



**AKTIVITAS KERATINOLITIK *Aspergillus niger* PADA TEPUNG BULU AYAM  
MENGUNAKAN *SOLID STATE FERMENTATION* (SSF)**

**SKRIPSI**

Oleh  
**Rizki Bagus Setyabudi**  
**NIM 101810401038**

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



**AKTIVITAS KERATINOLITIK *Aspergillus niger* PADA TEPUNG BULU AYAM  
MENGUNAKAN *SOLID STATE FERMENTATION* (SSF)**

**SKRIPSI**

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

Oleh  
**Rizki Bagus Setyabudi**  
**NIM 101810401038**

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

## Persembahan

Dengan rahmat Allah Yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang, skripsi ini Penulis persembahkan kepada :

1. ayahanda yang selalu saya banggakan Drs. Imam Mustofa dan ibunda tercinta Wiji Asmaraning Tina yang selalu memberikan motivasi, cinta, kepercayaan dan doa restu yang senantiasa menyertai perjuangan anak-Mu ini dalam menuntut ilmu;
2. ibu Esti Utarti S.P., M.Si , terima kasih saya ucapkan atas dukungan, bimbingan serta doa yang telah diberikan kepada penulis selama menyelesaikan penelitian ini;
3. adikku Dinda Risqiyah Maulida, yang selalu memberikan semangat dan keceriaan;
4. almamater Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

**MOTO**

IF YOU CAN'T FLY THEN RUN, IF YOU CAN'T RUN THEN WALK, IF YOU CAN'T WALK THEN CRAWL, BUT WHATEVER YOU DO, YOU HAVE TO KEEP MOVING FORWARD.

(Martin Luther King Jr)

Maka sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan. Maka apabila engkau telah selesai (dari sesuatu urusan), tetaplah bekerja keras (untuk urusan yang lain).

(Qs. Al Insyirah :5-7)

---

<sup>\*)</sup> Departemen Urusan Agama Islam, Wakaf, Dakwah dan Irsyad Kerajaan Saudi Arabia.1995. *Al-Qur'an dan terjemahannya dalam Bahasa Indonesia*. Madinah Al - Munawwarah: Komplek Percetakan Alquranul Karim Kepunyaan Raja Fahd.

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

nama : Rizki Bagus Setyabudi

NIM : 101810401038

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Aktivitas Keratinolitik *Aspergillus niger* Pada Tepung Bulu Ayam Menggunakan *Solid State Fermentation* (SSF)” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsaha dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 4 Mei 2015

Yang menyatakan,

Rizki Bagus Setyabudi

NIM 101810401038

**SKRIPSI**

**AKTIVITAS KERATINOLITIK *Aspergillus niger* PADA TEPUNG BULU AYAM  
MENGUNAKAN *SOLID STATE FERMENTATION* (SSF)**

**Oleh**

**Rizki Bagus Setyabudi**

**NIM 101810401038**

**Pembimbing**

Dosen Pembimbing Utama : Drs. Siswanto, M.Si

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

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “Aktivitas Keratinolitik *Aspergillus niger* Pada Tepung Bulu Ayam Menggunakan *Solid State Fermentation* (SSF)” telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

**Tim Penguji**

Ketua,

Sekretaris,

Drs. Siswanto, M.Si  
NIP 196012161993021001

Dr. Kahar Muzakhar, S.Si.  
NIP 196805031994011001

Anggota I,

Anggota II,

Prof. Ir. Bambang Sugiharto MAgr.Sc.D.Agr.S  
NIP 195510221982121001

Drs. Rudju Winarsa., M.Kes  
NIP 196008161989021001

Mengesahkan

Dekan,

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

## RINGKASAN

**Aktivitas Keratinolitik *Aspergillus niger* Pada Tepung Bulu Ayam Menggunakan Solid State Fermentation;** Rizki Bagus Setyabudi, 101810401038; 2015; 33; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Aktivitas keratinolitik merupakan kemampuan mikroba menghasilkan enzim keratinase untuk mendegradasi substrat keratin di lingkungannya. Keratin merupakan limbah yang kaya dengan struktur rapat dan kuat dalam bentuk  $\alpha$ -heliks ( $\alpha$ -keratin) atau  $\beta$ -sheet ( $\beta$ -keratin) menjadi rantai polipeptida supercoil. Ikatan polipeptida keratin distabilisasi oleh beberapa ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik, selain itu juga terdapat beberapa ikatan disulfida (S-S) sehingga sulit untuk di degradasi. Salah satu sumber keratin adalah tepung bulu ayam. Keberadaan bulu ayam di Indonesia yang sangat berlimpah merupakan salah satu faktor penyebab pencemaran lingkungan. Bulu ayam tersusun  $\pm$  90% protein keratin yang menyebabkan bulu ayam sulit untuk didegradasi karena memiliki stabilitas ikatan protein yang tinggi. Sehingga dengan mengetahui aktivitas keratinolitik *Aspergillus niger*, diduga akan mengoptimalkan proses degradasi limbah bulu ayam.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari (i) Skrining *Aspergillus niger* Keratinolitik secara Semi Kuantitatif, (ii) Produksi enzim keratinase *Solid State Fermentation* (SSF), (iii) Analisis Kandungan Protein Terlarut Tepung Bulu Ayam, (iv) Optimasi Waktu Produksi Enzim, dan (v) Optimasi Lama Inkubasi Uji Aktivitas Keratinase.

Hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa *Aspergillus niger* mampu meningkatkan kadar protein terlarut substrat keratin (TBA-2) sebesar 79,6 % pada saat pasca fermentasi secara SSF. *Aspergillus niger* memiliki waktu



produksi enzim yang optimum pada proses fermentasi (SSF) selama enam hari, yaitu dengan pelepasan kadar tirosin sebesar 156.125  $\mu\text{g/ml}$  dan aktivitas enzim sebesar 11.97 mU/ml. Enzim ekstrak kasar yang dihasilkan dari proses fermentasi, juga memiliki aktivitas enzim yang optimum pada lama inkubasi 1 jam pada proses uji kuantitatif aktivitas enzim keratinase, yaitu dengan aktivitas enzim sebesar 55.54 mU/ml dengan pelepasan kadar tirosin sebesar 120.75  $\mu\text{g/ml}$ .

## KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirobbil alamin, segala puji bagi Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya serta shalawat dan salam kehariban baginda Rasulullah SAW, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “ Aktivitas Keratinolitik *Aspergillus niger* Pada Tepung Bulu Ayam Menggunakan *Solid State Fermentation* (SSF) ”.

Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan sarjana di Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Ketercapaian penulisan skripsi ini tidak lepas dari dukungan – dukungan berbagai pihak terkait. Oleh sebab itu, pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih sebesar-besarnya kepada :

1. Drs. Siswanto M. Si selaku Dosen Pembimbing Utama dan Dr. Kahar Muzakhar, S. Si selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah memberikan waktu, bimbingan serta arahan-arahan bagi penulis sehingga penulisan skripsi ini dapat tercapai;
2. Prof. Bambang Sugiharto selaku Dosen Penguji I dan Drs. Rudju Winarsa., M.Kes selaku Dosen Penguji II yang telah memberikan kritik dan saran dalam penulisan skripsi ini;
3. Esti Utarti, S.P., M.Si selaku dosen pembimbing sekaligus pemilik proyek dalam penelitian ini yang telah memberikan bimbingan dan nasehat-nasehat selama penulisan skripsi ini;
4. Drs. Siswanto M. Si., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing dan mengarahkan penulis selama menjadi mahasiswa aktif;

5. Ir. Endang Susetyaningsih dan Sutrisno selaku teknisi dan staf Laboratorium Mikrobiologi FMIPA Universitas Jember yang telah membantu dan melayani selama penelitian;
6. seluruh guru dan dosen yang telah memberikan ilmu yang tidak terkira kepada penulis;
7. orang tua dan keluarga besar yang selalu memberikan motivasi, cinta, kepercayaan dan doa restu yang senantiasa menyertai perjuangan penulis dalam menuntut ilmu;
8. E.C.3 Team Research group yaitu Dini Ramadani, Rion Faizah Muammaroh, Tifni Istiqomah dan Laila Karomah yang telah membantu dalam menyelesaikan skripsi ini dan para sahabat Biologi angkatan 2010 (BOLU).  
Besar harapan penulis semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat yang sebesar-besarnya bagi penulis pada khususnya dan pembaca pada umumnya.

Jember, Mei 2015

Penulis

**DAFTAR ISI**

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	iii
<b>HALAMAN MOTO</b> .....	iv
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	v
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	vii
<b>RINGKASAN</b> .....	viii
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	x
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xiv
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xv
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xvi
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
<b>1.1 Latar Belakang</b> .....	1
<b>1.2 Rumusan Masalah</b> .....	2
<b>1.3 Tujuan</b> .....	3
<b>1.4 Manfaat</b> .....	3
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	4
<b>2.1 Keratin</b> .....	4
<b>2.2 Mikroba Keratinolitik</b> .....	7
<b>2.3 Degradasi Substrat Keratin</b> .....	9
<b>2.4 <i>Aspergillus niger</i></b> .....	10
<b>2.5 <i>Solid State Fermentation (SSF)</i></b> .....	11

<b>BAB 3. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>13</b>
<b>3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan.....</b>	<b>13</b>
<b>3.2 Alat dan Bahan .....</b>	<b>13</b>
<b>3.3 Prosedur Penelitian .....</b>	<b>14</b>
3.3.1 Skrining <i>Aspergillus niger</i> Keratinolitik secara Semi Kuantitatif.....	14
3.3.2 <i>Solid State Fermentation</i> (SSF).....	14
3.3.2.1 Pembuatan inokulum.....	14
3.3.2.2 Persiapan Substrat Keratin.....	15
3.3.2.3 Fermentasi Tepung Bulu Ayam .....	15
3.3.3 Analisis Kandungan Protein Terlarut Tepung Bulu Ayam .....	16
3.3.4 Optimasi Waktu Produksi Enzim .....	16
3.3.5 Optimasi Lama Inkubasi Uji Aktivitas Keratinase .....	17
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>18</b>
<b>4.1 Skrining Kapang Keratinolitik Secara Semikuantitatif..</b>	<b>18</b>
<b>4.2 Produksi Enzim Keratinase.....</b>	<b>19</b>
<b>4.3 Efek Perlakuan Waktu Inkubasi Produksi Enzim         keratinase .....</b>	<b>20</b>
<b>4.4 Efek Perlakuan Lama Inkubasi Uji Aktivitas Enzim.....</b>	<b>22</b>
<b>BAB 5. PENUTUP .....</b>	<b>25</b>
<b>5.1 Kesimpulan .....</b>	<b>25</b>
<b>5.2 Saran .....</b>	<b>25</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>26</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>32</b>

**DAFTAR TABEL**

	Halaman
2.1 Komposisi asam amino keratin bulu ayam.....	7
4.1 Kenaikan kadar protein pasca proses fermentasi (SSF) pada berbagai tipe tepung bulu ayam (TBA).....	20

**DAFTAR GAMBAR**

	Halaman
2.1. Struktur keratin.....	4
2.2. Skema struktur bangun keratin.....	5
2.3. Struktur bulu ayam pada pengamatan mikroskop electron.....	6
2.4. Morfologi sel <i>Aspergillus</i> .....	10
4.1. Skrining <i>A.niger</i> pada medium a) KSA 2%, b) KSA 1,5%.....	18
4.2. Kadar protein terlarut Pra-fermentasi dan Pasca Fermentasi TBA oleh <i>A.niger</i> .....	19
4.3. Kurva Optimasi lama waktu fermentasi <i>A. niger</i> terhadap substrat keratin .....	21
4.4. Jumlah pelepasan kadar tirosin pada optimasi perlakuan lama waktu inkubasi uji aktivitas enzim keratinase.....	23
4.5. Kurva aktivitas enzim keratinase ekstrak kasar pada perlakuan lama waktu inkubasi uji aktivitas enzim keratinase.....	24

**DAFTAR LAMPIRAN**

	Halaman
<b>A. Gambar Tepung Bulu Ayam</b> .....	32
<b>B. Komposisi Bahan</b>	
<b>B.1 Media KSA 2% (20 ml)</b> .....	32
<b>B.2 Media KSA 1.5% (20 ml)</b> .....	33
<b>C. Tabel Kepadatan Spora <i>A. niger</i></b> .....	33
<b>D. Grafik</b>	
<b>D.1. Grafik Standar Protein</b> .....	34
<b>D.2. Grafik Standar Tirosin</b> .....	34
<b>D.3. Grafik Kadar Tirosin (Produksi Enzim)</b> .....	35
<b>E. Surat Keterangan Identifikasi</b> .....	36



## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Aktivitas keratinolitik merupakan kemampuan mikroba menghasilkan enzim keratinase untuk mendegradasi substrat keratin di lingkungannya. Keratin merupakan salah satu protein struktural pada bulu ayam. Di Indonesia, produksi ayam pada tahun 2013 mencapai  $\pm 1.514.391$  ton dalam satu periode (BPS, 2013). Pada unggas, bulu berjumlah sekitar 5 – 7 % dari total berat unggas dewasa, sehingga dapat diperkirakan produksi bulu ayam di Indonesia sekitar  $\pm 90.864$  ton dari industri peternakan ayam selama tahun 2013. Penumpukan limbah bulu ini, akan menyebabkan pencemaran lingkungan karena sulitnya degradasi bulu ayam.

Sulitnya degradasi bulu ayam ini disebabkan oleh struktur pembentuk bulu yang didominasi oleh protein serat keratin. Keratin mempunyai struktur rapat dan kuat dalam bentuk  $\alpha$ -heliks ( $\alpha$ -keratin) atau  $\beta$ -sheet ( $\beta$ -keratin) menjadi rantai polipeptida supercoil (Parry dan North, 1998). Ikatan polipeptida keratin distabilisasi oleh beberapa ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik, selain itu juga terdapat beberapa ikatan disulfida (S-S). Hal ini menyebabkan protein keratin sangat stabil, kaku dan sulit didegradasi oleh enzim proteolitik yang umum seperti tripsin, pepsin dan papain (Riffel *et al.*, 2003). Meskipun protein keratin bersifat tidak larut dan sulit didegradasi, keratin dapat didegradasi oleh enzim yaitu enzim keratinase.

Enzim keratinase merupakan protease dengan aktivitas hidrolitik dan termasuk dalam protease serin (Matsubara dan Feder, 1971 ; Friedrich dan Antranikian, 1996). Enzim keratinase mampu menghidrolisis keratin, dengan menyerang ikatan disulfida pada keratin. Enzim keratinase telah banyak dihasilkan oleh beberapa fungi yang diisolasi dari tanah dan limbah peternakan. Beberapa diantaranya adalah kapang yang mampu memproduksi enzim hidrolitik untuk

mendegradasi bulu unggas dan memiliki aktivitas keratinolitik adalah *Acremonium strictum*, *Chrysosporium indicum*, *Chrysosporium tropicum*, *Penicillium griseofulvum*, *Malbranchea sp.*, *Myceliophthora fergusii*, *Aspergillus sp* dan *Gymnoascus intermedius* (Kumar dan Kushwaha, 2014).

*Aspergillus niger* merupakan sejenis kapang yang sering digunakan pada proses fermentasi dalam pembuatan pakan ternak alternatif. Berdasarkan hasil penelitian Mazotto *et al.*, (2013), dilaporkan bahwa *A. niger* memiliki kemampuan untuk mendegradasi limbah bulu. Penggunaan *A. niger* sebagai agen hayati dalam mendegradasi keratin ini, diharapkan mampu untuk mendegradasi berbagai limbah peternakan yang mengandung keratin khususnya pada limbah bulu ayam.

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka dinilai perlu untuk dilakukannya penelitian mengenai aktivitas keratinolitik *A. niger* koleksi laboratorium mikrobiologi Fakultas MIPA Universitas Jember pada limbah hasil peternakan unggas, khususnya pada tepung bulu ayam.

## 1.2 Rumusan Masalah

Keberadaan bulu ayam di Indonesia yang sangat berlimpah merupakan salah satu faktor penyebab pencemaran lingkungan. Bulu ayam tersusun  $\pm 90\%$  protein keratin yang menyebabkan bulu ayam sulit untuk didegradasi karena memiliki stabilitas ikatan protein yang tinggi. Sehingga dengan mengetahui aktivitas keratinolitik *Aspergillus niger*, diduga akan mengoptimalkan proses degradasi limbah bulu ayam.

## 1.3 Tujuan

Penelitian ini, bertujuan untuk mengetahui daya degradasi *A. niger* terhadap tepung bulu ayam (TBA) dengan metode fermentasi, tipe *Solid State Fermentation* (SSF).

#### 1.4 Manfaat

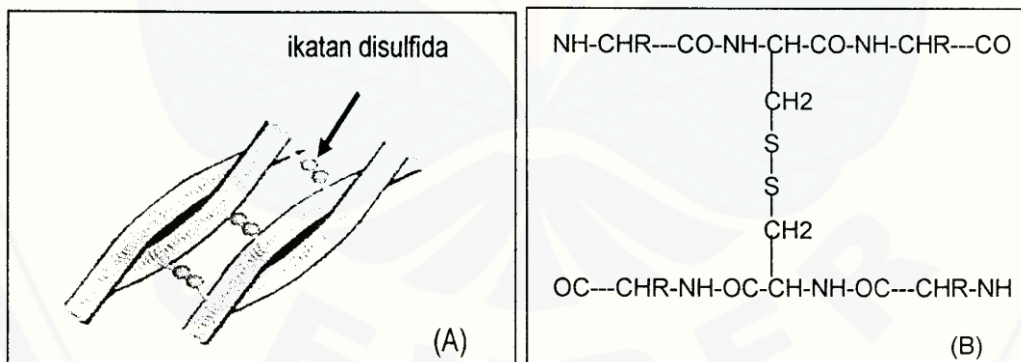
Hasil dari penelitian ini diharapkan memberi informasi tentang pemanfaatan *Aspergillus niger* sebagai agen pendegradasi keratin tepung bulu ayam. Selain itu, hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai sumber informasi dalam eksplorasi lebih lanjut dalam pemanfaatan berbagai sumber keratin dengan menggunakan *A. niger*.



## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Keratin

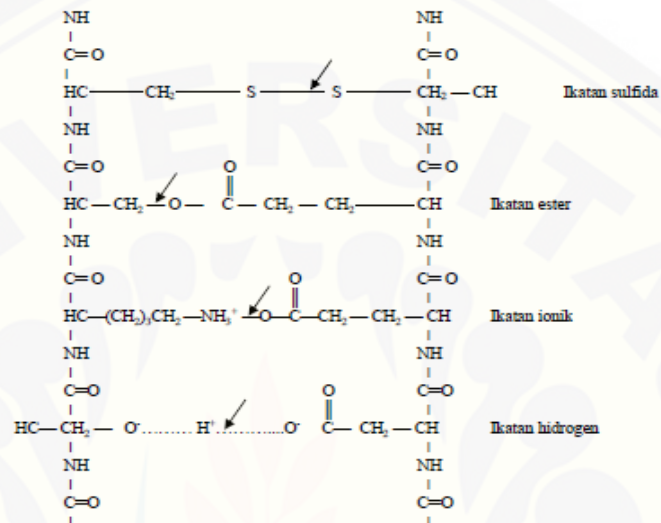
Keratin merupakan produk dari proses pengerasan jaringan epidermis yang tersusun atas protein–protein serat yang kaya akan sulfur. Keratin banyak ditemukan pada rambut, kuku, bulu, tanduk, kulit hewan, kuku dan semua produk epidermal. Keratin merupakan limbah yang sangat banyak dan sulit untuk didegradasi karena keratin tersusun dengan rapat dan kuat dalam bentuk  $\alpha$ -keratin atau  $\beta$ -keratin menjadi rantai polipeptida supercoil (Parry dan North, 1998). Ikatan polipeptida keratin distabilisasi oleh beberapa ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik, selain itu juga terdapat beberapa ikatan disulfida (S-S) (Gambar 2.1). Hal ini menyebabkan protein keratin sangat stabil, kaku dan sulit didegradasi oleh enzim proteolitik yang umum seperti tripsin, pepsin dan papain (Riffel *et al.*, 2003).



Gambar 2.1. Struktur keratin [ (A) PPT (2002) ; (B)Haurowitz (1984) ]

Ikatan silang rantai protein oleh jembatan sistein menjadikan keratin memiliki stabilitas mekanik yang tinggi dan resisten terhadap degradasi proteolitik oleh enzim.

Kandungan sistein pada keratin berkisar 11-12 % dan tidak dimiliki oleh jenis protein lainnya. Protein keratin mengandung 14% sistein dengan disulfida sebagai jembatan antar molekul (Gambar 2.2).

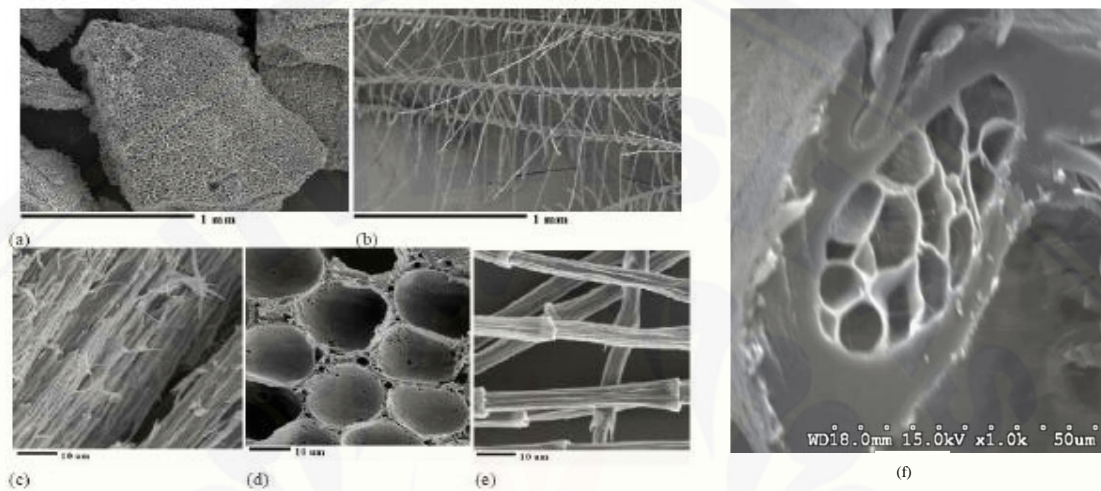


Gambar 2.2. Skema struktur bangun keratin (West dan Todd, 1961)

Bulu ayam merupakan limbah yang berasal dari rumah pemotongan unggas dengan jumlah berlimpah dan terus bertambah seiring meningkatnya populasi ayam dan tingkat pemotongan sebagai akibat meningkatnya permintaan daging ayam oleh konsumen. Bulu ayam sampai saat ini belum banyak dimanfaatkan dan hanya sebagian kecil saja yang dimanfaatkan sebagai bahan untuk membuat kemoceng, pengisi jok, pupuk tanaman, kerajinan tangan/hiasan dan shuttle cock (Adiati *et al.*, 2004).

Pada bidang industri peternakan, bulu ayam akan menjadi limbah yang dapat menimbulkan dampak penurunan kualitas tanah karena bulu ayam sulit terdegradasi di lingkungan akibat adanya keratin atau protein fibrous berupa serat. Oleh sebab itu limbah bulu ayam resisten terhadap perombakan atau degradasi dan merupakan

masalah yang serius di lingkungan. Fraksi bulu ayam terdiri dari bulu sebelah dalam dan sebelah luar, bulu sebelah luar berstruktur pori pori lebih rapat daripada bulu sebelah dalam (Gambar 2.3).



Gambar 2.3. Struktur bulu ayam pada pengamatan mikroskop elektron

Keterangan : (a) bulu bagian dalam (b) serat (c) bulu bagian luar (d) bulu bagian dalam (e) serat ( Kock, 2006) (f) struktur sarang lebah pada barbules (Reddy, 2007)

Protein bulu ayam sebagian besar terdiri atas keratin yang digolongkan ke dalam protein serat. Protein bulu ayam mempunyai ciri kaya akan asam amino bersulfur, yaitu sistein. Pada bulu ayam terdapat lebih dari 90% protein ( $\beta$ -keratin). Struktur  $\beta$ -Heliks tersebut cenderung agregat oleh ikatan hidrogen untuk membentuk unit silinder polipeptida struktur rantai yang unik (Riffel *et al.*, 2003). Kandungan asam amino pada protein bulu ayam pada tabel 2.1.

Potensi kandungan asam amino pada bulu ayam ini dapat digunakan dalam pemenuhan kebutuhan protein pada hewan ternak (khususnya unggas). Suplementasi tepung bulu/bulu kasar dengan keratinase PWD-1 mampu mengubah struktur keratin sehingga meningkatkan daya cerna dan pertumbuhan ayam (Odetallah *et al.*, 2003).

Tepung bulu relatif lebih murah dan lebih unggul dalam hal kandungan sistein, treonin, dan valinnya bila dibandingkan dengan bungkil kedelai (Apple *et al.*, 2003)

Tabel 2.1 Komposisi asam amino keratin bulu ayam (Moore *et al.*, 2006)

Asam Amino	Konsentrasi (% b/b)
Serin	9.31
Asam aspartat	4.73
Glysin	6.18
Asam glutamat	7.65
Prolin	8.77
Histidin	0.43
Arginin	5.36
Leusin	7.04
Threonin	3.50
Tirosin	1.96
Alanin	3.56
Valin	6.94
Metionin	1.30
Sistein	7.63
Isoleusin	4.28
Lisin	0.53
Fenilalanin	4.20

## 2.2 Mikroba Keratinolitik

Mikroba keratinolitik adalah mikroba penghasil enzim keratinase, protease spesifik yang mampu mendegradasi substrat yang mengandung keratin. Enzim keratinase ini, dapat dihasilkan secara intraseluler maupun ekstraseluler oleh bakteri keratinolitik (Orifade *et al.*, 1998). Keratinase pada umumnya memiliki aktivitas optimal pada pH netral hingga alkali (pH 7.0 – 12). Beberapa spesies bakteri menghasilkan keratinase termotabil dengan aktivitas optimal pada kisaran suhu 60–80°C (Gumulya, 2004). Berat molekul keratinase yang dihasilkan mikroba sangat bervariasi, berkisar dari 30kDa hingga lebih dari 200 kDa (Gumulya, 2004; Nam *et al.*, 2002).

Keratinase yang dihasilkan oleh mikroba memiliki spesifisitas luas. Keratinase mampu menghidrolisis berbagai protein larut misalnya kasein, gelatin, serum albumin, albumin telur, hemoglobin, mioglobin, dan protein yang tak larut seperti keratin, elastin, kolagen, fibrin, laminin, fibronektin (Letourneau *et al.*, 1998). Sebagian besar enzim keratinase yang dihasilkan oleh mikroba tergolong dalam protease serin yang dicirikan dengan adanya gugus serina pada sisi aktif enzimnya dan dihambat oleh senyawa diidopropil fluorofosfat (DFP). Protease serin yang dihasilkan oleh mikroba ini memerlukan kofaktor  $Mg^{2+}$  dan  $Ca^{2+}$  untuk aktifitasnya (Bockel *et al.* 1995, Friedrich dan Antranikian 1996, Bressolier *et al.*, 1999, Gradisar *et al.*, 2000, Riessen dan Antranikian, 2001).

Beberapa bakteri pendegradasi bulu telah berhasil diisolasi dari tanah dan limbah unggas. Meskipun kebanyakan didominasi oleh genera *Streptomyces* dan *Bacillus*, beberapa penelitian mengindikasikan bahwa keanekaragaman bakteri pendegradasi bulu sangatlah besar (Lucas *et al.*, 2003). Selain itu, ada beberapa bakteri gram positif yang telah teridentifikasi memiliki aktifitas keratinolitik yaitu *Arthrobacter* sp. (Lucas *et al.*, 2003), *Microbacterium* sp. (Thys *et al.*, 2004), dan *Kocuria rosea* (Bernal *et al.*, 2004). Beberapa strain dari *Bacillus* yang telah dilaporkan juga memiliki aktivitas keratinolitik, antara lain *B. licheniformis*, *B. subtilis* (Lin *et al.*, 1999; Suh dan Lee 2001), *B. pumillus* dan *B. cereus* (Kim *et al.*, 2001; Werlang dan Brandelli, 2005). Beberapa kapang yang diisolasi dari tanah dan mampu memproduksi enzim hidrolitik untuk menghilangkan bulu unggas dan memiliki aktivitas keratinolitik adalah *Acremonium strictum*, *Microsporium gypseum*, *Chrysosporium indicum*, *Chrysosporium tropicum*, *Penicillium griseofulvum*, *Malbranchea* sp., *Myceliophthora fergusii*, *Aspergillus* sp dan *Gymnoascus intermedius* (Kumar dan Kushwaha, 2014).

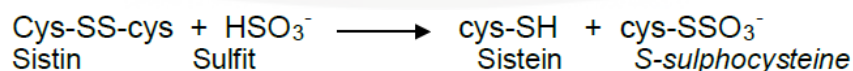


### 2.3 Degradasi Substrat Keratin

Degradasi keratin dalam medium ditandai dengan dilepaskannya produk-produk hidrolisis ke dalam medium. Produk utama adalah peptida berberat molekul satu hingga dua kilodalton, akan tetapi ditemukan juga asam-asam amino bebas dan protein berberat molekul tinggi. Indikator terbaik terjadinya keratinolisis adalah peningkatan pH medium (sedikitnya mencapai pH 8.0) yang menggambarkan penggunaan protein keratin, deaminasi, dan produksi ammonia (Kunert, 2000).

Keratin mengandung kaya akan sulfur, kelebihan sulfur dikurangi dengan dioksidasi menjadi sulfat dan dilepaskan ke dalam medium. Sulfat merupakan produk akhir dan bersifat *inert*, konsentrasi sulfat dalam medium dapat menjadi parameter yang baik bagi terjadinya degradasi substrat. Akan tetapi konsentrasi sulfur organik berupa sistein dan peptida mengandung *S-sulphocysteine* relatif rendah, sedangkan kandungan sistein (Tiol) sangat bervariasi. Tiol, termasuk sistein dalam kondisi alkali dan akan dioksidasi kembali oleh oksigen menjadi disulfida (Kunert, 2000).

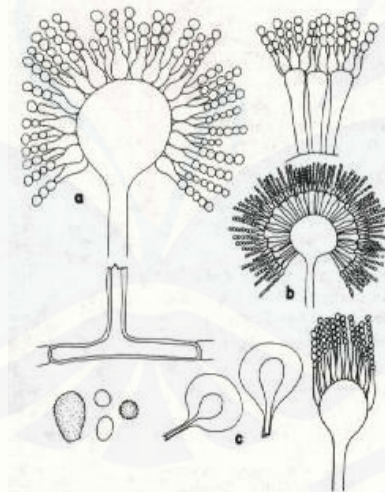
*Streptomyces* memulai aktivitas proteolitiknya dengan proses denaturasi (reduksi) jembatan disulfida (Bockle & Muller, 1997). Namun pada fungi keratinolitik tidak terjadi reduksi keratin oleh enzim ekstraseluler dan atau Tiol. Pada fungi selain protease tampaknya alkalinisasi medium dan *sulphitolysis* merupakan faktor utama denaturasi keratin (Kunert, 2000). Fungi mengeksresikan sulfit dan ammonia, dalam kondisi alkali sulfit akan memotong jembatan disulfida substrat. Kemudian secara perlahan substrat akan terdenaturasi dan hal ini mempermudah kerja protease. *Sulphitolysis* pada jembatan disulfida menghasilkan produk utama *S-sulphocysteine* baik dalam bentuk bebas maupun kombinasi dengan peptida. Pada kultur yang sudah tua, sedikitnya 80% sulfur organik berupa *S-sulphocysteine*. Sulfit merupakan stimulator yang kuat bagi protease *M. gypseum* saat menghidrolisis keratin wool (Kunert, 1999).



Menurut Kunert (2000), degradasi keratin pada fungi diduga merupakan hasil kerja tiga faktor yaitu “deaminasi” (menghasilkan lingkungan alkali yang dibutuhkan untuk pengembangan substrat, *sulphitolysis*, dan aksi proteolitik); “*sulphitolysis*” (denaturasi substrat dengan memutus jembatan disulfida) dan “proteolisis” (pemotongan substrat yang telah terdenaturasi menjadi produk terlarut).

#### 2.4 *Aspergillus niger*

*Aspergillus niger* merupakan kapang anggota dari genus *Aspergillus*, famili Eurotiaceae, ordo Eutiales, sub-kelas Plectomycetidae, kelas Ascomycetes, subdivisi Ascomycotina dan divisi Amastigmycota (Hardjo *et al.*, 1989). Genus *Aspergillus* mempunyai morfologi sel seperti pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4. Morfologi sel *Aspergillus* : a. Vesikel, b. Metulae, c. Spora (Malloch,1997).

*A. niger* memiliki karakteristik yang khas dengan kepala pembawa konidia yang besar, padat, bulat dan berwarna hitam coklat atau ungu coklat. Kapang ini

mempunyai bagian yang khas yaitu hifanya berseptata, spora yang bersifat seksual dan tumbuh memanjang di alas stigma, mempunyai sifat aerobik, sehingga dalam pertumbuhannya memerlukan oksigen yang cukup. *A. niger* termasuk mikroba mesofilik dengan pertumbuhan maksimum pada suhu 35-37°C. Derajat keasaman untuk pertumbuhannya adalah 2,0-8,5 tetapi pertumbuhan akan lebih baik pada kondisi keasaman atau pH yang rendah (Fardiaz, 1989).

*Aspergillus niger* merupakan salah satu mikroorganisme terpenting dalam bidang bioteknologi. Mikroba ini telah sering digunakan dalam produksi enzim ekstraseluler seperti glucose oksidase, pektinase,  $\alpha$  – Amilase dan glukamilase, asam organik dan protein rekombinan. Selain itu, *A. niger* juga digunakan untuk biotransformasi dan penanganan limbah. Salah satu fungsi *A. niger* sebagai agen biotik dalam penanganan limbah adalah penggunaan *A. niger* dalam mendegradasi limbah keratin. Karakteristik *A. niger* ini telah dikonfirmasi berdasarkan hasil penelitian Lopez *et al.*, (2011), yang menyatakan *A. niger* mampu mendegradasi beberapa substrat keratin seperti rambut manusia, rambut babi, bulu ayam, tepung bulu ayam dan tanduk sapi.

### **2.5 Solid State Fermentation (SSF)**

*Solid State Fermentation* (SSF) merupakan proses fermentasi yang melibatkan pertumbuhan mikroorganisme pada substrat padat tanpa adanya liquid bebas pada substrat seperti dedak, ampas tebu, dan bubur kertas. Konsep penggunaan substrat padat kemungkinan merupakan metode tertua yang digunakan peneliti untuk memanfaatkan mikroba dalam proses fermentasi. Beberapa tahun terakhir, SSF telah menunjukkan perkembangan yang menjanjikan, namun SSF tidak bisa digunakan dalam fermentasi dengan agen hayati bakteri (Bhargav *et al.*, 2008).

Pada metode SSF, kelembapan memiliki peranan penting untuk pertumbuhan mikroba dalam matriks padat pada substrat. Tujuan dari metode SSF adalah untuk mengkultivasi fungi ataupun mikroorganisme lain pada substrat yang tidak larut

untuk mendapatkan konsentrasi nutrisi esensial maupun non-esensial dari substrat selama proses fermentasi (Bhargav *et al*, 2008). Keuntungan utama menggunakan substrat ini adalah bahwa bahan limbah kaya nutrisi dapat dengan mudah didaur ulang sebagai substrat. Dalam teknik fermentasi ini, substrat yang digunakan sangat lambat dan kuat, sehingga substrat yang sama dapat digunakan untuk waktu yang lama dalam proses fermentasi. Oleh karena itu, teknik ini mendukung pengendalian dalam hal pelepasan nutrisi. SSF ini paling cocok untuk teknik fermentasi yang melibatkan jamur dan mikroorganisme yang membutuhkan lingkungan minim kadar air . Namun, tidak dapat digunakan dalam proses fermentasi yang melibatkan organisme yang membutuhkan  $a_w$  tinggi (aktivitas air), seperti bakteri. (Babu dan Satyanarayana, 1996).

### **BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN**

#### **3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan**

Penelitian dilakukan pada bulan Juni 2014 sampai Februari 2015 di Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember.

#### **3.2 Alat dan Bahan**

Alat yang digunakan pada penelitian ini, antara lain : tabung reaksi serta rak, timbangan, oven, shaker, labu Erlenmeyer, pipet volume, pipet tetes, lampu bunsen, cawan petri, mikro pipet, batang L, sentrifuse, aluminium foil, kertas dorslag, tabung ukur, beaker glass, pH meter, object glass, cover glass, jarum ose, penggaris, pinset, shaker, blender, Laminar Air Flow (LAF), haemositometer, mortar porselein, mikroskop Olympus CX31-P dan spektrofotometer.

Bahan yang digunakan adalah Isolat *Aspergillus niger* koleksi laboratorium Mikrobiologi Universitas Jember, aquades, alkohol 70 %, medium Potato Dextrose Agar (PDA), Substrat Kasein, skim milk, pepton, medium produksi enzim, bulu ayam, Kloroform, methanol, dedak padi, larutan 0.9%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.1 mol L<sup>-1</sup> HCl, buffer asetat 200 mM (pH 4.2), kertas saring, buffer asetat 200 mM (pH 4.2), Bovine Serum Albumin (BSA), reagen bradford, Tris/HCl (50 mM, pH 8), Tricloroacetic Acid (TCA 5%),  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dan reagen follin.

### 3.3 Prosedur Penelitian

#### 3.3.1 Skrining *Aspergillus niger* Keratinolitik secara Semi Kuantitatif

Uji aktivitas keratinolitik secara semikuantitatif dilakukan dengan menginokulasikan *A. niger* pada *casein media Agar* (CMA), dengan komposisi media ( $\text{g l}^{-1}$ ) yaitu a) pepton 1; bacto agar 20; casein 100; (b) pepton 1; bacto agar 20; casein 75; skim milk 25. Aktivitas keratinolitik dinyatakan sebagai indeks aktivitas keratinolitik yang ditunjukkan dengan rasio diameter zona bening terhadap diameter koloni.

#### 3.3.2 *Solid State Fermentation* (SSF)

##### 3.3.2.1 Pembuatan inokulum

Inokulum *A. niger* yang digunakan adalah kultur *A. niger* dengan kepadatan spora  $10^9$ . Pembuatan inokulum diawali penentuan kepadatan spora. Penghitungan kepadatan spora *A. niger* dibuat dengan mengkulturkan spora *A. niger* media PDA miring, kemudian diinkubasi pada inkubator suhu  $30^\circ\text{C}$ . Kultur PDA miring diamati kepadatan sporanya setiap hari berturut-turut selama satu minggu. Pengamatan dilakukan dengan menambahkan 9 mL akuades steril pada tabung kultur. Spora dikerik menggunakan jarum inokulum hingga merata. Suspensi spora yang didapat dipindahkan secara aseptis pada tabung steril dan dihomogenkan. Sebanyak 1 ml suspensi spora ditetaskan pada bidang hitung *haemocytometer* dan dihitung dengan bantuan mikroskop. Spora yang dihitung adalah spora yang ada pada kotak sedang *haemocytometer*. Penghitungan dilakukan sebanyak lima kali ulangan. Selanjutnya, jumlah spora/ml sampel ditentukan dengan persamaan berikut:

$$S = \frac{n}{L(0.2 \text{ mm}^2) \times t(0.1 \text{ mm})10^{-1}} \times 10^3$$

Keterangan: S= Jumlah spora/ml; n = Rerata jumlah spora pada bidang hitung; L= Luas bidang hitung ( $0.2 \text{ mm}^2$ ); t= kedalaman bidang hitung (0.1); d= Faktor pengenceran ( $10^{-1}$ )

### 3.3.2.2 Persiapan Substrat Keratin

Bulu ayam pada penelitian ini, akan digunakan sebagai sumber protein dalam pembuatan media keratin. Bulu ayam dan itik yang diambil dari limbah peternakan dicuci dengan air. Kemudian dikeringkan pada suhu 60° C selama satu malam. Penghilangan lipid pada bulu dilakukan dengan cara dicuci dengan kloroform : methanol (1:1 v/v) selama 1 jam dan selanjutnya dikeringkan kembali pada suhu 60° C dan dilakukan penepungan dengan blender. Tepung Bulu ayam dibagi menjadi 3 macam yaitu bagian rachis (TBA-1), barbules (TBA-2), dan campuran dari kedua bagian bulu (TBA-3).

### 3.3.2.3 Fermentasi Tepung Bulu Ayam

Pada proses *Solid State Fermentation* (SSF), sebanyak 0.4 g tepung bulu ayam dicampurkan dengan 40 g dedak padi didalam labu Erlenmeyer 125 ml dan disterilisasi menggunakan autoklaf. Dedak padi tersebut berisi 50 g tepung dedak padi yang dilarutkan dalam 30 ml larutan 0.9%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.1 mol L<sup>-1</sup> HCl. Sebanyak 10<sup>9</sup> spora dalam 10 ml aquades steril diinokulasi pada media dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 7 hari. Untuk perlakuan kontrol fermentasi, tidak digunakan 0.4 g tepung bulu ayam melainkan diganti dengan 0.4 g tepung dedak padi, sehingga total dedak padi yang digunakan dalam pembuatan kontrol adalah 40,4 g.

Ekstraksi produk fermentasi terlarut dilakukan dengan menambahkan 100 ml buffer asetat 200 mM (pH 4.2) pada SSF. Campuran tersebut selanjutnya dishaker selama 1 jam pada putaran 200 rpm dengan suhu ruang. Selanjutnya dilakukan pemisahan residu padat dari larutan enzim ekstrak kasar dengan cara filtrasi menggunakan kertas saring dan dilanjutkan dengan sentrifugasi 8000 rpm 10 menit.

### 3.3.3 Analisis Kandungan Protein Terlarut Tepung Bulu Ayam

Enzim ekstrak kasar yang didapatkan dari hasil fermentasi selanjutnya dilakukan uji kadar protein terlarut. Konsentrasi protein terlarut pada supernatant dihitung berdasarkan metode Bradford (Bradford, 1976), dengan menggunakan Bovine Serum Albumin (BSA) sebagai standar. Standar BSA dibuat dengan melarutkan 0.01 g BSA dalam 10 ml akuades, sehingga didapatkan larutan stok BSA dengan konsentrasi 1000  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Selanjutnya dilakukan seri pengenceran untuk mendapatkan konsentrasi BSA 0%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100% dan 120%. Berdasarkan nilai absorbansi yang didapatkan akan dibuat kurva regresi linier yang menunjukkan hubungan antara konsentrasi dengan nilai absorbansi larutan sampel.

Sebanyak 100 ml ekzim ekstrak kasar dan BSA pada tiap konsentrasi, masing-masing diambil 100  $\mu\text{l}$  dan ditambahkan 900  $\mu\text{l}$  reagent Bradford dan diinkubasi suhu ruang selama 10 menit. Kadar protein tersebut diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm.

### 3.3.4 Optimasi Waktu Produksi Enzim

Waktu produksi enzim yang optimum pada tepung bulu ayam ditentukan melalui fermentasi *A. niger* pada TBA secara *Solid State Fermentation* (SSF) dengan waktu inkubasi berbeda. Medium fermentasi (3.3.2.3) yang telah disterilisasi, selanjutnya diinokulasi dengan  $10^9$  spora yang dilarutkan dalam 10 ml akuades steril dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 0, 2, 4, 6, 8, 10 hari. Hasil fermentasi kemudian diekstraksi untuk mendapatkan enzim ekstrak kasar dan dilanjutkan uji aktivitas enzim keratinase (Walter, 1984). Inkubasi enzim ekstrak kasar terhadap substrat keratin (TBA) diinkubasi selama 7 jam.



### 3.3.5 Optimasi Lama Inkubasi Uji Aktivitas Keratinase

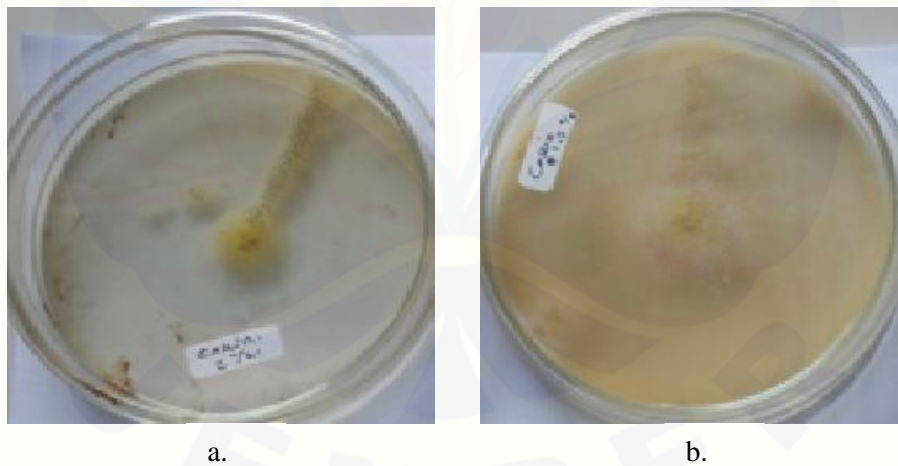
Waktu optimum aktivitas enzim keratinase terhadap substrat keratin (TBA) sesuai metode walter (Walter, 1984) menggunakan 1% tepung bulu ayam yang dilarutkan dalam Tris/HCl (50 mM, pH 8) sebagai substrat. Sebanyak 200 $\mu$ l enzim ekstrak kasar yang di reaksikan dengan 800  $\mu$ l 0,5% w/v substrat keratin. Selanjutnya diinkubasi selama 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 dan 8 jam pada suhu 37°C. Kemudian ditambahkan *Trichloroacetic acid* (TCA 5%) 500  $\mu$ l dan dicampur pada suhu 37 °C selama 30 menit.

Setelah penambahan TCA tersebut dilanjutkan dengan sentrifugasi pada 8000 rpm selama 10 menit. 1000  $\mu$ l supernatan yang dihasilkan kemudian ditambahkan dengan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1000  $\mu$ l dan 200  $\mu$ l reagen follin yang sebelumnya dilarutkan dengan akuades (1 : 2). Kemudian di inkubasi selama 30 menit pada suhu 37 °C. Setelah sentrifugasi 8000 rpm selama 10 menit, diukur absorbansinya pada  $\lambda$  660 nm. Selanjutnya dibuat kurva standar tyrosin untuk mendapatkan regresi linier yang menunjukkan hubungan antara konsentrasi dengan nilai absorbansi larutan sampel dan akan digunakan sebagai standar penentuan aktivitas enzim. Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai sejumlah enzim yang membebaskan 1  $\mu$ mol tyrosine dalam waktu reaksi 1 menit.

## BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Skrining Kapang Keratinolitik Secara Semikuantitatif

Dari hasil skrining yang telah dilakukan pada masing-masing konsentrasi penambahan kasein pada medium, ditemukan adanya aktivitas keratinolitik oleh *A. niger*. Pertumbuhan kapang pada medium (Gambar 4.1) merupakan salah satu indikator adanya sifat keratinolitik disamping pembentukan zona bening oleh kapang. *A. niger* menunjukkan adanya aktivitas keratinase dengan membentuk indeks aktivitas sebesar 1 yaitu memiliki diameter zona bening yang sama dengan koloni. *A. niger* menunjukkan pertumbuhan koloni terbesar pada medium yang mengandung kasein 1.5%.



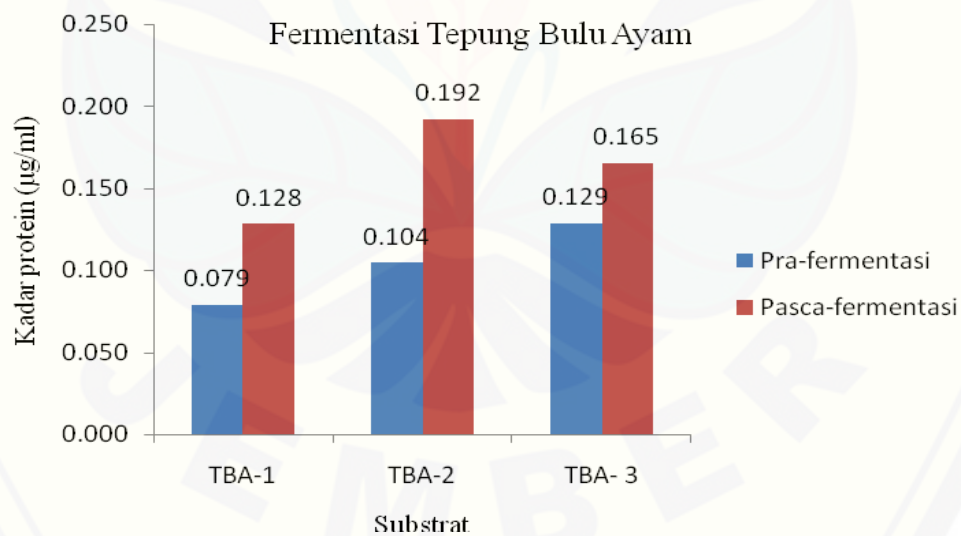
Gambar 4.1. Skrining *A.niger* pada medium a) KSA 2%, b) KSA 1.5%

Menurut field (2015), substrat kasein mengandung  $\pm 5.7\%$  asam amino aromatik tirosin dan digunakan untuk skrining keratinolitik pada bakteri keratinolitik mutan strain *Bacillus subtilis* (Cai *et al.*, 2008). Adanya pertumbuhan *A.niger* pada

medium yang mengandung kadar kasein tinggi, diindikasikan bahwa *A. niger* tersebut memiliki kemampuan untuk mendegradasi substrat keratin dengan cara melepaskan asam amino aromatik berupa tirosin ke lingkungan. Selanjutnya, *A. niger* dilakukan uji kuantitatif untuk mengetahui aktivitas optimum enzim keratinase.

#### 4.2 Produksi Enzim Keratinase

Pada penelitian ini digunakan beberapa jenis tepung bulu ayam yang digunakan dalam produksi enzim. Penggolongan jenis TBA diambil dari setiap bagian bulu ayam yang dilakukan proses penepungan. Beberapa diantaranya yang dilakukan penepungan adalah bagian rachis, barbule, dan campuran dari kedua bagian bulu tersebut. Produksi enzim dengan fermentasi secara *Solid State Fermentation* (SSF), menunjukkan kadar protein terlarut berbeda – beda pada setiap TBA dan dapat dilihat dalam Tabel 4.1 berikut.



Gambar 4.2. Kadar protein terlarut Pra-fermentasi dan Pasca Fermentasi TBA oleh *A.niger*

Perbedaan kadar protein tersebut (Gambar 4.2), disebabkan karena adanya perbedaan struktur penyusun bagian bulu. Menurut Reddy (2007) dalam hasil penelitiannya melaporkan bahwa barbules memiliki struktur menyerupai sarang lebah sehingga barbules memiliki kepadatan yang rendah dan berbeda dengan rachis yang memiliki sifat lebih tebal dan kaku daripada barbules. Rachis juga memiliki lebih banyak protein kristaline daripada barbules, sehingga sangat memungkinkan jika bagian rachis pada bulu ayam lebih sulit untuk dihidrolisis. Selanjutnya, TBA yang memiliki kadar protein tertinggi dilakukan uji coba lanjutan untuk mengetahui aktivitas keratinase optimum oleh *A. niger*.

Tabel 4.1 menunjukkan bahwa Tepung Bulu Ayam ke 2 (TBA-2) menunjukkan kenaikan kadar protein yang tertinggi pasca proses fermentasi oleh *A.niger*, yaitu mengalami kenaikan sebesar 79,6%.

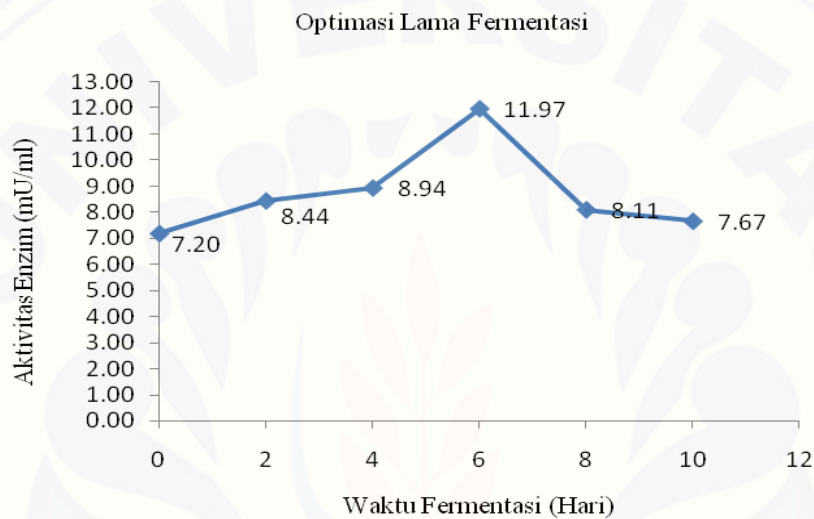
Tabel 4.1. Kenaikan kadar protein pasca proses fermentasi (SSF) pada berbagai tipe tepung bulu ayam (TBA)

Substrat	Kadar Protein Pra-Fermentasi (mg)	Kadar Protein Pasca Fermentasi (mg)	Kenaikan Kadar Protein (%)
TBA 1	0.079	0.128	53.55
<b>TBA 2</b>	<b>0.104</b>	<b>0.192</b>	<b>79.60</b>
TBA 3	0.129	0.165	26.97

### 4.3 Efek Perlakuan Waktu Inkubasi Produksi Enzim Keratinase

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa *A. niger* memiliki aktivitas optimum keratinase pada hari keenam inkubasi yaitu sebesar 11.97 mU/ml dengan pelepasan kadar tirosin sebesar 156.125 µg/ml (Gambar 4.4.b). Berdasarkan hasil penelitian Ugoh *et al.*, (2013) dan Mazotto *et al.*, (2013) , aktivitas keratinolitik enzim ekstrak

kasar *A. niger* memiliki aktivitas maksimum pada hari ketujuh yaitu sekitar 14.56 Ku (Keratinase unit) (Ugoh *et al*, 2013) dan 127.7 U/ml (Mazotto *et al.*, 2013). Dari hasil penelitian ini, didapatkan waktu inkubasi fermentasi optimum di hari keenam, dimungkinkan pada hari tersebut *A.niger* telah mencapai fase pertumbuhan eksponensial.



Gambar 4.3. Kurva Optimasi lama waktu fermentasi *A. niger* terhadap substrat keratin

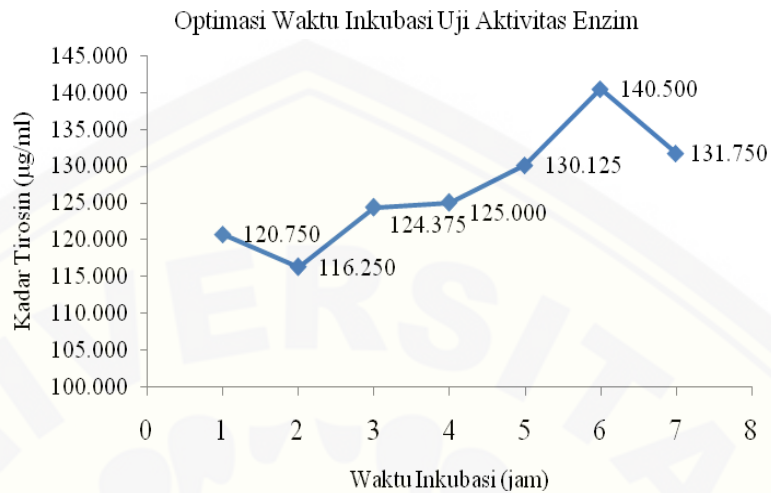
Produksi enzim keratinase oleh *A. niger* menunjukkan adanya peningkatan kadar tirosin pada substrat keratin pasca fermentasi (SSF) yaitu dimulai pada fermentasi hari ke 2 dengan adanya peningkatan kadar tirosin sebesar 17.31% dan aktivitas enzim sebesar 8.44 mU/ml (Gambar 4.3). Dari data grafik tersebut mengindikasikan bahwa hari ke 0 sampai hari ke 4 merupakan fase lag atau fase adaptasi *A. niger* pada substrat. Sedangkan fase log atau eksponensial dimulai pada rentangan waktu fermentasi hari ke 4 sampai hari ke 6. Fermentasi hari ke 6 tersebut merupakan waktu yang paling optimum dalam produksi enzim keratinase dengan kenaikan kadar tirosin sebesar 66.31% dan aktivitas enzim keratinase sebesar 11.97

mU/ml. Peningkatan aktivitas enzim keratinase tersebut disebabkan adanya penambahan tepung dedak padi pada medium produksi enzim keratinase. Menurut Chitturi dan Lakshmi (2015), penambahan sumber karbon seperti tepung dedak padi akan menyebabkan peningkatan produksi enzim keratinase.

Setelah mencapai produksi optimum keratinase produksi tyrosin menurun yang mengindikasikan turunnya aktivitas keratinase pada fermentasi hari ke 8 sampai hari ke 10. Penurunan aktivitas keratinase tersebut dimungkinkan karena berkurangnya kandungan nutrisi sumber karbon tambahan (tepung dedak padi) pada medium. Menurut Kaur *et al.*, (2001), kemampuan tepung dedak padi dalam mendukung produksi enzim keratinase dikarenakan adanya kandungan karbohidrat yang tinggi, protein, iron, zink, manganese, magnesium, asam pantothemic, riboflavin, thiamin, vitamin A, C, B6, B12, E dan fosfor yang mampu menginduksi peningkatan produksi enzim. Semakin menurunnya kandungan nutrisi pada tepung dedak padi akan menyebabkan faktor penginduksi terhadap proses produksi enzim akan berkurang pula, sehingga akan terjadi penurunan aktivitas enzim.

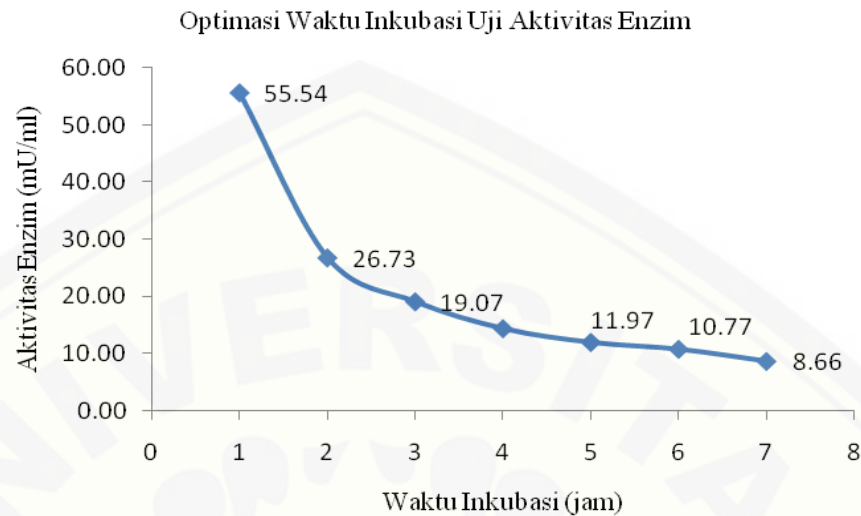
#### **4.4 Efek Perlakuan Lama Inkubasi Uji Aktivitas Enzim**

Uji aktivitas keratinase secara kuantitatif bertujuan untuk mengetahui tingkat aktivitas keratinase dengan kondisi tanpa adanya sel. Kemampuan enzim keratinase dalam menghidrolisis substrat keratin (TBA), dapat diketahui dengan mengukur kadar tirosin yang dihasilkan dari proses hidrolisis. Penggunaan standar tirosin dalam pengukuran aktivitas enzim keratinase didasarkan atas hasil penelitian Yamamura *et al.*, (2002) , melaporkan bahwa penambahan substrat keratin pada enzim ekstrak kasar hasil fermentasi substrat keratin ditemukan adanya asam amino yang dibebaskan dari hasil hidrolisis berupa phenylalanine, tirosin dan valin. Semakin besar substrat keratin yang terhidrolisis, maka semakin besar pula kadar tirosin yang dihasilkan (Gambar 4.4).



Gambar 4.4. Jumlah pelepasan kadar tirosin pada optimasi perlakuan lama waktu - inkubasi uji aktivitas enzim keratinase

Hasil uji aktivitas enzim keratinase berdasarkan lama waktu inkubasi pada saat uji aktivitas enzim, ditunjukkan pada gambar 4.5. Dari hasil pengukuran aktivitas enzim keratinase tersebut, enzim ekstrak kasar mulai memasuki proses hidrolisis pada waktu inkubasi satu jam yaitu dengan aktivitas enzim sebesar 55.54 mU/ml dengan kadar tirosin yang dilepaskan oleh enzim sebesar 120.750 µg/ml. Inkubasi selama 1 jam tersebut merupakan waktu optimum aktivitas enzim keratinase dalam mendegradasi substrat tepung bulu ayam, dikarenakan enzim ekstrak kasar terus mengalami penurunan aktivitas enzim sampai dengan lama inkubasi selama 7 jam yaitu dengan aktivitas enzim sebesar 8.66 mU/ml dan kadar tirosin yang dilepaskan ± 131.750 µg/ml. Hasil tersebut menyimpulkan bahwa supernatan (enzim ekstrak kasar) yang dihasilkan oleh *A. niger* dari proses fermentasi SSF mampu menghidrolisis substrat keratin (TBA) dengan waktu optimum inkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C dalam proses uji aktivitas.



Gambar 4.5. Kurva aktivitas enzim keratinase ekstrak kasar pada perlakuan lama waktu inkubasi uji aktivitas enzim keratinase

Penurunan kadar tirosin yang dilepaskan oleh enzim setelah jam ke 6, dimungkinkan karena terjadinya perubahan struktur enzim karena pengaruh lingkungan, sehingga stabilitas enzim berkurang karena perubahan konformasi. Menurut Wojciech (2010), enzim merupakan protein yang sensitif terhadap berbagai paparan lingkungan seperti suhu, cahaya, dan bahan kimia yang berinteraksi dengan enzim. Berbagai faktor tersebut akan memberikan efek kerusakan yang berbanding lurus dengan lamanya interaksi dengan enzim. Semakin lama paparan yang terjadi pada enzim akan menyebabkan perubahan struktur enzim, sehingga akan mengakibatkan enzim menjadi rusak dan berdampak pada menurunnya aktivitas enzim. Peningkatan hasil aktivitas enzim berdasarkan efek terhadap perlakuan lama waktu inkubasi uji aktivitas enzim keratinase juga terjadi pada enzim keratinase yang dihasilkan oleh *Bacillus pumilus* FH9 dari hasil fermentasi bulu ayam. Peningkatan enzim keratinase terjadi secara berkala mulai dari inkubasi 15 menit sampai 90 menit, dengan waktu optimum inkubasi selama 90 menit (El-Refai, 2005).



## BAB 5. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

*Aspergillus niger* mampu meningkatkan kadar protein terlarut substrat keratin (TBA-2) sebesar 79,6 % pada saat pasca fermentasi secara SSF. *Aspergillus niger* memiliki waktu produksi enzim yang optimum pada proses fermentasi (SSF) selama enam hari, yaitu dengan pelepasan kadar tirosin sebesar 156.125 µg/ml dan aktivitas enzim sebesar 11.97 mU/ml. Enzim ekstrak kasar yang dihasilkan dari proses fermentasi, juga memiliki aktivitas enzim yang optimum pada lama inkubasi 1 jam pada proses uji kuantitatif aktivitas enzim keratinase, yaitu dengan aktivitas enzim sebesar 55.54 mU/ml dengan pelepasan kadar tirosin sebesar 120.75 µg/ml.

### 5.2 Saran

Penelitian lebih lanjut dapat dilakukan uji karakterisasi enzim keratinase yang dihasilkan dari proses fermentasi padat (SSF) ini, seperti optimasi terhadap suhu, pH, pengaruh ion logam dan stabilitas enzim keratinase tersebut. Selain itu, perlu dilakukan pula uji aktivitas enzim spesifik untuk mengetahui enzim apa saja yang berperan dalam menghidrolisis substrat bulu ayam.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Adiati, U., W. Puastuti dan W. Mathius. 2004. Peluang Pemanfaatan Tepung Bulu Ayam Sebagai Bahan Pakan Ternak Ruminansia. *Wartazoa*. Vol. **14** (1) : 39–44.
- Apple J. K., C. B. Boger, D. C. Brown, C. V. Maxwell, K. G. Friesen, W. J. Roberts, and Z. B. Johnson. 2003. Effect of Feather Meal on Live Animal Performance and Carcass Quality and Composition of Growing-Finishing Swine. *J Anim Sci*. Vol. **81**: 172-181.
- Babu, K.R. and Satyanarayana, T. 1996. Production of Bacterial Enzymes by *Solid State Fermentation*. *Journal of Scientific and Industrial Research*. Vol. **55**: 464-467.
- Bernal, C., Cairo, J., and Coello, N. 2006. Purification and Characterization of a Novel Exocellular Keratinase From *Kocuria rosea*. *Enzyme Microb Technol*. Vol. **38**:49–546.
- Bhargav, S., B. P. Panda, M. Ali, and S. Javed. 2008. Solid-State Fermentation: An Overview, *Chem. Biochem. Eng. Q*. Vol. **22** (1) 49–70.
- Bockle, B., and Muller, R. 1997. Reduction of Disulfide Bonds by *Streptomyces pactum* During Growth on Chicken Feathers. *Appl Environ Microbiol*. Vol. **63**: 790–792.
- Badan Pusat Statistik. 2013. "Populasi Ternak 2013". <http://www.bps.go.id> (Diakses pada tanggal 04 Mei 2014).
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-dye binding; *Anal. Biochem*. Vol. **72**: 284-254.

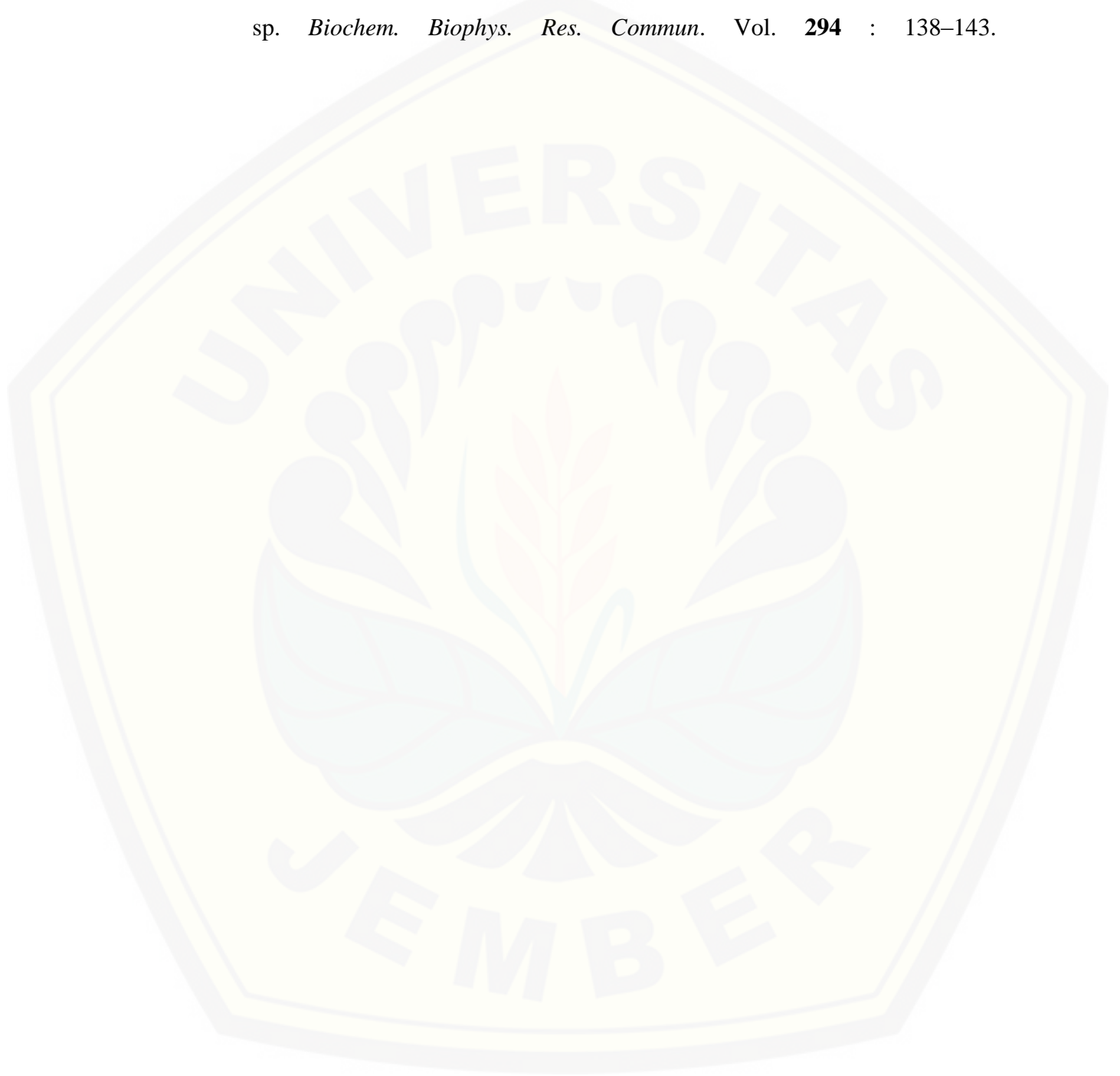
- Bressollier, P., Letourneau, F., Urdaci, M., and Verneuil B. 1999. Purification and Characterization of a Keratinolytic Serine Proteinase from *Streptomyces albidoflavus*. *Appl Environ Microbiol* . Vol. **65** (6): 2570-2576.
- Cai, C.G., Chen, J.S., Qi, J.J., YinY, Zheng XD, 2008. Purification and characterization of keratinase from a new *Bacillus subtilis* strain. *J. Zhejiang Univ. Sci. B*. Vol. **9** (9) : 713–720.
- Chitturi, C. M. K., & Lakshmi, V. V. 2015. Fermentative production of keratinase using solid agricultural wastes. *International Journal of Scientific & Engineering Research*. Vol. **6**(2), 50–55.
- El-Refai, H.A., AbdelNaby, M.A., Gaballa, A., El-Araby, M.H., and Abdel Fattah, A.F., 2005. Improvement of the newly isolated *Bacillus pumilus* FH9 keratinolytic activity. *Process Biochem*. Vol. **40**(7):2325-2332.
- Fardiaz, S. 1989. *Mikrobiologi Pangan*. PAU. Bogor: IPB dengan LSI IPR.
- Friedrich, A.B., and Antrakian G. 1996. Keratin Degradation by *Ferbidobacterium pennavorans*, a Novel Thermophilic Anaerobic Species of the Order *Thermotogales*. *Appl Environ Microbiol* . Vol. **62** : 2875 – 2882.
- Gradisar, H., Kern, S., and Friedrich, J. 2000. Keratinase of *Doratomyces micros pores*. *Appl Microbiol Biotechnol*. Vol. **53** : 196 – 200.
- Gumulya Y. 2004. *Optimasi Produksi Enzim Keratinase dari Bakteri Termofilik L-23 Asal Sulawesi Utara*. Skripsi. Bogor: Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
- Hardjo , S.S., N.S. Indrasti dan B. Tajuddin. 1989. *Pemanfaatan Limbah Industri Pertanian*. Bogor: Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi, IPB.
- Haurowitz F. 1984. *Biochemistry* .An Introductory Text Book. New York : J. Wiley & Son.
- Kaur. S., R.M. Vohra, M. Kapoor, Q.K. Beg and G.S. Hoondal. 2001. Enhanced production and characterization of a highly thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. P-2; *World J.Microbiol. Biotechnol*. Vol. **17**: 125-129.

- Kim, J.M., Lim, W.J. and Suh, H.J. 2001. "Feather Degrading *Bacillus sp.*, from Poultry Waste". *Process Biochemistry*. Vol. **37**: 287-291.
- Kock Jeffrey W. 2006. *Physical and Mechanical Properties of Chicken Feather Materials*: Thesis. Georgia : Georgia Institute of Technology.
- Kumar J dan Kushwaha R.K.S. 2014. Screening of Fungi Efficient in Feather Degradation and Keratinase Production. *Applied Science Research*. .Vol. **6** (1) : 73 – 78.
- Kunert J. 2000. Physiology of Keratinophilic Fungi . *Revista Iberoamericana de Micologia. Bilbao*: 66-85.
- Letourneau F, Saussotte V, Bressolier P, Brandland P, Verneuil B. 1998. Keratinolytic Activity of *Streptomyces sp.*S.K<sub>1-02</sub> : A new isolated strain. *Lett Appl Microb* . Vol. **26** : 77 – 80.
- Lin, X., Inglis, G., Yanke, L. and Cheng, K.J. 1999. Selection and Characterization of Feather-Degrading Bacteria from Canola Meal Compost. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Vol. **23**: 149-153.
- Lopes F.C, Lucas A.D.S., Deise M. T., Daniel J.D., Renata V., Jamile Q.P., Ana Paula F.C., Adriano B. 2011. Research Article : Production of Proteolytic Enzymes by a Keratin-Degrading *Aspergillus niger*. *Enzyme Research*. Volume 2011, Article ID 487093, 9 pages.
- Lucas, F. S., Broennimann, O., Febbraro, I., & Heeb, P. 2003. High Diversity Among Feather-Degrading Bacteria from a Dry Meadow Soil. *Microbial Ecology*. Vol. **45**: 282–290.
- Malloch, D. 1997. *Moulds Isolation, Cultivation, Identification, Mycology*. Departement of Botany. Toronto: University of Toronto.
- Matsubara, H., and Feder, J. 1971. Other Bacterial, Molds and Yeast Proteases. Di dalam Boyer PD, editor. *The Enzymes, Hidrolysis: Peptide Bonds*. New York: Academic Pr.

- Mazotto A.M, Sonia C, Monica C.T.D, Alane B.V.2013. Degradation of Feather Waste by *Aspergillus niger* keratinases : Comparison of Submerge and Solid State Fermentation. *Int. Biodeterioration & Biodegradation*. Vol. **85** : 189 – 195.
- Moore GRP., Martelli SM., Gandolfo C., and Sobral PJ. Do A., Laurindo JB. 2006. Influence of the glycerol concentration on some physical properties of feather keratin films. *Food Hydrocolloids*. Vol. **20**: 975-982.
- Nam, G. W., D. W. Lee, H. S. Lee, N. J. Lee, and B. C. Kim. 2002. Native-Feather Degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW-1, a Newly Isolated Keratinase-Producing Thermophilic Anaerobe. *Arch Microbiol*. Vol. **178** (6): 538-547.
- Odetallah N.H., Wang J.J., Garlich J.D., Shih J.C. 2003. Keratinase in Starter Diets Improves Growth of Broiler Chicks. *Poultry Sci*. Vol. **82** (4): 664-670.
- Onifade, A.A., Al-Sane, N.A., Al-Musallam, A.A., dan Al-Zarban, S. 1998. A Review : Potentials for Biotechnological Applications of Keratin-Degrading Microorganism and Their Enzymes for Nutritional Improvement of Feathers and Other Keratins as Livestock Feed Resources. *Biores Technol*. Vol. **66** : 1 – 11.
- Parry, D.A.D., North, A.C.T. 1998. Hard  $\alpha$ -Keratin Intermediate Filament Chains : Substructure of the N- and C-terminal Domains and the Predicted Structure and Function of the C-terminal Domains of Type I and Type II Chains. *J Struct Biol*. Vol. **122**:67-75.
- Protein Polymer Technology (PPT). 2002. Keratin Structure. <http://www.ppti.com/technology/tech.html> (15 Mei 2014).
- Reddy Narendra and Yiqi Yang. 2007. Structure and Properties of Chicken Feather Barbs as Natural Protein Fibers. *Journal of Polymers and the Environment*. Vol. 15 : 81–87.

- Riffel, A., Lucas F., Heeb P., dan Brandelli A. 2003. Characterization of new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin. *Arch Microbiol.* Vol. **179** (4): 258-265.
- Riessen, S., and Antranikian, G. 2001, Isolation of *Thermoanaerobacter keratinophilus* sp. Nov, a novel thermophilic, anaerobic bacterium with keratinolytic activity. *Extremophiles.* Vol. **5** : 399 - 408
- Suh, H.J., Lee, H. K . 2001. Characterization of a keratinolytic serine protease from *Bacillus subtilis* KS-1. *Protein Chem.* Vol. **20**:165–169.
- Tiwarly E, Gupta R .2012. Rapid Conversion of Chicken Feather to Feather Meal Using Dimeric Keratinase from *Bacillus licheniformis* ER-15. *J Bioprocess Biotech .* Vol. **2**:123.
- Thys R.C.S., Lucas F.S., Riffel A., Heeb P., Brandelli A. 2004. Characterization of a protease of a feather-degrading *Microbacterium* sp. *Lett in Appl Microbiol.* Vol. **39**: 181-186.
- Ugoh, Sylvanus, C., and Ijigbade, B. 2013. Production And Characterisation Of Keratinase By Fungi Isolated From Soil Samples At Gwagwalada, FCT – Abuja, Nigeria. *Nature and Science.* Vol. 11(10)
- Walter, H.E., 1984. *Proteinases (protein as substrates). Method with haemoglobin, casein and azocoll as substrate.* In: Bergmeyer, J., Grassl, M. (Eds.), *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd ed. Weinheim: Verlag Chemie, pp. 270–278.
- West,E.S. and W.R. Todd. 1961. *Text book of Biochemistry.* 3thEd. The McMillan Company, New York
- Werlang P.O., Brandelli A. 2005. Characterization of a novel feather-degrading *Bacillus* sp. strain. *Appl Biochem Biotechnol.* Vol. **120** (1): 71-80.
- Wojciech Łaba and Anna Rodziewicz. 2010. Keratinolytic Potential of Feather - Degrading *Bacillus polymyxa* and *Bacillus cereus*. *Polish J. of Environ. Stud.* Vol. **19** (2): 371-378.

Yamamura, S., Morita, Y., Hasan, Q., Yokoyama, K., and Tamiya, E. 2002. Keratin degradation: a cooperative action of two enzymes from *Stenotrophomonas* sp. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Vol. **294** : 138–143.



## LAMPIRAN

### Lampiran A. Gambar Tepung Bulu Ayam



Keterangan :

- a. TBA – 1 : Rachis
- b. TBA – 2 : Barbules
- c. TBA – 3 : Rachis + Barbules

### Lampiran B. Komposisi Bahan

#### B.1 Media KSA 2% (20 ml)

Komposisi	Jumlah
Pepton	0.02 gr
Bakto agar	0.4 gr
Kasein	2 gr
Akuades	20 ml

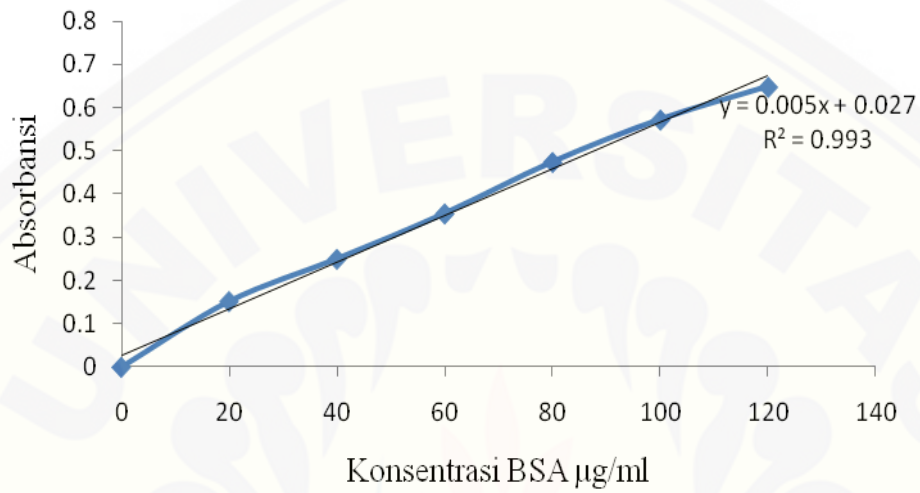
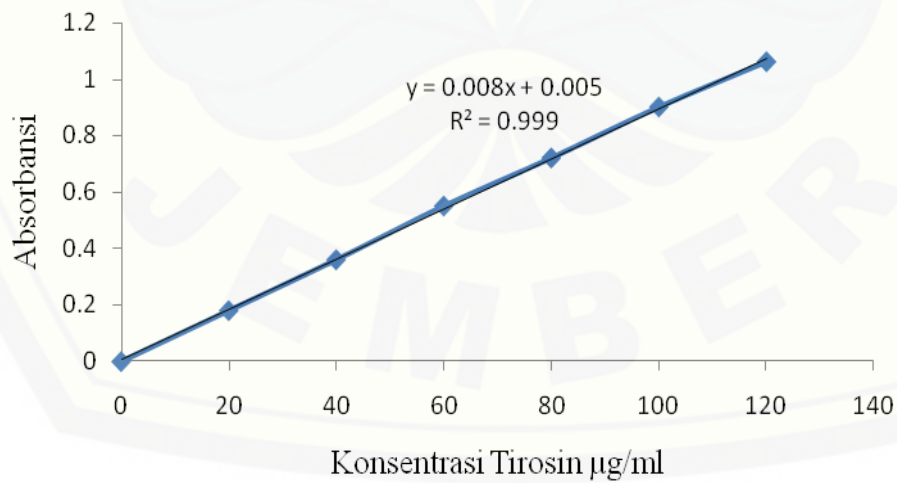


**B.2 Media KSA 1.5% (20 ml)**

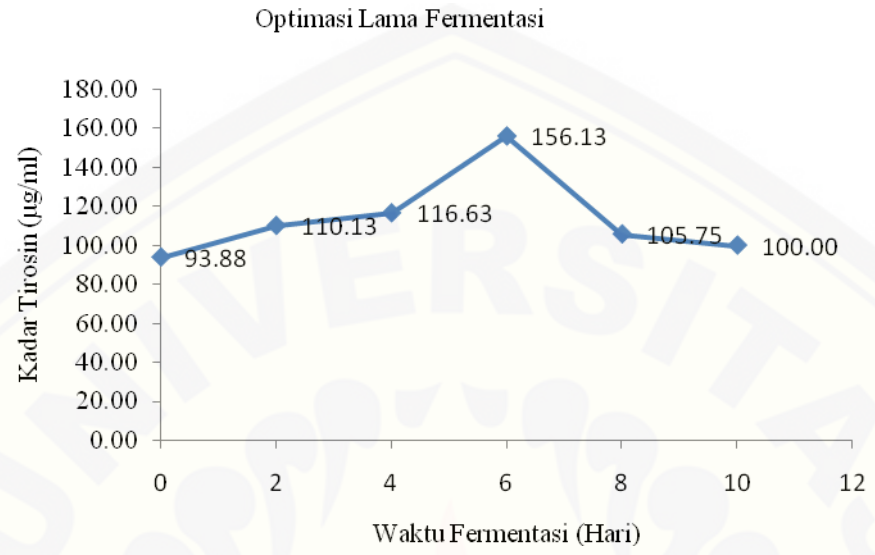
Komposisi	Jumlah
Pepton	0.02 gr
Bakto agar	0.4 gr
Kasein	1.5 gr
Skim milk	0.5 gr
Akuades	20 ml

**Lampiran C. Tabel Kepadatan Spora *A. niger***

Inkubasi Hari	Jumlah spora
Ke – 1	$8,7 \times 10^6$
Ke – 2	$5,2 \times 10^8$
Ke – 3	$28,8 \times 10^8$
Ke – 4	$51,2 \times 10^8$
Ke – 5	$35,04 \times 10^8$
Ke – 6	$52,60 \times 10^8$
Ke – 7	$8 \times 10^9$

**Lampiran D.****D.1. Grafik Standar Protein****Standard Bradford****D.2. Grafik Standar Tirosin****Standar Tirosin**

**D.3. Grafik Kadar Tirosin (Produksi Enzim)**





KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
FAKULTAS MATEMATIKA DAL ILMU PENGETAHUAN  
ALAM  
JURUSAN BIOLOGI  
Jalan Kalimantan III No. 23 FMIPA, Universitas Jember, Jawa  
Timur 68123

---

### SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI

Kami dari pihak MIPA Universitas Jember memberitahukan bahwa isolat *Aspergillus niger* yang dibeli dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas MIPA Universitas Jember oleh

Nama : Rizki Bagus Setyabudi

Nim : 101810401038

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA)

berasal dari stok murni bibit *Aspergillus niger*. Isolat *Aspergillus niger* tersebut diperoleh dari Universitas Gajah Mada, Yogyakarta. Bibit murni tersebut selanjutnya oleh pihak Laboratorium Mikrobiologi FMIPA dibiakkan.

Demikian surat identifikasi ini kami buat

Jember, 5 Mei 2015

Ka. Laboratorium

Drs. Rudju Winarsa., M.Kes  
NIP 196008161989021001