



## B. Kurva Standart Glukosa



## C. Perhitungan Jumlah Spora *Aspergillus niger*

Waktu inkubasi (hari)	Jumlah spora *	Kepadatan spora (x 10 <sup>7</sup> )
0	5	0.25
1	7	0.35
2	15	0.75
3	101	5.05
4	98	4.90
5	117	5.85
6	149	7.45
7	245	12.25

\* Sel kapang diamati dibawah mikroskop Olympus dengan perbesaran 400X

Jumlah sel kapang dihitung dengan menggunakan *Haemacytometer*

Kepadatan sel dihitung berdasarkan rumus:

$$\text{Jumlah sel/ml} = \frac{n}{V} \times Fp$$

Keterangan : n = jumlah spora pada bidang hitung

V = volume *Haemacytometer*

fp = faktor pengenceran

(Schlegel, 1994)

**D. Kadar Gula Pereduksi pada Penentuan Waktu Produksi Enzim***Ekstraseluler Aspergillus niger*

Waktu inkubasi (Hari)	Kadar Gula Pereduksi ( $\mu\text{g/ml}$ )
1	0.76
2	12.09
3	37.76
4	40.09
5	30.64
6	10.87
7	19.20

**E. Kadar Gula Pereduksi pada Analisis Kemampuan Hidrolisis TKKS oleh***Crude Enzim Aspergillus niger*

Waktu inkubasi (jam)	Absorbansi (OD 500 nm)	Kadar gula pereduksi ( $\mu\text{g/ml}$ )
0	0.420	459
1	0.469	513
2	0.539	592
3	0.562	617
6	0.687	756
12	0.513	562