

**PEMANFAATAN KULIT BUAH KAKAO SEBAGAI MEDIA
PADAT UNTUK MEMPRODUKSI ENZIM AMILASE
OLEH *Aspergillus niger* dan *Aspergillus oryzae***

**(Utilization of Cocoa Shell as Solid State Fermentation
(SSF) to Produce Amylase Enzyme by *Aspergillus niger*
and *Aspergillus oryzae*)**

Oleh:

MUNIRAH MUCHTAR

G311 09 005



**PROGRAM STUDI ILMU DAN TEKNOLOGI PANGAN
JURUSAN TEKNOLOGI PERTANIAN
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2013**

**PEMANFAATAN KULIT BUAH KAKAO SEBAGAI
MEDIA PADAT UNTUK MEMPRODUKSI ENZIM AMILASE
OLEH *Aspergillus niger* dan *Aspergillus oryzae***

Oleh

MUNIRAH MUCHTAR

G 311 09 005

SKRIPSI

Sebagai Salah Satu Syarat Memperoleh Gelar
SARJANA TEKNOLOGI PERTANIAN
pada
Jurusan Teknologi Pertanian

**PROGRAM STUDI ILMU DAN TEKNOLOGI PANGAN
JURUSAN TEKNOLOGI PERTANIAN
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2013**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : Pemanfaatan Kulit Buah Kakao Sebagai Media Padat
untuk Memproduksi Enzim Amilase oleh *Aspergillus
niger* dan *Aspergillus oryzae*.

Nama : Munirah Muchtar

Stambuk : G 311 09 005

Program Studi : Ilmu dan Teknologi Pangan

Disetujui

1. Tim Pembimbing

Dr. Ir. Mariyati Bilang, DEA.
Pembimbing I

Prof. Dr. Ir. Amran Laga, MS.
Pembimbing II

Mengetahui

2. Ketua Jurusan Teknologi Pertanian

3. Ketua Panitia Ujian Sarjana

Prof. Dr. Ir. H. Mulyati M. Tahir, MS
Nip. 19570923 198312 2 001

Ir. Nandi K. Sukendar, M.App. Sc
Nip. 19571103 198406 1 001

Tanggal Lulus :

Munirah Muchtar (G31109005). Pemanfaatan Kulit Buah Kakao sebagai Media Padat untuk Memproduksi Enzim Amilase oleh *Aspergillus niger* dan *Aspergillus oryzae* Dibawah bimbingan Mariyati Bilang dan Amran Laga.

RINGKASAN

Kulit buah kakao yang jumlahnya melimpah di Sulawesi Selatan adalah limbah kurang dimanfaatkan. Padahal kulit kakao memiliki kandungan kimia yang dapat dijadikan sebagai substrat dalam memproduksi enzim diantaranya adalah enzim amilase. Salah satu metode yang dapat digunakan untuk menghasilkan enzim adalah dengan metode fermentasi media padat. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui suhu dan lama pemanasan substrat (kulit kakao dan dedak padi) serta lama inkubasi yang optimum dalam memproduksi enzim. Proses produksi enzim dilakukan dengan menginokulasikan larutan spora (*Aspergillus niger* dan *Aspergillus oryzae*) ke dalam media steril (kulit kakao dan dedak padi) yang telah diberi perlakuan pemanasan A1 (121°C selama 30 menit), A2 (100°C selama 90 menit) dan A3 (100°C selama 60 menit), kemudian diinkubasi selama B1 (24 jam), B2 (48 jam), B3 (72 jam) dan B4 (96 jam), selanjutnya enzim diekstraksi dan dianalisa aktivitas enzimnya. Pengolahan data menggunakan analisis sidik ragam metode RAL pola faktorial dengan dua kali ulangan. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa enzim α -amilase dan glukoamilase optimum diproduksi setelah masa inkubasi 96 jam. Sedangkan suhu pemanasan optimum untuk enzim α -amilase dari *Aspergillus oryzae* adalah 121°C selama 30 menit dan 100°C selama 90 menit dari kultur *Aspergillus niger*. Sedangkan aktivitas optimum enzim glukoamilase diproduksi pada pemanasan 100°C selama 60 menit.

Kata kunci : Amilase, Kulit Kakao, Fermentasi Media Padat, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*.

Munirah Muchtar (G31109005). Utilization of Cocoa Shell as Solid State Fermentation (SSF) to Produce Amylase Enzyme by *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* Supervised by Mariyati Bilang and Amran Laga.

ABSTRACT

The Cocoa shell is produced a lot in South Sulawesi. It is still less in usage. However, it has some chemical components that are useful as substrate in producing enzyme, such as amylase. One of methods in producing enzyme was solid state fermentation. This research aimed to know the temperature and heated of substrates (Cocoa shell and rice brand), as well as the incubation periods which was optimum in producing enzyme. Enzyme produced by inoculated spores suspension (*Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae*) to the sterile medium (cocoa shell and rice bran) that had been heated 121°C for 30 minutes (A1), 100°C for 90 minutes (A2) and 100°C for 60 min (A3), then incubated for 24 hours (B1), 48 hours (B2), 72 hours (B3) and 96 hours (B4), then the enzyme was extracted and analyzed enzyme activity. Data was processed by analysis of variance methods factorial with two replications. The results of this research showed that the optimum activity for both types of enzyme (α -amylase and glucoamylase) was 96 hours incubation time. Optimum heating temperature for α -amylase enzyme of *Aspergillus Oryzae* was 121°C for 30 minutes and 100 °C for 90 minutes of *Aspergillus Niger*. On the other side, optimum activity of glucoamylase enzyme was produced at 100 °C heating for 60 minutes long.

Keywords : Amylase, Cocoa shell, Solid State Fermentation (SSF), *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*.

KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah SWT Tuhan semesta alam atas segala berkat, rahmat, taufik, serta hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul "**Pemanfaatan Kulit Buah Kakao sebagai Media Padat untuk Memproduksi Enzim Amilase oleh *Aspergillus niger* dan *Aspergillus oryzae***".

Dalam penyusunan skripsi ini, penulis memperoleh banyak bantuan dari berbagai pihak. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr. Ir. Mariyati Bilang, DEA., selaku dosen pembimbing I dan Prof. Dr. Ir. Amran Laga, MS., selaku dosen pembimbing II yang telah memberikan bimbingan dan arahan sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini, serta kedua orang tua, keluarga besar penulis, dan rekan-rekan mahasiswa Universitas Hasanuddin yang selalu berdoa dan memberikan motivasi kepada penulis.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih terdapat banyak kekurangan. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun agar skripsi ini dapat lebih baik lagi. Akhir kata penulis berharap skripsi ini dapat memberikan wawasan dan pengetahuan kepada para pembaca pada umumnya dan pada penulis pada khususnya.

Makassar, Agustus 2013

Munirah Muchtar

UCAPAN TERIMAKASIH

Puji syukur yang tak terhingga saya sampaikan kepada Allah SWT Yang Maha Berkuasa Atas Segalanya, karena hanya dengan ridho, hidayah dan anugerah-Nya saya dapat menyelesaikan skripsi ini. dan salam penulis panjatkan kepada junjungan Nabi Muhammad S.A.W, serta seluruh keluarga dan sahabatnya.

Untukmu Ayahanda **Muchtar Mahmud** dan Ibunda **Hj. Rahmawati, S.TP.**, skripsi ini kupersembahkan. Terimakasih untuk doa, cinta, dan kasih sayangnya. Kalian adalah anugerah terindah yang Allah berikan kepada penulis. Untukmu juga Adindaku **Muthia nurfani, Munawwarah** dan **Muadzahrah**. Terimakasih untuk semangatnya. Sungguh, penulis sangat menyayangi kalian.

Terimakasih tak terhingga kepada Ibu Dr. Ir. Mariyati Bilang, DEA., selaku pembimbing I **Prof. Dr. Ir Amran Laga, MS**, selaku pembimbing II. Tak lupa pula ucapan terima kasih kepada **Ir. Nurlaila Abdullah, MS** dan **Februadi Bastian, S.TP., MSi.**, selaku penguji yang telah meluangkan waktunya guna memberikan masukan dan petunjuk menuju kesempurnaan dalam penyusunan skripsi ini.

Sahabat-sahabat seperjuanganku di ITP 09, **Hikma Sulaiman, Tariq Hussein, Rahmadana S, Andi Tendri Lawang, S.TP, Husnul Khatimah Yasin S.TP, Mukarramah Lubis**, terimakasih untuk empat tahun yang sangat berharganya. Akan ada banyak kisah yang bisa kita ceritakan nanti. Dan untuk **Muhipdah, Asriyanti, Nurhazizah Amin**,

Hasrayanti, Asriyanti, akhirnya kita selesai juga. Penelitian yang penuh warna (penelitian yang super sekali). Dan semua Kanda dan Adinda di KMJTP-UH. Terimakasih karena telah memberi kesempatan kepada penulis untuk berproses di HIMATEPA-UH.

Makassar , Agustus 2013

Penulis

RIWAYAT HIDUP PENULIS



Munirah Muchtar, lahir di Ujung Pandang 14 Maret 1991. Penulis merupakan anak pertama dari pasangan Muchtar Mahmud dan Hj. Rahmawati, S.TP.

Pendidikan formal yang pernah dijalani adalah:

1. TK Aisyah Jatia, Gowa. Tahun 1995-1997.
2. Sekolah Dasar Inpres Pare'-Pare', Gowa. Tahun 1997-2003.
3. Sekolah Lanjutan Tingkat Pertama 1 Bajeng, Gowa. Tahun 2003-2006.
4. Sekolah Menengah Umum 1 Bajeng, Gowa. Tahun 2006-2009.
5. Pada Tahun 2009, penulis diterima di Perguruan Tinggi Universitas Hasanuddin Makassar, Program Strata Satu (S1) sebagai Mahasiswa Program Studi Ilmu dan Teknologi Pangan, Jurusan Teknologi Pertanian, Fakultas Pertanian.

Selama menjalani studinya di Universitas Hasanuddin, penulis aktif dalam organisasi Himpunan Mahasiswa Teknologi Pertanian Universitas Hasanuddin (HIMATEPA-UH).

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
I. PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	4
1.3. Tujuan Penelitian	5
II. TINJAUAN PUSTAKA	
A. Produksi Enzim oleh Mikroba	6
1. Umum	6
2. <i>Aspergillus niger</i>	7
3. <i>Aspergillus oryzae</i>	9
B. Media dan Lingkungan Pertumbuhan Kapang	10
1. Kulit Buah Kakao	12
2. Dedak Padi	12
C. Amilum (pati)	13
D. Amilase	14
1. α -Amilase	16
2. Glukoamilase	18
3. Aplikasi Amilase dalam Industri	18
E. Fermentasi Media Padat (Solid State Fermentation)	19
F. Berat Kering	20
III. METODE PENELITIAN	
A. Waktu dan Tempat	22
B. Alat dan Bahan	22
C. Prosedur Penelitian	23
1. Penelitian Pendahuluan	23
2. Penelitian Utama	23

	Halaman
D. Prosedur Penelitian	23
1. Penyiapan Alat dan Bahan.....	23
1.1. Pencucian dan Sterilisasi alat.....	23
1.2. Pembuatan Media Kultur Jamur	24
1.3. Pengambilan Bahan substrat Pertumbuhan Jamur	24
1.4. Pengeringan Bahan Media Pertumbuhan Jamur.....	24
1.5. Analisa Awal Komposisi Substrat	25
2. Penyiapan Mikroba	25
2.1. Penyiapan Biakan Murni.....	26
3. Produksi Enzim	26
3.1. Pembuatan Media Produksi Enzim.....	26
3.2. Percobaan Penambahan Larutan Mineral	26
3.3. Penyiapan Suspensi Spora	27
3.4. Produksi Enzim.....	27
4. Isolasi Enzim.....	28
5. Uji Aktivitas Enzim.....	28
E. Perlakuan Penelitian	28
F. Pengolahan Data	29
G. Parameter Pengamatan	30
H. Prosedur Analisa	30
1. Kadar air	30
2. Protein.....	31
3. Total Gula	32
4. Kadar Pati	33
5. Analisa Aktivitas α -amilase	34
6. Analisa Aktivitas Glukoamilase	37
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	
A. Penelitian Pendahuluan	39

	Halaman
B. Aktivitas Enzimatik	41
B.1. Aktivitas Enzim α -amilase.....	41
B.2. Aktivitas Glukoamilase	45
C. Perubahan Berat Kering	49
V. KESIMPULAN DAN SARAN	
A. Kesimpulan	52
B. Saran	53
DAFTAR PUSTAKA	54
LAMPIRAN	58

DAFTAR TABEL

NO	Judul	Halaman
1.	Produksi Enzim dari <i>Aspergillus niger</i> dan Aplikasinya	8
2.	Komponen Kulit Kakao Basah	12
3.	Komposisi Media Fermentas	26
4.	Rancangan Perlakuan Penelitian	29
5.	Hasil Analisa Komposisi Awal Substrat (Kulit Kakao dan Dedak Padi).....	41

DAFTAR GAMBAR

No.	Judul	Halaman
1.	Fase Pertumbuhan Mikroba	11
2.	Struktur Kimia Amilosa dan Amilopektin.....	14
3.	Diagram Alir Produksi Enzim Amilase	38
4.	Hubungan Suhu dan Lama Pemanasan serta Waktu Inkubasi terhadap Aktivitas α -amilase	42
5.	Hubungan Suhu dan Lama Pemanasan serta Waktu Inkubasi terhadap Aktivitas α -amilase yang dihasilkan oleh Kultur <i>Aspergillus oryzae</i>	43
6.	Hubungan Suhu dan Lama Pemanasan serta Waktu Inkubasi terhadap Aktivitas α -amilase yang dihasilkan oleh Kultur <i>Aspergillus niger</i>	43
7.	Hubungan Suhu dan Lama Pemanasan serta Waktu Inkubasi terhadap Aktivitas Glukoamilase	47
8.	Hubungan Suhu dan Lama Pemanasan serta Waktu Inkubasi terhadap Aktivitas glukoamilase yang dihasilkan oleh Kultur <i>Aspergillus oryzae</i>	48
9.	Hubungan Suhu dan Lama Pemanasan serta Waktu Inkubasi terhadap Aktivitas glukoamilase yang dihasilkan oleh Kultur <i>Aspergillus oryzae</i>	48
10.	Hubungan Aktivitas Enzim α -amilase dan Berat Kering terhadap Waktu Inkubasi.....	51
11.	Hubungan Aktivitas Enzim Glukoamilase dan Berat Kering terhadap Waktu Inkubasi.....	51

DAFTAR LAMPIRAN

No.	Judul	Halaman
1.	a. Hasil Pengukuran Berat Kering Media Fermentasi dari Kultur <i>Aspergillus oryzae</i>	58
	b. Hasil Pengukuran Berat Kering Media Fermentasi dari Kultur <i>Aspergillus niger</i>	59
2.	a. Kurva Standar Aktivitas Enzim α -amilase	59
	b. Kurva Standar Aktivitas Enzim glukamilase	60
3.	a. Hasil Analisa Aktivitas Enzim α -amilase dari kultur <i>Aspergillus oryzae</i>	60
	b. Analisa Sidik Ragam Aktivitas Enzim α -amilase dari kultur <i>Aspergillus oryzae</i>	61
	c. Uji Lanjutan BJND Pengaruh Suhu dan Lama Pemanasan terhadap Aktivitas Enzim α -amilase dari kultur <i>Aspergillus oryzae</i>	61
	d. Uji Lanjutan BJND Pengaruh Waktu Inkubasi terhadap Aktivitas Enzim α -amilase dari kultur <i>Aspergillus oryzae</i>	61
	e. Uji Lanjutan BJND Analisa Pengaruh Interaksi Suhu Pemanasan dan Lama Inkubasi terhadap Aktivitas Enzim α -amilase dari kultur <i>Aspergillus oryzae</i>	62
4.	a. Hasil Analisa Aktivitas Enzim α -amilase dari kultur <i>Aspergillus niger</i>	62
	b. Analisa Sidik Ragam Aktivitas Enzim α -amilase dari kultur <i>Aspergillus niger</i>	63
	c. Uji Lanjutan BJND Pengaruh Suhu dan Lama Pemanasan terhadap Aktivitas Enzim α -amilase dari kultur <i>Aspergillus niger</i>	63

Sambungan

No.	Judul	Halaman
d.	Uji Lanjutan BJND Pengaruh Waktu Inkubasi terhadap Aktivitas Enzim α -amilase dari kultur <i>Aspergillus niger</i>	63
e.	Uji Lanjutan BJND Analisa Pengaruh Interaksi Suhu Pemanasan dan Lama Inkubasi terhadap Aktivitas Enzim <i>niger</i> dari kultur <i>Aspergillus niger</i>	64
5. a.	Hasil Analisa Aktivitas Enzim glukoamilase dari kultur <i>Aspergillus oryzae</i>	64
b.	Analisa Sidik Ragam Aktivitas Enzim glukoamilase dari kultur <i>Aspergillus oryzae</i>	65
c.	Uji Lanjutan BJND Pengaruh Suhu dan Lama Pemanasan terhadap Aktivitas Enzim glukoamilase dari kultur <i>Aspergillus oryzae</i>	65
d.	Uji Lanjutan BJND Pengaruh Waktu Inkubasi terhadap Aktivitas Enzim glukoamilase dari kultur <i>Aspergillus oryzae</i>	65
e.	Uji Lanjutan BJND Analisa Pengaruh Interaksi Suhu Pemanasan dan Lama Inkubasi terhadap Aktivitas Enzim glukoamilase dari kultur <i>Aspergillus oryzae</i>	66
6. a.	Hasil Analisa Aktivitas Enzim glukoamilase dari kultur <i>Aspergillus niger</i>	66
b.	Analisa Sidik Ragam Aktivitas Enzim glukoamilase dari kultur <i>Aspergillus niger</i>	67
c.	Uji Lanjutan BJND Pengaruh Suhu dan Lama Pemanasan terhadap Aktivitas Enzim glukoamilase dari kultur <i>Aspergillus niger</i>	67
d.	Uji Lanjutan BJND Pengaruh Waktu Inkubasi terhadap Aktivitas Enzim glukoamilase dari kultur <i>Aspergillus niger</i>	67
e.	Uji Lanjutan BJND Analisa Pengaruh Interaksi Suhu Pemanasan dan Lama Inkubasi terhadap Aktivitas Enzim glukoamilase dari kultur <i>Aspergillus niger</i>	68

Sambungan

No.	Judul	Halaman
7.	a. Hasil Rekapitulasi Aktivitas Enzim α -amilase	68
	b. Hasil Rekapitulasi Aktivitas Enzim glukoamilase	69
8.	Rumus Perhitungan Aktivitas Enzim α -amilase	69
9.	Prosedur Pembuatan Buffer Fosfat (pH 5)	69
10.	Prosedur Pembuatan Buffer Asetat (pH 5.5)	70
11.	Prosedur Pembuatan Larutan Lugol.....	70
12.	Gambar Kulit Kakao Basah dan Kulit Kakao Kering	70
13.	Larutan Mineral.....	71
14.	Penggoresan Kultur Kapang ke Media Agar Miring	71
15.	Gambar Media Pertumbuhan Kapang <i>Aspergillus oryzae</i> dan <i>Aspergillus niger</i>	71
16.	Proses Pembotolan Enzim	72

I. PENDAHULUAN

1. Latar Belakang

Prinsip fermentasi padat telah lama dikenal di Indonesia, yaitu fermentasi koji. Metode fermentasi ini banyak diterapkan dalam pembuatan makanan tradisional seperti tempe, tauco, oncom, dan sebagainya. Metode fermentasi padat dalam ilmu mikrobiologi dikenal istilah Solid State Fermentation (SSF), yaitu metode fermentasi yang dilakukan dengan menumbuhkan mikroorganisme dalam partikel substrat yang tidak larut namun memiliki kandungan air yang cukup untuk pertumbuhan mikroorganisme (Suhartono, 1989). Substrat yang digunakan dalam fermentasi padat biasanya digunakan dari limbah hasil pertanian. Hal ini karena limbah hasil pertanian mengandung nutrisi dan mampu menyerap air, untuk pertumbuhan mikroorganisme (Anonim, 2010b).

Indonesia memiliki areal perkebunan yang sangat luas. menurut data BPS Sulawesi Selatan, luas area perkebunan kakao di Sulawesi Selatan tahun 2011 yaitu 274.760 Ha. Dari hasil perkebunan kakao, yang umum digunakan adalah biji kakao, sedangkan bagian yang lainnya kurang termanfaatkan dan menjadi limbah. Limbah buah kakao yang paling banyak adalah dari kulit buah kakao, karena pada buah kakao 74%nya merupakan kulit buah kakao. Hal inilah yang menjadikan limbah kulit kakao melimpah di Sulawesi Selatan (Taufik, 1992).

Kulit buah kakao dapat dimanfaatkan sebagai media pertumbuhan mikroba dalam menghasilkan enzim. Dalam kulit buah kakao basah mengandung kadar air 84,24-86,03%; lemak kasar 0,74-1,23%; protein kasar 0,90-1,07%; gula reduksi 0,80-0,97%; tannin 0,08-0,82%; kafein 0,04-0,12%; serat kasar 0,52-4,68; abu 0,55-1,57% (Anonim, 1991). Kandungan kimia pada kulit buah kakao dapat dimanfaatkan oleh *Aspergillus oryzae* dan *Aspergillus niger* untuk memproduksi enzim (Mangasi, 1995). Pada penelitian ini kulit kakao yang digunakan adalah kulit kakao campuran dari jenis kakao Lindak dan kakao Mulia.

Selain kulit buah kakao, limbah pertanian lain yang juga dapat digunakan sebagai substrat pertumbuhan mikroba produksi enzim adalah dedak padi. Selama ini dedak padi umumnya hanya digunakan sebagai pakan ternak dan belum ada usaha pemanfaatan yang menjajikan dan memberi nilai ekonomi yang tinggi, padahal dalam dedak padi mengandung karbohidrat 46,6%, protein 14,6%, lemak 13,4%, vitamin B; thiamin 27,9%, piridoksin 32,1%, asam panthothenat 71,3% dan nisin 408,6% (Matz, 1970).

Enzim banyak digunakan dalam industri karena enzim merupakan biokatalisator, yang artinya, enzim dapat meningkatkan kecepatan reaksi kimia (Marks, 2000). Enzim juga merupakan produk yang memiliki nilai ekonomi yang tinggi. Salah satu

jenis enzim yang banyak dimanfaatkan dalam industri adalah amilase (Pandey, 2000)

Amilase banyak digunakan dalam berbagai keperluan, khususnya dalam industri pangan dan tekstil. Amilase digunakan dalam industri gula cair, pembuatan pati termodifikasi, desizing tekstil (Anonim, 2010a). Amilase terdapat pada tanaman, jaringan mamalia dan tersebar luas pada berbagai mikroba (Suhartono, 1989). Akan tetapi memproduksi enzim dengan menggunakan mikroba lebih menguntungkan dibandingkan dari sumber lainnya karena dapat menghasilkan enzim dengan cepat dan biaya produksinya lebih murah serta isolasi enzimnya pun relatif lebih mudah. Mikroba yang mampu menghasilkan amilase diantaranya adalah *Aspergillus oryzae* dan *Aspergillus niger*.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mempelajari pemanfaatan kulit buah kakao sebagai media pertumbuhan kapang *A. oryzae* dan *A. niger* untuk memproduksi enzim amilase. Selain itu, juga untuk mempelajari suhu sterilisasi media pertumbuhan kapang yang memproduksi enzim amilase dan analisa optimasi aktivitas enzim yang dihasilkan.

Rumusan masalah

Kulit buah kakao yang jumlahnya melimpah di Sulawesi Selatan adalah limbah kurang dimanfaatkan. Sejauh ini, kulit buah kakao hanya terbuang begitu saja atau hanya digunakan sebagai pupuk di area perkebunan kakao. Salah satu manfaat kulit kakao adalah untuk media atau substrat untuk memproduksi enzim amilase menggunakan mikroorganisme (*A. niger* dan *A. oryzae*) dengan sistem fermentasi padat atau Solid State Fermentation (SSF), yaitu metode fermentasi dengan kondisi substrat yang tidak larut dan tidak terdapat air bebas di sekitar permukaan media. Agar nutrisi (terutama karbon dan nitrogen) yang terdapat dalam media (kulit kakao dan dedak padi) dapat digunakan secara optimum oleh mikroba, maka perlu dilakukan perlakuan pemanasan pada substrat (kulit kakao dan dedak padi). Selain itu, mengkaji aktivitas enzim dengan mengukur penurunan berat kering kultur kapang dari setiap periode waktu inkubasi.

Tujuan Penelitian

1. Mengkaji pengaruh waktu dan suhu pemanasan media pertumbuhan (kulit kakao dan dedak padi) kultur kapang *Aspergillus niger* dan *Aspergillus oryzae* terhadap aktivitas enzim amilase yang dihasilkan.
2. Mengkaji produktivitas enzim amilase yang dihasilkan menurut waktu inkubasi kultur jamur (*Aspergillus niger* dan *Aspergillus oryzae*) yang diukur melalui hasil hidrolisis enzim amilase terhadap substratnya (pati terlarut).

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Produksi Enzim oleh Mikroba

1. Umum

Mikroorganisme (bakteri, khamir, kapang) telah lama dimanfaatkan oleh manusia mulai dari 8000 tahun yang lalu dalam pembuatan dan produksi makanan dan minuman, seperti roti, keju, bir, anggur, dsb. Mikroba mengandung kira-kira 2000-3000 jenis biokatalisator enzim yang mengkatalisis reaksi biokimiawi. Keragaman biokimiawi mikroorganisme membuat mahluk ini berpotensi sebagai sumber berbagai jenis enzim (Suhartono, 1989).

Kapang memiliki kemampuan mengurai aneka substrat organik di alam. *Amylomyces rouxii*, *Aspergillus oryzae*, *A. awamori*, *Rhizopus oryzae* merupakan penghasil α -amilase dan glukoamilase yang terbaik (Gandjar, dkk., 2006). Kemudian menurut Suhartono (1989), kapang *Aspergillus niger* dan *Aspergillus oryzae* merupakan kapang penghasil amilase, glukoamilase, protease, laktase, katalase, glukosa oksidase, lipase, selulase, hemiselulase dan pektinase.

Kapang adalah penghasil enzim yang diproduksi secara ekstraseluler (Rani, 2009). Enzim ekstraseluler merupakan enzim yang dihasilkan sel kemudian dikeluarkan melalui dinding sel ke medium sekitarnya dan bereaksi memecah bahan organik tanpa tergantung pada sel yang melepaskannya. Enzim intraseluler

dihasilkan di dalam sel yang pada bagian membran sitoplasma. Enzim tersebut melakukan metabolisme di dalam sel (Frost, 1987).

Enzim-enzim ekstraselular pada umumnya bersifat terinduksi, dimana produksinya akan meningkat jika ada substrat yang sesuai di sekelilingnya. Tanpa induksi, enzim tetap diproduksi tetapi dalam jumlah kecil. Enzim ekstraselular akan menghidrolisa makromolekul di luar sel menjadi komponen yang lebih larut, sehingga dapat diserap ke dalam sel dengan sistem transport tertentu. Komponen-komponen makromolekul tersebut pada umumnya digunakan sebagai sumber karbon dan energi (Fardiaz, 1988).

2. *Aspergillus niger*

Aspergillus niger adalah kapang anggota genus *Aspergillus*, famili Eurotiaceae, ordo Eutiales, sub-klas Plectomycetidae, kelas Ascomycetes, sub-divisi Ascomycotina dan divisi Amastigmycota (Hardjo *etal.* 1989). *A. niger* mempunyai kepala pembawa konidia yang besar yang dipak secara padat, bulat dan berwarna hitam, hitam-coklat atau ungu-coklat. Konidianya besar dan mengandung pigmen. Kebanyakan galur dalam grup ini mempunyai skleeotia yang berwarna abu-abu sampai hitam. Beberapa galur digunakan dalam produksi asam sitrat, asam glukonat dan enzim (Fardiaz, 1992).

A. niger dalam pertumbuhannya berhubungan langsung dengan zat makanan yang terdapat dalam substrat, molekul sederhana yang terdapat disekeliling hifa dapat langsung diserap sedangkan molekul yang lebih kompleks harus dipecah dahulu sebelum diserap ke dalam sel, dengan menghasilkan beberapa enzim ekstra seluler seperti protease, amilase, mananase, dan α -glaktosidase. Bahan organik dari substrat digunakan oleh *Aspergillus niger* untuk aktivitas transport molekul, pemeliharaan struktur sel, dan mobilitas sel (Rahman, 1989).

Terdapat 23 jenis enzim yang telah diidentifikasi dari *Aspergillus niger* dan 20 jenis enzim dari *Aspergillus oryzae* (Tauber, 1950). Menurut Reed (1966), enzim-enzim komersil yang dihasilkan dari *Aspergillus niger* adalah amilase, glukoamilase, selulase, pektinase, glukosa oksidase dan katalase. Beberapa jenis enzim yang telah diproduksi secara komersial dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Produksi enzim dari *Aspergillus niger* dan Aplikasinya

Enzim	Aplikasi
Amilase tahan asam	Sirup, industri fermentasi alkohol, produksi glukosa, membantu pencernaan, industri tekstil
Glukoamilase	Produksi glukosa
Protease	Industri makanan, membantu pencernaan
Glukosa oksidase	untuk menghilangkan oksigen atau glukosa dari berbagai makanan, industri telur kering
Naringinase	menghilangkan rasa pahit dan getir dalam industri sari buah jeruk

Sumber: Arima (1964)

3. *Aspergillus oryzae*

Aspergillus oryzae termasuk spesies yang penting dalam fermentasi beberapa makanan tradisional dan untuk memproduksi enzim, tetapi kapang dalam grup ini juga sering menyebabkan kerusakan makanan. *Aspergillus oryzae* digunakan dalam fermentasi tahap pertama dalam pembuatan kecap dan tauco (Fardiaz, 1992).

Aspergillus oryzae memiliki kepala konidia berbentuk bulat, berwarna hijau pucat agak kekuningan, dan bila tua menjadi coklat redup. Konidifor berbentuk berwarna hialin dengan panjang 4-5 mm, dan umumnya berdinding kasar. Vesikula berbentuk semibulat, dan berdiameter 40-80 μm . Fialid terbentuk langsung pada vesikula atau pada metula, dan berukuran (10-15) x (3-5) μm (Gandjar, *dkk.*, 1999).

Fungi memerlukan nutrient untuk pertumbuhannya. Nutrient berupa unsur-unsur atau senyawa kimia, dari lingkungan digunakan sel sebagai konstituen kimia penyusun sel. Secara umum, nutrient yang diperlukan dalam bentuk karbon, nitrogen, sulfur, kalium, magnesium, natrium, kalsium, nutrient mikro (besi, mangan, zinc, kobalt, molybdenum) dan vitamin (Gandjar, *dkk.*, 2006). *Aspergillus* dengan baik tumbuh pada suhu 35-37°C dan pada selang pH 2 - 8,5 (Frazier, 1978).

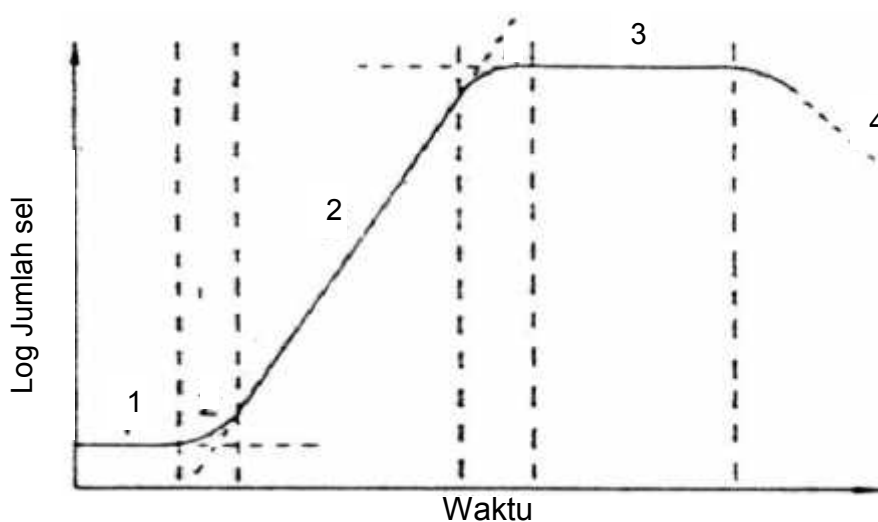
B. Media dan Lingkungan Pertumbuhan Kapang

Mikroba memerlukan nutrient dengan komposisi tertentu untuk tumbuh dan membelah diri, komposisi nutrient untuk pertumbuhan mikroba berbeda bagi mikroba yang berbeda. Untuk kapang berfilamen, rata-rata mengandung 10-25% protein, 1-3% asam nukleat, 20-50% lipida (% berat kering). Sejumlah mineral dan unsur hara terdapat di dalam tubuh mikroba untuk menjalankan fungsi khusus; K, Ca, Mg, Fe, Co, Zn dan Mo. Dengan sendirinya kandungan kimiawi ini mempengaruhi kebutuhan nutrient untuk menunjang penggandaan sel dan pertumbuhannya (Suhartono, 1989).

Substrat merupakan sumber nutrisi utama bagi fungi. Nutrien-nutrien baru dapat dimanfaatkan sesudah fungi mengekskresi enzim-enzim ekstraselular yang dapat mengurai senyawa-senyawa kompleks dari substrat tersebut menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana (Gandjar, *dkk.*, 2006).

Pertumbuhan kapang mengikuti pola pertumbuhan mikroorganisme pada umumnya, yaitu diawali dengan fase adaptasi. Pada fase adaptasi, mikroba akan menyesuaikan diri dengan kondisi lingkungan disekitarnya. Lamanya fase adaptasi dipengaruhi oleh medium dan lingkungan pertumbuhan. Jika medium dan lingkungan pertumbuhan sama seperti medium dan lingkungan sebelumnya, mungkin tidak diperlukan waktu adaptasi. Tetapi jika nutrient yang tersedia dan kondisi lingkungan yang baru berbeda dengan

sebelumnya, diperlukan waktu penyesuaian untuk mensintesa enzim-enzim. Selanjutnya yaitu fase log/pertumbuhan eksponensial, pada fase logaritmik mikroba membelah dengan cepat dan konstan dan pada fase ini kecepatan pertumbuhan sangat dipengaruhi oleh media tempat tumbuhnya seperti pH dan kandungan nutrisi, juga kondisi lingkungan termasuk suhu dan kelembaban udara. Fase stasioner, fase ini merupakan suatu keadaan seimbang antara laju pertumbuhan dengan laju kematian, sehingga jumlah keseluruhan mikroba yang hidup akan tetap. Fase kematian, pada saat medium kehabisan nutrisi maka populasi mikroba akan menurun jumlahnya, Pada saat ini jumlah sel yang mati lebih banyak daripada sel yang hidup (Fardiaz, 1988). Fase pertumbuhan mikroba dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Fase Pertumbuhan Mikroba

Keterangan:

1. Fase adaptasi
2. Fase log/ pertumbuhan eksponensial
3. Fase stasioner
4. Fase kematian

1. Kulit Buah Kakao

Kulit buah kakao (shel fod husk) merupakan limbah agroindustri yang dihasilkan tanaman kakao (*Theobroma cacao L.*). Buah coklat terdiri dari 74 % kulit buah, 2 % plasenta dan 24 % biji (Nasrullah, 1993). Persentase komposisi kimia kulit kakao pada Tabel 2 memberikan informasi bahwa kulit kakao merupakan bahan yang cukup potensial untuk dimanfaatkan (Saleh, 1998). Komposisi kimia kulit kakao basah dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Komponen Kulit Kakao Basah

Komponen	Persentase (%)
Air	57,75
Total Bahan Padatan	42,25
Protein Kasar	9,65
Substansi lemak	0,15
Abu	10,80
Ekstrak kasar	33,90
Ekstrak bebas N	42,90
Glukosa	1,16
Sukrosa	0,18
Theobromin	0,20

Sumber: Opeke (1984)

2. Dedak Padi

Dedak padi merupakan hasil ikutan penggilingan padi yang berasal dari lapisan luar beras pecah kulit dalam proses penyosohan beras. Proses pengolahan gabah menjadi beras akan menghasilkan dedak padi kira-kira sebanyak 10%, pecahan-pecahan beras atau

menir sebanyak 17%, tepung beras 3%, sekam 20% dan berasnya sendiri 50%. Persentase tersebut sangat bervariasi tergantung pada varietas dan umur padi, derajat penggilingan serta penyosohnya (Grist, 1972).

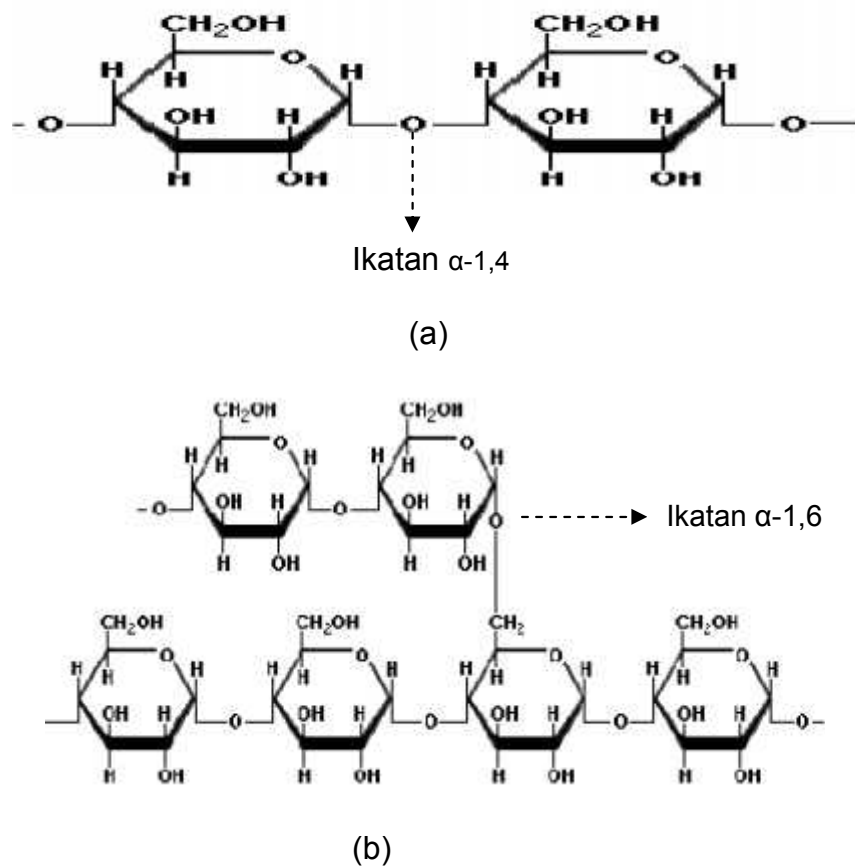
C. Amilum (Pati)

Amilum atau dalam bahasa sehari-hari disebut juga pati adalah polimer karbohidrat dengan rumus molekul $(C_6H_{10}O_5)_n$. (Poedjiadi, 1994). Pati terdiri dari dua fraksi yang dapat dipisahkan dengan air panas. Fraksi terlarut disebut amilosa dan fraksi tidak terlarut disebut amilopektin. Amilosa mempunyai struktur lurus dengan cabang ikatan α -(1,4)-D-glukosa sebanyak 4-5% dari berat total (Winarno, 2004).

Amilosa merupakan rantai lurus yang terdiri dari molekul-molekul glukosa yang berikatan α -(1,4)-D-Glukosa. Dalam larutan, rantai amilosa membentuk heliks (spiral). Bentuk cincin ini dengan enam unit atom karbon menyebabkan amilosa membentuk kompleks dengan bermacam-macam molekul kecil yang dapat masuk ke dalam lingkarannya. Warna biru tua yang diberikan pada penambahan iod merupakan contoh pembentukan kompleks tersebut (Hart, 1987).

Amilopektin adalah molekul hasil polimerisasi unit-unit glukosa anhydrous melalui ikatan α -1,4 dan α -1,6 pada setiap 20-26 unit monomer. Amilopektin juga dapat membentuk kristal, tetapi tidak

sereaktif amilosa. Hal ini terjadi karena adanya rantai percabangan yang menghalangi terbentuknya kristal. (Rapaille, 1994). Struktur molekul dari amilosa dan amilopektin dapat dilihat pada Gambar 2:



Gambar 2. Struktur Kimia (a) Amilosa (b) Amilopektin

D. Amilase

Amilase adalah kelompok enzim yang memiliki kemampuan untuk memutuskan ikatan glikosida yang terdapat pada molekul amilum. Hasil hidrolisis atau pemecahan molekul amilum ini adalah molekul-molekul yang lebih kecil seperti maltosa, dekstrin dan terutama molekul glukosa sebagai unit terkecil (Reddy *et al.*, 2003).

Amilase telah banyak dilaporkan bahwa dapat diproduksi oleh mikroorganisme. Walaupun begitu, amilase juga dapat ditemukan pada jaringan hewan dan tumbuhan. Dua kelompok utama enzim amilase yang telah diidentifikasi di dalam mikroorganisme, yaitu α -amilase dan Glukoamilase (Pandey, 2000).

Aktivitas enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya adalah, (a) suhu. Kenaikan suhu di atas suhu optimum dapat mengakibatkan peningkatan atau penurunan aktivitas enzim. Secara umum, tiap kenaikan suhu 10 derajat C, kecepatan reaksi menjadi dua kali lipat dalam batas suhu yang wajar. (b) pH/keasaman. Sebagian besar enzim dapat bekerja paling efektif pada kisaran pH lingkungan yang agak sempit. Diluar pH optimum tersebut, kenaikan atau penurunan pH menyebabkan penurunan aktivitas enzim dengan cepat. (c) Konsentrasi enzim, substrat dan kofaktor. Jika pH, suhu, dan konsentrasi enzim dalam keadaan konstan, reaksi awal hingga batas tertentu sebanding dengan substrat yang ada. Jika sistem enzim memerlukan suatu koenzim atau ion kofaktor, konsentrasi substrat dapat menentukan laju keseluruhan sistem enzim. (d) Inhibitor. Enzim dapat dihambat sementara atau tetap oleh inhibitor berupa zat kimia tertentu. Zat kimia tersebut merupakan senyawa selain substrat yang biasa terikat pada sisi aktif enzim (substrat normal) sehingga antara substrat dan inhibitor terjadi persaingan untuk mendapatkan sisi aktif. Persaingan tersebut terjadi karena inhibitor biasanya mempunyai

kemiripan kimiawi dengan substrat normal. (Shofyan, 2010). Kemudian Martin, *et.al.* (1983) juga menyatakan bahwa aktivitas enzim sangat dipengaruhi oleh lama inkubasi. Waktu inkubasi merupakan waktu yang diperlukan oleh enzim berinteraksi dengan substrat, apabila enzim telah jenuh dengan substrat maka enzim tidak akan bekerja secara optimal. Darwis, *dkk.* (1995) juga menyatakan bahwa pada awal fermentasi aktivitas enzim masih sangat rendah. Aktivitas enzim akan meningkat sejalan dengan bertambahnya waktu fermentasi dan menurun pada hari ke-10. Hal ini mengikuti pola pertumbuhan mikroorganisme yang mengalami beberapa fase pertumbuhan yaitu fase adaptasi, fase eksponensial, fase stasioner, dan fase kematian.

1. α -amilase

Enzim α -amilase terdapat pada tanaman, jaringan mamalia, dan mikroba. α -amilase murni dapat diperoleh dari berbagai sumber, misalnya dari malt, ludah manusia dan pankreas. Dapat juga diisolasi dari *Aspergillus oryzae* dan *Bacillus subtilis* (Winarno, 2004).

α -amilase merupakan enzim ekstraseluler yang memotong secara acak ikatan 1,4- α -D-glikosidik antara unit glukosa yang berdekatan dalam rantai linier amilosa. α -amilase juga termasuk endoenzim yang memotong substrat pada bagian dalam molekul dan diklasifikasikan berdasarkan sifat dan cara kerjanya (Pandey, 2000).

Secara umum α -amilase stabil pada pH 5,5-8,0. Aktivitas optimum α -amilase secara normal berada pada pH 4,8-6,5, tetapi aktivitas suhu dan pH α -amilase berbeda untuk enzim yang dihasilkan dari sumber yang berbeda (Suhartono, 1989)

Aktivitas α -amilase ditentukan dengan mengukur hasil degradasi pati, biasanya dari penurunan kadar pati yang larut atau dari kadar dekstrinnya dengan menggunakan substrat jenuh. Hilangnya substrat dapat diukur dengan pengurangan derajat pewarnaan iodium terhadap substrat. Seperti telah diketahui, pati yang mengandung amilosa bereaksi dengan iodium menghasilkan warna biru, sedang dekstrin bila bereaksi dengan iodium akan berwarna coklat. Di samping itu, keaktifan α -amilase dapat juga dinyatakan dalam berbagai cara, misalnya dengan pengukuran viskositas dan jumlah pereduksi yang terbentuk (Winarno, 2004).

Hidrolisis amilosa oleh α -amilase terjadi dua tahap. Tahap pertama adalah degradasi menjadi maltosa dan maltotriosa yang terjadi secara acak. Degradasi ini terjadi sangat cepat diikuti pula dengan menurunnya viskositas dengan cepat. Tahap kedua relatif lambat dengan pembentukan glukosa dan maltosa sebagai hasil akhir. Hidrolisis amilopektin oleh α -amilase menghasilkan glukosa, maltosa dan berbagai jenis α -limit dekstrin, yaitu oligosakarida yang terdiri dari empat atau lebih residu glukosa yang mengandung ikatan α -1,5 glikosidik (Suhartono, 1989).

2. Amiloglukosidase (glukoamilase)

Enzim glukoamilase dikenal pula dengan nama enzim glukoamilase. Enzim ini banyak diproduksi oleh genus *Aspergillus* dan *Rhizopus*, dari golongan *Aspergillus niger*, *A. awamori*, *A. phoenicus* dan *A. foetidus*. Selain dari *Aspergillus* dan *Rhizopus*, glukoamilase dihasilkan oleh hampir semua kapang (Suhartono, 1989).

Enzim glukoamilase memecah ikatan α -1,4 dalam amilosa, amilopektin dan glikogen dari ujung gula non pereduksi. Enzim ini dapat juga menghidrolisis ikatan α -1,6 meskipun pemecahan ikatan tersebut sangat lambat (Suhartono, 1989). Glukosa, maltose dan limit dekstrin merupakan produk-produk akhir aktivitas glukoamilase (Rahman, 1992).

3. Aplikasi Amilase dalam Industri

Penggunaan enzim dalam industri, khususnya dalam industri pangan dilakukan karena enzim merupakan alat yang ideal digunakan untuk memanipulasi bahan-bahan biologis. Beberapa keuntungan penggunaan enzim dalam pengolahan pangan adalah aman terhadap kesehatan karena bahan alami, mengkatalisis reaksi yang sangat spesifik tanpa efek samping, aktif pada konsentrasi yang rendah, dapat diinaktivasi, dan dapat digunakan sebagai indikator kesesuaian proses pengolahan (Anonim, 2011).

Dalam industri pangan, enzim α -amilase berfungsi menyediakan gula hidrolisis pati sehingga dapat dimanfaatkan untuk produksi sirup glukosa ataupun sirup fruktosa yang mempunyai tingkat kemanisan tinggi, pembuatan roti, dan makanan bayi. Di industri tekstil enzim α -amilase digunakan untuk membantu dalam proses penghilangan pati, yang digunakan sebagai perekat untuk melindungi benang saat ditenun agar lentur (Setiasih, 2006).

E. Fermentasi Media Padat (Solid State Fermentation)

Fermentasi media padat adalah fermentasi yang substratnya tidak larut dan tidak mengandung air bebas tetapi cukup mengandung air untuk keperluan mikroba. Media berfungsi sebagai sumber karbon, nitrogen maupun sumber energi (Taufik, 1992).

Media fermentasi biasanya diberi perlakuan fisik berupa pemanasan (pemasakan, perebusan) dan perendaman. Perlakuan fisik ini menyebabkan media terdegradasi sehingga memudahkan untuk dicerna oleh mikroorganisme. Pemanasan akan memutus ikatan kimia yang terdapat dalam media, tetapi komposisi kimianya tidak berubah (Nathalia, 2011).

Fermentasi padat di dalam produksi enzim umumnya memberikan hasil yang baik karena jumlah substrat yang tersediapakan lebih banyak (20-50% padatan). Selain lebih banyak, enzim yang dihasilkan biasanya beragam. Cara fermentasi padat disukai untuk menghasilkan berbagai enzim ekstraseluler. Sehingga dengan adanya

hasil enzim campuran, perlu diperhatikan kemungkinan dari penghambatan sintesis enzim tertentu oleh produk enzim yang telah terakumulasi. Masa siklus bagi tiap-tiap organisme berlainan satu dengan yang lain. Ada yang beberapa hari dan adapula yang sampai seminggu. Siklus ini masih dipengaruhi lagi oleh ketersediaan nutrient. Produksi enzim umumnya optimum pada fase logaritmik, stasioner, atau fase penurunan. Umumnya fermentasi media padat dalam menghasilkan enzim membutuhkan waktu yang lebih lama dibandingkan dengan fermentasi media cair. Jenis enzim dan mikroba menentukan waktu optimal proses fermentasi. Organisme pembentuk spora biasanya memproduksi enzim pasca eksponensial. Mutan spora bagi organisme tersebut dapat digunakan di dalam fermentasi, untuk mengurangi kemungkinan terhambatnya produksi enzim oleh sporulasi (Suhartono, 1989).

F. Berat Kering

Berat bahan kering adalah berat bahan setelah mengalami pemanasan beberapa waktu tertentu sehingga beratnya tetap (konstan). Bahan kering suatu bahan dapat diketahui dengan memanaskan bahan tersebut di dalam oven pada suhu 105 °C, air yang terkandung seluruhnya akan menguap, Berat yang hilang merupakan berat air dan yang tersisa adalah berat bahan kering (Ginting, 2001).

Kehilangan bahan kering pada proses fermentasi terjadi karena proses konversi bahan oleh aktivitas kapang untuk pertumbuhannya, bahan kering yang dikonversi oleh kapang menjadi energi dan hasil lainnya berupa CO₂ dan H₂O (Mirwandhono, 2004).