



**OPTIMASI PRODUKSI DAN PURIFIKASI PARSIAL ENZIM SELULASE
ISOLAT VM9 (*Pestalotiopsis* sp.) PADA PROSES FERMENTASI PADAT
KULIT BUAH KOPI**

SKRIPSI

Oleh:

**Siti Erlinkha
NIM 141810401014**

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2018**



**OPTIMASI PRODUKSI DAN PURIFIKASI PARSIAL ENZIM SELULASE
ISOLAT VM9 (*Pestalotiopsis* sp.) PADA PROSES FERMENTASI PADAT
KULIT BUAH KOPI**

SKRIPSI

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

Oleh:

**Siti Erlinkha
NIM 141810401014**

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2018**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk :

1. orang tua saya, Ibu Hamidah dan Bapak Hamdan serta seluruh keluarga yang turut mendo'akan, memberikan dukungan serta memberikan segenap kasih dan sayangnya untuk saya;
2. guru-guru mulai dari Taman Kanak-kanak hingga Sekolah Menengah Atas, serta dosen-dosen di Perguruan Tinggi yang telah membimbing dan memberikan ilmunya yang bermanfaat selama ini;
3. Almamater tercinta Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember;
4. Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

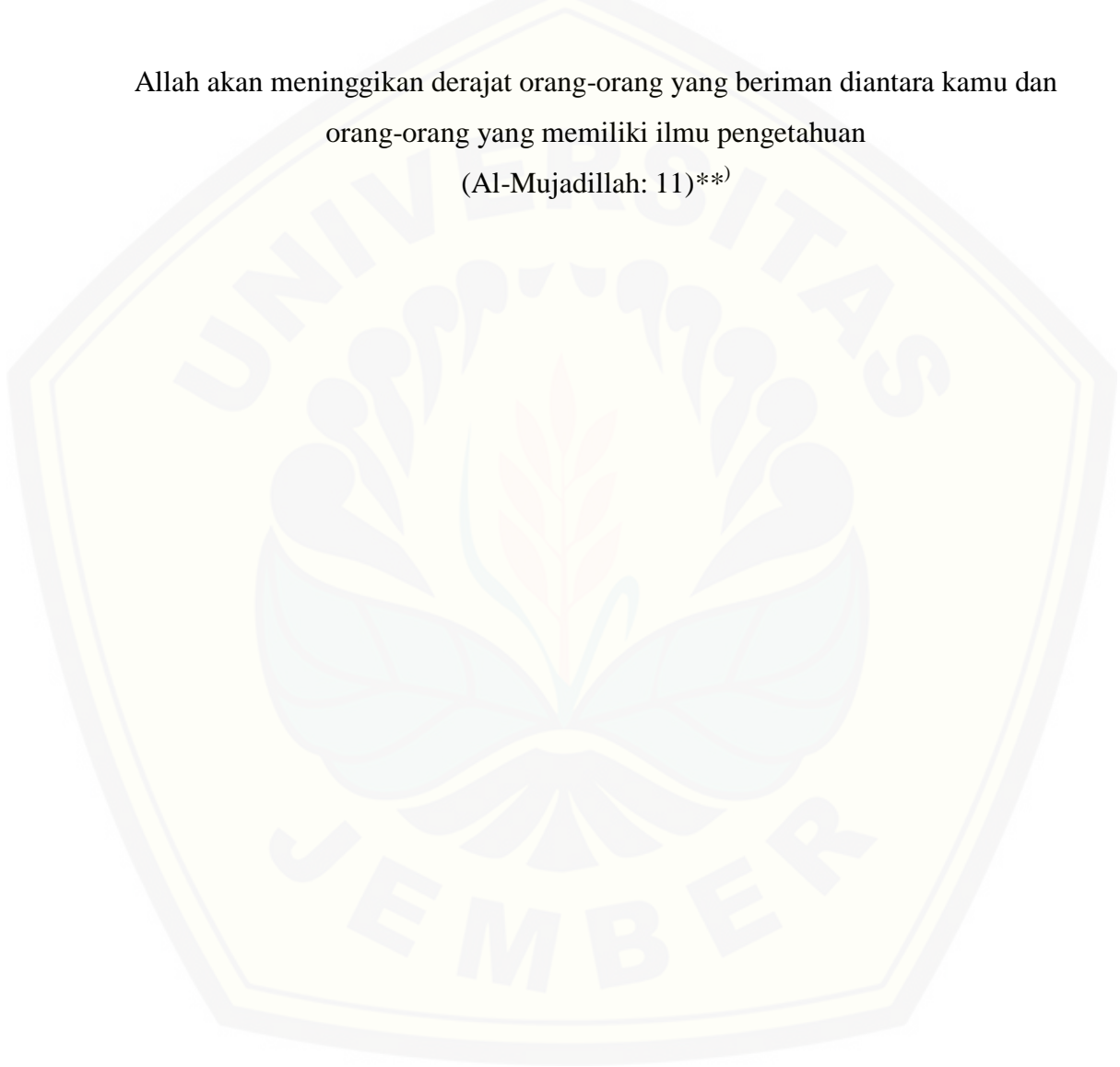
MOTTO

Barang siapa keluar untuk mencari ilmu maka dia berada di jalan Allah

(HR. Turmudzi)*)

Allah akan meninggikan derajat orang-orang yang beriman diantara kamu dan orang-orang yang memiliki ilmu pengetahuan

(Al-Mujadillah: 11)**)



*) Hadist Riwayat Turmudzi

**) Departemen Agama Republik Indonesia. 2007. *Al-Qur'an dan Terjemahnya Special for Woman*. Bogor: Syaamil Al-Qur'an.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Siti Erlinkha

NIM : 141810401014

menyatakan dengan sebenarnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Optimasi Produksi dan Purifikasi Parsial Enzim Selulase Isolat VM9 (*Pestalotiopsis* sp.) Pada Proses Fermentasi Padat Kulit Buah Kopi” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institut mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia menerima sanksi akademik jika di kemudian hari pernyataan yang saya tulis ini terbukti tidak benar.

Jember, 20 Juli 2018

Yang menyatakan,

Siti Erlinkha

NIM 141810401014

SKRIPSI

**OPTIMASI PRODUKSI DAN PURIFIKASI PARSIAL ENZIM SELULASE
ISOLAT VM9 (*Pestalotiopsis* sp.) PADA PROSES FERMENTASI PADAT
KULIT BUAH KOPI**

Oleh:

Siti Erlinkha
NIM 141810401014

Pembimbing

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

Dosen Pembimbing Anggota : Drs. Siswanto M.Si.

PENGESAHAN

Skripsi yang berjudul “Optimasi Produksi dan Purifikasi Parsial Enzim Selulase Isolat VM9 (*Pestalotiopsis* sp.) Pada Proses Fermentasi Padat Kulit Buah Kopi” 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,

Anggota I,

Dr. Kahar Muzakhar, S.Si.
NIP 196805031994011001

Drs. Siswanto, M.Si.
NIP 196012161993021001

Anggota II,

Anggota III,

Drs. Rudju Winarsa, M.Kes.
NIP 196008161989021001

Eva Tyas Utami, S.Si., M.Si
NIP 197306012000032001

Mengesahkan
Dekan,

Drs. Sujito Ph.D.
NIP 196102041987111001

RINGKASAN

Optimasi Produksi dan Purifikasi Parsial Enzim Selulase Isolat VM9 (*Pestalotiopsis* sp.) Pada Proses Fermentasi Padat Kulit Buah Kopi; Siti Erlinkha, 141810401014; 2018; 52 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Kopi merupakan komoditas hasil perkebunan yang memiliki prospek perkembangan yang baik di Indonesia bahkan di pasar dunia. Hal ini terlihat dari semakin meningkatnya volume dan nilai ekspor kopi Indonesia. Indonesia merupakan Negara terbesar ketiga penghasil kopi setelah Vietnam dan Brazil. Produksi kopi pada tahun 2013 mencapai 298.000 ton dengan luas lahan perkebunan 478.000 Ha. Perkembangan produksi kopi tersebut juga diiringi dengan meningkatnya hasil samping berupa kulit buah kopi yang dihasilkan pada proses pengolahan kopi. Selama ini kulit buah kopi tidak dimanfaatkan secara optimal. Kulit buah kopi mempunyai kandungan komponen organik yakni selulosa dan lignin yang tinggi, dengan nilai berturut-turut yaitu 63% dan 17% dari berat kering.

Kandungan selulosa yang tinggi, membuat kulit buah kopi dapat dijadikan sebagai substrat dalam produksi enzim selulase melalui fermentasi dengan bantuan kapang. Kapang VM9 mampu menghasilkan enzim selulase dan merupakan isolat yang memiliki indeks selulolitik yang tinggi. Penelitian ini menggunakan VM9 sebagai agen mikroorganisme selulolitik yang berpotensi untuk mendegradasi selulosa dari kulit buah kopi. Optimasi produksi dilakukan untuk mengetahui waktu optimum *Pestalotiopsis* sp. dalam memproduksi enzim ekstrak kasar secara optimal, selanjutnya dilakukan pemurnian crude enzim dengan cara purifikasi parsial untuk memperoleh enzim spesifik yang diinginkan sehingga dapat diketahui tingkat aktivitas enzim.

Produksi crude enzim selulase dari isolat VM9 (*Pestalotiopsis* sp.) yang dilanjutkan dengan purifikasi parsial. Purifikasi parsial enzim selulase merupakan tahapan untuk melakukan pemurnian crude enzim selulase guna mengetahui

aktivitas enzim dalam proses fermentasi padat kulit buah kopi. Purifikasi parsial memiliki beberapa tahapan, yakni presipitasi ammonium sulfat, dialisis dan *DEAE Cellulose Chromatography*. Hasil dari purifikasi parsial menggunakan *DEAE Cellulose*, diuji aktivitas enzimnya menggunakan metode *Somogyi-Nelson* pada absorbansi 500 nm dan diuji kuantitas proteinnya pada absorbansi 280 nm.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat *Pestalotiopsis* sp. (VM9) memiliki aktivitas enzim yang optimum dalam media fermentasi padat kulit buah kopi pada inkubasi hari ke-6 dengan jumlah gula reduksi sebesar 146,15 $\mu\text{g/ml}$. Pada tahap purifikasi parsial, aktivitas enzim selulase tertinggi sebesar 85,385 $\mu\text{g/ml}$ dengan absorbansi protein pada panjang gelombang 280 nm sebesar 0,388.

PRAKATA

Puji Syukur kehadiran Allah SWT. atas segala rahmat dan Karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Optimasi Produksi dan Purifikasi Parsial Enzim Selulase Isolat VM9 Pada Proses Fermentasi Padat Kulit Buah Kopi”. Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan program strata satu (S1) pada Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

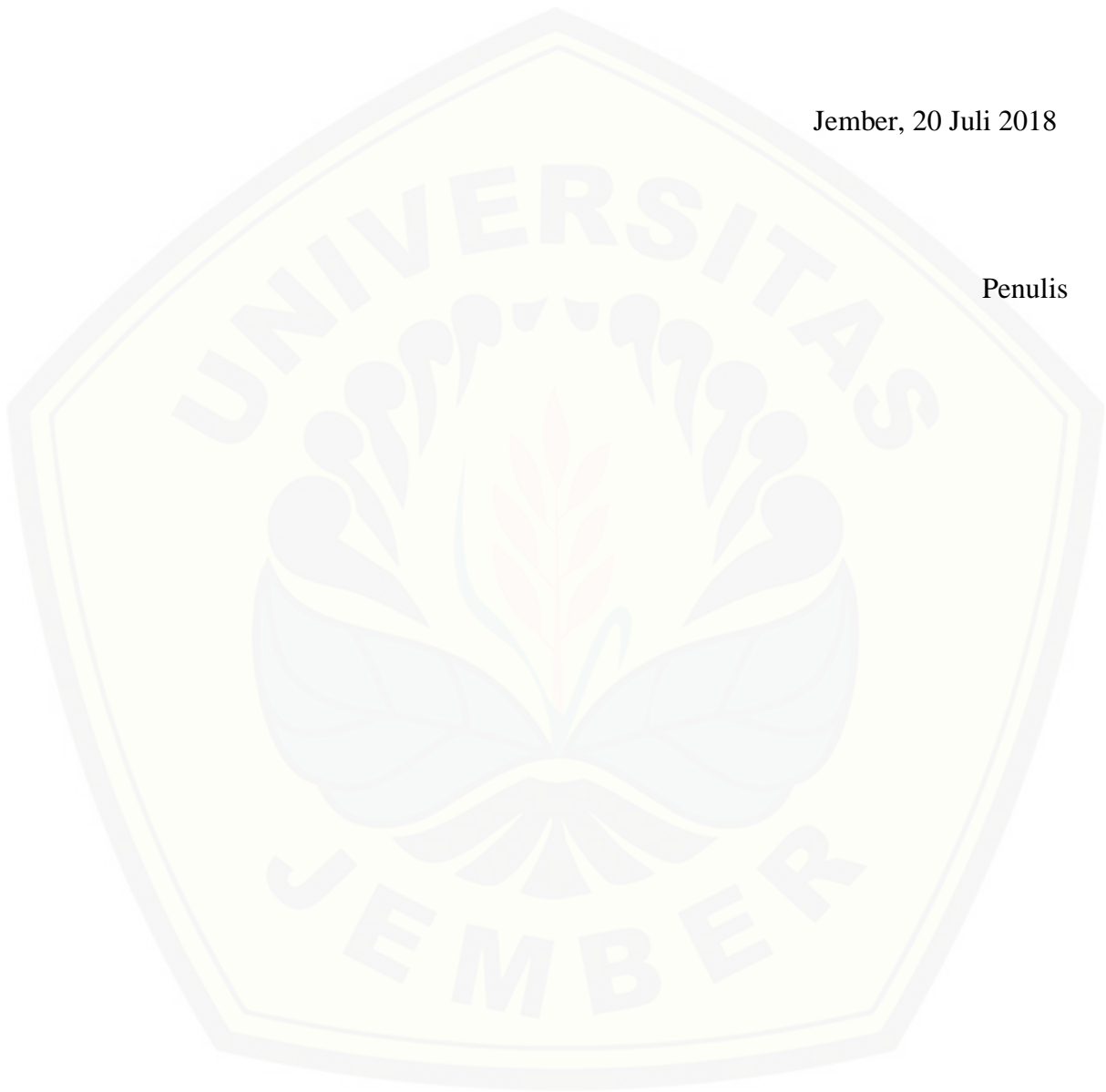
Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, sehingga penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. dosen pembimbing utama Dr. Kahar Muzakhar, S.Si, dosen pembimbing anggota Drs. Siswanto, M.Si, dosen penguji saya Drs. Rudju Winarsa, M.Kes dan Eva Tyas Utami, S.Si., M.Si yang telah memberikan ilmu, saran, kritik dan bimbingan yang sangat bermanfaat;
2. Dr. Retno Wimbaningrum, M.Si selaku dosen pembimbing akademik yang telah membimbing selama penulis menjadi mahasiswa;
3. Ir. Endang Soesetyaningsih, selaku teknisi Laboratorium Mikrobiologi yang banyak membantu persiapan alat dan bahan penulis selama penelitian;
4. ibu, bapak dan seluruh keluarga yang telah memberikan banyak do’a, motivasi, materi, dan dukungan yang tiada henti;
5. sahabat-sahabat terdekat saya, Tirtha Dwi Purnamasari, Desi Lutfiyani, Dwi Ayu Nur Isadatul Ilmiah, Putri Yulia Pramesti dan sahabat-sahabat Bivalvia lainnya yang tidak bisa saya sebut satu persatu terhadap dukungan, doa dan semangat untuk saya;
6. seluruh personil laboratorium enzim (Mikrobiologi), Syafiq Ubaidillah, Nur Putri Rahardiyanti, Fianda Deviyastuti, Zunairoh Nidaan Khofiyah, Khilia Nisa’ dan Dwi Nur Hanifah Aprilia yang telah banyak mendukung dan berkontribusi pada proses penyelesaian skripsi saya;
7. semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis memohon maaf apabila terdapat kesalahan penulisan. Penulis juga menerima kritik dan saran yang membangun dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi kita semua.

Jember, 20 Juli 2018

Penulis



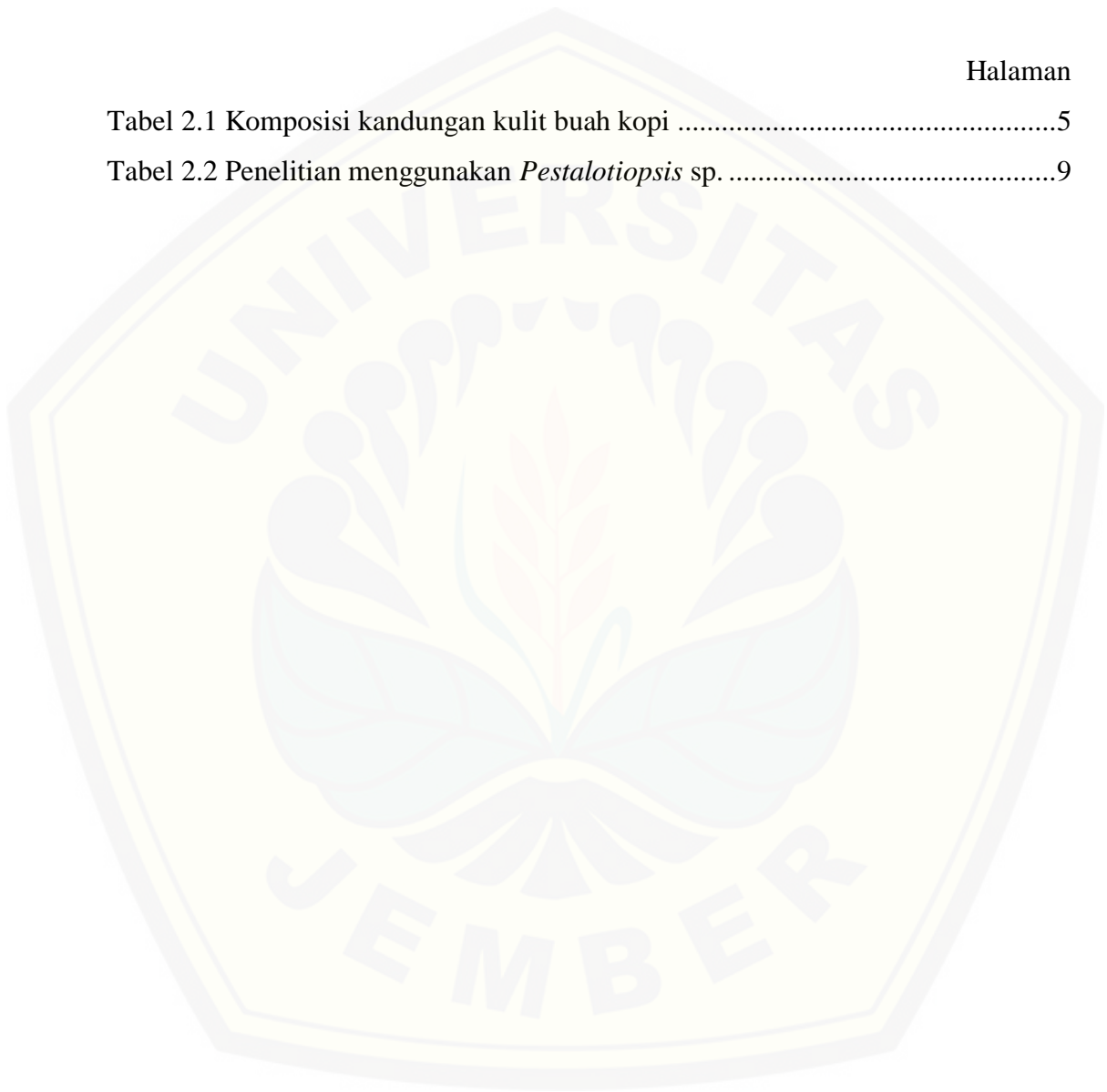
DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN.....	v
HALAMAN PEMBIMBING.....	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI.....	xii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Batasan Masalah.....	2
1.4 Tujuan.....	2
1.5 Manfaat Penelitian	2
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Kulit Buah Kopi Robusta (<i>Coffea canephora</i> L.).....	4
2.2 Hidrolisis komponen Selulosa.....	5
2.3 Kapang <i>Pestalotiopsis</i> sp.	7
2.4 Fermentasi Padat	10
2.5 Purifikasi Parsial Enzim	10
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	14
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	14
3.2 Alat dan Bahan	14
3.3 Rancangan Penelitian.....	15

3.4	Prosedur Penelitian	16
3.4.1	Persiapan Penelitian.....	16
3.4.2	Produksi Enzim Ekstrak Kasar (Crude Enzim).....	18
3.4.3	Purifikasi Parsial Enzim Ekstrak Kasar	20
BAB 4.	HASIL DAN PEMBAHASAN	22
4.1	Kurva Kepadatan Spora <i>Pestalotiopsis</i> sp. (VM9)	22
4.2	Optimasi Produksi Crude Enzim.....	23
4.3	Purifikasi Parsial	25
BAB 5.	KESIMPULAN DAN SARAN	27
5.1	Kesimpulan.....	27
5.2	Saran	27
	DAFTAR PUSTAKA	28
	LAMPIRAN.....	33

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Komposisi kandungan kulit buah kopi	5
Tabel 2.2 Penelitian menggunakan <i>Pestalotiopsis</i> sp.	9



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Morfologi dan anatomi buah kopi.....	5
Gambar 2.2 Struktur selulosa.....	6
Gambar 2.3 Morfologi dan anatomi <i>Pestalotiopsis</i> sp.....	8
Gambar 2.4 Preparasi dan tahap pemurnian protein	11
Gambar 3.1 Alur penelitian.....	15
Gambar 4.1 Kurva kepadatan spora <i>Pestalotiopsis</i> sp. VM9.....	22
Gambar 4.2 Kurva produksi crude enzim <i>Pestalotiopsis</i> sp. (VM9).....	24
Gambar 4.3 Kurva purifikasi parsial enzim	26

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Komposisi Media	33
A.1 Komposisi Media Potato Dekstrosa Agar (PDA).....	33
B. Komposisi Reagen <i>Somogyi-Nelson</i>	34
B.1 Komposisi Reagen Somogyi.....	34
B.2 Komposisi Reagen Nelson.....	34
C. Kurva Standar Glukosa.....	35
C.1 Tabel Standar Glukosa.....	35
C.2 Kurva Standar Glukosa.....	35
D. Tabel Hasil Presipitasi Ammonium Sulfat.....	35
E. Kurva Gradien Konsentrasi NaCl.....	36

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kopi merupakan komoditas hasil perkebunan yang memiliki prospek perkembangan yang baik di Indonesia bahkan di pasar dunia. Hal ini terlihat dari semakin meningkatnya volume dan nilai ekspor kopi Indonesia. Indonesia merupakan negara terbesar ke-3 penghasil kopi setelah Vietnam dan Brazil. Produksi kopi pada tahun 2013 mencapai 298.000 ton dengan luas lahan perkebunan 478.000 Ha (BPS, 2014). Indonesia menyumbang 6,8% dari produksi kopi dunia serta menjadi negara pengeksport kopi terbesar ke-4 dengan pangsa pasar 11% di dunia (Raharjo, 2013).

Perkembangan produksi kopi tersebut juga diiringi dengan meningkatnya hasil samping berupa kulit buah kopi yang dihasilkan dari proses pengolahan kopi. Selama ini kulit buah kopi tidak dimanfaatkan secara optimal (Ratnaningsih *et al.*, 2013). Kulit buah kopi mempunyai kandungan komponen organik yakni selulosa dan lignin yang tinggi, dengan nilai berturut-turut yaitu 63% dan 17% dari berat kering (Corro *et al.*, 2013). Selulosa di alam berbentuk kristal bersama lignin dan hemiselulosa, tidak mudah larut dalam air dan selulosa sulit mengalami degradasi (Sonia dan Kusnadi, 2015). Selulosa hanya dapat dirombak menjadi glukosa dengan enzim selulase (Buselli *et al.*, 2007).

Kandungan selulosa yang tinggi, membuat kulit buah kopi dapat dijadikan sebagai substrat dalam produksi enzim selulase melalui fermentasi dengan bantuan kapang. Kapang VM9 (Vermikomposting Middle 9) mampu menghasilkan enzim selulase dan merupakan isolat yang memiliki indeks selulolitik yang tinggi yakni sebesar 1,17 pada media CMC dan 1,66 pada media TKKS serta aktivitas anzim pada media CMC sebesar 27,50 $\mu\text{g/ml}$ dan pada media TKKS sebesar 19,51 $\mu\text{g/ml}$ (Yuniar, 2013). Isolat VM9 memiliki kemampuan menghidrolisis substrat TKKS sebesar 0,36%. Berdasarkan penelitian tersebut diketahui bahwa VM9 merupakan genus *Pestalotiopsis*. Namun dalam

penelitian tersebut tidak dilakukan purifikasi parsial untuk uji aktivitas enzim yang telah dihasilkan.

Penelitian ini menggunakan VM9 sebagai agen mikroorganisme selulolitik yang berpotensi untuk mendegradasi selulosa dari kulit buah kopi. Optimasi produksi dilakukan untuk mengetahui waktu optimum *Pestalotiopsis* sp. dalam memproduksi enzim ekstrak kasar (crude enzim) secara optimal, selanjutnya dilakukan pemurnian crude enzim dengan cara purifikasi parsial untuk memperoleh enzim spesifik yang diinginkan sehingga dapat diketahui tingkat aktivitas enzim. Produksi crude enzim selulase dari isolat VM9 (*Pestalotiopsis* sp.) yang dilanjutkan dengan purifikasi parsial merupakan tahapan untuk melakukan pemurnian crude enzim selulase guna mengetahui aktivitas enzim dalam proses fermentasi padat kulit buah kopi.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas, rumusan masalah yang diambil adalah bagaimana optimasi produksi dan tingkat aktivitas enzim selulase isolat VM9 dari tahapan purifikasi parsial?

1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah dari penelitian ini adalah aktivitas enzim yang dihasilkan dari purifikasi parsial.

1.4 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui optimasi produksi crude enzim isolat VM9 pada substrat kulit buah kopi dan tingkat aktivitasnya melalui purifikasi parsial menggunakan substrat CMC.

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan dari penelitian ini adalah mengetahui pemanfaatan mikroorganisme untuk proses fermentasi kulit buah kopi dalam

menghasilkan enzim selulolitik dan menambah nilai guna limbah perkebunan dengan menggunakan isolat VM9.



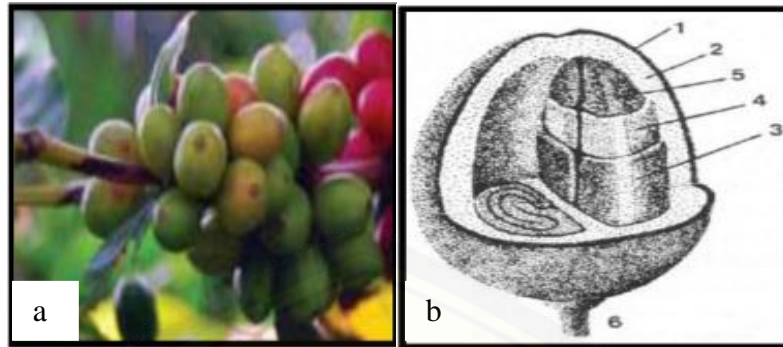
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kulit Buah Kopi Robusta (*Coffea canephora* L.).

Indonesia merupakan negara terbesar ketiga penghasil kopi setelah Vietnam dan Brazil. Luas perkebunan kopi di Indonesia mencapai 478.000 Ha dengan produksi kopi pada tahun 2013 mencapai 298.000 ton (Direktorat Jenderal Perkebunan, 2014). Selain itu Indonesia juga menjadi negara pengeksport kopi terbesar keempat dengan pangsa pasar 11% di dunia (Raharjo, 2013). Kulit buah kopi merupakan limbah hasil pengolahan buah kopi yang memiliki proporsi 40 – 45% (Simanihuruk dan Sirait, 2010). Industri pengolahan kopi dilakukan dengan memisahkan biji kopi dan membuang bagian kulitnya (Corro *et al.*, 2013).

Kulit buah kopi yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit buah kopi Robusta (*Coffea canephora* L.). Kopi Robusta mendominasi seluruh perkebunan kopi di Indonesia. Sebanyak 245.051 ton kopi Robusta diekspor Indonesia ke mancanegara dalam kurun waktu 1997-2001 (Wijaya, 2003). *International Coffee Organization* (2012) menyebutkan bahwa peningkatan rata-rata konsumsi kopi dunia sejak tahun 2010 sebesar 2,5% per tahun.

Secara anatomi, buah kopi terdiri atas 2 bagian yaitu biji dan kulit buah (pericarp). Kulit buah terdiri atas lapisan kulit luar (exocarp), daging buah (mesocarp), kulit tanduk dan kulit ari (Muchtadi *et al.*, 2010). Struktur morfologi dan anatomi buah kopi dapat dilihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1 Morfologi dan anatomi buah kopi (a). Morfologi buah kopi (Sumber: Arief *et al.*, 2011) dan (b). Anatomi buah kopi (1. Kulit luar, 2. Daging buah, 3. Kulit tanduk, 4. Kulit ari, 5. Biji) (Sumber: Natawidjaya, 2012).

Braham dan Bressani (1979) mengatakan bahwa buah kopi terdiri atas 55,4% biji kopi, 28,7% kulit buah kering, 11,8% kulit cangkang dan sisanya sebesar 4,15% berupa lendir. Berikut ini merupakan tabel komposisi kandungan kulit buah kopi, dapat dilihat pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Komposisi kandungan kulit buah kopi

Komposisi	Kandungan (%)
Selulosa	63%
Lignin	17%
Protein	11,5%
Hemiselulosa	2,3%
Tanin	1,8-8,56%
Pektin	6,5%
Kafein	1,3%
Gula reduksi	12,4%
Gula non reduksi	2%

(Sumber: Corro *et al.*, 2013).

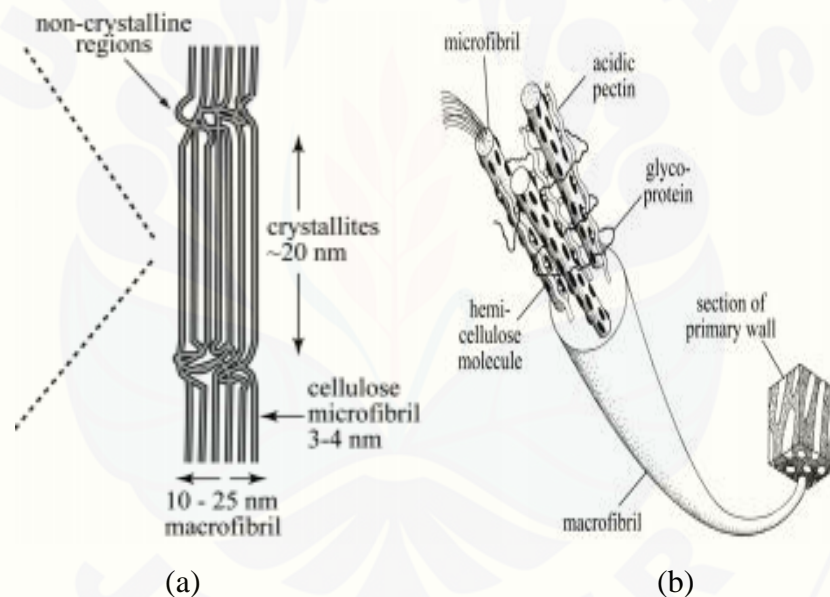
Kulit buah kopi memiliki kandungan selulosa yang tinggi. Bahan organik yang mengandung selulosa merupakan substrat bagi pertumbuhan bakteri selulolitik (Gupta dan Turner, 2017). Hal tersebut menjadikan limbah kulit kopi berpotensi sebagai substrat bagi mikroorganisme selulolitik untuk menghasilkan enzim selulase (Nurfitriani dan Handayanto, 2017).

2.2 Hidrolisis Komponen Selulosa

Selulosa adalah komponen utama yang terdapat pada dinding sel tumbuhan. Selulosa merupakan polimer dari glukosa dan mengandung

polisakarida tidak bercabang β (1-4) D-glukosa yang disintesis pada membran plasma oleh *Cellulose Synthase Complex* (CSC) (Simon *et al.*, 1988). Selulosa di alam jarang terdapat dalam bentuk murni, tetapi membentuk kristal bersama lignin dan hemiselulosa, berbentuk kristal dan tidak mudah larut dalam air dan selulosa sulit mengalami degradasi (Maleki *et al.*, 2016). Selulosa dapat dihidrolisis menjadi unit glukosa sehingga dapat digunakan sebagai bahan baku fermentasi dengan substrat tertentu (Shiratory *et al.*, 2006).

Selulosa terdiri atas cincin panjang polisakarida, terbentuk dari mikrofibril dengan region kristalin dan non kristalin region yang lebih pendek. Mikrofibril bergabung membentuk makrofibril dengan diameter kira-kira 10-25nm dengan hemiselulosa dan pektin atau lignin.



Gambar 2.2 Struktur Selulosa (a) Mikrofibril selulosa, (b) Makrofibril selulosa (Sumber: Ali dan Gibson, 2012).

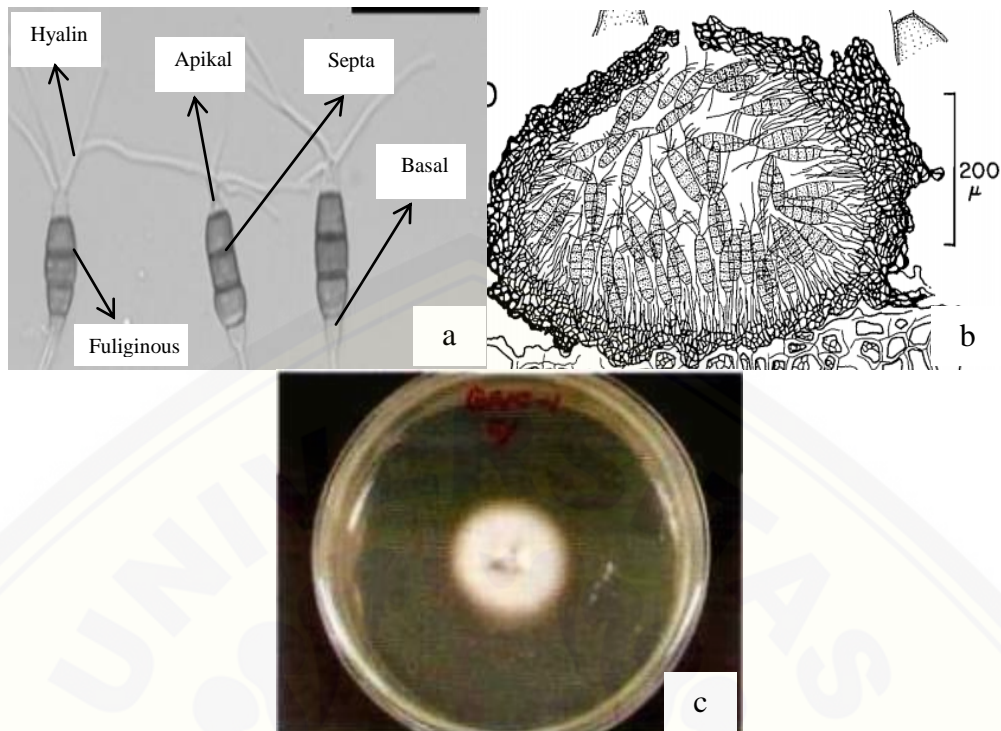
Enzim selulase merupakan enzim yang dapat menghidrolisis ikatan β (1-4) D-glukosa pada selulosa (Simon *et al.*, 1988). Adanya selulosa dalam suatu substrat dapat menginduksi terbentuknya enzim selulase oleh mikroorganisme selulolitik. Mikroorganisme selulolitik yang dapat digunakan untuk menghasilkan enzim selulase misalnya kapang (Ul-haq *et al.*, 2005). Enzim selulase dapat diproduksi oleh mikroorganisme dan tergantung pada komposisi medium pertumbuhan, pH dan temperatur (Devi dan Kumar, 2012).

Menurut Miyamoto (1997) selulase terdiri dari tiga komponen enzim yang penting yaitu endoglukanase, eksoglukanase dan β -glukosidase. Endoglukanase, memotong secara acak ikatan selulosa menjadi selooligosakarida. Enzim ini aktif menyerang pada bagian selulosa yang tersubstitusi seperti CMC. Eksoglukanase, menyerang ujung rantai selulosa non-pereduksi dan membebaskan selobiosa dari rantai selulosa. β -glukosidase, menghidrolisis selobiosa menjadi glukosa. Ketiga komponen enzim selulase tersebut bersinergi mengkonversikan selulosa menjadi glukosa.

Penelitian Nurfitriani dan Handayanto (2017) menunjukkan bahwa penambahan isolat mikroorganisme tertentu seperti kapang mampu menguraikan senyawa-senyawa organik pada substrat kulit kopi. Bahan organik yang mengandung selulosa merupakan substrat bagi pertumbuhan bakteri selulolitik (Gupta dan Turner, 2017).

2.3 Kapang *Pestalotiopsis* sp. dan Potensinya Dalam Menghasilkan Enzim

Genus *Pestalotiopsis* memiliki karakteristik morfologi yang khas pada konidia yang dimiliki. Konidia (spora aseksual) berbentuk fusiformis, terdiri atas 3-4 septa, *appendages* (hyalin) apikal berbentuk filiform bercabang atau tidak bercabang, *appendages* basal 4-9 μm timbul dari sel basal (Jeewon *et al.*, 2004). Konidiopor dengan hyalin, memanjang, bersifat hidrofilik, konidia terdiri atas 5 sel, sel median berwarna coklat (Sutton, 1969). Konidia memiliki panjang 25,12 – 32,12 μm dan lebar 5,6 – 7,88 μm . Koloni *Pestalotiopsis* sp. menunjukkan pigmentasi serupa, miselium berwarna putih dengan adanya zona hitam di bagian tengahnya yang menunjukkan adanya perkembangan konidia (Lazarotto *et al.*, 2014).



Gambar 2.3 Morfologi dan anatomi kapang *Pestalotiopsis* sp. (a) Konidia *Pestalotiopsis* sp. (Sumber: Watanabe *et al.*, 2010), (b) Konidium (Sumber: Sutton, 1969), (c) Makroskopis *Pestalotiopsis* sp. (Sumber: LIPI, 2008).

Klasifikasi taksonomi dari *Pestalotiopsis* sp. berdasarkan National Center for Biotechnology Information (NCBI) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Fungi
 Divisi : Ascomycota
 Kelas : Sordariomycetes
 Ordo : Xylariales
 Famili : Amphisphaeriaceae
 Genus : *Pestalotiopsis*
 Spesies : *Pestalotiopsis* sp. (NCBI, 2017).

Berdasarkan penelitian Yuniar (2013), *Pestalotiopsis* sp. diisolasi dari vermikomposting TKKS dan diberi kode VM9 (*Vermicomposting middle 9*) yang menunjukkan bahwa mikroorganisme ini ditemukan pada lapisan tengah dari proses vermikomposting sedangkan 9 merupakan urutan mikroorganisme yang ditemukan. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa *Pestalotiopsis* sp.

adalah salah satu dari lima isolat yang memiliki pola aktivitas selulolitik yang tinggi dalam menghidrolisis substrat TKKS pada CMC untuk menghasilkan gula reduksi. Gula reduksi yang dihasilkan dari *Pestalotiopsis* sp. (VM9) adalah sebesar 0,36%.

Kapang merupakan mikroorganisme penghasil enzim yang baik. Enzim berperan sebagai biokatalisator dalam mempercepat reaksi dalam sel sehingga memudahkan terpecahnya molekul kompleks menjadi molekul yang lebih sederhana (Meryandini *et al.*, 2009). Kapang *Pestalotiopsis* sp. merupakan mikroorganisme yang memiliki potensi dalam menghasilkan enzim tertentu. Hal tersebut dibuktikan dengan beberapa penelitian yang telah dilakukan, seperti dapat dilihat pada Tabel 2.2.

Tabel 2.2 Penelitian yang telah dilakukan dengan menggunakan *Pestalotiopsis* sp.

Referensi	Judul penelitian	Hasil penelitian
Rao, M., Thakur, N., Mithal, B., dan Manjunath, S. 1983. Production of Cellulose From <i>Pestalotiopsis versicolor</i> . <i>Biotechnology and Bioengineering</i> . Vol. 25.	Production of Cellulose From <i>Pestalotiopsis versicolor</i>	Sistem selulase dari <i>Pestalotiopsis versicolor</i> ditemukan kaya akan β -glukosidase.
Sena, A.R., Santos, A.C., Gouveia, M.J., Mello, M.R., Leite, T., Moreira, K., dan Assis, S. 2014. Production, Characterization and Application of a Thermostable Tnnase from <i>Pestalotiopsis guepinii</i> URM 7114. Original Scientific Paper, 54(4).	Production, Characterization and Application of a Thermostable Tannase from <i>Pestalotiopsis guepinii</i> URM 7114	<i>Pestalotiopsis guepinii</i> berpotensi dalam memproduksi enzyme selulase, pectinase, xylanase dan protease
Yanto, D.H., Tachibana, S. 2016. Utilization of kapok fiber as a natural sorbent in petroleum hydrocarbon biodegradation by <i>Pestalotiopsis</i> sp. <i>Journal of Lignocellulose Technology</i> . Vol.1.	Utilization of kapok fiber as a natural sorbent in petroleum hydrocarbon biodegradation by <i>Pestalotiopsis</i> sp.	<i>Pestalotiopsis</i> sp. memiliki aktivitas ligninoselulolitik pada medium kapok dalam menghasilkan <i>crude oil</i> .

2.4 Fermentasi Padat

Fermentasi padat merupakan proses fermentasi yang berlangsung dalam substrat tidak terlarut tetapi mengandung air yang cukup sekalipun tidak mengalir bebas. Fermentasi padat dapat digunakan untuk memproduksi enzim selulase. Terdapat beberapa faktor yang dapat mempengaruhi proses fermentasi padat seperti kadar air, pH dan waktu fermentasi (Idiawati *et al.*, 2014). Kadar air berpengaruh pada pertumbuhan mikroorganisme, biosintesis dan sekresi enzim. Pengaturan pH sangat penting agar mikroorganisme yang ditumbuhkan dapat menghasilkan produk yang optimal (Gandjar, 2006). Selain itu, waktu fermentasi juga mempengaruhi aktivitas mikroorganisme karena mikroorganisme mengalami beberapa fase pertumbuhan (Darwis *et al.*, 1995).

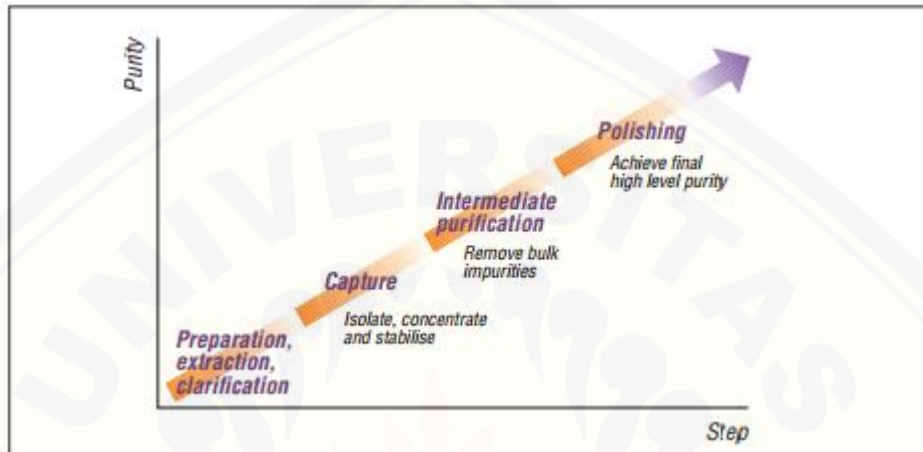
Fermentasi padat atau *Solid State Fermentation* (SSF) adalah metode biofisiologis yang sering dilakukan karena memiliki produktivitas yang tinggi dan karakteristik produk yang lebih baik daripada metode fermentasi dalam media cair. Kelebihan lain dari fermentasi padat bila dibandingkan dengan fermentasi dalam media cair adalah biaya yang diperlukan lebih rendah, air yang diperlukan jauh lebih sedikit dan media kultur lebih sederhana (Pandey, 2003). Selain itu, substrat pada fermentasi padat cukup menyediakan nutrisi yang diperlukan untuk pertumbuhan isolat (Orozco *et al.*, 2008).

2.5 Purifikasi Parsial Enzim

Pemurnian enzim adalah salah satu cara untuk memisahkan enzim dari jenis protein lain dan kontaminan. Tujuan yang ingin dicapai dalam pemurnian enzim adalah mengisolasi enzim spesifik dari enzim ekstrak kasar (*crude*) yang mengandung banyak komponen lain (Dewi, 2014). Purifikais parsial menghasilkan enzim spesifik yang diinginkan dan dapat diketahui aktivitasnya. Pemurnian enzim bertujuan untuk mendapatkan enzim yang murni dari pengotor dan dapat digunakan untuk keperluan medis, farmasi dan penelitian biokimia karena spesifitasnya yang tinggi (Lehninger, 1995). Keberhasilan proses pemurnian dengan metode purifikasi parsial dapat diketahui dari nilai aktivitas spesifik dan tingkat kemurnian yang tinggi (Siboro *et al.*, 2017).

Menurut Biotech (1999), purifikasi parsial terdiri dari 3 tahap yaitu :

1. *Capture*, bertujuan untuk mengisolasi, mengetahui konsentrasi dan menstabilkan sampel
2. *Intermediate purification*, bertujuan untuk menghilangkan kotoran
3. *Polishing*, mendapatkan tingkat kemurnian.



Gambar 2.4 Preparasi dan tahap pemurnian protein (Sumber : Biotech, 1999).

Tingkat kemurnian suatu enzim diketahui dari aktivitas spesifik enzim tersebut, semakin tinggi aktivitas spesifik suatu enzim maka enzim akan semakin murni (Scopes, 1994). Tiap metode pemurnian protein terdapat perbedaan dalam hal kapasitas daya pisah, kapasitas penampungan, kecepatan pemurnian serta pengendalian pemurnian. Berdasarkan keempat parameter tersebut, tidak semua proses pemurnian protein akan melewati tiga tahapan pemurnian (*capture*, *intermediate* dan *polishing*), tergantung pada metode pemurnian dan jenis sampel yang digunakan. Jenis sampel tertentu, kadang tidak dibutuhkan proses *polishing* karena enzim yang dihasilkan sudah murni pada tahap intermediet (Biotech, 1999).

Terdapat beberapa metode yang dapat digunakan untuk pemurnian protein. Metode tersebut adalah sebagai berikut:

1. Presipitasi

Presipitasi merupakan metode pengendapan dengan aplikasi konsentrasi garam bervariasi dengan penambahan garam amonium sulfat kedalam ekstrak kasar enzim disertai pengadukan pada suhu rendah. Garam yang ditambahkan

tergantung pada jenis enzim. Ammonium sulfat lebih sering digunakan karena kelarutannya yang tinggi (Janson, 2011).

Pengendapan protein dipengaruhi oleh konsentrasi garam ammonium sulfat yang digunakan sehingga mempengaruhi kekuatan ion dari penambahan garam amonium sulfat. Penggunaan konsentrasi ammonium sulfat yang semakin besar akan terjadi peningkatan muatan listrik di sekitar protein yang akan menarik molekul air dari koloid protein. Interaksi hidrofobik antar molekul protein pada kadar ionik tinggi akan menurunkan kelarutan protein. Peristiwa ini disebut “*salting out*”. Proses *Salting out* dapat digunakan untuk memisahkan protein dari komponen terlarut lainnya (Aulanni'am, 2005). Ammonium sulfat yang tersisa pada endapan enzim dipisahkan dengan proses dialisis (McKee dan McKee, 2004).

2. Kromatografi penukar ion (*Ion Exchange Chromatography*)

Prinsip pemurnian dengan menggunakan teknik kromatografi adalah adanya distribusi komponen-komponen dalam fase diam (*stationer*) dan fase gerak (*mobile*) berdasarkan perbedaan sifat fisik komponen yang dipisahkan dalam suatu sampel (Ardianingsih, 2009). Metode ini memisahkan molekul berdasarkan muatan ionnya. Molekul dibuat bermuatan agar dapat terikat pada media dalam kekuatan ion yang rendah dan dilepaskan dari media dengan menggunakan gradien garam. Molekul dengan muatan ion paling kecil akan elusi lebih dahulu dibandingkan dengan biomolekul yang memiliki muatan ion lebih besar (Harris dan Angel, 1989). Muatan ion yang lebih besar diperlukan larutan garam NaCl dengan konsentrasi semakin besar pula. Oleh karena itu, pada umumnya elusi dilakukan secara *linear gradient* (Meyer, 2004).

3. *DEAE Cellulose Chromatography*

Diethylaminoethyl (*DEAE*) cellulose adalah matriks penukar ion (*ion exchanger*) yang digunakan dalam kolom kromatografi untuk pemisahan dan pemurnian protein atau asam amino. Matriks merupakan turunan dari dietilaminoethanol (*DEAE*) yang dapat mengunci protein atau asam nukleat yang bermuatan untuk dapat berikatan dengan matriks (Peterson dan Sober, 1955). Protein yang terikat pada matriks akan dilepaskan dengan elusi NaCl

menggunakan gradien konsentrasi untuk mengubah muatan pada protein yang terikat (Janson, 2011).



BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada Bulan Januari 2018 sampai Juli 2018 di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember.

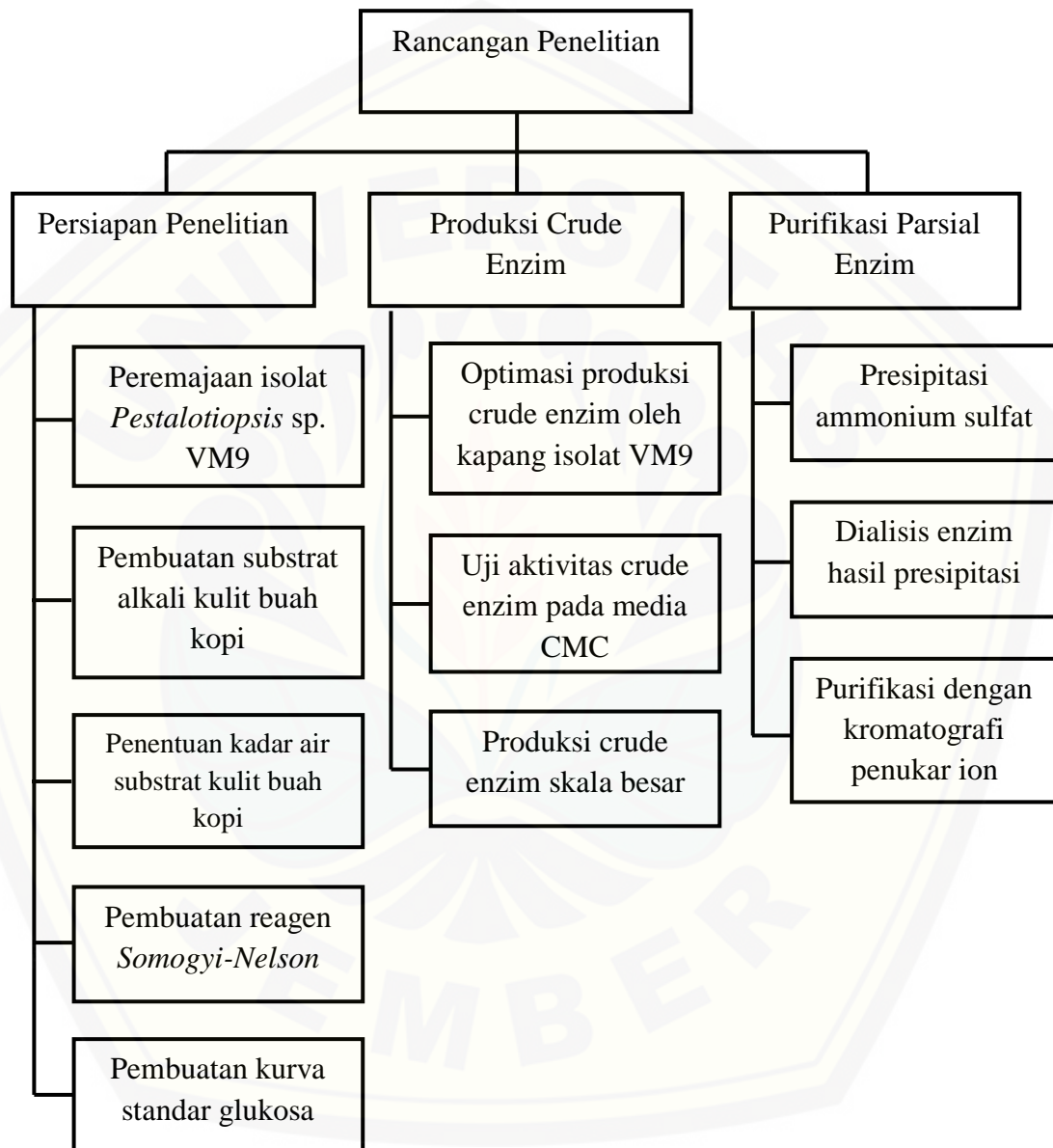
3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain autoklaf, laminar air flow, hemacytometer, magnetic stirer, kolom chromatography, neraca analitik, gelas ukur, gelas beker, inkubator, *hot plate*, tabung reaksi, rak tabung, labu erlenmeyer, jarum ose, spatula, pipet volume, pipet tetes, kolom dialisis spectrum 50 kDa.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain kulit buah kopi kering, isolat *Pestalotiopsis* sp. VM9, media *Potato Dextrose Agar* (PDA), media *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC), NaOH, CH₃COOH, akuades, alkohol 70%, natrium karbonat (Na₂CO₃), potassium sodium tartrate tetrahydrat (C₄H₄KNaO₄·4H₂O), sulfat pentahydrat (CuSO₄·5H₂O), natrium hydrogen carbonat (NaHCO₃), natrium sulfat, (NH₄)₆ Mo₇O₂₄·4H₂O, sulfuric acid (H₂SO₄), sodium arsenat (Na₃AsO₄·7H₂O), NaCl, natrium azide, buffer fosfat, amonium sulfat, matriks *DEAE*, kertas doorslag, alumunium foil, lampu bunsen, korek api, kapas dan tissue.

3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian dilakukan dengan beberapa tahapan, sebagaimana dapat dilihat pada Gambar 3.1



Gambar 3.1 Alur penelitian

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Persiapan Penelitian

a. Peremajaan isolat VM9 (*Pestalotiopsis* sp.)

Peremajaan isolat *Pestalotiopsis* sp. dilakukan pada 3 tabung reaksi berisi 5 mL media PDA miring. Media PDA terdiri dari 3 gram kentang, 0,15 gram dextrose, 0,25 gram agar dan aquades 25 ml. Sebanyak satu ose isolat dikulturkan pada media PDA miring dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 4x24 jam.

b. Penentuan Kadar Air Kulit Buah Kopi dalam substrat fermentasi padat

Penentuan kadar air dilakukan dengan cara memasukkan 5 gram kulit buah kopi yang telah dihaluskan ke dalam kantong teh kemudian direndam dalam aquades selama 30 menit. Selanjutnya kulit buah kopi dalam kantong teh digantung hingga airnya tidak menetes lalu ditimbang untuk mengetahui berat basahnya. Kulit buah kopi dalam kantong teh dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C selama 6 jam dan ditimbang. Kulit buah kopi dioven lagi pada suhu yang sama selama 6 jam dan ditimbang lagi hingga berat konstan untuk mengetahui berat keringnya. Selisih antara berat basah dan berat kering merupakan kadar air kulit buah kopi (Kurniawati, 2016).

c. Pembuatan Substrat Alkali Kulit Buah Kopi

Kulit buah kopi sebanyak 200 gram dilakukan delignifikasi menggunakan NaOH 2 M sebanyak 80 gram dan aquades 1 liter pada tabung erlenmeyer lalu dihomogenkan menggunakan magnetik stirer selama 24 jam. Suspensi disaring untuk memisahkan air dengan kulit buah kopi sehingga diperoleh filtrat air perasan pertama. Ampas kulit kopi sisa filtrat pertama ditambahkan 350 mL aquades lalu diperas kembali untuk mendapatkan filtrat kedua. Filtrat yang diperoleh diukur pH dan dilakukan penambahan asam asetat (CH_3COOH) untuk menurunkan pH sampai pH 7,2 lalu disentrifuse 3 menit. Sebanyak 1125 mL alkohol 97% ditambahkan dan didiamkan selama 30 menit lalu disentrifuse 3 menit. Selanjutnya diambil pelet kemudian dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50°C. Substrat alkali disimpan pada wadah tertutup untuk dijadikan bahan fermentasi.

d. Pembuatan Substrat Kulit Buah Kopi Jenuh Air Untuk Fermentasi Padat

Pembuatan substrat kulit buah kopi dilakukan setelah diketahui kadar airnya. Substrat kulit buah kopi jenuh air digunakan dalam fermentasi padat. Sebanyak 10 gram kulit buah kopi dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 200 ml dan dicampur dengan air yang volumenya dihitung berdasarkan kadar air yang telah diketahui. Kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf selama 20 menit pada suhu 121°C.

e. Pembuatan CMC 0,5% dalam 20 mM buffer asetat pH 5

Buffer asetat 20 mM pH 5 sebanyak 100 ml ditambahkan 0,5 gram CMC. Kedua bahan tersebut diaduk hingga larut dan distirer selama 24 jam.

f. Pembuatan Reagen *Somogyi-Nelson*

Pembuatan reagen *Somogyi* dilakukan dengan melarutkan 24 gram natrium karbonat (Na_2CO_3) dan 12 gram potassium sodium tartrate tetrahydrat ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) ke dalam 240 mL aquades sebagai larutan I. Sebanyak 4 gram Kupfer (II) sulfat pentahydrat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) dilarutkan pada 60 mL aquades dan ditambahkan 16 gram natrium hydrogen carbonat (NaHCO_3) sebagai larutan II. Larutan I dan larutan II dicampur dengan diaduk hingga homogen (sebagai larutan III). Selanjutnya membuat larutan IV dengan melarutkan 180 gram natrium sulfat (Na_2SO_4) ke dalam 300 mL aquades sambil dipanaskan. Setelah dingin, dicampurkan larutan III dan IV, dihomogenkan lalu ditambahkan aquades hingga volume 1000 ml. Reagen *Somogyi* diinkubasi dalam botol gelap pada suhu 37°C selama 7 hari.

Pembuatan reagen *Nelson* dengan cara melarutkan 50 gram $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ pada 500 mL aquades. Sebanyak 46 mL sulfuric acid (H_2SO_4) ditambahkan dengan hati-hati. Larutan ditambah dengan 6 gram sodium arsenat ($\text{Na}_3\text{AsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) yang telah dilarutkan dalam 25 mL aquades. Campuran larutan ditambahkan dengan aquades hingga volume 1000 ml. Kemudian diinkubasi dalam botol gelap pada suhu 37°C selama 24 jam.

g. Pembuatan Kurva Standar Glukosa

Pembuatan kurva standar glukosa dilakukan dengan analisis gula reduksi menggunakan metode *Somogyi-Nelson*. Seri pengenceran dibuat dari stok glukosa

0,01 gram dilarutkan dalam aquades hingga 100 ml sehingga konsentrasi menjadi 100 µg/ml. Pengenceran dilakukan dengan konsentrasi menjadi 0µg/ml, 20 µg/ml, 40µg/ml, 60 µg/ml, 80 µg/ml dan 100 µg/ml. Setiap konsentrasi glukosa tersebut ditambahkan reagen Somogyi sebanyak 0,5 ml dan dipanaskan pada air mendidih selama 15 menit. Setelah dingin, tiap seri pengenceran ditambahkan reagen Nelson sebanyak 0,5 ml dan akuades 2,5 ml. Kadar gula reduksi kemudian diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 500 nm hingga diperoleh nilai absorbansinya. Nilai absorbansi ini kemudian dipakai sebagai acuan untuk membuat kurva standar glukosa. Kurva standar glukosa dibuat kurva regresi linear antara nilai absorbansi dan konsentrasi larutan sampel.

3.4.2 Produksi Enzim Ekstrak Kasar (Crude Enzim)

a. Peremajaan Biakan *Pestalotiopsis* sp. VM9

Pestalotiopsis sp. diinokulasikan ke dalam media agar miring yang mengandung substrat alkali ekstrak kulit buah kopi 1% dan diinkubasi selama 72 jam dengan suhu 30°C.

b. Perhitungan Jumlah Spora

Perhitungan jumlah spora dilakukan secara langsung dengan metode *Petroff-Hauser* dengan menggunakan *haemocytometer*. Isolat *Pestalotiopsis* sp. ditumbuhkan pada 7 tabung reaksi yang berisi media miring mengandung substrat alkali ekstrak kulit buah kopi 1% kemudian diinkubasi selama 1-8 hari dengan suhu 30°C dan dilakukan perhitungan setiap 24 jam sekali selama 7 hari dari awal pertama inokulasi. Sebanyak 10 ml aquades dimasukkan ke dalam tabung yang berisi inokulum *Pestalotiopsis* sp. VM9 pada substrat alkali ekstrak kulit buah kopi 1% kemudian dikerik dan diambil ± 0,5 ml dari sampel. Sampel 0,5 ml diteteskan pada bidang hitung *haemocytometer* dan dihitung jumlah spora per mili (spora/ml) dengan 5 kali ulangan. Perhitungan dilakukan dengan rumus sebagai berikut:

$$S \text{ (spora/ml)} = \frac{n}{L (0,04 \text{ mm}^2) \times h (0,1 \text{ mm}) \times d} \times 10^3$$

Keterangan: S : jumlah spora/ml

n : rerata jumlah sel pada bidang hitung

L : luas bidang hitung kotak sedang (0,04 mm²)

h : kedalaman bidang hitung (0,1 mm)

d : faktor pengenceran (Seiverd, 1964).

c. Optimasi Produksi Crude Enzim

Optimasi aktivitas selulase digunakan untuk mengetahui waktu optimum *Pestalotiopsis* sp. dalam memproduksi crude enzim (enzim ekstrak kasar) yang optimal. Optimasi dilakukan dengan metode fermentasi padat kulit buah kopi menggunakan *Pestalotiopsis* sp. Sebanyak 1 ml suspensi *Pestalotiopsis* sp. diinokulasikan pada 10 gr substrat kulit buah kopi jenuh air. Lalu diinkubasi pada suhu 30°C selama 7 hari dan dilanjutkan dengan pemanenan crude enzim mulai hari pertama sampai hari ketujuh. Pemanenan dilakukan dengan 2 tahap. Tahap pertama preparasi, dilakukan dengan melarutkan 1% NaCl dan Natrium azide 0,01% ke dalam aquades 20 ml. Selanjutnya di shaker 150 rpm selama 12 jam dan difiltrasi dengan menggunakan kertas saring. Hasil filtrasi disentrifuse dengan kecepatan 8000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh merupakan enzim ekstrak kasar (crude enzim) dan disimpan dalam suhu -20°C. Supernatan tersebut diuji aktivitasnya menggunakan analisis gula reduksi *Somogyi-Nelson* dari hari pertama sampai hari ketujuh.

Uji aktivitas crude enzim dilakukan dengan analisis gula reduksi pada substrat CMC. Crude enzim yang dihasilkan selanjutnya diuji aktivitas selulase terhadap substrat CMC. Uji aktivitas selulase dilakukan dengan mengukur gula reduksi yang terbentuk menggunakan *Somogyi-Nelson*. Sebanyak 0,5 % substrat CMC dalam 500 µl buffer asetat 20 mM pH 5 dimasukkan dalam inkubator (37°C) selama 15 menit. Enzim ekstrak kasar ditambahkan sebanyak 50 µl dan diinkubasi dalam inkubator selama 2 jam. Setelah inkubasi 2 jam dikeluarkan dari inkubator, ditambahkan reagen Somogyi 0,5 ml dan divortex hingga homogen, kemudian dididihkan dalam penangas air selama 15 menit. Reagen Somogyi

berfungsi untuk menghentikan reaksi enzimatik (Somogyi, 1952). Reagen Nelson 0,5 ml ditambahkan dengan 2,5 ml akuades. Kadar gula reduksi diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 500 nm. Reagen Nelson berfungsi mengikat gula reduksi hasil hidrolisis substrat sehingga dapat terwarnai dan terbaca nilai absorbansinya (Nelson, 1944). Pengukuran dilakukan dengan dua kali pengulangan. Supernatan kemudian diambil dan gula reduksinya diukur dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 500 nm sebanyak 2 kali pengulangan. Hasil uji kadar gula reduksi ini kemudian dikonversikan dengan kurva standar glukosa yang telah dibuat sebelumnya.

d. Produksi Crude Enzim

Produksi crude enzim dilakukan dengan menggunakan 600 gr substrat kulit buah kopi jenuh air. Enzim dipanen dengan menggunakan metode seperti point 3.4.2.c. Bedanya hanya terletak pada waktu inkubasinya yakni menggunakan waktu inkubasi optimum *Pestalotiopsis* sp. yang telah diketahui sebelumnya. Crude enzim yang dihasilkan diinkubasi pada suhu 4°C agar enzim tidak rusak.

3.4.3 Purifikasi Parsial Enzim Ekstrak Kasar

a. Presipitasi dengan Amonium Sulfat

Optimasi presipitasi menggunakan amonium sulfat adalah tahapan awal purifikasi parsial. Tahapan ini dilakukan dengan skala kecil yang bertujuan untuk mengetahui pada konsentrasi berapa persen amonium sulfat jenuh yang dapat mengendapkan enzim secara optimal. Optimasi presipitasi dengan amonium sulfat skala kecil dilakukan dengan mensuspensikan 1 ml ekstrak enzim kasar dengan garam amonium sulfat (ditambahkan sedikit demi sedikit) hingga mendapatkan serial konsentrasi 35% - 70%. Campuran ini dipisahkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 10000 rpm suhu 4° C selama 30 menit. Protein yang diendapkan (pelet) diuji aktivitas enzimnya dengan mengukur kadar gula reduksi.

Presipitasi enzim menggunakan amonium sulfat pada skala besar dilakukan dengan mensuspensikan 200 ml ekstrak enzim kasar dengan 55,4 gram amonium sulfat (ditambahkan sedikit demi sedikit) hingga diperoleh konsentrasi

optimum. Campuran ini dipisahkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 10000 rpm suhu 4° C selama 30 menit. Pelet yang dihasilkan disuspensikan dengan 20 ml buffer asetat 20 mM pH 5.

Larutan ammonium sulfat dan enzim yang terdapat dalam buffer dipisahkan menggunakan kolom dialisis (*Spektrum* 50 kDa). Buffer pada proses dialisi diganti tiap 4 jam sekali untuk mempercepat laju dialisis. Keberadaan garam amonium sulfat pada enzim dapat dideteksi menggunakan reagen Nessler. Reagen Nessler ditambahkan pada buffer, apabila pada buffer masih terdapat endapan atau berwarna kuning-cokelat, menunjukkan bahwa pada enzim masih terdapat garam amonium sulfat. Proses dialisis dihentikan apabila semua ammonium sulfat telah terpisah dengan enzim (Liu dan Xu, 2008).

b. *DEAE Cellulose Chromatography*

Tahap kedua dalam purifikasi parsial enzim yaitu menggunakan *ion exchanger* dengan *DEAE Cellulose*. Sebanyak 5 ml enzim dari tahap presipitasi diaplikasikan pada kolom *DEAE Cellulose chromatography* yang telah disetimbangkan dengan penambahan 20 mM buffer asetat pH 5. Kolom kromatografi kemudian dibilas dengan menggunakan larutan buffer asetat 20 mM pH 5. Protein yang terikat pada matriks dibilas dengan metode stepwise pada gradient mixer menggunakan konsentrasi larutan NaCl 1 M dalam buffer asetat 20 mM pH 5, kecepatan alir eluen sebanyak 225 tetes (5 ml) tiap fraksi. Fraksi yang keluar ditampung sebanyak 70 fraksi, kemudian tiap fraksi kuantitas proteinnya diukur pada panjang gelombang 280 nm dan gula reduksi diukur pada panjang gelombang 500 nm menggunakan metode *Somogyi-Nelson*.

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Isolat *Pestalotiopsis* sp. (VM9) memiliki aktivitas enzim yang optimum dalam media fermentasi padat kulit buah kopi pada inkubasi hari ke-6 dengan jumlah gula reduksi sebesar 146,15 µg/ml. Pada tahap purifikasi parsial, aktivitas enzim selulase tertinggi sebesar 85,385 µg/ml dengan absorbansi protein pada panjang gelombang 280 nm sebesar 0,388.

5.2 Saran

Penelitian selanjutnya diperlukan tahapan purifikasi lebih lanjut untuk mengetahui karakter enzim hasil purifikasi dan untuk mengetahui senyawa hasil hidrolisis oleh enzim selulase.

DAFTAR PUSTAKA

- Ali, Z. dan L. Gibson. 2012. The Structure and Mechanics of Nanofibrillar Cellulose Foams. *Soft Matter*, 9, 1580–1588.
- Al-kayyis, H. K. dan H. Susanti. 2016. Perbandingan Metode *Somogyi-Nelson* dan *Anthrone-Sulfat* Pada Penetapan Kadar Gula Pereduksi Dalam Umbi Cilembu (*Ipomea batatas* L.). *Jurnal Farmasi Sains dan Komunitas*. 13(2): 81-89.
- Ardianingsih, R. 2009. Penggunaan Fast Performance Liquid Chromatography (FPLC) Dalam Proses Analisa Deteksi Ion. *Berita Dirgantara*. 10(4), 101-104.
- Arief, M., M. Tarigan, R. Saragih dan F. Rahmadani. 2011. *Panduan Sekolah Lapang Budidaya Kopi Konservasi*. Conservation International Indonesia. Jakarta. Hal 38-39.
- Aulanni'am. 2005. *Protein dan Analisisnya*. Malang: Citra Mentari Group.
- Biotech, A. P. 1999. *Protein Purification* (AB. SE-751.). Sweeden: Upsalla.
- Braham, J.E. dan R. Bressani. 1979. *Coffee Pulp, Composition, Technology and Utilization*. International Development Research Centre, Ottawa.
- Buselli, R.A.F, W.C. Otoni dan C.P. Joshi. 2007. Structure, organization and functions of cellulose synthase complexes in higher plants. *Brazilian Journal Plant Physiology*. 19(1): 1-13.
- Corro, G., L. Paniagua, U. Pal, F. Banuelos dan M. Rosas. 2013. Generation of Biogas from Coffe-pulp annd Cow-dung Co-digestion: Infrared Studies of Postcombustion Emissions. *Energy Conversion and Management*, 74. 471–481.
- Darwis, A.A., I. Sailah, T.T. Irawadi dan Safriani. 1995. Kajian Kondisi Fermentasi Pada Produksi Selulase dari Limbah Kelapa Sawit (Tandan Kosong dan Sabut) oleh *Neurospora sitophila*. *J. Teknologi Industri Pertanian*. Vol.5 (3),199–207.
- Davidson, V.L. dan D.B. Sittman. 1999. *Biochemistry*, 4th edition, Lipincott Williams and Wilkins, Maryland, hal. 19-21.
- Departemen Agama Republik Indonesia. 2007. *Al-Qur'an dan Terjemahnya Special for Woman*. Bogor: Syaamil Al-Qur'an.

- Devi, M. dan M. Kumar. 2012. Production, Optimization and Partial Purification of Cellulase by *Aspergillus niger* Fermented with Paper and Timber Sawmill Industrial Wastes. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 2(1), 120-128.
- Dewi, R. F. 2014. Purifikasi dan Karakterisasi Ekstraselular Selulase Isolat Kapang yang Didapatkan dari Proses Vermikomposting Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS). *Tesis*. Universitas Jember.
- Direktorat Jendral Perkebunan. 2014. *Statistik Perkebunan Indonesia 2013-2015 – Kopi*. Jakarta. Direktorat Jenderal Perkebunan.
- Fardiaz, S. 1988. *Mikrobiologi Pangan I*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Gandjar. 2006. *Mikologi Dasar dan Terapan*. Jakarta : Yayasan Obor Indonesia.
- Gupta, A. dan S. Turner. 2017. Cellulose. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, 2nd edition, Volume 1. University of Manchester, Manchester, UK.
- Harris, V. dan S. Angel. 1989. *Book Reviews Gel Electrophoresis of Proteins : Approach (Second Edition) Practical Protein Purification Methods : A Practical Approach A Practical Guide to Protein and Peptide Purification for Microsequencing*, Volume 19. Oxford: Oxford University Press.
- Idiawati, N., E.M. Harfinda dan L. Arianie. 2014. Produksi Enzim Selulase Oleh *Aspergillus niger* Pada Ampas Sagu. *Natur Indonesia*. 16(1), 1-9.
- International Coffee Organization (ICO). 2012. *All Exporting Countries Total Production Crop Years*. England: International Coffee Organization.
- Janson, J.C. 2011. *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Application*. New York: John and Wiley Inc.
- Jeewon R., Liew dan K. Hyde. 2004. Phylogenetic Evaluation of Species Nomenclature of *Pestalotiopsis* in Relation to Host Association. *Fungal Divers*. 17, 39–55.
- Koehler, L.H. 1952. Differentiation of carbohydrates by anthrone reaction rate and color intensity. *Journal Analytical Chemistry*, 24, 1576-1579.
- Kurniawati, N. H. 2016. Uji Aktivitas *Crude* Enzim Ekstraseluler *Aspergillus* VT12 Dalam Mendekomposisi Polisakarida dari Tepung Kulit Lunak Buah Kopi. *Skripsi*. Jember: FMIPA Biologi Universitas Jember.
- Lazarotto, M., M. Bovolini, M. Muniz, R. Harakawa, L. Reiniger dan A. Santos, 2014. Identification and Characterization of Pathogenic *Pestalotiopsis* Species to Pecan Tree in Brazil. *Pesq. agropec. bras.* 49(6), 440-448.

- Lehninger, L. 1995. *Dasar-Dasar Biokimia*. Jakarta: Erlangga.
- LIPI, 2008. Berita Biologi. *Jurnal Ilmiah Nasional*. 9(2). Jakarta: Pusat Penelitian Biologi-LIPI.
- Liu, X. D. dan Y. Xu. 2008. A novel raw starch digesting α -amylase from a newly isolated *Bacillus* sp. YX-1: Purification and characterization. *Bioresource Technology*. 99 : 4315–4320.
- Maleki, S., K. Mohammadi dan K. Ji. 2016. Characterization of Cellulose Synthesis in Plant Cells. *The Scientific World Journal*. 1-8.
- McKee, T. dan J. R. McKee. 2004. *Biochemistry: The Molecular Basis of Life*. New York: McGraw Hill.
- Meryandini, A., W. Widosari, B. Maranantha, T. C. Sunarti, R. Rachmania dan H. Satria. 2009. Isolasi Bakteri dan Karakterisasi Enzimnya. *Makara Sains*. 13, 33-38.
- Meyer, V. R. 2004. *Practical High Performance Liquid Chromatography, Fourth Edition*. Swiss Federal Laboratories for Materials Testing and Research (EMPA), St. Gallen, Switzerland.
- Miyamoto, K. 1997. “Renewable Biological System For Alternative Sustainable Senergy Production”. *FAO Agricultural Services Bulletin* 128.
- Muchtadi., R. Tien, Sugiyono dan F. Ayustaningwarno. 2010. *Ilmu Pengetahuan Bahan Pangan*. Bogor: CV Alfabeta.100-112.
- Natawidjaya, H. 2012. *Pedoman Teknis Penanganan Pascapanen Kopi. Direktorat Pascapanen dan Pembinaan Usaha*. Direktorat Jenderal Perkebunan. Kementrian Perkebunan. 13-15.
- NCBI. 2017. National Center for Biotechnology Information. Retrieved September 17, 2017, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Nelson, N. 1944. A Photometric Adaptation of The Somogy Method for The Determination of Glucose. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 153: 375-380.
- Nurfitriani, S. dan E. Handayanto. 2017. Dekomposisi Kulit Kopi Oleh Bakteri Selulolitik yang Diisolasi dari Timbunan Kulit Kopi Di Perkebunan Kalibendo, Jawa Timur. *Jurnal Tanah dan Sumberdaya Lahan*. 4(2), 503-514.
- Orozco, A.L., M.I. Pérez, O. Guevara, J. Rodríguez, M. Hernández, F.J. González-Vila, O. Polvillo dan M.E. Arias. (2008). Biotechnological Enhancement of Coffee Pulp Residues by Solid-State Fermentation with

- Streptomyces. Py–GC/MS Analysis. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. Vol. 8, 247-252.
- Pandey, A. 2003. Solid State Fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. Vol.13, 81-84.
- Peterson, E. A., H. A. Sober. 1956. Chromatography of Proteins. I. Cellulose Ion-exchange Adsorbents. *Journal of the American Chemical Society*. 78(4): 751–755.
- Raharjo, T.B. 2013. Analisis Penentu Ekspor Kopi Indonesia. *Jurnal Ilmiah*. Universitas Brawijaya.
- Rao, M., N. Thakur, B. Mithal dan S. Manjunath. 1983. Production of Cellulose From *Pestalotiopsis versicolor*. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 25.
- Ratnaningsih, A., R. Badrani dan S. Arifin. 2013. *Campuran Beton Ringan Material Wall/Flooring Dengan Pemanfaatan Limbah Kulit Kopi*. Jerami dan Fly Ash, 58-63.
- Sari, F. 2012. Purifikais Parsial dan Karakterisasi Endoglukanase dari *Trichoderma viride* T051 Pada Fermentasi Menggunakan Substrat Dedak Padi. *Skripsi*. Universitas Indonesia.
- Scopes, K., 1994, *Protein purification : Principle and Practice, 3rd Ed*. Springer, New York.
- Sena, A.R., A.C. Santos, M.J. Gouveia, M.R. Mello, T. Leite, K. Moreira dan S. Assis. 2014. Production, Characterization and Application of a Thermostable Tnnase from *Pestalotiopsis guepinii* URM 7114. *Original Scientific Paper*, 54(4).
- Siboro, R., Puspita, I., dan Ustadi. 2017. Produksi, Purifikasi Parsial dan Aktivitas Kitinase dari *Bacillus cereus* SMG 1.1. *Skripsi*. Universitas Gadjah Mada.
- Simanihuruk, K. dan J. Sirait. 2010. *Silase Kulit Buah Kopi Sebagai Pakan Dasar Pada Kambing Boerka Sedang Tumbuh*. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner.
- Simon, I. L., H. Glasser, A. Scherag dan J. Manley. 1988. “Structure of Cellulose. 2. Low-energy Crystalline Arrangements”. *Macromolecules*, 21(4), 990–998.
- Soesetyaningsih, E. 2015. *Pembuatan Media Untuk Mikroorganisme*. Jember: UPT Penerbitan UNEJ.
- Solehah, S.H. 2016. *Hidrolisis Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS) Oleh Trichoerma viride dan Pestalotiopsis sp. (VM9) Sebagai Media PST Saccharomyes cerevisiae*. Jember: Universitas Jember.

- Somogyi, M. 1952. Notes on Sugar Determination. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 195: 19-23.
- Sonia, N. M. dan J. Kusnadi. 2015. Isolasi dan Karakterisasi Parsial Enzim Selulase dari Isolat Bakteri Os-16 Asal Padang Pasir Tengger-Bromo. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, 3(4), 11-19.
- Sutton, B. 1969. *Forest Microfungi*. The Heterogeneity of *Pestalotia denot*. Section Sexloculatae klebahn Sensus Guba. Canadian journal of botany.
- Ul-haq, I., M.M. Javed, T.S. Khan dan Z. Siddiq. 2005. Cotton Saccharifying Activity of Cellulases Produced by Co-culture of *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride*. *Res. J. Agric dan Biol. Sci*, 1(3), 241–245.
- Wang, N.S. 2004. Enzyme purification by salt (ammonium sulfate) precipitation, <http://www.glue.umd.edu/~nsw/ench485/lab6a.htm>. [1 agustus 2007].
- Watanabe, K., K. Motohashi dan Y. Ono. 2010. Description of *Pestalotiopsis pallidothaeae*: A New Species from Japan. *Mycoscience*. 51, 182–188.
- Wijaya H. 2003. Sambutan Ketua Umum BPP AEKI. Dalam : I. Bersten. 2003. *Coffee, Sex, and Health. A History of Anti Coffee Crusaders and Sexual Hysteria*. Australia: Helian Books.
- Yanto, D.H. dan S. Tachibana, 2016. Utilization of kapok fiber as a natural sorbent in petroleum hydrocarbon biodegradation by *Pestalotiopsis* sp. *Journal of Lignocellulose Technology*. Vol. 1.
- Yuniar, W. 2013. Skrining dan Identifikasi Kapang Selulolitik Pada Proses Vermikomposting Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS). *Jurnal Skripsi*, 1(53).

LAMPIRAN

Lampiran A. KOMPOSISI MEDIA

A.1 Komposisi Media Potato Dekstrosa Agar (PDA)

No	Bahan	Jumlah/ Liter
1	Kentang	200 gram
2	Dekstrosa	20 gram
3	Agar	15 gram
4	Akuades	1000 ml

Langkah-langkah pembuatan:

- 1) Memanaskan *Beaker glass* berisi akuades lebih kurang 250 ml diatas hot plate.
- 2) Menimbang dextrose 2 gr dan agar 3 gr dengan menggunakan aluminium foil sebagai tempat bahan sesuai dengan takaran.
- 3) Mengupas kentang kemudian menimbang seberat 40 gr, lalu duci dan setelah agak kering dipotong seperti dadu.
- 4) Memasukkan kentang yang telah dipotong seperti dadu ke dalam akuades pada butir 1 yang telah mendidih, sambil sekali-sekali diaduk sampai mendidih, setelah mendidih biarkan dalam keadaan tersebut sampai \pm 15 menit. Hal ini bertujuan untuk meluruhkan sari-sari kentang.
- 5) Menyaring air kentang dengan cara: diatas beaker glass kosong diberi saringan teh yang berisi kapas bersih kemudian tuangkan rebusan kentang tadi; ukur filtrat (sari kentang) dengan menggunakan gelas ukur, jika hasilnya kurang dari 200 ml maka harus ditambah akuades sampai 200 ml yang dilakukan dengan cara: sisa rebusan kentang pada butir 4 dibilas dengan akuades lalu digoyang-goyang kemudian disaring lagi.
- 6) Menuang filtrate dari gelas ukur ke dalam beaker glass (yang digunakan sebagai tempat menyaring pada butir 5), kemudian tambahkan agar dan dextrose ke dalam filtrat.
- 7) Memanaskan medium dalam beaker glass (pada butir 6) di atas hotplate sambil diaduk terus sampai mendidih (jangan sampai gosong).

- 8) Mengangkat medium sesudah mendidih dan agar sudah larut seluruhnya dari hot plate sambil terus diaduk. Apabila medium yang dihasilkan sudah jernih bagus, maka tidak perlu disaring dan jika sebaliknya (tidak/kurang jernih), maka perlu disaring (dengan menggunakan saringan the yang diberi kapas bersih) dan pada saat medium harus masih dalam kondisi panas atau langsung setelah mendidih.
- 9) Memasukkan medium ke dalam tabung reaksi dengan menggunakan pipet ukur 10 ml dan penyedotnya (pipet filler).
- 10) Menutup/menyumbat tabung reaksi dengan kapas sampai tertutup sangat rapat (setiap 10 tabung reaksi, di atasnya, ditutup dengan ketas sampul cokelat [warna yang mengkilap berada diluar]), kemudian seluruh tabung reaksi diikat dengan karet gelang tahan panas.
- 11) Melakukan sterilisasi dengan menggunakan autoclave pada tekanan 15 lbs atau 1 atm, suhu 121°C selama 15 – 20 menit. Penggunaan autoclave harus mengikuti IK autoclave (lampiran 2 atau 3) (Soesetyaningsih, 2015).

Lampiran B. KOMPOSISI REAGEN *SOMOGYI-NELSON*

B.1 Komposisi Reagen Somogyi

No	Bahan	Jumlah/Liter
1	Na ₂ CO ₃	24 gram
2	C ₄ H ₄ KNaO ₆ H ₂ O	12 gram
3	NaHCO ₃	16 gram
4	CuSO ₄ .5H ₂ O 10 %	40 ml
5	Na ₂ SO ₄	180 gram
6	Akuades	1000 ml

B.2 Komposisi Reagen Nelson

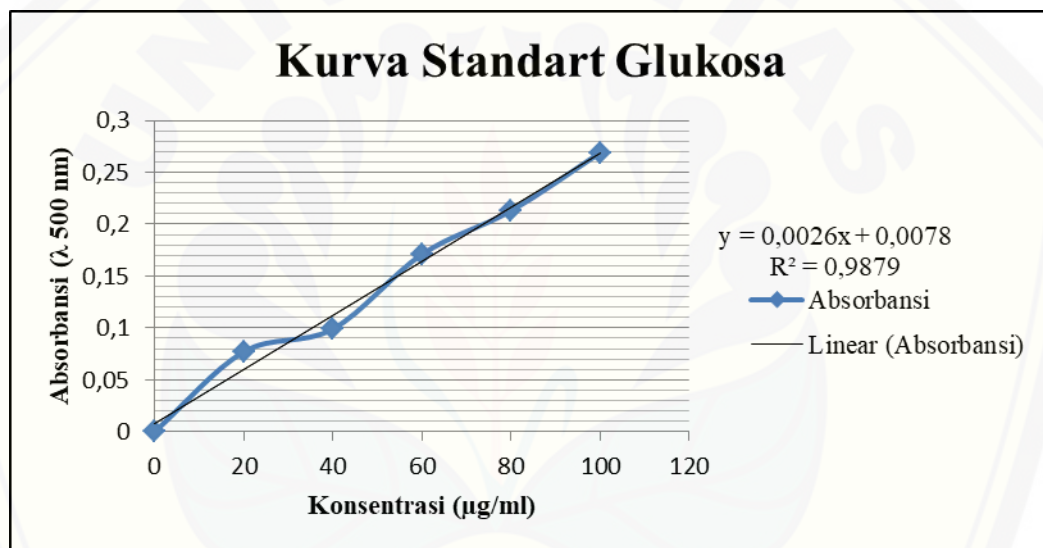
No	Bahan	Jumlah/Liter
1	(NH ₄) Mo ₇ O ₂₄	50 gram
2	H ₂ SO ₄	46 gram
3	NaHSO ₄ . 7H ₂ O	6 gram
4	Akuades	1000 ml

Lampiran C. KURVA STANDAR GLUKOSA

C.1 Tabel Standar Glukosa

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	ABS (500 nm)
0	0
20	0,077
40	0,099
60	0,171
80	0,213
100	0,269

C.2 Kurva Standar Glukosa



Lampiran D. TABEL HASIL PRESIPITASI AMMONIUM SULFAT

Konsentrasi Ammonium Sulfat	Gula Reduksi	% Recovery
35	106,73	65,992
40	109,23	67,538
45	130,769	80,856
50	99,615	61,593
55	99,423	61,474
60	93,461	57,788
65	71,923	44,471
70	45,576	28,180

Lampiran E. KURVA GRADIEN KONSENTRASI NaCl

