

**KARAKTERISASI DAN UJI AKTIVITAS ENZIM KAPANG  
SELULOLITIK DARI LIMBAH SERBUK GERGAJI**

**TESIS**

**Oleh :  
RIZAL MUHAMMAD  
NIM. 220602210012**



**PROGRAM STUDI MAGISTER BIOLOGI  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM  
MALANG  
2024**

**KARAKTERISASI DAN UJI AKTIVITAS ENZIM KAPANG  
SELULOLITIK DARI LIMBAH SERBUK GERGAJI**

**TESIS**

**Oleh :  
RIZAL MUHAMMAD  
NIM. 220602210012**

**diajukan Kepada:  
Fakultas Sains dan Teknologi  
Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang  
untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam  
Memperoleh Gelar Magister Sains (M.Si)**

**PROGRAM STUDI MAGISTER BIOLOGI  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM  
MALANG  
2024**

**KARAKTERISASI DAN UJI AKTIVITAS ENZIM KAPANG  
SELULOLITIK DARI LIMBAH SERBUK GERGAJI**

**TESIS**

**Oleh:  
RIZAL MUHAMMAD  
NIM. 220602210012**

**Telah diperiksa dan disetujui untuk diuji  
tanggal:**

**Pembimbing I**



**Dr. Evika Sandi Savitri, M.P.**  
NIP. 19741018 200312 2 002

**Pembimbing II**



**Prof. Dr. Bayyinatul Muchtaromah M.Si.**  
NIP. 19710910200003 2 001

**Mengetahui,  
Ketua Program Studi Magister Biologi**



**Prof. Dr. Bayyinatul Muchtaromah M.Si.**  
NIP. 19710910200003 2 001

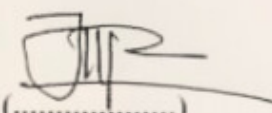

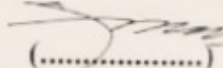

**KARAKTERISASI DAN UJI AKTIVITAS ENZIM KAPANG  
SELULOLITIK DARI LIMBAH SERBUK GERGAJI**

**TESIS**

**Oleh:  
RIZAL MUHAMMAD  
NIM. 220602210012**

**Telah dipertahankan  
di depan Dewan Penguji Tesis dan dinyatakan diterima sebagai salah satu  
persyaratan untuk memperoleh gelar Magister Sains (M.Si.)  
Tanggal:**

**telah diperiksa dan disetujui untuk diuji  
tanggal:**

|                           |          |   |  |
|---------------------------|----------|---|--|
| <b>Penguji Utama</b>      | <b>:</b> | <b>Prof. Dr. Ulfa Utami, M.Si<br/>NIP. 19650509 199903 2 002</b>                    | <br>(.....) |
| <b>Ketua Penguji</b>      | <b>:</b> | <b>Dr. Akyunul Jannah, M.Si.<br/>NIP. 19750410 200501 2 009</b>                     | <br>(.....) |
| <b>Sekretaris Penguji</b> | <b>:</b> | <b>Dr. Evika Sandi Savitri, M.P.<br/>NIP. 19741018 200312 2 002</b>                 | <br>(.....) |
| <b>Anggota Penguji</b>    | <b>:</b> | <b>Prof. Dr. Bayyinatul Muchtaromah M.Si. (.....)<br/>NIP. 19710910200003 2 001</b> | <br>(.....) |

**Mengesahkan,  
Ketua Program Studi Magister Biologi**



**Prof. Dr. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si.  
NIP. 19710910200003 2 001**

## PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Rizal Muhammad  
NIM : 20602210012  
Program Studi : Magister Biologi  
Fakultas : Sains dan Teknologi  
Judul Penelitian : Karakterisasi dan Uji Aktivitas Enzim Kapang  
Selulolitik dari Limbah Serbuk Gergaji

menyatakan dengan sebenarnya bahwa tesis yang saya tulis ini benar-banar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan tesis ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi akademik maupun hukum atas perbuatan tersebut.

Malang, 29 Juli 2024  
Yang membuat pernyataan,



Rizal Muhammad  
NIM. 20602210012

## **PEDOMAN PENGGUNAAN TESIS**

Tesis ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar Pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.

# Karakterisasi dan Uji Aktivitas Enzim Kapang Selulolitik dari Limbah Serbuk Gergaji

Rizal Muhammad, Evika Sandi Savitri, Bayyinatul Muchtaromah

Program Studi Magister Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi,  
Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang

## ABSTRAK

Kapang selulolitik sebagai mikroorganisme penghasil enzim selulase, dapat ditemukan pada substrat dengan kandungan selulosa tinggi. Limbah serbuk gergaji merupakan limbah organik yang memiliki kandungan selulosa signifikan (40% pada kayu lunak dan 43-47% pada kayu keras). Limbah ini sering ditemukan di pabrik pemotongan kayu dan dapat terakumulasi dalam jangka waktu lama, memungkinkan terjadinya mutasi dan transfer genetik pada mikroorganisme yang hidup di dalamnya. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi, mengkarakterisasi, dan menguji aktivitas selulolitik kapang dari limbah serbuk gergaji yang telah terakumulasi selama bertahun-tahun di pabrik pemotongan kayu. Penelitian eksploratif ini menggunakan teknik pengenceran serial dan penanaman pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA) untuk isolasi kapang. Karakterisasi kapang dilakukan secara makroskopik pada media PDA dan mikroskopik menggunakan mikroskop cahaya. *Carboxymethyl Cellulose* (CMC) *plate assay* digunakan untuk mengamati zona bening yang dihitung sebagai Indeks Selulolitik (IS). Karakterisasi molekuler (gen ITS) dilakukan pada tiga spesies dengan IS tertinggi. Uji aktivitas selulolitik dilaksanakan menggunakan metode CMCase dan FPase berdasarkan kadar gula reduksi yang dihasilkan. Diperoleh tujuh kapang limbah serbuk gergaji. Empat kapang menunjukkan potensi selulolitik yakni LSG-3 (IS 1,00), LSG-5 (IS 1,32), LSG-6 (IS 0,92), dan LSG-7 (IS 0,5). Identifikasi molekuler mengungkapkan bahwa LSG-3 adalah *Aspergillus niger* (100% *identity*), LSG-5 adalah *Trichoderma harzianum* (99,83% *identity*), dan LSG-6 adalah *Rhizopus arrhizus* (99,83% *identity*). Kapang dengan kemampuan selulolitik terbaik secara berturut-turut adalah LSG-3 (0,11 U/mL), LSG-5 (0,10 U/mL), dan LSG-6 (0,09 U/mL).

Kata kunci : *Enzim industri, resiudi organik, limbah serbuk gergaji*

# Characterization and Testing of Cellulolytic Mold Enzyme Activity from Sawdust Waste

Rizal Muhammad, Evika Sandi Savitri, Bayyinatul Muchtaromah

Master of Biology Study Program, Faculty of Science and  
Technology, Maulana Malik Ibrahim State Islamic University  
Malang

## ABSTRACT

Cellulolytic molds, as cellulase enzyme-producing microorganisms, can be found on substrates with high cellulose content. Sawdust waste is organic waste that has a significant cellulose content (40% in softwood and 43-47% in hardwood). This waste is often found in wood cutting plants and can accumulate over a long period of time, allowing mutations and genetic transfer to occur in the microorganisms that live in it. This study aims to isolate, characterize, and test the cellulolytic activity of mold from sawdust waste that has accumulated over many years in wood cutting plants. This exploratory research uses serial dilution techniques and planting on Potato Dextrose Agar (PDA) media for mold isolation. Mold characterization was carried out macroscopically on PDA media and microscopically using a light microscope. Carboxymethyl Cellulose (CMC) plate assay is used to observe clear zones that are calculated as the Cellulose Index (IS). Molecular characterization (ITS gene) was carried out in three species with the highest IS. The cellulolytic activity test was carried out using the CMCase and FPase methods based on the reduced sugar content produced. Seven sawdust waste molds were obtained. Four molds showed cellulolytic potential, namely LSG-3 (IS 1.00), LSG-5 (IS 1.32), LSG-6 (IS 0.92), and LSG-7 (IS 0.5). Molecular identification revealed that LSG-3 was *Aspergillus niger* (100% identity), LSG-5 was *Trichoderma harzianum* (99.83% identity), and LSG-6 was *Rhizopus arrhizus* (99.83% identity). The molds with the best cellulolytic ability were LSG-3 (0.11 U/mL), LSG-5 (0.10 U/mL), and LSG-6 (0.09 U/mL) respectively.

Keywords: *industrial enzymes, organic wastes, sawdust waste*



## توصيف واختبار نشاط إنزيم العفن الخلوي من نفايات نشارة الخشب

ريزال محمد ، إفيكا ساندي سافيتري ، باييناتول موشتاروما

برنامج دراسة ماجستير في علم الأحياء ، كلية العلوم والتكنولوجيا ، جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج

### ملخص البحث

يمكن العثور على قوالب السليلوزية ، مثل الكائنات الحية الدقيقة المنتجة لإنزيم السليلولاز ، على ركانز تحتوي على نسبة عالية من السليلوز. نفايات نشارة الخشب هي نفايات عضوية تحتوي على نسبة كبيرة من السليلوز (40% في الخشب اللين و 43-47% في الخشب الصلب). غالبا ما توجد هذه النفايات في مصانع قطع الأخشاب ويمكن أن تتراكم على مدى فترة طويلة من الزمن ، مما يسمح بحدوث طفرات ونقل جيني في الكائنات الحية الدقيقة التي تعيش فيها. تهدف هذه الدراسة إلى عزل وتوصيف واختبار النشاط السليلولي للعفن من نفايات نشارة الخشب التي تراكمت على مدى سنوات عديدة في مصانع قطع الأخشاب. يستخدم هذا البحث الاستكشافي تقنيات التخفيف التسلسلي والغرس على وسائط أجار سكر العنب (PDA) لعزل العفن. تم إجراء توصيف العفن العياني على وسائط المساعد الرقمي الشخصي والمجهري باستخدام المجهر الضوئي. يستخدم فحص لوحة كربوكسي ميثيل السليلوز (CMC) لمراقبة المناطق الواضحة التي يتم حسابها على أنها مؤشر السليلوز (IS). تم إجراء التوصيف الجزيئي (جين ITS) في ثلاثة أنواع ذات أعلى IS. تم إجراء اختبار النشاط الخلوي باستخدام طرق CMC و FPase بناء على محتوى السكر المنخفض المنتج. تم الحصول على سبعة قوالب نفايات نشارة الخشب. أظهرت أربعة قوالب إمكانات تحلل الخلايا ، وهي LSG-3 (IS 1.00) و LSG-5 (IS 1.32) و LSG-6 (IS 0.92) و LSG-7 (IS 0.5). كشف التحديد الجزيئي أن LSG-3 كان *Aspergillus niger* (هوية 100%) ، وكان LSG-5 هو *Trichoderma harzianum* (هوية 99.83%) ، و LSG-6 كان *Rhizopus arrhizus* (هوية 99.83%). كانت القوالب ذات أفضل قدرة على تحلل السليلوليك هي LSG-3 (0.11 وحدة / مل) ، LSG-5 (0.10 وحدة / مل) ، و LSG-6 (0.09 وحدة / مل) على التوالي.

الكلمات المفتاحية: الإنزيمات الصناعية ، الوصفات العضوية ، نفايات نشارة الخشب

## KATA PENGANTAR

*Assalamualaikum Wr. Wb.*

*Bismillahirrohmaanirrohiim*, segala puji bagi Allah Swt. Tuhan semesta alam karena atas berkat dan rahmat-Nya penulis dapat menyelesaikan tugas akhir ini yang berjudul “Karakterisasi dan Uji Aktivitas Enzim Kapang Selulolitik dari Limbah Serbuk Gergaji”. Tidak lupa pula shalawat dan salam disampaikan kepada junjungan Nabi besar Muhammad Saw. yang telah menegakkan agama Islam yang terpatri hingga akhiruz zaman. Aamiin.

Berkat bimbingan dan dorongan dari berbagai pihak maka penulis mengucapkan terima kasih yang tak terkira khususnya kepada:

1. Prof. Dr. H. M. Zainuddin, M.A. selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Prof. Dr. Sri Hariani, M.Si. selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Prof. Dr. drh. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si. selaku Ketua Program Studi Magister Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Dr. Evika Sandi Savitri, M.P. dan Prof. Dr. drh. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si. selaku pembimbing I dan II, yang telah membimbing penulis dengan penuh kesabaran dan keikhlasan dalam meluangkan waktu untuk membimbing penulis sehingga tugas akhir ini dapat terselesaikan.
5. Dr. Eko Budi Minarno, M.Pd. selaku Dosen wali, yang telah membimbing dan memberikan masukan sehingga penulis dapat menyelesaikan studi dengan baik.
6. Seluruh dosen dan laboran di Program Studi Magister Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang yang setia menemani penulis dalam melakukan penelitian di laboratorium tersebut.
7. Ayah dan Ibuku dan keluarga tercinta yang telah memberikan Doa, dukungan serta motivasi kepada penulis.
8. Teman-teman seperjuangan keluarga biologi dan teman-teman seperjuangan di laboratorium mikrobiologi.
9. Teman-teman yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan penelitian khususnya Darul Huddi, M. Ainur Ridho, dan Dewi Muna Larasati.

Semoga amal baik yang telah diberikan kepada penulis mendapat balasan dari Allah SWT. Skripsi ini sudah ditulis secara cermat dan sebaik-baiknya, namun apabila ada kekurangan, saran dan kritik yang membangun sangat penulis harapkan.

*Wassalamu'alaikum Wr. Wb.*

Malang 29 Juli 2024

Penulis

## DAFTAR ISI

|  |      |
|--|------|
| HALAMAN JUDUL .....                      | i    |
| HALAMAN PERSETUJUAN .....                | ii   |
| HALAMAN PENGESAHAN .....                 | iii  |
| HALAMAN PERSEMBAHAN .....                | iv   |
| HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN..... | v    |
| HALAMAN PEDOMAN PENGGUNAAN TESIS.....    | vi   |
| ABSTRAK.....                             | vii  |
| ABSTRACT .....                           | viii |
| ملخص البحث.....                          | ix   |
| KATA PENGANTAR .....                     | x    |
| DAFTAR ISI .....                         | xi   |
| DAFTAR TABEL .....                       | xiii |
| DAFTAR GAMBAR.....                       | xiv  |
| DAFTAR LAMPIRAN .....                    | xv   |
| DAFTAR SINGKATAN .....                   | xvi  |

### BAB I PENDAHULUAN

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| 1. 1 Latar Belakang .....     | 1 |
| 1. 2 Rumusan Masalah.....     | 7 |
| 1. 3 Tujuan .....             | 7 |
| 1. 4 Manfaat Penelitian ..... | 8 |
| 1. 5 Batasan Masalah .....    | 8 |

### BAB II TINJAUAN PUSTAKA

|   |    |
|---|----|
| 2. 1 Enzim Selulase.....                            | 10 |
| 2. 2 Kapang Selulolitik .....                       | 12 |
| 2. 4 Identifikasi Kapang.....                       | 16 |
| 2. 5 Produksi Enzim Selulase Metode SmF.....        | 23 |
| 2. 6 Pengukuran kadar gula reduksi metode DNS ..... | 24 |
| 2. 7 Selulosa .....                                 | 25 |
| 2. 8 Limbah Kayu .....                              | 30 |
| 2. 9 Kerangka konseptual dan teori .....            | 32 |

### BAB III METODE PENELITIAN

|                             |    |
|-----------------------------|----|
| 3. 1 Jenis Penelitian ..... | 35 |
|-----------------------------|----|

|  |           |
|--|-----------|
| 3. 2 Waktu dan Tempat.....   | 35        |
| 3. 3 Alat dan Bahan .....  | 35        |
| 3. 4 Prosedur Penelitian .....   | 36        |
| 3. 5 Analisis Data.....  | 44        |
| <b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN</b>   |           |
| 4.1 Karakteristik kapang limbah serbuk gergaji.....                        | 45        |
| 4.2 Aktivitas selulolitik kapang limbah serbuk gergaji.....                | 59        |
| 4.3 Kapang limbah serbuk gergaji dengan aktivitas selulolitik terbaik..... | 69        |
| <b>BAB V PENUTUP</b>   |           |
| 5.1 Kesimpulan.....  | 69        |
| 5.2 Saran.....   | 71        |
| <b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>   | <b>70</b> |
| <b>LAMPIRAN.....</b>   | <b>75</b> |

## DAFTAR TABEL

| Tabel  | Halaman |
|--|---------|
| Tabel 4. 1 Karakteristik makroskopik kapang limbah serbuk gergaji .....  | 45      |
| Tabel 4. 2 Karakteristik mikroskopik kapang limbah serbuk gergaji .....  | 46      |
| Tabel 4. 3 Identifikasi sequeence gen ITS 4 menggunakan BLAST NCBI ..... | 55      |

## DAFTAR GAMBAR

| Gambar   | Halaman |
|--|---------|
| Gambar 2. 1 Proses degradasi oleh enzim selulase .....                     | 12      |
| Gambar 2. 2 Daerah ITS pada rDNA. ....                                     | 18      |
| Gambar 2. 3 Selulosa pada dinding sel tumbuhan.....                        | 26      |
| Gambar 2. 4 Sumber selulosa alami .....                                    | 27      |
| Gambar 2. 5 Skema struktur kayu dari pohon hingga molekul selulosa .....   | 28      |
| Gambar 2. 6 Struktur selulosa .....  | 29      |
| Gambar 2. 7 Ilustrasi skema struktur mikro serat selulosa.....             | 29      |
| Gambar 2. 8 Kerangka konseptual.....                                       | 32      |
| Gambar 3. 2 Pengukuran zona bening.....                                    | 38      |
| Gambar 4. 1 Gambar kapang LSG-1.....                                       | 47      |
| Gambar 4. 2 Gambar kapang LSG-2 .....                                      | 49      |
| Gambar 4. 3 Gambar kapang LSG-3 .....                                      | 50      |
| Gambar 4. 4 Gambar kapang LSG-4 .....                                      | 51      |
| Gambar 4. 5 Gambar kapang LSG-5 .....                                      | 52      |
| Gambar 4. 6 Gambar kapang LSG-6 .....                                      | 53      |
| Gambar 4. 7 Gambar kapang LSG-7 .....                                      | 54      |
| Gambar 4. 8 Pohon Filogenetik Kapang Limbah Serbuk Gergaji LSG 3 .....     | 56      |
| Gambar 4. 9 Pohon Filogenetik Kapang Limbah Serbuk Gergaji LSG 5 .....     | 57      |
| Gambar 4.10 Pohon Filogenetik Kapang Limbah Serbuk Gergaji LSG 6 .....     | 58      |
| Gambar 4. 11 Isolat kapang yang menampilkan zona bening .....              | 59      |
| Gambar 4. 12 Indeks selulolitik kapang limbah serbuk gergaji .....         | 60      |
| Gambar 4. 13 Grafik kadar gula reduksi kapang LSG-3 metode CMCase .....    | 62      |
| Gambar 4. 14 Grafik kadar gula reduksi kapang LSG-3 metode FPase.....      | 63      |
| Gambar 4. 15 Grafik kadar gula reduksi kapang LSG-5 metode CMCase .....    | 64      |
| Gambar 4. 16 Grafik kadar gula reduksi kapang LSG-5 metode FPase.....      | 65      |
| Gambar 4. 17 Grafik kadar gula reduksi kapang LSG-6 metode CMCase .....    | 66      |
| Gambar 4. 18 Grafik kadar gula reduksi kapang LSG-6 metode FPase.....      | 67      |
| Gambar 4. 19 Aktivitas Enzim Selulolitik Kapang Limbah Serbuk Gergaji..... | 68      |

## DAFTAR LAMPIRAN

|  |    |
|--|----|
| 1. Karakteristik kapang secara makroskopik dan mikroskopik ..... | 76 |
| 2. Hasil uji biokimia kapang .....                               | 78 |
| 3. Hasil visualisasi elektroforesis.....                         | 80 |
| 4. Kurva standar.....  | 81 |

## DAFTAR SINGKATAN

| Simbol/Singkat | Keterangan                               |
|----------------|--|
| IS             | Indeks selulolitik                       |
| CMC            | <i>Carboxymethyl cellulose</i>           |
| FP             | <i>Filter paper</i>                      |
| PDA            | <i>Potato Dextrose Agar</i>              |
| LPCB           | <i>Lactophenol Cotton Blue</i>           |
| CFW            | <i>Calcofluor White</i>                  |
| ITS            | <i>Internal Transcribed Spacer</i>       |
| PCR            | <i>Polymerase Chain Reaction</i>         |
| ddNTP          | <i>dideoksinukleotida trifosfat</i>      |
| CRL            | <i>Contiguous Read Length</i>            |
| BLAST          | <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> |
| SmF            | <i>Submerged Fermentation</i>            |
| LAF            | <i>laminar air flow</i>                  |
| μl             | Mikroliter                               |
| rpm            | Rotation per minute                      |
| PCR            | Polymerase Chain Reaction                |
| MEGA           | Molecular Evolutionary Genetics Analysis |
| pH             | power of Hydrogen                        |
| DNS            | 3,5-Dinitrosalicylic acid                |
| g              | Gram                                     |
| L              | Liter                                    |



# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Enzim merupakan makromolekul berupa protein majemuk yang berperan sebagai biokatalisator untuk membantu reaksi kimia dalam metabolisme organisme (Wibowo *et al.*, 2021). Dengan kemampuan tersebut enzim mulai diteliti dan diisolasi, kemudian dimanfaatkan secara ekstraseluler. Pemanfaatan enzim secara ekstraseluler sebagai biokatalisator menjadikan enzim dapat diaplikasikan dalam reaksi kimia untuk kebutuhan tertentu sesuai dengan kemampuan enzim tersebut. Dalam membantu reaksi kimia, enzim sangat efisien karena mampu mempercepat laju reaksi kimia sebesar 100 juta hingga 10 miliar kali lebih cepat bila dibandingkan dengan reaksi kimia normal (Gurung *et al.*, 2013).

Enzim sebagai biokatalisator memiliki beberapa kelebihan jika dibandingkan dengan penggunaan katalis sintetik terutama pada sifat enzim yang ramah lingkungan, karena sebagai katalisator alami enzim mudah terurai sehingga tidak menimbulkan residu berbahaya bagi lingkungan. Selain itu enzim memiliki selektivitas yang sangat tinggi secara kimia (kemoselektif), regioselektif (posisi gugus fungsional pada molekul), dan stereoselektif (konfigurasi ruang molekul) sehingga tidak bereaksi pada molekul yang tidak diinginkan.

Enzim juga memiliki kondisi reaksi yang ringan yakni pada suhu berkisar 37°C pada tekanan 1 atm dan kisaran pH 7,0 (Stanley M. *et al.*, 1995). Kelebihan tersebut menjadikan enzim sebagai katalis yang sangat potensial untuk dimanfaatkan dalam sektor industri karena dapat menyebabkan pengurangan biaya

operasional dari mitigasi timbulan limbah, penyederhanaan jalur produksi dan energi yang dibutuhkan (Chapman ., 2018).

Penggunaan enzim secara sistematis dalam industri baru dimulai pada abad ke-19, yakni setelah Louis Pasteur membuktikan bahwa fermentasi adalah proses yang dikatalisasi oleh enzim (El-Mansi *et al.*, 2018). Kemudian Eduard Buchner yang berhasil memisahkan enzim zimase dari sel ragi yang mendemonstrasikan bahwa enzim dapat bekerja di luar sel (Bhatt. S, 2022). Penemuan-penemuan ini membuka jalan bagi penelitian dan pengembangan enzim untuk aplikasi industri. Kemudian pada abad ke-20, penelitian dan pengembangan enzim terus berkembang pesat, didorong oleh kemajuan dalam biokimia dan mikrobiologi. Hal ini memungkinkan pengembangan enzim untuk aplikasi industri (Yamaguchi, 2017).

Industri makanan, minuman dan industri kimia telah menempati posisi kedua dan ketiga sektor industri terbesar pada buku tahunan *industrial statistic* PBB (Perserikatan Bangsa-bangsa) (UNIDO, 2023). Posisi tersebut menggambarkan potensi besar enzim dalam pasar global. Hal ini berkaitan dengan kebutuhan industri tersebut pada enzim sebagai peningkat kualitas produknya maupun menjadi bagian dari rangkaian proses utama dalam produknya. Disebutkan dalam Maghraby *et al.*, (2023) terdapat empat enzim yang banyak digunakan dalam sektor industri salah satunya yakni enzim selulase.

Enzim selulase merupakan enzim yang banyak digunakan dalam industri terutama sektor industri makanan, minuman dan kimia (Putrika *et al.*, 2023). Enzim ini dalam pasar global memiliki pasar yang sangat luas, Ilić *et al.*, (2023) melaporkan pada tahun 2022 pasar enzim ini mencapai 1621 juta dolar amerika (USD) dan diperkirakan akan meningkat 3153,1 USD pada tahun 2032. Salah satu

penyebab kenaikan pangsa pasar enzim selulase global adalah berkembangnya industri bioetanol sebagai energi terbarukan, karena enzim selulase memainkan peran penting dalam produksi bioetanol yang berimbas pada meningkatnya permintaan enzim selulase seiring berkembangnya industri tersebut (Ilić *et al.*, 2023).

Penggunaan enzim dinilai lebih ramah lingkungan bila dibandingkan dengan penggunaan senyawa lain mengingat pada sifat *biodegradable* enzim. Perkembangan industri bioetanol juga tidak luput dari kampanye perserikatan bangsa-bangsa yang terus menyuarakan *Clean energy* dan *Climate action* (UN, 2023). Dengan demikian industri bioetanol enzim selulase memiliki peluang besar secara global untuk diproduksi secara komersil.

Peluang besar pasar enzim selulase secara global membuka peluang bagi negara Indonesia untuk berpartisipasi. 6Wresearch (2023) melaporkan bahwa penguasa pasar enzim di Indonesia dipegang oleh tiga perusahaan besar yang berasal dari luar negeri. Hal ini menandakan kurangnya peran Indonesia dalam sektor tersebut. Sehingga dirasa sangat penting untuk dilakukan pengembangan produksi enzim di Indonesia terutama enzim selulase yang telah memiliki peluang besar dalam pasar global.

Enzim selulase dapat diproduksi oleh berbagai jenis mikroorganisme, termasuk bakteri, *fungi* (jamur), dan beberapa *Archaea*. Spesies bakteri yang dikenal menghasilkan selulase yakni *Fibrobacter succinogenes*, *Fusicoccum* sp, dan *Rhodothermus marinus* sedangkan beberapa spesies jamur yang telah diteliti untuk produksi selulase meliputi *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Colletotrichum*, dan *Fusarium*. Selain itu, beberapa *Archaea* juga telah diteliti untuk kemampuan

produksi selulase. Mikroorganisme-mikroorganisme ini memiliki kemampuan untuk menghasilkan berbagai jenis selulase dengan sifat-sifat yang bervariasi, seperti kestabilan terhadap suhu tinggi, pH ekstrim, dan salinitas tinggi, yang membuat mereka potensial untuk aplikasi industri (Thapa *et al.*, 2020).

Mikroorganisme yang mampu memproduksi selulase memiliki kelebihan dan kekurangan yang terus dipelajari. Bakteri dilaporkan memiliki keunggulan tingkat pertumbuhan yang lebih tinggi dibandingkan mikroorganisme lain sehingga dapat memproduksi selulase lebih cepat, selain itu juga lebih banyak beradaptasi dengan lingkungan yang ekstrim, bakteri juga menghasilkan enzim yang kurang terhambat oleh bahan terhidrolisis (Wijayanti *et al.*, 2020).

Sedangkan pada jamur aktivitas eksoglukanasenya menjadi kelebihan yang tidak dimiliki mikroorganisme lain, kemudian jamur memiliki keragaman genetik yang lebih tinggi, memungkinkan mereka menghasilkan berbagai jenis enzim selulase dengan fungsi dan spesifisitas berbeda. Jamur juga memiliki sistem sekretori yang lebih efisien, memungkinkan mereka mengeluarkan enzim selulase ke luar sel dengan lebih mudah dan dalam jumlah yang lebih banyak. Sedangkan bakteri mengeluarkan enzim selulase ke dalam ruang periplasma, membatasi jumlah enzim yang dapat diakses substrat. (Wang *et al.*, 2020).

Jamur dipelajari secara ekstensif diantara organisme lain karena memiliki hifa memanjang yang menghasilkan tekanan mekanis pada struktur selulosa, yang menyebabkan mereka memasok selulase dalam jumlah besar (Imran *et al.*, 2016). Jamur dengan struktur hifa dikenal sebagai kapang (Fitria *et al.*, 2008) sehingga penelitian ini berfokus pada jamur dengan filamen atau kapang untuk menyelidiki organisme penghasil enzim selulase.

Kapang dapat diisolasi dari berbagai macam lingkungan lebih spesifiknya lingkungan yang menyediakan nutrisi-nutrisi bagi pertumbuhan kapang. Lingkungan dengan residu organik dianggap sebagai habitat utama mikroorganisme (Freitas *et al.*, 2019). Maka lingkungan dengan residu organik menjadi tempat yang tepat untuk mengisolasi kapang, salah satu tempat yang potensial dengan residu organik yang mengandung selulosa tinggi adalah limbah serbuk gergaji pabrik kayu.

Pabrik kayu adalah tempat pemrosesan kayu dari mentah menjadi kayu yang siap pakai dengan ukuran dan bentuk sesuai kebutuhan. Pemrosesan kayu menjadi siap pakai melibatkan proses-proses pemotongan yang diatur sesuai tujuan penggunaan, pada pemrosesan kayu menjadi siap pakai terdapat beberapa limbah diantaranya adalah kulit kayu, bagian pinggir kayu, dan serbuk gergaji kayu. Pabrik kayu kebanyakan memiliki tempat tersendiri untuk menyimpan limbah produksinya. Tempat penyimpanan tersebut merupakan akumulasi residu organik yang memiliki kandungan selulosa, sehingga limbah tersebut sangat potensial untuk memperoleh mikroorganisme pendegradasi selulosa (Gbenro *et al.*, 2019).

Penelitian tentang isolasi kapang selulolitik beberapa kali telah dilakukan. (Oduwobi, 2023) mengisolasi kapang selulolitik dari pabrik kayu Gbogidi, Ilaro, Negara Bagian Ogun ditemukan tiga kapang dengan potensi yang baik dalam mengurai selulosa yakni *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* dan *Malassezia globosa*. Akpomie *et al.*, (2021) juga telah mengisolasi kapang selulolitik dari pabrik kayu di kawasan industri Nigeria yakni *Aspergillus flavus*, *Blakeslea* sp., dan *Trichoderma asperellum*. Kemudian Jumare *et al.*, (2022) mengisolasi kapang dari serbuk gergaji dan serpihan kayu dari pabrik kayu Shehu Wunbi, Negara Bagian

Sokoto, Nigeria ditemukan *Mucor* sp, dan *Rhizopus* sp,. Pabbathi *et al.*, (2020) dalam penelitiannya pada pabrik kayu yang berumur lima puluh tahun, terdapat 85% spesies mikroorganisme yang belum terklasifikasi dan diprediksi berpotensi menghasilkan gen-gen baru, disebabkan pertukaran genetik, tekanan seleksi maupun evolusi jangka panjang mikroorganisme.

Selain itu keragaman kayu yang diproses dalam pabrik juga memungkinkan berkumpulnya mikroorganisme berbagai jenis kayu dari berbagai tempat kayu tersebut ditebang mengingat mikroorganisme dapat hidup secara epifit dan endofit pada tanaman (Seddouk *et al.*, 2022); (Yadav *et al.*, 2022). Hasil isolasi dari limbah serbuk gergaji dibuktikan oleh Cyrus & Juwon, (2015) diperoleh kapang yang lebih banyak dari isolasi dari limbah pertanian. Dengan demikian maka isolasi kapang dari serbuk gergaji memiliki potensi yang besar. Sehingga dalam penelitian limbah pabrik kayu menjadi tempat untuk mengisolasi kapang dengan potensi penghasil enzim selulase.

Penelitian kapang pengurai selulosa dari serbuk gergaji pabrik kayu penting untuk dilakukan guna mengungkap potensi-potensi kapang dengan kemampuan mengurai selulosa. Dengan demikian sebagai khalifah di muka bumi maka meneliti kapang selulolitik menjadi bentuk usaha dalam merepresentasikan makna *Ulul Al-bab* yang difirmankan Allah SWT dalam Al-Qur'an surat Ali Imran ayat 190-191 yakni :

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَاخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ لَآيَاتٍ لِّأُولِي الْأَلْبَابِ ۝ ١٩٠  
الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَامًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ  
وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَاطِلًا ۖ سُبْحٰنَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ ۝ ١٩١

Artinya : *“Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, dan pergantian malam dan siang terdapat tanda-tanda (kebesaran Allah) bagi orang yang berakal.. (yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri, duduk atau dalam keadaan berbaring, dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata), "Ya Tuhan kami, tidaklah Engkau menciptakan semua ini sia-sia; Maha suci Engkau, lindungilah kami dari azab neraka.” (QS: Ali imran [3]:190-191)*

Tafsir Al-misbah menjelaskan bahwa telah menjadi ciri *Ulul Al-bab* mereka selalu merenungkan keagungan dan kebesaran Allah dalam hati dimanapun mereka berada, dalam keadaan duduk, berdiri dan berbaring. Mereka selalu merenungkan penciptaan langit dan bumi, dan keunikan yang terkandung di dalamnya sambil berkata, "Tuhanku, tidak Engkau ciptakan jagat ini tanpa ada hikmah yang telah Engkau tentukan di balik itu (Shihab, 2002). Dengan demikian dalam meneliti kapang selulolitik diharapkan juga dapat dipahami secara holistik mengenai peran kapang dalam siklus alam sebagai organisme dengan kemanfaatan bagi manusia dan alam.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Bagaimana karakteristik makroskopik, mikroskopik dan molekuler kapang yang diisolasi dari limbah serbuk gergaji ?
2. Bagaimana kemampuan kapang potensial dalam mendegradasi selulosa berdasarkan kadar gula reduksi ?
3. Bagaimana jenis, konsentrasi dan lama waktu kapang selulolitik terbaik dalam penelitian ini ?

## **1.3 Tujuan**

Tujuan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Untuk mengetahui karakteristik makroskopik, mikroskopik dan molekuler kapang yang diisolasi dari limbah serbuk gergaji.
2. Untuk mengetahui kemampuan kapang potensial dalam mendegradasi selulosa berdasarkan kadar gula reduksi.
3. Untuk mengetahui jenis, konsentrasi dan lama waktu kapang selulolitik terbaik dalam penelitian ini.

#### **1.4 Manfaat Penelitian**

Manfaat yang diharapkan dalam penelitian ini adalah :

1. Memberikan informasi terkait karakteristik makroskopik, mikroskopik dan molekuler kapang yang diisolasi dari limbah serbuk gergaji.
2. Memberikan informasi terkait kemampuan kapang potensial dalam mendegradasi selulosa berdasarkan kadar gula reduksi.
3. Memberikan informasi jenis, konsentrasi dan lama waktu kapang selulolitik terbaik dalam penelitian ini.

#### **1.5 Batasan Masalah**

Batasan masalah pada penelitian ini adalah :

1. Sampel serbuk gergaji yang digunakan diambil dari pabrik kayu UD. Karunia Rimba yang memperoleh kayu dari berbagai daerah di Jawa Timur.
2. Limbah serbuk gergaji yang digunakan berasal dari pemrosesan kayu mangir (*Ganophyllum valida*), mindi (*Melia azedarach*), sengon (*Albizzia falcata*), waru (*Albizzia procera*), sonokeling (*Dalbergia latifolia*), glugu (*Cocos nucifera*), mahoni (*Swietenia mahagoni*), kembang rekisi (*Canarium asperum*), akasia (*Acacia mangium*), jati (*Tectona grandis*), randu (*Ceiba pentandra*), durian (*Durio zibethinus*), dan jabon (*Anthocephalus cadamba*).



3. Kadar gula reduksi yang digunakan adalah hasil degradasi dari enzim kasar kapang potensial pada selulosa berbentuk CMC (*Carboxymethyl cellulose*) dan *Filter paper*.
4. Karakterisasi molekuler kapang selulolitik dilakukan pada gen ITS (*Internal Transcribed Spacer*) menggunakan primer ITS4 pada tiga organisme potensial berdasarkan indeks selulolitik dalam penelitian ini.

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Enzim Selulase

Enzim selulase adalah sekelompok enzim hidrolitik yang utamanya terdiri dari endoglukanase, eksoglukanase, selobiohidrolase, dan  $\beta$ -glukosidase. Pemecahan selulosa secara dominan dilakukan oleh endoglukanase, selobiohidrolase,  $\beta$ -glukosidase, dan litik polisakarida monooksidase (LPMO). Endoglukanase menghidrolisis ikatan beta-1,4-glikosidik internal secara acak, sementara selobiohidrolase bekerja pada ujung bebas polimer selulosa kristal.  $\beta$ -glukosidase memecah selobiosa menjadi glukosa, dan LPMO melakukan pembelahan oksidatif selulosa. Enzim-enzim ini beroperasi secara sinergis, menghidrolisis ikatan glikosidik yang kuat dalam selulosa dan menghasilkan molekul gula sederhana seperti glukosa, galaktosa, xilosa, dan fruktosa (Okal *et al.*, 2020); (Arnthong *et al.*, 2020).

Enzim selulase disintesis oleh jamur, bakteri, tumbuhan, dan hewan. Menurut database *Carbohydrate-Active Enzymes*, enzim ini tergolong dari keluarga glikosida hidrolase. Selulase telah diklasifikasikan menjadi 115 famili berdasarkan kesamaan urutan asam amino dan struktur kristal dan semua selulase membelah ikatan  $\beta$ -1,4-glikosidik. Struktur selulase terdiri dari dua jenis modul, yaitu modul katalitik dan modul non-katalitik.

Modul katalitik bertanggung jawab untuk pemecahan selulosa dan telah diklasifikasikan ke dalam berbagai keluarga berdasarkan urutan asam amino dan struktur kristalnya. Sementara itu, modul non-katalitik, seperti modul pengikat karbohidrat, dapat ditemukan di ujung N-terminal atau C-terminal dari modul

katalitik. Modul non-katalitik ini memiliki fungsi yang beragam, baik yang sudah dikenal maupun yang belum sepenuhnya dipahami, yang berperan dalam meningkatkan efisiensi dan fungsi keseluruhan enzim.

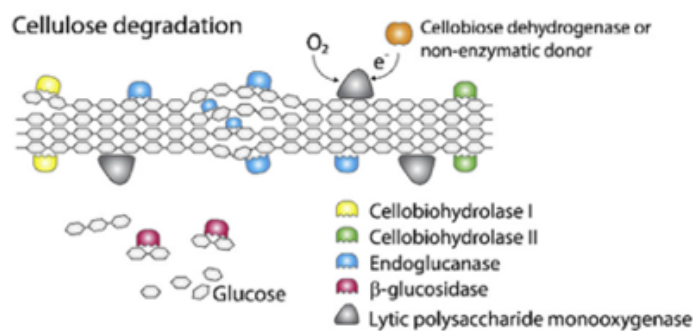
Enzim selulase yang dihasilkan jamur dan bakteri memiliki dua atau lebih domain struktural dan fungsional. Ada dua jenis sistem selulase yakni nonkompleks dan kompleks. Sistem selulase nonkompleks diproduksi oleh mikroorganisme selulolitik aerob, dan merupakan campuran enzim kooperatif ekstraseluler. Dalam sistem selulase nonkompleks, pengaturan umum adalah menggabungkan domain katalitik dengan domain pengikat selulosa.

Sedangkan sistem selulase yang kompleks diproduksi oleh mikroorganisme anaerobik yang disebut selulosom. Selulase tersebut dirakit dengan menggabungkan domain katalitik dengan domain dockerin. Selain dua domain utama ini dalam struktur selulase, ada beberapa domain lain yang ada di banyak selulase, misalnya *domain S-layer homolog* (SLH), domain fibronektin tipe 111, dan domain NodB, dan disana juga daerah lain dari fungsi yang tidak diketahui. Domain-domain ini sering dihubungkan oleh rangkaian penghubung yang diperkaya Protein dan asam amino hidroksi (treonin dan serin). Di antara semua domain ini, domain katalitik dan pengikat selulosa adalah yang paling penting karena merupakan domain yang dianggap berpartisipasi dalam mekanisme hidrolitik enzim (Stephen *et al.*, 2006).

Ada tiga jenis enzim yang bekerja dalam proses degradasi selulosa menjadi glukosa, yaitu: enzim endoglukanase, enzim ini bekerja dengan menghidrolisis ikatan glikosidik  $\beta$ -1,4 secara acak dan terutama beroperasi pada daerah amorf dari serat selulosa. Hasilnya adalah pembentukan oligosakarida dan polimer yang lebih

pendek, seperti pada *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC). Kemudian enzim endoglukanase yang memiliki afinitas yang tinggi terhadap substrat CMC (CMC-ase). Kemudian enzim eksoglukanase atau selobiohidrolase, enzim ini mengikis atau memotong residu selubiosil dari rantai selulosa. Ujung rantai selulosa yang tidak tereduksi akan terlepas dan menghasilkan selobiosa dan enzim endo  $\beta$ -glukosidase yang berperan dalam menghidrolisis selobiosa menjadi dua unit glukosa (Houfani *et al.*, 2020).

Berdasarkan uraian tersebut proses mendegradasi selulosa menjadi glukosa melibatkan tiga jenis enzim, yaitu enzim endoglukanase yang menghasilkan oligosakarida dan polimer yang lebih pendek, enzim eksoglukanase atau selobiohidrolase yang menghasilkan selobiosa, dan enzim endo  $\beta$ -glukosidase yang mengubah selobiosa menjadi dua unit glukosa.



**Gambar 2. 1. Proses degradasi oleh enzim selulase (Champreda *et al.*, 2019)**

## 2.2 Kapang Selulolitik

Kapang merupakan jamur multiseluler, berdasarkan ukurannya kapang tergolong sebagai mikrofungi yang strukturnya hanya bisa dilihat dengan mikroskop (Sutari, 2020). Kapang adalah mikroorganisme tidak berklorofil, berbentuk hifa atau miselium, eukariotik, berdinding sel dari kitin atau selulosa,

menyerap nutrisi dengan cara absorpsi, bereproduksi seksual dan aseksual dengan membentuk spora.

Sebagian besar tubuh kapang terdiri atas benang-benang yang disebut hifa, yang saling berhubungan menjadi semacam jala, yaitu miselium. Miselium dapat dibedakan atas miselium vegetatif yang berfungsi menyerap nutrisi dari lingkungan, dan miselium fertil (aerial) yang berfungsi dalam reproduksi. Kapang dapat ditemukan pada substrat, baik di lingkungan darat, perairan, maupun udara.

Kapang juga banyak ditemui di berbagai lingkungan di alam dan mereka hidup dengan cara memakan sisa-sisa bahan organik dan sampah. Mereka juga memainkan peranan penting dalam mendaur ulang mineral dan karbon. Diperkirakan mereka mendaur ulang jutaan ton sampah organik di lingkungan alamnya pada tiap tahun. Kapang dapat mensintesis protein dengan mengambil sumber karbon dari karbohidrat (misalnya glukosa, sukrosa atau maltosa), sumber nitrogen dari bahan organik atau anorganik, dan mineral dari substratnya.

Kapang dapat dibedakan menjadi dua kelompok berdasarkan struktur hifanya. Hifa tidak bersekat pada kelas *Phycomycetes* (*Zygomycetes* dan *Oomycetes*) kapang ini intinya tersebar di sepanjang septa. Sedangkan hifa bersekat pada kelas *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* dan *Deuteromycetes*.

Kapang selulolitik merupakan sebutan bagi jamur mikroskopik berfilamen yang memiliki kemampuan mengurai selulosa. Hal ini dikarenakan kapang dapat tumbuh dan berkembang dengan cara mendegradasi molekul kompleks menjadi molekul yang lebih sederhana dari zat makanan yang tersedia pada lingkungan atau media tumbuhnya (Suryani, Taupiqurrahman, & Kulsum, 2020).

Kapang selulolitik memiliki kemampuan menyerang atau mendegradasi

selulosa terutama pada kondisi aerob. Fungi membuktikan diri lebih unggul dari bakteri terutama dalam tanah asam dan pada penguraian selulosa yang terinkrustasi dengan lignin.

Kapang dapat tumbuh dan berkembang dengan cara mendegradasi molekul kompleks menjadi molekul yang lebih sederhana dari zat makanan yang tersedia pada lingkungan atau media tumbuhnya. Genus kapang yang mempunyai sifat selulolitik yang kuat antara lain adalah *Trichoderma*, *Aspergillus*, dan *Penicillium*. Biodegradasi yang dilakukan oleh mikroorganisme yang berlangsung karena aksi katalisator biokimia yaitu enzim yang dihasilkan oleh mikroba hidup tertentu, menyebabkan perubahan bahan organik yang kompleks menjadi bahan yang lebih sederhana oleh kegiatan enzim dari mikroorganisme (Pujiati & Widiyanto, 2017).

### **2.3 Media Pertumbuhan Kapang**

Media pertumbuhan kapang adalah suatu substrat yang menyediakan nutrisi dan lingkungan yang dibutuhkan oleh kapang untuk tumbuh dan berkembang. Media pertumbuhan kapang dapat berupa media padat atau media cair. Media padat adalah media pertumbuhan kapang yang berbentuk padat, seperti agar. Sedangkan media cair adalah media yang tidak mengandung bahan pematat sehingga wujudnya cair. Media padat ini biasanya digunakan untuk pengamatan morfologi koloni kapang sedangkan media cair digunakan untuk mengamati pertumbuhan kapang dan mempelajari metabolit kapang.

Bahan-bahan nutrisi yang dibutuhkan oleh kapang untuk tumbuh dan berkembang antara lain:

#### **Karbohidrat**

Karbohidrat adalah sumber energi utama bagi kapang. Karbohidrat dapat

berupa gula sederhana, seperti glukosa, fruktosa, dan sukrosa, atau gula kompleks, seperti pati.

### **Protein**

Protein adalah sumber nitrogen utama bagi kapang. Protein dapat berupa pepton, asam amino, atau protein murni.

### **Vitamin**

Vitamin adalah senyawa organik yang dibutuhkan oleh kapang dalam jumlah kecil. Vitamin berfungsi sebagai kofaktor enzim, yaitu senyawa yang membantu enzim untuk bekerja.

### **Mineral**

Mineral adalah unsur anorganik yang dibutuhkan oleh kapang dalam jumlah kecil. Mineral berfungsi sebagai penyusun sel dan berperan dalam berbagai fungsi sel.

Komposisi media pertumbuhan kapang dapat disesuaikan dengan jenis kapang yang akan ditumbuhkan. Misalnya, jika akan ditumbuhkan kapang yang membutuhkan nitrogen dalam jumlah banyak, maka komposisi media pertumbuhannya perlu ditambahkan dengan sumber nitrogen yang lebih banyak, seperti pepton atau asam amino.

Salah satu contoh media pertumbuhan kapang yang umum digunakan adalah *Potato Dextrose Agar* (PDA) yang merupakan media padat terdiri dari kentang, dekstrosa, dan agar-agar. Media ini merupakan media umum untuk pertumbuhan kapang dikarenakan kentang merupakan sumber karbohidrat yang kaya akan nutrisi, sedangkan dekstrosa merupakan sumber energi yang mudah diserap oleh kapang (Becton, 2009).

## **2.4 Identifikasi Kapang**

Identifikasi kapang adalah proses penting dalam berbagai disiplin ilmu. Tujuan utama identifikasi kapang adalah untuk memastikan pengenalan dan klasifikasi yang akurat dari berbagai spesies kapang sehingga dapat ditemukan dan dikenali kemampuan kapang tertentu yang dapat dimanfaatkan atau dicegah keberadaannya. Proses identifikasi ini dapat dilakukan melalui berbagai metode, termasuk pendekatan makroskopik, mikroskopik, dan molekuler, masing-masing dengan kelebihan dan tantangan tersendiri sebagai berikut.

### **2.4.1 Identifikasi makroskopik dan mikroskopik**

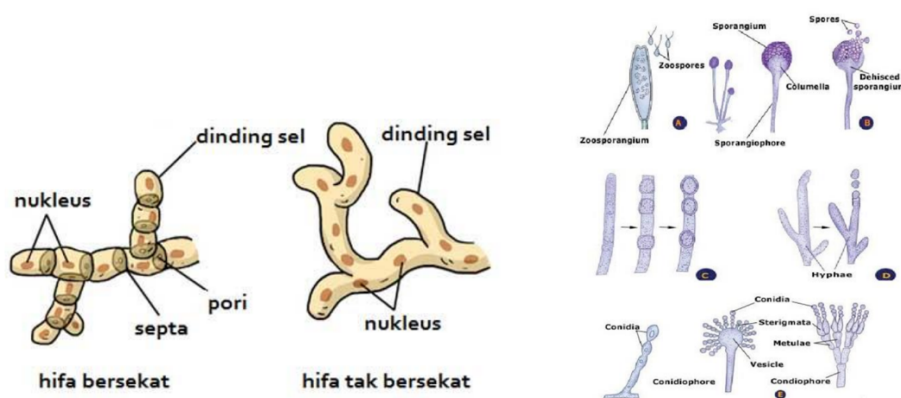
Identifikasi secara makroskopik dan mikroskopik merupakan identifikasi melalui pendekatan yang melibatkan pengamatan visual terhadap koloni kapang yang tumbuh pada media kultur. Karakteristik seperti warna, tekstur, bentuk, dan pola pertumbuhan koloni memberikan petunjuk awal mengenai genus atau spesies kapang. Metode pengamatan makroskopik untuk identifikasi merupakan metode yang cepat dan tidak memerlukan peralatan canggih, namun identifikasi makroskopik sering kali tidak cukup untuk membedakan spesies kapang yang memiliki morfologi serupa (Campbell *et al.*, 2013).

Mengidentifikasi kapang dengan kenampakan koloni yang serupa diperlukan pendekatan mikroskopik untuk detail lebih mendalam dengan mengamati struktur mikroskopis kapang, seperti spora, hifa, konidia, dan organ reproduksi. Pengamatan secara langsung organ kapang di bawah mikroskop terkadang memberikan hasil yang bias untuk diamati terutama pada kapang yang tidak menunjukkan warna yang spesifik sehingga teknik pewarnaan dalam penggunaan mikroskop cahaya dapat mengungkap karakteristik spesifik.



Teknik pewarnaan dalam identifikasi mikroskopik kapang dapat menggunakan pewarna. Pewarna yang umum digunakan antara lain *Lactophenol Cotton Blue* (LPCB), *Calcofluor White* (CFW), *Congo Red*, dan *Giemsa Stain*. Masing-masing pewarna memiliki kelebihan dan kekurangannya. LPCB dan *Congo Red* mudah digunakan dan menghasilkan kontras yang jelas, namun tidak membedakan spesies kapang dengan baik. CFW lebih sensitif dan memungkinkan pengamatan struktur sel halus, namun membutuhkan mikroskop ultraviolet dan mudah memudar. Giemsa Stain memberikan informasi struktur sel yang lebih detail, namun rumit dan tidak selalu kontras.

Pemilihan pewarna yang tepat tergantung pada tujuan pengamatan, seperti identifikasi spesies, mempelajari struktur sel, atau mengamati jamur mati. Penggunaan pewarna harus mengikuti protokol yang sesuai dan dengan kewaspadaan karena dapat berbahaya bagi kesehatan. Namun, identifikasi mikroskopik juga memiliki keterbatasan, terutama dalam membedakan spesies yang sangat mirip secara morfologis (Eviva Science, 2019).

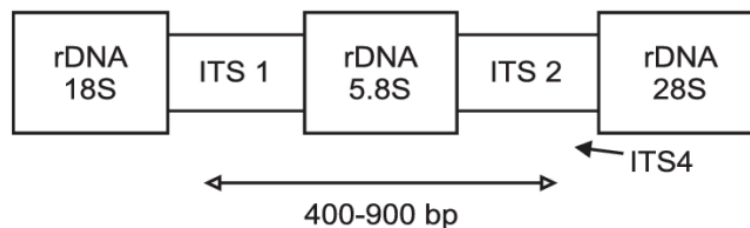


(Suryani, Taupiqurrahman, & Yuni, 2020)

#### 4.4.1 Identifikasi molekuler kapang

Ribosom merupakan komponen sel yang utama dengan jumlah sekitar 20.000 ribosom per genom. Ribosom mengandung kira-kira 10% dari seluruh total protein dan sekitar 80% dari keseluruhan massa sel. Pada prokariot atau bakteri, ada tiga macam ribosom DNA (rDNA) yaitu 23S-rDNA (2900 nukleotida), 16S-rDNA (1500 nukleotida), dan 5S-rDNA (sekitar 120 nukleotida). Sedangkan pada eukariot ada empat macam yaitu 28S-rDNA, 5.8S-rDNA, 5S-rDNA dan 18S-rDNA.

Identifikasi *fungi*/kapang secara molekuler digunakan daerah konservasi ITS (*Internal Transcribed Spacer*). ITS adalah daerah di antara struktur DNA yang tidak mempunyai fungsi secara khusus. Daerah ITS ditemukan di antara daerah 5.8S DNA yaitu ITS1 dan ITS2 (Gambar 2.7). Daerah ITS banyak digunakan untuk identifikasi karena daerah ini mudah untuk diamplifikasi walaupun dengan jumlah DNA yang kecil (Patantis & Fawzya, 2009). Area ini sangat bervariasi antara berbagai genus atau spesies fungi. Dalam penelitian ini, DNA barcoding digunakan untuk mengidentifikasi kapang endofit. Primer ITS1 dan ITS4 digunakan untuk mengamplifikasi area internal transcribed spacer (ITS), yang merupakan area konservatif pada kingdom fungi (Iwen *et al.*, 2002).



Gambar 2. 2. Daerah ITS pada rDNA (Valente Brasileiro *et al.*, 2004).

## **Amplifikasi DNA**

Identifikasi molekuler banyak dilakukan dengan menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yang melibatkan pengamplifikasi DNA target. Metode PCR adalah teknik enzimatik yang digunakan untuk mengamplifikasi DNA secara *in vitro* dan pertama kali dikembangkan oleh Kary B. Mullis pada tahun 1985. Proses ini melibatkan tiga langkah utama: denaturasi, annealing, dan ekstensi yang dipicu oleh enzim DNA polimerase. Sebuah pasangan primer spesifik oligonukleotida, yang dikenal sebagai amplimer, digunakan untuk membuat penanda dengan ujung-5' menuju ujung-3' dari ujung DNA target dan mengamplifikasi urutan yang diinginkan (M. Jannah *et al.*, 2021).

## **Sequencing DNA**

Amplifikasi DNA yang telah dilakukan menyediakan DNA yang cukup untuk dianalisis. Dari DNA yang diperoleh untuk dapat mengidentifikasinya dilakukan sequencing terlebih dahulu untuk membaca urutan nukleotida dalam DNA, metode yang umum digunakan adalah metode sanger. Metode sanger didasarkan pada penggunaan *dideoksinukleotida trifosfat* (ddNTP) yang tidak memiliki gugus 3'-OH yang diperlukan untuk pembentukan ikatan fosfodiester.

Ketika ddNTP dimasukkan ke dalam rantai DNA yang sedang tumbuh, sintesis DNA terhenti. Dengan mencampurkan ddNTP ke dalam reaksi sintesis DNA, fragmen DNA dengan panjang yang berbeda dapat dihasilkan. ddNTPs menyebabkan terminasi rantai karena tidak memiliki grup 3'-OH yang diperlukan untuk penambahan nukleotida berikutnya. Produk reaksi sequencing kemudian dipisahkan berdasarkan ukuran menggunakan elektroforesis kapiler, dan sinyal fluoresen yang dihasilkan dideteksi untuk menghasilkan kromatogram yang

menunjukkan urutan nukleotida DNA (Heather & Chain, 2016).

### **Evaluasi hasil sequencing**

Evaluasi hasil sequencing bertujuan untuk memastikan bahwa data yang diperoleh akurat, berkualitas tinggi, dan dapat diandalkan. Hal ini tidak hanya meningkatkan efisiensi dan efektivitas proses sequencing tetapi juga memberikan kepercayaan dalam hasil yang diperoleh. Evaluasi hasil sequencing dilakukan dalam beberapa tahapan yakni evaluasi untuk menjamin akurasi data, menilai secara keseluruhan hasil sequencing kemudian identifikasi dan koreksi masalah (Tasma, 2015).

Evaluasi hasil sequencing untuk menjamin akurasi data dapat dianalisis menggunakan Quality Value 20 (QV20) sebagai metrik yang menunjukkan tingkat kepercayaan dalam pembacaan tiap nukleotida. QV20 menunjukkan bahwa kemungkinan kesalahan pembacaan kurang dari 1 dalam 100, atau dengan kata lain, tingkat kepercayaan 99%. Evaluasi menggunakan QV20 memastikan bahwa urutan DNA yang dihasilkan memiliki tingkat akurasi yang tinggi, yang sangat penting untuk aplikasi di mana kesalahan kecil bisa berdampak besar, seperti dalam penelitian genetik, diagnosis medis, atau rekayasa genetika.

Setelah data terjamin akurasinya perlu untuk dilakukan penilaian dari keseluruhan hasil sequencing. Untuk melakukan penilaian hasil sequencing dapat menggunakan *Contiguous Read Length* (CRL) sebagai ukuran panjang urutan DNA yang dapat dibaca secara terus-menerus dengan nilai kualitas di atas ambang batas tertentu. CRL memberikan gambaran tentang seberapa panjang urutan DNA yang dapat diandalkan secara berkelanjutan. Urutan yang panjang dengan nilai kualitas

tinggi menunjukkan bahwa hasil sequencing stabil dan dapat dipercaya untuk analisis lebih lanjut (Applied Biosystems, 2009).

Analisis tersebut dilakukan melalui perangkat lunak *Sequence Scanner* yang secara otomatis memproses dan menganalisis data sequencing, menghemat waktu dan tenaga yang diperlukan dibandingkan dengan evaluasi manual. Dari perangkat lunak tersebut peneliti dapat mengidentifikasi segmen-segmen urutan yang mungkin memiliki kualitas rendah atau kesalahan. Hal ini memungkinkan untuk mengevaluasi dan mengulang proses sequencing jika diperlukan, atau untuk memfokuskan analisis hanya pada bagian urutan yang berkualitas tinggi.

Deteksi dini masalah ini penting untuk efisiensi dan keberhasilan proyek sequencing. *Sequence scanner* secara otomatis memproses dan menganalisis data sequencing, menghemat waktu dan tenaga yang diperlukan dibandingkan dengan evaluasi manual. Ini memungkinkan peneliti untuk fokus pada interpretasi hasil dan langkah-langkah penelitian selanjutnya (Applied Biosystems, 2009).

### **Analisis *Query sequence***

*Query sequence* adalah urutan DNA, RNA, atau protein yang dimasukkan ke dalam alat pencarian bioinformatika seperti BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) untuk menemukan kesamaan dengan urutan lain dalam database. Proses ini bertujuan untuk mengidentifikasi urutan yang homolog atau serupa yang dapat memberikan informasi mengenai fungsi, struktur, atau evolusi dari *query sequence* tersebut (Tasma, 2015).

Analisis *query sequence* yang diperoleh dari hasil sequencing dapat dilakukan dengan melalui beberapa langkah yakni dimulai dengan menyiapkan *query Sequence* urutan nukleotida (DNA atau RNA) atau urutan asam amino

(protein) yang ingin dianalisis. Urutan ini bisa dalam format teks biasa atau dalam format file FASTA. Kemudian *query Sequence* yang dimiliki dapat dianalisis dengan menggunakan alat BLAST dari NCBI dengan mengakses situs web NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Alat tersebut dapat digunakan sesuai tujuan dari peneliti dengan mempertimbangkan jenis *query sequence* sehingga penting untuk memilih Jenis BLAST yang tepat diantaranya BLASTN (Untuk mencari kesamaan urutan nukleotida), BLASTP (Untuk mencari kesamaan urutan protein), BLASTX (Untuk menerjemahkan urutan nukleotida ke urutan protein dan mencari kesamaan dengan urutan protein), TBLASTN (Untuk mencari urutan protein pada basis data nukleotida yang diterjemahkan), dan TBLASTX (Untuk mencari kesamaan antara urutan nukleotida yang diterjemahkan dan basis data nukleotida yang diterjemahkan).

Setelah dipilih jenis BLAST selanjutnya dimasukkan urutan query ke dalam kotak input yang tersedia dan disesuaikan parameter pencarian sesuai kebutuhan, seperti memilih database yang akan digunakan (misalnya, nmo del scoring, dan r untuk urutan non-redundant, refseq\_rna untuk urutan RNA referensi), kriteria penyaringan lainnya.

Analisis *query sequence* pada BLAST berlangsung dengan memproses *query sequence* dan mencari urutan yang memiliki kesamaan dalam database yang dipilih. Setelah pencarian selesai, hasilnya akan ditampilkan dalam bentuk alignment, skor kesamaan, dan statistik lainnya. Hasil ini mencakup : *hit list* sebagai daftar urutan yang paling mirip dengan query sequence, *alignment view* untuk penampilan alignment antara *query sequence* dan urutan dalam database. Kemudian *e-value* :

nilai yang menunjukkan signifikansi kesamaan; nilai yang lebih rendah menunjukkan kesamaan yang lebih signifikan. dan *bit score* : skor yang menunjukkan kesamaan antara query sequence dan urutan dalam database.

*Query sequence* dalam BLAST memiliki beberapa manfaat yakni identifikasi homologi yang bertujuan menemukan urutan yang homolog untuk memprediksi fungsi dan struktur *query sequence*, analisis evolusi untuk melacak hubungan evolusi antara *query sequence* dan urutan lain, penelitian fungsional untuk mengidentifikasi gen atau protein yang terkait dengan fungsi biologis tertentu, dan pendeteksian mutasi untuk menemukan variasi dalam urutan yang dapat berhubungan dengan penyakit atau karakteristik spesifik (Bergman, 2007).

## **2.5 Produksi Enzim Selulase Metode SmF**

Enzim memegang peranan penting dalam berbagai proses biologi dan industri. Seiring dengan meningkatnya permintaan enzim, metode produksinya pun terus berkembang. Salah satu metode tradisional yang populer adalah fermentasi terendam (*Submerged Fermentation* atau SmF). Fermentasi terendam (SmF) merupakan metode tradisional yang populer untuk memproduksi enzim penting dalam skala industri.

Hal ini dikarenakan SmF menawarkan beberapa keuntungan, di antaranya adalah kemudahan penanganan, SmF memungkinkan proses fermentasi dilakukan dalam wadah cair, yang lebih mudah dioperasikan dan dikendalikan dibandingkan metode fermentasi lain, SmF juga memiliki kontrol lingkungan yang lebih baik yakni faktor-faktor lingkungan seperti suhu dan pH dapat dikontrol dengan lebih presisi, yang sangat penting untuk memastikan enzim yang dihasilkan memiliki kualitas dan aktivitas yang optimal, selain itu SmF mudah diubah skalanya untuk

memenuhi kebutuhan produksi yang berbeda, mulai dari skala laboratorium hingga industri besar. SmF umumnya lebih hemat biaya dibandingkan metode produksi enzim lainnya, seperti ekstraksi dari sumber alami (Mrudula & Murugammal, 2011).

Menurut Ouedraogo & Tsang, (2021) tahapan utama SmF adalah isolasi mikroorganisme penghasil enzim yang diinginkan diisolasi dari alam, kemudian dipilih strain yang menghasilkan enzim dengan aktivitas dan sifat terbaik. Kemudian dilakukan percobaan untuk menentukan komposisi media kultur yang optimal untuk pertumbuhan mikroorganisme dan produksi enzim. Faktor-faktor seperti sumber karbon, nitrogen, dan mineral dipertimbangkan. Selanjutnya mikroorganisme ditumbuhkan dalam tangki fermentasi dengan kondisi yang dikontrol dengan cermat. Nutrisi ditambahkan selama fermentasi untuk mendukung pertumbuhan dan produksi enzim. Kemudian enzim dipisahkan dari sel mikroorganisme dan dimurnikan melalui berbagai teknik, seperti filtrasi, presipitasi, dan kromatografi. Enzim yang dimurnikan dianalisis untuk memastikan kemurnian, aktivitas, dan sifat lainnya sesuai dengan standar kualitas yang ditentukan.

## **2.6 Pengukuran kadar gula reduksi metode DNS**

Pengukuran konsentrasi glukosa merupakan salah satu teknik penting dalam biokimia dan bioteknologi, khususnya dalam studi aktivitas enzimatik dan proses fermentasi. Salah satu metode yang sering digunakan adalah metode DNS (3,5-dinitrosalisilat), yang dikenal karena kesederhanaan dan keandalannya dalam mendeteksi gula reduksi, seperti glukosa. Metode ini melibatkan reaksi kimia antara



gula reduksi dan reagen DNS yang menghasilkan perubahan warna, yang kemudian dapat diukur secara spektrofotometrik.

Metode DNS didasarkan pada reaksi antara gula reduksi dan asam 3,5-dinitrosalisilat dalam kondisi alkali. Dalam reaksi ini, gula reduksi mereduksi asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS) menjadi 3-amino-5-nitrosalisilat, yang berwarna coklat kemerahan. Intensitas warna ini sebanding dengan konsentrasi gula reduksi dalam sampel, dan dapat diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm.

Metode DNS memiliki keunggulan dalam beberapa hal yakni metode ini sensitif terhadap gula reduksi, memungkinkan deteksi pada konsentrasi rendah. Prosedurnya sederhana dan dapat dilakukan tanpa peralatan laboratorium yang kompleks. Hasil dapat diperoleh dengan cepat setelah pemanasan dan pendinginan sampel. Namun metode ini juga memiliki keterbatasan yakni senyawa lain dalam sampel yang memiliki sifat reduktif dapat mengganggu hasil pengukuran selain itu variasi dalam waktu dan suhu pemanasan dapat mempengaruhi hasil akhir.

Metode DNS sering digunakan dalam penelitian enzimatik untuk mengukur aktivitas enzim yang menghasilkan gula reduksi. Misalnya, dalam studi aktivitas enzim selulase, metode ini digunakan untuk mengukur glukosa yang dihasilkan dari hidrolisis selulosa (Miller, 1959).

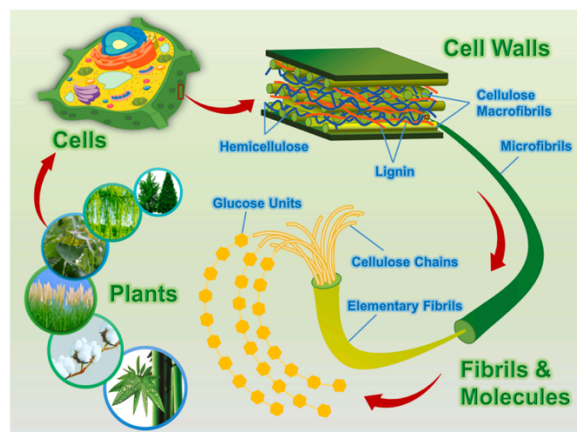
## **2.7 Selulosa**

Selulosa merupakan polimer terbarukan yang melimpah di bumi, selulosa terdistribusi secara luas di polimer karbohidrat pada dinding sel tanaman tingkat tinggi, dalam organisme laut, dan bahkan dibuat oleh biosintesis mikroba (ganggang, jamur, bakteri). Terlepas dari sumbernya, struktur kimia selulosa

tersusun dari rantai polimer yang sama, yang dihubungkan oleh unit D-glukopiranosil melalui ikatan  $\beta$ -1,4-glikosidik (K. Liu *et al.*, 2021).

### Sumber selulosa

Selulosa adalah bahan bangunan utama yang digunakan untuk membentuk tanaman, selulosa adalah zat yang sangat penting bagi tanaman. Pada tumbuhan selulosa terdapat pada dinding sel yang tersedia dalam lignoselulosa bersama dengan hemiselulosa dan lignin.

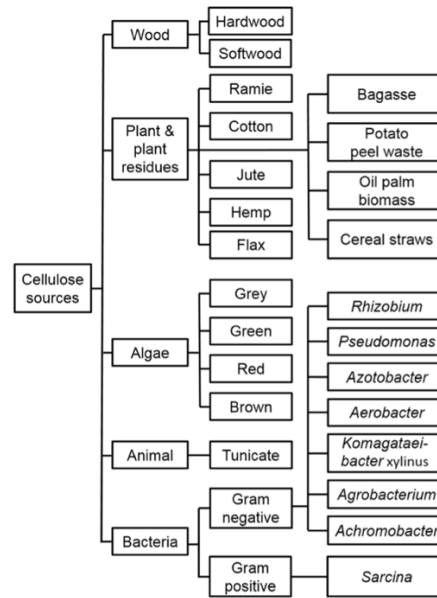


**Gambar 2. 3. Selulosa pada dinding sel tumbuhan** (K. Liu *et al.*, 2021).

Selulosa secara garis besar dapat diklasifikasikan kedalam dua kelompok besar yakni selulosa alami dan sintetis. Serat alami berbasis selulosa diperoleh dari berbagai bagian tumbuhan. Serat selulosa alami dapat diklasifikasikan seperti yang ditunjukkan pada gambar 2.2 Komposisi kimia, lokasi tempat tumbuh, umur tanaman, dan metode ekstraksi menentukan sifat fisik dan mekanik serat selulosa alami.

Serat alami memiliki beberapa keunggulan seperti biaya dan kepadatan yang rendah, dapat diperbaharui, tersedia secara melimpah, polusi yang lebih sedikit selama produksi, bahaya kesehatan yang minimal, dan ramah lingkungan.

Namun, mereka memiliki beberapa kelemahan seperti kecenderungan penyerapan air yang tinggi dan kekuatan benturan yang rendah (Venkatarajan & Athijayamani, 2021).



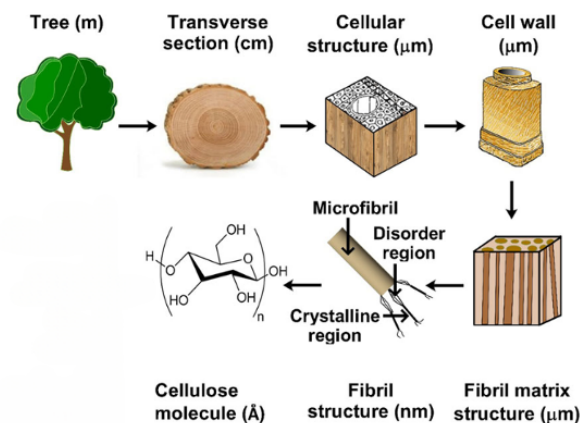
**Gambar 2. 4. Sumber selulosa alami (Seddiqi *et al.*, 2021)**

Selulosa alami dikategorikan berdasarkan sumber asalnya, yaitu sebagai selulosa berbasis kayu dan tanaman, selulosa berbasis bakteri, selulosa berbasis ganggang, dan selulosa berbasis tunicate. Dalam sejarah panjang penggunaan selulosa, berdasarkan kelimpahan dan efektivitas biayanya, selulosa berbasis kayu dan tumbuhan menjadi jenis selulosa yang paling umum dikenal dibandingkan dengan selulosa berbasis bakteri, selulosa berbasis tunicate, dan selulosa berbasis ganggang (Seddiqi *et al.*, 2021).

Selulosa berbasis kayu merupakan selulosa yang menjadi komponen utama kayu, pada kayu selulosa dikemas dalam serat kristal yang disebut sebagai "mikrofibril" yang sejajar untuk membentuk lembaran berorientasi. Struktur lamelar yang didasarkan pada lembaran yang bertumpuk, membentuk dinding sel,

dan sel-sel tersusun membentuk struktur anatomi kayu. Kombinasi struktur hirarkis yang canggih ini dengan komponen matriks seperti hemiselulosa dan lignin memberi pohon sifat mekanis yang memungkinkannya tumbuh besar dan hidup untuk jangka waktu yang lama (Horikawa, 2022).

Serat selulosa kayu merupakan bahan alami yang mudah diperoleh. Serat selulosa berbasis kayu memiliki kelebihan yakni biaya yang rendah dan mudah terurai. Selulosa berbasis kayu telah banyak digunakan dalam konstruksi, penyimpanan energi, dan peralatan elektronik yang fleksibel. Selulosa berbasis kayu memiliki sifat fisik dan pengubah kimia yang baik, serta konsep keberlanjutan dan peluang pengembangan ekologi industri untuk material baru menjadi daya tarik untuk selulosa berbasis kayu digunakan (Zhang *et al.*, 2021).

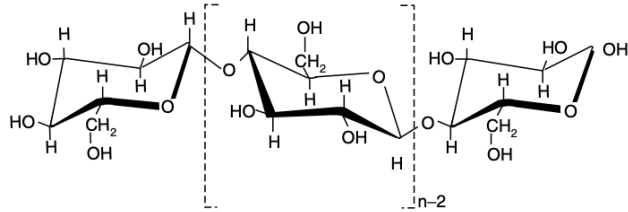


**Gambar 2. 5. Skema struktur kayu dari pohon hingga molekul selulosa (Seddiqi *et al.*, 2021)**

### Struktur Selulosa

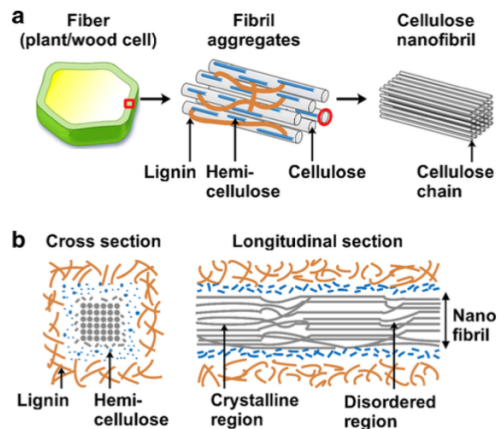
Setiap unit glukosa memiliki gugus hidroksil pada C2, C3, dan C6, yang mampu membentuk ikatan hidrogen di dalam dan di antara molekul-molekul makromolekul selulosa. Panjang rantai polimer tergantung pada sumber selulosa.

Secara umum, jumlah unit glukosa atau derajat polimerisasi lignoselulosa alami mencapai 10.000 unit.



**Gambar 2. 6. Struktur selulosa (Shen & Sun, 2021)**

Selulosa tidak ditemukan sebagai molekul tunggal di alam, tetapi sebagai geometri serat yang dibentuk oleh beberapa rantai molekul selulosa (K. Liu *et al.*, 2021). Mayoritas selulosa di alam ditemukan pada bahan lignoselulosa yang masih terdiri atas selulosa, hemiselulosa, dan lignin (Romruen *et al.*, 2022).



**Gambar 2. 7. Ilustrasi skema struktur mikro serat selulosa.** (a) Serat tumbuhan/kayu, agregat fibril, dan nanofibril (mengandung rantai selulosa) yang berasosiasi dengan lignin dan hemiselulosa. (b) Penampang melintang dan memanjang menunjukkan daerah kristalin dan tidak (Seddiqi *et al.*, 2021).

### Sifat Fisik dan Kimia Selulosa

Selulosa adalah bahan higroskopis, artinya dapat menyerap air. Selulosa tidak larut dalam air, asam encer, dan sebagian besar pelarut. Namun, selulosa dapat

membengkak dalam air, asam encer, dan sebagian besar pelarut. Kelarutan dapat dicapai dalam asam pekat, tetapi dengan mengorbankan degradasi yang cukup besar melalui hidrolisis asetal (glikosidik). Larutan alkali menyebabkan pembengkakan dan pelarutan hemiselulosa yang cukup besar.

Degradasi mikrobiologis selulosa terjadi melalui pembelahan hidrolitik enzimatis dari ikatan B-1,4-glukosidik. Eter selulosa tersubstitusi karena alasan sterik kurang terpapar pada proses ini, dan mereka relatifnya mungkin jauh lebih besar. Juga diketahui bahwa, seperti yang diharapkan, selulosa amorf lebih rentan terhadap hidrolisis enzimatis daripada selulosa yang lebih kristalin. Kemudian, degradasi parsial selulosa alami menggunakan enzim pengurai multikomponen menghasilkan produk yang memiliki keuntungan praktis tertentu, termasuk peningkatan kelarutan (Coffey, D. G., Bell, D. A., & Henderson, 1995).

## **2.8 Limbah Kayu**

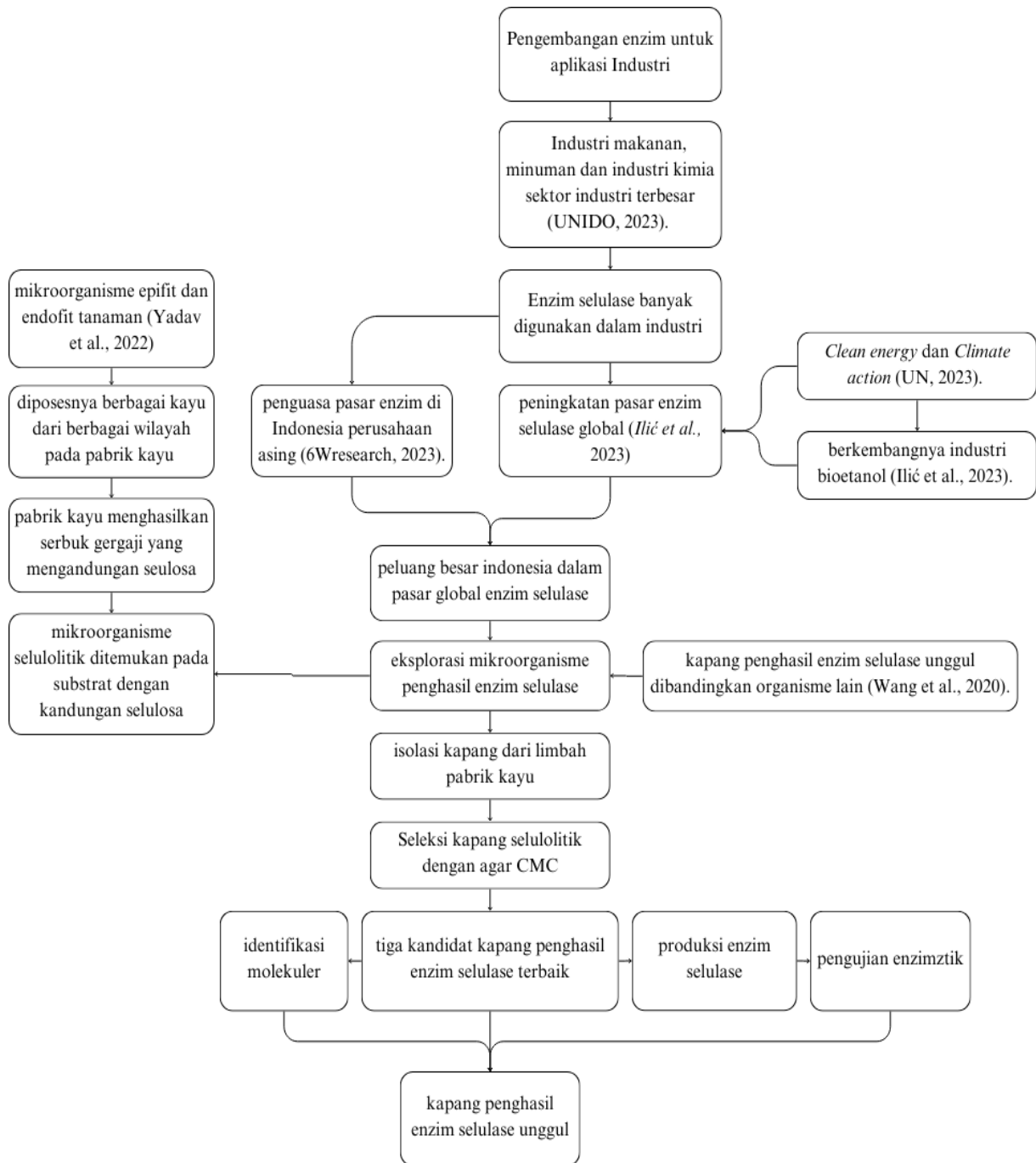
Limbah kayu adalah sisa-sisa atau bagian-bagian kayu yang dianggap tidak ekonomis lagi dalam suatu proses, waktu, dan tempat tertentu, akan tetapi mungkin masih dapat dimanfaatkan pada proses, tempat, dan waktu yang berbeda. Limbah kayu sebagian besar dihasilkan dari kegiatan kehutanan, industri kayu, lokasi konstruksi dan pembongkaran, serta furnitur lama dari rumah tangga. Potongan limbah kayu juga ditemukan di fasilitas pengolahan limbah, tempat pengumpulan semua jenis limbah rumah tangga atau industri (Rizzo, 2010).

Industri penggergajian kayu merupakan tempat pemrosesan dimana kayu bulat diolah menjadi produk kayu gergajian dengan berbagai bentuk dan ukuran. Pemrosesan kayu menjadi bentuk dan ukuran yang diinginkan melewati tahapan proses penggergajian kayu. Pada umumnya proses penggergajian kayu meliputi

*break down sawing, resawing, edging, dan trimming.* Setiap tahapan proses pengolahan kayu gergajian akan dihasilkan limbah kayu, dengan berbagai bentuk, ukuran, jumlah dan pemanfaatannya (Purwanto, 2009).

Secara garis besar limbah dari industri penggergajian kayu dapat dibagi menjadi dua kategori berdasarkan ukurannya yakni berupa serbuk gergaji kayu dan limbah potongan kayu (Taufani *et al.*, 2023). Limbah kayu seringkali hanya dimanfaatkan sebagai bahan pembakaran dengan tujuan tertentu. Namun penyimpanan limbah kayu pada industri penggergajian kayu seringkali mengalami penumpukan akibat tercecernya limbah penggergajian yang bercampur dengan tanah, hal ini menjadikan terjadinya akumulasi limbah kayu sebagai sumber nutrisi bagi mikroorganisme karena kandungannya.

## 2. 9 Kerangka konseptual dan teori



**Gambar 2. 8. Kerangka konseptual**



### 2. 8. 1 Uraian Kerangka Konseptual

Kemajuan ilmu pengetahuan dalam biokimia dan mikrobiologi telah mendorong kemungkinan pengembangan enzim, terutama untuk aplikasi industri yang membutuhkan enzim dalam skala besar dan efisien (Yamaguchi, 2017). Industri makanan minuman, dan industri kimia telah menempati posisi kedua dan ketiga sebagai sektor industri terbesar di dunia (UNIDO, 2023). Posisi tersebut menggambarkan kebutuhan enzim untuk sektor industri. Salah satu enzim yang banyak digunakan dalam industri adalah enzim selulase (Putrika *et al.*, 2023). Seiring dengan kampanye Perserikatan Bangsa-Bangsa tentang *Clean Energy* dan *Climate Action* (UN, 2023), yang mendorong berkembangnya industri terbarukan ramah lingkungan seperti industri bioetanol juga telah membuka peluang bagi pasar enzim selulase (Ilić *et al.*, 2023). Dengan peluang pasar yang besar produksi enzim selulase perlu untuk dilakukan guna memenuhi permintaan pasar global. Sedangkan pasar enzim di Indonesia pada saat ini dikuasai oleh tiga perusahaan besar yang berasal dari luar negeri (6Wresearch, 2023). Sehingga pengembangan enzim selulase penting dilakukan agar Indonesia juga dapat berkontribusi pada pasar global.

Kapang menjadi penghasil enzim selulase yang unggul dibandingkan organisme lain (Wang *et al.*, 2020). Kapang selulolitik dapat ditemukan pada substrat dengan kandungan selulosa tinggi salah satunya adalah limbah serbuk gergaji. Limbah serbuk gergaji dapat diperoleh dari pabrik kayu yang menghasilkan residu organik berupa serbuk gergaji dengan kandungan selulosa, di mana mikroorganisme selulolitik dapat ditemukan. Pabrik kayu memproses berbagai kayu dari berbagai wilayah yang memungkinkan terkumpulnya mikroorganisme

dari berbagai tempat mengingat bahwa mikroorganisme dapat hidup secara epifit dan endofit pada tanaman (Yadav *et al.*, 2022). Seleksi kapang dengan potensi selulolitik dapat dilakukan dengan agar CMC. Tiga kapang yang menunjukkan indeks selulolitik tertinggi kemudian diuji kemampuannya dalam mengurai selulosa berbentuk CMC dan *Filter paper* berdasarkan kadar gula reduksi yang terbentuk menunjukkan tingkat kemampuan kapang dalam mengurai selulosa.

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Jenis Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksploratif yang bertujuan untuk menemukan kapang dari serbuk gergaji dengan kemampuan menghasilkan enzim selulase. Karakterisasi kapang dilakukan dengan pengamatan makroskopik dan mikroskopik. Kemudian kapang yang diperoleh diuji kemampuan mengurai selulosa menggunakan media CMC agar yang disajikan dalam bentuk indeks selulolitik. Tiga kapang dengan indeks selulolitik terbesar kemudian diuji aktivitas enzimnya menggunakan metode CMCase dan FPase (*Filter paper*) dengan konsentrasi inokulum dan waktu yang berbeda untuk mengetahui konsentrasi inokulum, waktu optimal kapang dan kecepatan dalam mengurai selulosa. Tiga kapang tersebut kemudian diidentifikasi secara molekuler untuk mengetahui karakteristik molekulernya.

#### **3.2 Waktu dan Tempat**

Penelitian ini dilakukan pada bulan Mei sampai Juni 2024. Pengambilan sampel serbuk gergaji dilakukan di pabrik kayu UD. Karunia Rimba Malang. Isolasi kapang selulolitik dan produksi enzim dilakukan di laboratorium mikrobiologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang sedangkan isolasi DNA kapang dilakukan di laboratorium Griya Sains Malang dan sequencing dilakukan di 1st Base Laboratories Selangor, Malaysia.

#### **3.3 Alat dan Bahan**

##### **3.3.1 Alat**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah cawan petri, tabung reaksi,

erlenmeyer, rak tabung, kantong plastik, kapas, autoklaf, *laminar air flow* (LAF), sarung tangan, jarum ose, bunsen, korek api, kaliper digital, inkubator, *hot plate*, stirrer, gelas ukur, erlenmeyer, mikropipet, pipet ukur, bola hisap, pipet tetes, tip, timbangan analitik, cover glass, objek glass, vortex, mikroskop, setrifuge, mikrosentrifuge, *cork borer*, *thermocycler*, geldoc, elektroforesis, *tube spin column*, mikrotube, *sequencing scanner*, komputer dan spatula.

### **3.3.2 Bahan**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi sampel limbah kayu, *Potato Dextrose Agar* (PDA), NaCl fisiologis, aquades, alkohol 70%, pepton,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , agar dan CMC (*Carboxy Methyl Cellulose*), spiritus,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , KI,  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Co}_2\text{Cl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , Glycine, Kit DNA Genomik (Tiagen), RNase, agarose, *Deoxynucleotide Triphosphates* (dNTPs), DNA *Polymerase*, primer ITS1, primer ITS4 dan *Fluorescent*.

## **3.4 Prosedur Penelitian**

### **3.4.1 Preparasi Alat**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini disiapkan dan dibungkus menggunakan kantong plastik kemudian dilakukan sterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu  $121^\circ\text{C}$  dengan tekanan 151 psi selama waktu 15 menit (Ramadhani & Wahyuni, 2020).

### **3.4.2 Preparasi Sampel**

Sampel serbuk gergaji diambil dari pabrik kayu UD. Karunia Rimba Malang. Sampel diambil dari tempat penggergajian yang telah digunakan sekitar dua puluh tahun sesuai dengan penelitian Oduwobi, (2023) bahwa pada tempat dengan residu

organik bertahun-tahun dimungkinkan ditemukannya keragaman genetik yang tinggi pada kapang yang diperoleh. Sampel yang diambil adalah serbuk gergaji yang halus sesuai dengan Szablewski *et al.*, (2021) bahwa granulasi yang lebih halus pada limbah kayu memiliki tingkat kontaminasi kapang yang lebih tinggi. Sampel yang diambil adalah sampel yang berada pada permukaan tanah diharapkan terjadinya konsorsium antara kapang tanah dan serbuk gergaji sehingga berpotensi ditemukannya kapang yang lebih beragam sesuai dengan penelitian (Khdiar *et al.*, 2023) bahwa tanah juga merupakan tempat hidup dari berbagai koloni kapang.

Sampel dibawa dari pabrik kayu menuju laboratorium menggunakan plastik bening steril dan disimpan di rak penyimpanan Laboratorium Mikrobiologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

#### **3.4.3 Isolasi Kapang Selulolitik Limbah Serbuk Gergaji**

Isolasi kapang dilakukan menggunakan pengenceran bertingkat  $10^{-5}$  dengan menimbang 1 gram sampel serbuk gergaji kayu kemudian dicampurkan kedalam 10 ml NaCl 0,9 M kemudian pada pengenceran  $10^{-3}$  sampai  $10^{-5}$  masing masing diambil 1 ml suspensi dan dibiakkan kedalam media PDA dengan metode pour plate (Kaur *et al.*, 2023). Kemudian kapang diinkubasi selama tujuh hari pada suhu ruangan.

Media PDA dibuat dengan ditimbang sebanyak 39 gram PDA instan kemudian dimasukkan kedalam erlenmeyer 1000 ml dan ditambahkan aquades hingga mencapai 1000 ml setelah itu dipanaskan menggunakan hot plate dan diaduk dengan stirer hingga homogen setelah homogen kemudian erlenmeyer ditutup dengan menggunakan kapas dan dibungkus dengan plastik setelah itu dilakukan sterilisasi menggunakan autoklaf (Ramadhani & Wahyuni, 2020).

### **Purifikasi kapang Limbah Serbuk Gergaji**

Kapang yang telah tumbuh kemudian dimurnikan dengan menumbuhkan kapang yang memiliki karakteristik berbeda pada media PDA dengan memotong bagian agar yang ditumbuhi menggunakan cork borer steril, kemudian ditumbuhkan pada media PDA dan diinkubasi selama tujuh hari pada suhu ruangan (Surya *et al.*, 2022). Untuk kapang yang belum murni dilakukan kembali langkah tersebut hingga diperoleh kapang murni. Kapang yang telah murni kemudian disimpan di rak penyimpanan pada suhu ruangan.

### **Karakterisasi Kapang Limbah Serbuk Gergaji**

Kapang yang telah dipurifikasi kemudian dikarakterisasi. Untuk karakterisasi secara makroskopik kapang yang telah dimurnikan dikultur menggunakan cork borer steril pada media PDA kemudian diinkubasi selama tujuh hari. Pengamatan makroskopis kapang dilakukan dengan mengamati karakter koloni kapang yang telah dimurnikan pada cawan dengan media PDA di dalam laminar air flow, karakter yang diamati meliputi warna, tekstur, bentuk, tepi, elevasi.

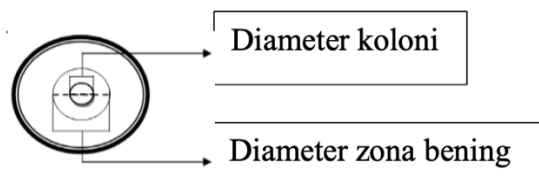
Karakterisasi secara mikroskopik dilakukan dengan membuat preparat dengan mengambil hifa kapang yang sudah ditumbuhkan menggunakan ose steril dan diletakkan pada kaca preparat kemudian ditetesi *Lactophenol cotton blue* (LCB) untuk memberikan warna pada preparat, kemudian hifa yang telah diwarnai ditutup dengan cover glass. Pengamatan secara mikroskopis dilakukan dengan mengamati karakter kapang pada mikroskop meliputi ada tidaknya septa pada hifa,

bentuk konidia, bentuk spora dan ciri khusus yang nampak (Gultom *et al.*, 2019);(Danazumi *et al.*, 2020).

#### 3.4.4 Seleksi Kapang dengan Potensi Selulolitik

Seleksi kapang dengan potensi selulolitik dilakukan dengan menginokulasikan isolat jamur murni kedalam media agar CMC (*Carboxy Methyl Cellulose*) yang telah dimodifikasi. Media CMC dibuat dengan mencampurkan 0,5 gr NaCl, 1 gr K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 gr MgSO<sub>4</sub>, 0.01 gr MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 0.3 gr NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 0.01 g FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 12, 10 gr CMC, dan 12 gr agar kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer 1000 ml dan ditambahkan air suling hingga mencapai batas (Singh *et al.*, 2023). Media yang sudah dibuat kemudian dituangkan, pada saat media mengeras diambil hifa kapang dengan menggunakan jarum ose steril dan diinokulasikan pada media kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 24°C sesuai (Sari *et al.*, 2017).

Aktivitas selulolitik ditandai dengan munculnya area bening pada sekitar isolat jamur. Zona bening diperoleh dengan membanjiri media dengan larutan congo red hingga menutupi seluruh permukaan media, kemudian didiamkan selama 15 menit dan disiram dengan NaCL untuk mencuci warna congo red hingga terlihat zona bening (Sukmawati *et al.*, 2018).



**Gambar 3. 1. Pengukuran zona bening** (Delfiyana *et al.*, 2018)

Zona bening yang muncul kemudian dihitung indeks selulolitiknya dengan

menggunakan rumus sesuai (Fen *et al.*, 2014) yakni :

$$\text{Indek selulolitik} = \frac{\text{Diameter zona bening} - \text{Diameter koloni}}{\text{Diameter koloni}}$$

### 3.4.5 Uji Aktivitas Enzim selulase kapang Limbah Serbuk Gergaji

#### Produksi enzim

Produksi enzim dilakukan dalam labu erlenmeyer 250 ml dengan menggunakan metode SmF. Tiga strain jamur yang menunjukkan zona bening besar pada uji congo red dipilih untuk produksi enzim. Media yang digunakan dalam produksi ini sesuai dengan (Gautam *et al.*, 2011) yakni media garam basal dengan komposisi mg/L NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>: 1650, KNO<sub>3</sub>: 1900, CaCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O: 440, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 370, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 170, MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O: 22.3, ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 8.6, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>: 6.2, KI: 0.83, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O: 0.25, CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O: 0.025, CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O: 0.025, dan glycine: 2, yang dimodifikasi dengan CMC (*carboxymethyl cellulose*) 1% sebagai satu satunya sumber karbon.

Tiga kapang yang dipilih ditumbuhkan pada media PDA selama 4 hari kemudian diambil dengan cork borer diameter 12 mm dan dilakukan pengenceran bertingkat menggunakan NaCl sebanyak satu kali dan dua kali kemudian 1 ml suspensi kapang diinokulasikan kedalam labu fermentasi yang berisi media dan labu-labu tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 30°C dalam keadaan stasioner selama 6 hari pada hari ke 2, 4, dan 6 diambil sebanyak 10 ml sampel untuk diambil enzim kasar.

#### Ekstraksi Enzim Selulase Kasar

Ekstraksi enzim selulase kasar dilakukan dengan disentrifugasi pada 8000



rpm selama 15 menit pada suhu 4° C untuk menghindari denaturasi enzim karena efek panas sentrifugasi. Sentrifugasi bertujuan untuk memisahkan biomassa, dan supernatan sebagai enzim selulase kasar (Lodha *et al.*, 2020). Setelah enzim selulase kasar diperoleh selanjutnya dilakukan uji aktivitas enzim.

#### **Uji aktivitas Enzim selulase metode CMCCase**

Uji aktivitas enzim selulase dengan metode CMCCase dilakukan sesuai metode (Jannah *et al.*, 2018) yang dimodifikasi. Pengujian dilakukan dengan menginkubasi campuran yang terdiri dari 1 mL larutan CMC 1% dalam 1 mL buffer fosfat (pH 7,0) dan 1 mL ekstrak kasar enzim selulase pada suhu 40 °C. Setelah reaksi berlangsung selama 60 menit kemudian diukur kadar gula reduksi pada sampel menggunakan DNS

#### **Uji aktivitas Enzim selulase metode FPase**

Uji aktivitas enzim selulase dengan metode FPase (*Filter Paper Activity*) dilakukan dengan menggunakan metode kertas saring standar sesuai dengan (Kaschuk *et al.*, 2020). Sepotong kertas saring (whatman No. 1, strip 16 cm) dililitkan secara spiral dan ditambahkan ke dalam tabung reaksi dengan 1 ml enzim kasar selulase dan 1 ml buffer fosfat ( pH 7) (Nompo *et al.*, 2019). Tabung reaksi ditempatkan dalam water bath pada suhu 40°C selama 60 menit. Jumlah gula pereduksi ditentukan dengan menggunakan metode asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS).

Metode CMCCase sebagai selulosa bebas menunjukkan peran endo- $\beta$ -1,4-glukanase dalam enzim selulase. Sedangkan metode FPase sebagai selulosa padat yang terikat sebagai kertas menunjukkan peran exo- $\beta$ -1,4-glukanase dalam enzim selulase. Berdasarkan kadar gula reduksi pada kedua pengujian tersebut data

dianalisis untuk mengetahui sebagai jumlah enzim yang diperlukan untuk melepaskan 1  $\mu\text{mol}$  glukosa per menit dari 60 menit hidrolisis enzimatis. Aktivitas CMCase dan FPase dinyatakan dalam unit per mililiter *crude enzyme* (U/mL) berdasarkan perhitungan sebagai berikut :

$$\text{Aktivitas enzim (U/mL)} = \frac{\text{Waktu reaksi (menit)} \times \text{Volume enzim yang digunakan (mL)}}{\text{konsentrasi gula pereduksi } (\mu\text{mol})}$$

### **Pengukuran Kadar Gula Pereduksi Menggunakan Metode DNS**

Setelah hidrolisis terjadi selama 60 menit 1 mL asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS) ditambahkan untuk menghentikan reaksi. Larutan DNS dibuat denganimbang 1 gram DNS, 1 gram NaOH, 0.2 gram fenol, dan 0.05 gram natrium sulfit kemudian dilarutkan dalam akuades sebanyak 100 ml, diaduk hingga tercampur dengan baik dan diberikan 1 ml larutan pada sampel yang akan diuji dan dihomogenkan menggunakan vortex. Selanjutnya dibuat kurva kalibrasi berupa 1 mL larutan glukosa anhidrat pada konsentrasi yang berbeda (0, 200, 400, 600, 800 dan 1000 PPM) dicampur dengan 1 mL DNS. Seluruh sampel yang akan diuji kemudian dipanaskan pada suhu 100 ° C selama 10 menit. Setelah itu ditambahkan 1 ml KNA tartrat 40% yang dibuat dengan melarutkan 20 gram kalium natrium tartarat pada 50 ml akuades, sampel yang telah didinginkan dievaluasi pada UV-vis pada panjang gelombang 540 nm (Miller, 1959).

### **3.4.6 Identifikasi Molekuler**

Identifikasi secara molekuler dilakukan terhadap strain kapang optimal dalam mendegradasi selulosa dengan ditumbuhkan strain tersebut pada media

*Potato Dextrose Agar* (PDA) dalam suhu 28°C selama 7 hari. Identifikasi kapang dilakukan melalui beberapa tahap yakni isolasi DNA, Amplifikasi PCR dan sekuensing.

### **Isolasi DNA**

Isolasi DNA kapang dilakukan dengan diambil 50 mg kapang dalam media PDA kemudian dipindahkan ke dalam 1,5 ml tube. Buffer LP1 sebanyak 400 µl dan 6 µl RNase ditambahkan ke dalam tube, lalu dicampur menggunakan vortex dan diinkubasi selama 10 menit. Tube kemudian ditambahkan dengan 130 µl buffer LP2 dan dicampur menggunakan vortex. Selanjutnya, supernatan dipipet ke dalam 1,5 ml tube baru setelah proses sentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit. Larutan diperkaya dengan menambahkan 750 µl buffer LP3 yang telah ditambahkan etanol, kemudian dicampur menggunakan vortex. Semua larutan dialihkan ke dalam spin column CB3, yang kemudian disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 30 detik.

Setelah pembuangan flow-through, spin column CB3 dipasang kembali pada collection tube. Buffer PW sebanyak 600 µl ditambahkan, dan setelah disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 30 detik, flow-through dibuang dan spin column CB3 dipasang kembali pada collection tube. Langkah ini diulang jika terdapat warna gelap, hijau, atau kuning pada membrane spin column, dengan menambahkan 500 µl etanol P.A. dan melakukan sentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 30 detik sebelum pembuangan flow-through.

Spin column CB3 kemudian disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 2 menit, dan inkubasi dengan tutup terbuka untuk mengeringkan membran. Setelah itu, spin column CB3 dipasang pada 1,5 ml tube baru dan ditambahkan

buffer TE sebanyak 50–100  $\mu$ l, diinkubasi selama 2-3 menit, dan disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 2 menit. Spin column CB3 dibuang dan DNA dipurifikasi untuk langkah selanjutnya. DNA disimpan pada  $-20^{\circ}\text{C}$  selama beberapa hari atau pada  $-70^{\circ}\text{C}$  untuk penyimpanan jangka panjang.

### **Amplifikasi PCR**

Setelah isolasi, sampel kemudian diamplifikasi menggunakan mesin PCR Biorad dalam 30  $\mu$ l larutan yang terdiri dari 15  $\mu$ l PCR Master Mix Nexpro, 2,5  $\mu$ l sampel DNA Template (100 ng/ $\mu$ l), 7,5  $\mu$ l air, dan 2,5  $\mu$ l primer (10 pmol setiap primer forward dan reverse). Primer yang digunakan adalah ITS1 5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3', dan ITS4 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'. Amplifikasi dilakukan dengan pengaturan suhu, pada pre-denaturasi dilakukan pada suhu  $95^{\circ}\text{C}$  selama 5 menit, diikuti dengan 40 siklus yang terdiri dari denaturasi pada suhu  $95^{\circ}\text{C}$  selama 45 detik, annealing pada suhu  $58^{\circ}\text{C}$  selama 45 detik, dan ekstensi pada suhu  $72^{\circ}\text{C}$  selama 45 detik. Proses post elongation dilakukan pada suhu  $72^{\circ}\text{C}$  selama 7 menit. Hasil PCR kemudian dilihat dengan elektroforesis pada agarose 1,5%.

Sampel DNA yang telah didapat disequencing dengan dipanaskan sampel DNA untuk memisahkan untai ganda menjadi dua untai tunggal, setelah itu primer annealing dilakukan dengan menempelkan primer oligonukleotida pendek pada setiap untai tunggal DNA. Campuran dNTP (deoksinukleotida trifosfat) dan ddNTP (dideozinukleotida trifosfat) ditambahkan ke dalam reaksi. Enzim DNA polimerase diinkubasi dengan campuran untuk mensintesis untai DNA baru yang komplementer dengan untai templat.

Kemudian campuran reaksi dipisahkan berdasarkan ukuran fragmen DNA

menggunakan elektroforesis gel poliakrilamida. Kemudian fragmen DNA divisualisasikan menggunakan metode fluoresensi. Pola pita yang dihasilkan pada gel dipindai dengan *sequence scanner*. Hasil sekuen kemudian dianalisis menggunakan perangkat lunak MEGAX data sekuen dipotong pada bagian yang tidak terbaca dan dibersihkan. Sekuen DNA kemudian dibandingkan dengan data yang tersedia di NCBI menggunakan BLAST (Li *et al.*, 2021). Hasil BLAST kemudian dibuat pohon filogenetik menggunakan neighbor joining dengan bootstrap 1000.

### **3.5 Analisis Data**

Data yang diperoleh dalam penelitian ini meliputi data karakteristik makroskopik dan mikroskopik kapang yang disajikan dalam bentuk tabel berdasarkan karakter yang diperoleh. Uji biokimia dilakukan dengan media selektif CMC keberadaan zona bening (*clearing zone*) diamati keberadaannya menunjukkan kemampuan kapang dalam mengurai selulosa. Zona bening yang muncul diukur dan disajikan dalam bentuk indeks selulolitik.

Indeks selulolitik yang diperoleh diperingkat kemudian diambil tiga kapang dengan indeks selulolitik tertinggi, kemudian kapang tersebut digunakan untuk membuat enzim selulase kasar pada konsentrasi dan waktu yang berbeda, data yang diperoleh berupa kadar gula reduksi yang disajikan dalam bentuk grafik. Kemudian identifikasi molekuler kapang optimal disajikan dalam bentuk persentase kemiripan sekuen dari hasil BLAST dan pohon filogenetik melalui konstruksi neighbor joining 1000 bootstrap menggunakan aplikasi MEGAX.

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Karakteristik Kapang yang diisolasi dari Limbah Serbuk Gergaji

Isolasi kapang yang dilakukan pada limbah serbuk gergaji menghasilkan tujuh isolat kapang dengan ciri-ciri sebagai berikut :

**Tabel 4. 1 Karakteristik makroskopik kapang limbah serbuk gergaji**

| Kode isolat | Warna             | Tekstur                | Bentuk          | Tepi         | Elevasi              |
|-------------|-------------------|------------------------|-----------------|--------------|----------------------|
| LSG-1       | Hijau kebiruan    | Beludru                | Eksudat         | Halus        | Cembung              |
| LSG-2       | Biru kehijauan    | Beludru                | Eksudat         | Halus        | Cembung              |
| LSG-3       | Coklat kehitaman  | Granul kasar           | Bundar          | Berjumbai    | Menonjol             |
| LSG-4       | Putih             | Seperti kapas          | Bundar          | menyebar     | Datar                |
| LSG-5       | Hijau             | Berbulu dengan butiran | Tidak beraturan | Bergelombang | Datar                |
| LSG-6       | Putih keabu-abuan | Seperti kapas          | Tidak beraturan | Menyebar     | Tinggi tak beraturan |
| LSG-7       | Putih             | Seperti kapas          | Tidak beraturan | Menyebar     | Tinggi tak beraturan |

Melalui pengamatan tersebut dapat diketahui tujuh isolat kapang yang memiliki ciri-ciri secara makroskopik berbeda. Isolat LSG-1 dan Isolat LSG-2 memiliki kemiripan dalam semua aspek pertumbuhan, yang membedakan terdapat pada warna kedua isolat LSG-1 memberikan warna hijau kebiruan sedangkan LSG-2 biru kehijauan namun kenampakan warna dari kedua kapang tersebut tidak terpaut jauh. Sedangkan Isolat LSG-3 merupakan isolat yang memiliki karakteristik berbeda dari isolat lainnya yakni pada warnanya yang coklat kehitaman, begitu juga dengan isolat LSG-5 yang memiliki warna hijau yang berbeda dengan isolat lainnya. Sedangkan isolat LSG-4, LSG-6 dan LSG-7 memiliki karakteristik warna

yang hampir sama yakni terdapat unsur warna putih namun isolat LSG-4 menunjukkan perbedaan pada pertumbuhannya yang memiliki karakter datar menyebar tidak seperti LSG-6 dan LSG-7. Pada isolat LSG-6 dan LSG-7 sebenarnya memiliki karakteristik yang identik namun perbedaan muncul pada permukaan isolat LSG-6 yang berwarna keabuan.

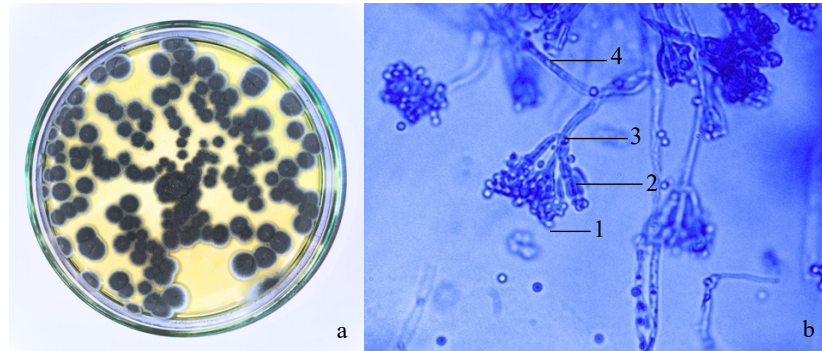
**Tabel 4. 2 Karakteristik mikroskopik kapang limbah serbuk gergaji**

| Kode isolat | Septa               | Konidia                           | Spora | Ciri khusus                         |
|-------------|---------------------|-----------------------------------|-------|-------------------------------------|
| LSG-1       | Hifa bersepta       | rantai yang terbentuk pada fialid | bulat | Konidiofor bercabang seperti sikat  |
| LSG-2       | Hifa bersepta       | Bulat hingga sedikit oval         | bulat | Ujung berbentuk vesikel             |
| LSG-3       | Hifa bersepta       | bulat                             | bulat | berujung vesikel bulat besar        |
| LSG-4       | Hifa bersepta       | bulat                             | bulat | Konidiofor halus                    |
| LSG-5       | Hifa bersepta       | bulat                             | bulat | Hifa bercabang banyak               |
| LSG-6       | Hifa tidak bersepta | Tidak membentuk konidia           | bulat | sporangiofor yang panjang dan besar |
| LSG-7       | Hifa tidak bersepta | Tidak membentuk konidia           | bulat | Spora menempel pada columella       |

Karakteristik pada tabel 4.2 menunjukkan karakter kapang yang diperoleh dari limbah serbuk gergaji secara makroskopik melalui pengamatan dengan bantuan mikroskop dan pewarnaan hifa menggunakan *lactophenol cotton blue*. Berdasarkan pengamatan yang telah dilakukan karakteristik mikroskopik dari beberapa isolat memiliki karakteristik yang berbeda dari ketujuh isolat lima isolat merupakan kapang dengan hifa bersepta sedangkan isolat LSG-6 dan LSG-7 memiliki hifa yang tidak bersekat. Pada pengamatan spora ketujuh isolat memiliki spora bulat. Namun ketujuh isolat memiliki beberapa ciri-ciri khusus seperti pada

tabel 4.2. yang akan dijelaskan lebih jauh sebagai berikut :

### LSG-1



**Gambar 4. 1 Gambar kapang LSG-1** a. Gambar makroskopik, b. Gambar mikroskopik (600x), 1. Spora, 2. Rantai pada fialid, 3. Konidiofor bercabang seperti sikat, 4. Septa

Kapang LSG-1 yang ditumbuhkan dalam media PDA (*Potato Dextrose Agar*) berwarna hijau kebiruan dengan tekstur beludru yang halus. Pertumbuhannya menyerupai eksudat, menyebar merata di permukaan media. Tepi koloninya rata dan tidak bergerigi. Elevasi koloninya cembung, menandakan pertumbuhan yang subur. Di bawah mikroskop, LSG-1 menunjukkan struktur yang lebih kompleks. Hifanya berseptata, terbagi menjadi kompartemen-kompartemen kecil, memberikan kekuatan dan stabilitas pada koloni. Pada ujung hifa, terdapat rantai konidia yang tersusun rapi. Konidia ini berbentuk bulat atau oval dan berfungsi sebagai alat reproduksi LSG-1. Konidiofor, struktur yang menopang konidia, bercabang seperti sikat, memungkinkan penyebaran spora yang luas dan efisien.

Berdasarkan ciri tersebut isolat LSG-1 diprediksi merupakan kapang dari genus *Penicillium* yang memiliki ciri khas hifa berseptata, konidia berbentuk bulat atau oval tersusun dalam rantai, dan konidiofor bercabang seperti sikat (Visagie *et al.*, 2014). *Penicillium* merupakan jamur yang umum ditemukan di berbagai tempat,

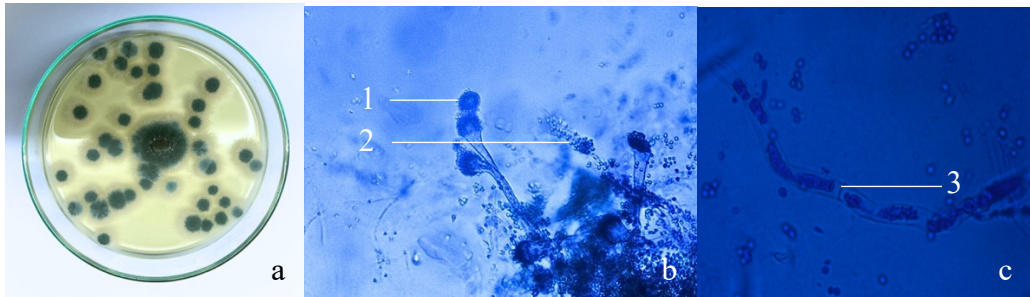


memiliki pengaruh besar bagi manusia. Jamur ini dapat ditemukan di tanah, tanaman, udara, makanan, kotoran hewan, dan air.

*Penicillium* memiliki peran ganda, di mana jamur ini dapat memberikan dampak positif dan negatif bagi kehidupan manusia. *Penicillium* dapat menyebabkan kerusakan dan pembusukan makanan, menghasilkan kerugian ekonomi dan risiko kesehatan. Contohnya, *Penicillium expansum* menyebabkan penyakit busuk biru pada buah-buahan, seperti apel dan jeruk, dan *Penicillium citrinum* menghasilkan mikotoksin citrinin yang dapat menyebabkan kerusakan ginjal. Beberapa spesies *Penicillium* menyerang tanaman sebelum dan sesudah panen, menyebabkan penyakit yang berakibat pada kerusakan dan kehilangan hasil panen. Contohnya, *Penicillium verticillium* menyebabkan penyakit busuk batang pada kentang dan tomat. *Penicillium* menghasilkan berbagai mikotoksin yang berbahaya bagi kesehatan manusia dan hewan. Mikotoksin ini dapat mencemari makanan dan menyebabkan berbagai penyakit, seperti keracunan aflatoxin dan ochratoxin (Torres-Garcia *et al.*, 2022).

*Penicillium* memiliki manfaat sebagai penghasil berbagai senyawa bioaktif dengan potensi medis yang besar. Senyawa antimikroba dan immunosupresan yang dihasilkan *Penicillium* menjadi senjata ampuh dalam melawan infeksi dan penyakit. Contohnya, penisilin, antibiotik pertama yang diproduksi dari *Penicillium notatum*. *Penicillium* juga menghasilkan enzim yang memiliki berbagai aplikasi industri, seperti dalam pengolahan makanan dan tekstil. Contohnya, enzim protease yang dihasilkan *Penicillium chrysogenum* digunakan dalam pembuatan bir dan deterjen (Srinivasan *et al.*, 2020).

## LSG-2



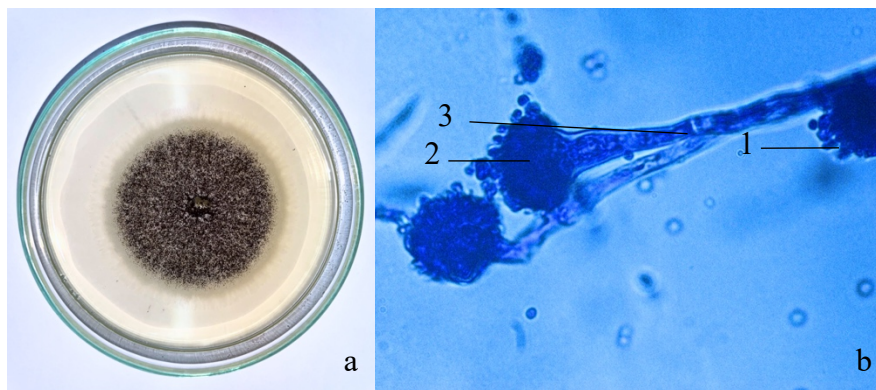
**Gambar 4. 2 Gambar kapang LSG-2** a. Gambar makroskopik, b. Gambar mikroskopik (400x), c. Gambar mikroskopik hifa kapang (600x), 1. Konidia, 2. Spora, 3. Septa.

Koloni LSG-2 berwarna biru kehijauan dengan tekstur beludru halus. Permukaan koloni eksudat, dan tepinya rata. Elevasi koloni cembung. Di bawah mikroskop, LSG-2 memiliki ciri-ciri mikroskopik yang unik. Hifanya berseptata, artinya terbagi menjadi kompartemen individu. Konidia LSG-2 berbentuk bulat hingga sedikit oval, tersusun dalam rantai dan diproduksi pada struktur khusus yang disebut fialid. Ujung konidia LSG-2 berbentuk vesikel. Berdasarkan ciri tersebut isolat LSG-2 diprediksi merupakan bagian dari genus *Aspergillus*.

*Aspergillus* merupakan genus jamur yang meliputi beragam spesies yang tersebar luas di berbagai habitat, *Aspergillus* dapat dibedakan dari genus lainnya melalui kombinasi ciri-ciri makroskopis dan mikroskopis yang khas. Secara makroskopis, *Aspergillus* sering menunjukkan variasi warna koloni yang mencakup hijau, hitam, kuning, coklat, dan krem, meskipun warna hijau atau hitam sering menjadi ciri yang mencolok. Tekstur koloninya umumnya beludru atau berdebu, tetapi ini juga bisa ditemukan pada genus lain tanpa spesifik. Bentuk koloni *Aspergillus* bisa datar, cembung, atau berkerut, tidak memberikan ciri yang unik untuk identifikasi genus ini (Amaiike & Keller, 2011).

Secara mikroskopis, karakteristik utama *Aspergillus* termasuk hifa bersepta, yang terdiri dari sekat-sekat yang membagi hifa menjadi kompartemen. Konidiofornya berbentuk seperti tiang tegak dengan vesikel di ujungnya, yang mendukung struktur seperti jari-jari disebut fialid. Konidia *Aspergillus* halus, biasanya berwarna hijau atau coklat, tersusun dalam rantai pada fialid. Variasi dalam bentuk konidia dan cara penempelan pada fialid dapat terjadi antar spesies (Géry *et al.*, 2021).

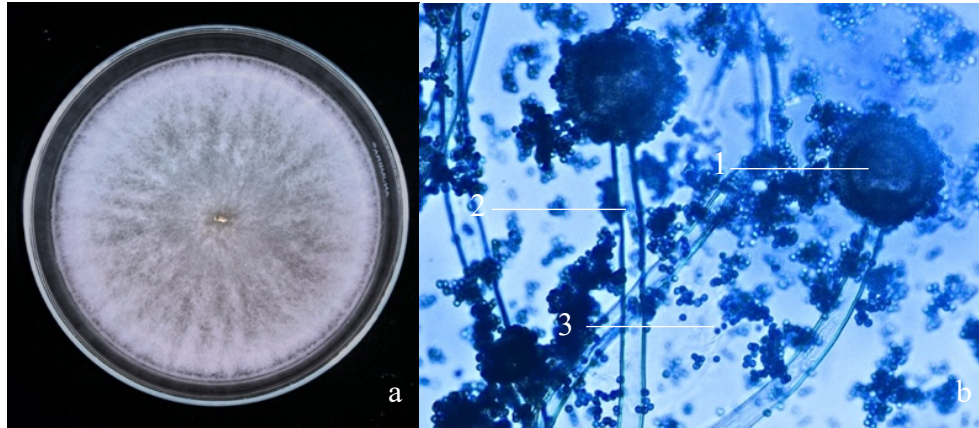
### LSG-3



**Gambar 4. 3 Gambar kapang LSG-3** a. Gambar makroskopik, b. Gambar mikroskopik (600x), 1. Spora, 2. Konidia, 3. Septa

LSG-3 menunjukkan ciri-ciri makroskopik koloni yang secara garis besar berwarna coklat kehitaman dengan ujung putih yang memiliki tekstur kasar seperti butiran pasir. Bentuk koloni LSG-3 bundar dengan tepi berjumbai, dan elevasi koloni menonjol. Di bawah mikroskop, LSG-3 memiliki menunjukkan hifanya yang memiliki septa. Konidia LSG-3 berbentuk bulat dan spora juga berbentuk bulat. Ciri-ciri tersebut mendekati ciri dari genus *Aspergillus* yang dijelaskan pada LSG-2 namun pada LSG-3 terdapat perbedaan pada warna koloni yang berwarna coklat kehitaman.

## LSG-4



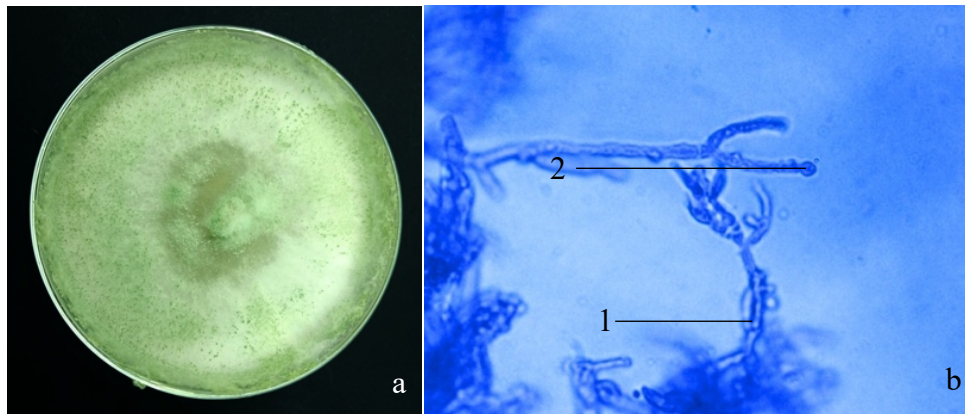
**Gambar 4. 4 Gambar kapang LSG-4** a. Gambar makroskopik, b. Gambar mikroskopik (600x), 1. Konidia, 2. Hifa, 3. Spora

Koloni LSG-4 berwarna hijau dengan tekstur berbulu dengan butiran. Permukaan koloni bulat, dan tepinya menyebar, elevasi koloni datar. Di bawah mikroskop, LSG-4 memiliki ciri-ciri mikroskopik yang unik. Hifanya bersepta, artinya terbagi menjadi kompartemen individu. Konidia LSG-4 berbentuk bulat dan spora juga berbentuk bulat. Konidiofor LSG-4 halus. Berdasarkan ciri tersebut isolat LSG-4 diprediksi merupakan bagian dari genus *Aspergillus* seperti LSG-2 dan LSG-3 namun pada LSG-4 terdapat perbedaan pada warna koloni yang berwarna putih seperti kapas.

*Aspergillus* merupakan genus jamur yang meliputi beragam spesies yang tersebar luas di berbagai habitat, *Aspergillus* dapat dibedakan dari genus lainnya melalui kombinasi ciri-ciri makroskopis dan mikroskopis yang khas. Secara makroskopis, *Aspergillus* sering menunjukkan variasi warna koloni yang akan bergantung pada kepadatan konidia yang dihasilkan yaitu biru, hijau, kuning, hitam, dan putih. Miselium *Aspergillus* memiliki sekat konidospora yang tidak bercabang, bertekstur kasar atau halus, dengan sel kaki di dasar akan menopang besarnya vesikel yang terletak di ujung.

Vesikel yang terbentuk satu atau dua baris, kemudian akan menopang vialid yang berbentuk seperti labu, baris vesikel tersebut akan memproduksi rantai filalokonidia yang halus maupun kasar (Kern, 1985). Semua spesies *Aspergillus* dicirikan oleh konidiofora, yang berkembang menjadi vesikel besar pada bagian ujung dan tertutup oleh falid yang menghasilkan rantai panjang konidia. Fialid mungkin muncul secara langsung dari vesikel (uniseriate) dan dari metulae, yang melekat pada vesikel (biseriate). Spesies *aspergillus* dapat diidentifikasi terutama berdasarkan struktur konidia yang ukuran, warna, serta bentuk konidiofora, konidia dan fialidnya (Joklik *et al*, 1988).

#### LSG-5

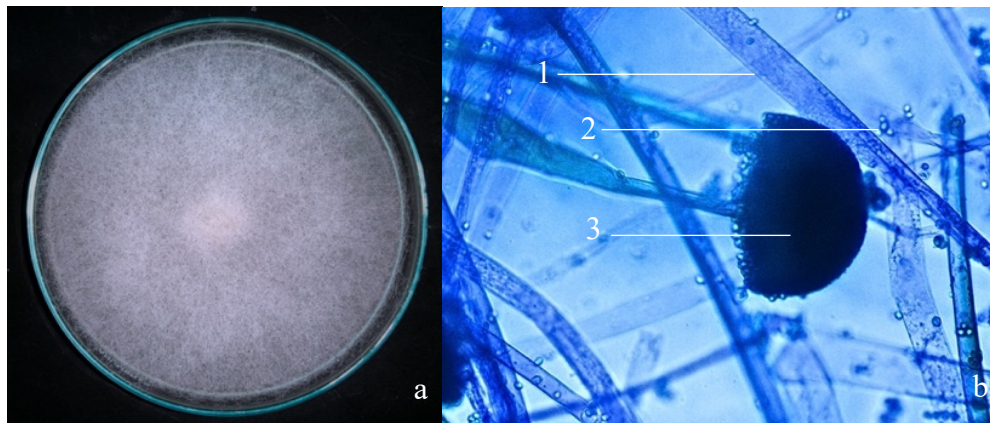


**Gambar 4. 5 Gambar kapang LSG-5** a. Gambar makroskopik, b. Gambar mikroskopik (400x), 1. Septa, 2. Spora

Koloni LSG-5 berwarna putih, tekstur berbulu dengan butiran. Permukaan koloni tidak beraturan, dan tepinya bergelombang. Elevasi koloni datar. Di bawah mikroskop, LSG-5 memiliki ciri-ciri mikroskopik yang unik. Hifanya berseptata, artinya terbagi menjadi kompartemen individu. Konidia LSG-5 berbentuk bulat dan spora juga berbentuk bulat. Hifa LSG-5 banyak bercabang. Berdasarkan ciri tersebut isolat LSG-5 diprediksi merupakan bagian dari genus *Trichoderma*.

Berdasarkan hasil pengamatan tersebut juga ditegaskan oleh (Barnet and Hunter, 1972) bahwa *Trichoderma* sp mempunyai ciri-ciri morfologi sebagai berikut warna koloni hijau, tekstur seperti bulu, konidia berwarna hijau tua, fialid tersusun berkelompok, konidiofor hialin dan bercabang banyak. Konidiofor bercabang-cabang menyerupai piramida, yaitu pada bagian bawah cabang lateral yang berulang-ulang, sedangkan ke arah ujung percabangan menjadi bertambah pendek (Tindaon, 2008). Konidia tersebut merupakan sel tunggal yang berbentuk oval yang saling melekat satu sama lain sehingga membentuk suatu kimipulan pada ujung konidiofora. Koloni fungi ini mudah dikenali dengan pertumbuhan yang cepat dan matang pada pertumbuhan 5 hari. Pada temperatur 25 °C dan dalam media *Potato Dextrose Agar* (PDA) fungi ini tumbuh seperti bulu domba dan awalnya terlihat putih, selanjutnya konidia mulai terbentuk menjadi warna hijau (Fenta *et al.*, 2023).

#### LSG-6



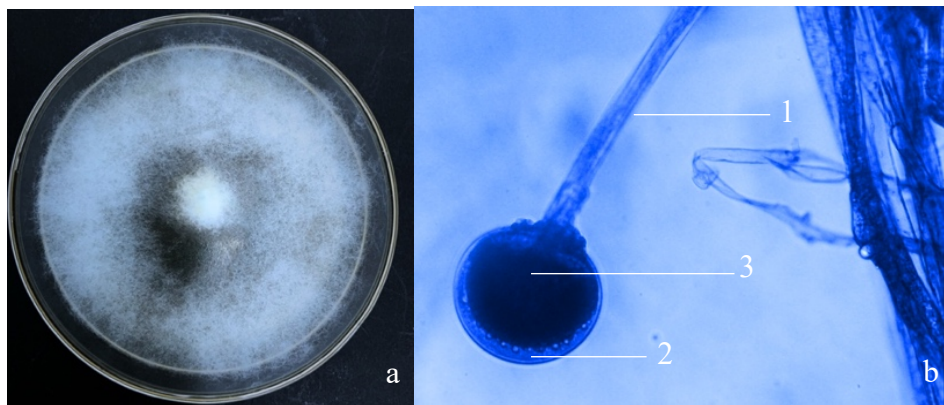
**Gambar 4. 6 Gambar kapang LSG-6** a. Gambar makroskopik, b. Gambar mikroskopik (600x), 1. Hifa, 2. Spora, 3. Konidia.

Koloni LSG-6 berwarna putih keabu-abuan, tekstur halus seperti kapas. Permukaan koloni tidak beraturan, dan tepinya menyebar. Elevasi koloni tinggi tak beraturan. Di bawah mikroskop, LSG-6 memiliki ciri-ciri mikroskopik yang

unik. Hifanya tidak bersepta. Konidia LSG-6 tidak membentuk konidia, spora berbentuk bulat. Sporangiofor pada LSG-6 panjang dan besar. Berdasarkan ciri tersebut isolat LSG-6 diprediksi merupakan bagian dari genus *Rhizopus* sp.

*Rhizopus* sp. ini memiliki morfologi yaitu tersusun atas rizoid yaitu hifa yang bercabang dengan bentuk kecil dan tumbuh dibawah stolon yang fungsinya sebagai jangkar untuk menyerap makanan, lalu ada stolon yaitu hifa yang membentuk jaringan pada permukaan substratnya, kemudian ada sporangiofor yaitu hifa yang tumbuhnya ke atas seperti batang, lalu ada sporangium yaitu hifa yang membentuk spora dan bentuknya bulat, lalu ada collarette yaitu seperti kerah kecil yang terbentuk akibat dari kelebihan dinding sel di sekitar sporangiofor, kemudian ada columella yaitu ujung sporangiofor yang menjadi tempat terbentuknya sporangium, lalu ada apophys yaitu sporangiofor yang membesar, dan ada sporangiospora yaitu alat reproduksi aseksual pada *Rhizopus* sp. (Rosidah, 2023).

#### LSG-7



**Gambar 4. 7 Gambar kapang LSG-7 a. Gambar makroskopik, b. Gambar mikroskopik (600x), 1. Hifa, 2. Spora, 3. Konidia.**

Koloni LSG-7 berwarna putih, tekstur halus seperti kapas. Permukaan koloni tidak beraturan, dan tepinya menyebar. Elevasi koloni tinggi tak beraturan.

Di bawah mikroskop, LSG-7 memiliki ciri-ciri mikroskopik yang unik. Hifanya tidak berseptata. Konidia LSG-6 tidak membentuk konidia, spora berbentuk bulat. Spora pada LSG-7 menempel pada columella. Berdasarkan ciri tersebut isolat LSG-6 diprediksi merupakan bagian dari genus *Mucor sp.*

Hal ini diperkuat dengan pernyataan Fathoni dkk (2017), bahwa koloni *Mucor sp.* memiliki karakteristik yaitu warna koloni putih yang tumbuh lebat, permukaan berbentuk seperti kapas, permukaan koloni rata dan tidak terdapat garis-garis radial konsnetris. Ciri mikroskopis *Mucor sp.* terlihat hifa tidak bersekat, konidofor tunggal tidak terlihat rhizoid, sporangium berbetuk bulat, kolumela berbentuk bulat, dengan spora berbentuk bulat dan halus. Sporangiospora yang muncul tidak teratur dari hifa, berbentuk panjang dan lurus, percabangannya tidak teratur seringkali muncul. Sporangiospora *Mucor* mengalami pembesaran pada bagian akhir distal menjadi columella dengan bentuk yang bervariasi.

### **Karakteristik Molekuler**

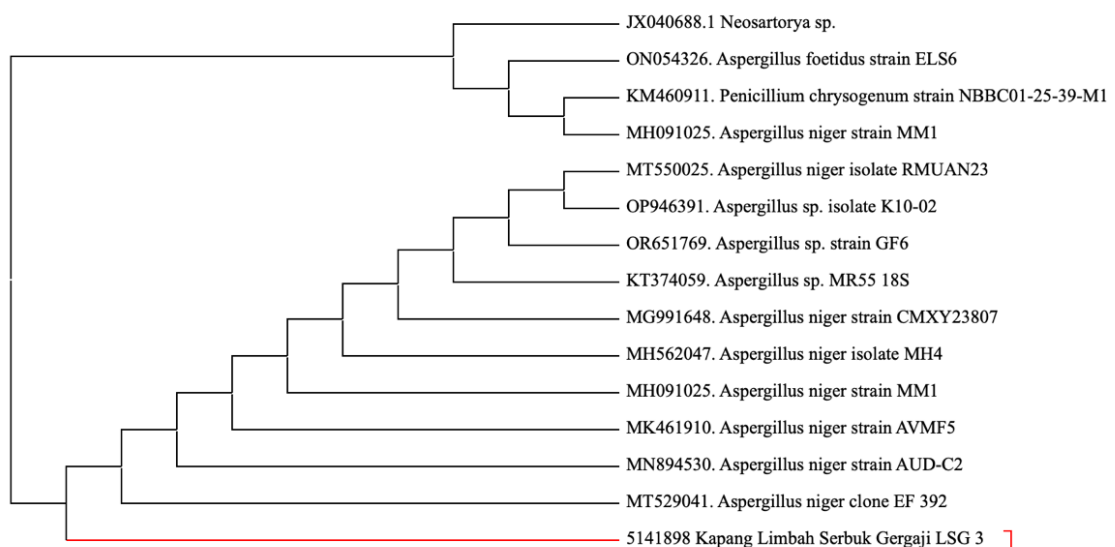
Kapang yang dikarakterisasi secara molekuler dalam penelitian ini adalah tiga kapang dengan aktivitas selulolitik terbaik berdasarkan indeks selulolitik kapang (Gambar 4.2). karakterisasi kapang secara molekuler dilakukan dengan membandingkan hasil sekuensing dengan data gen di *genbank* NCBI menggunakan BLAST. Berdasarkan pengujian yang telah dilakukan diperoleh hasil sebagai berikut :

**Tabel 4. 3 Identifikasi sequence gen ITS menggunakan BLAST NCBI**

| No | Sampel | Identifikasi                 | %      | Seq ID     |
|----|--------|------------------------------|--------|------------|
| 1  | LSG-3  | <i>Aspergillus niger</i>     | 100.00 | OP237080.1 |
| 2  | LSG-5  | <i>Trichoderma harzianum</i> | 99.83  | KX379170.1 |
| 3  | LSG-6  | <i>Rhizopus arrhizus</i>     | 99.83  | MK805507.1 |

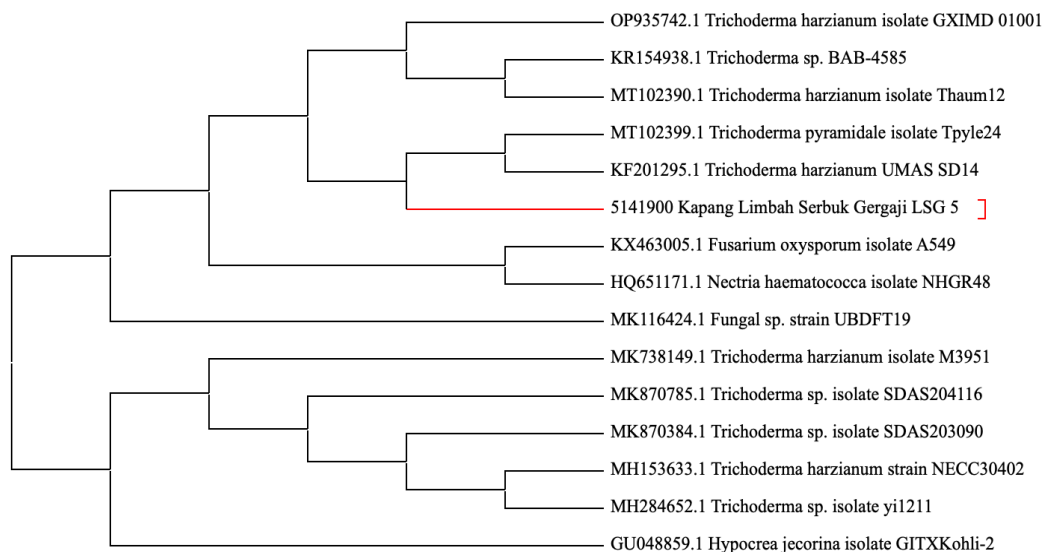


Berdasarkan tabel tersebut dapat diketahui bahwa LSG-3 sangat identik dengan *Aspergillus niger* dengan tingkat kemiripan 100%. Sedangkan kapang LSG-5 memiliki kecocokan dengan *Trichoderma harzianum* dengan tingkat kecocokan 99.83% dan LSG-6 memiliki kecocokan dengan *Rhizopus arrhizus* dengan tingkat kecocokan 99.83%. Untuk mengetahui kekerabatan dari kapang limbah serbuk gergaji dengan kapang sejenis yang terdapat pada database NCBI dilakukan konstruksi pohon filogenetik dengan menggunakan perangkat lunak MEGAX menggunakan neighbor joining (nilai bootstrap 1000) dan dibandingkan dengan 12 gen dengan persentase kemiripan tertinggi pada BLAST NCBI. *Outgroup* yang digunakan untuk konstruksi pohon filogenetik pada penelitian ini terdiri dari tiga spesies dengan kriteria *outgroup* pertama adalah spesies yang memiliki famili sama tetapi genus berbeda, *outgroup* kedua famili berbeda tetapi ordo sama, dan *outgroup* ketiga yang memiliki kekerabatan sangat jauh dari gen yang diidentifikasi. Berdasarkan konstruksi pohon filogenetik yang telah dilakukan diperoleh hasil sebagai berikut :



**Gambar 4. 8 Pohon Filogenetik Kapang Limbah Serbuk Gergaji LSG 3**

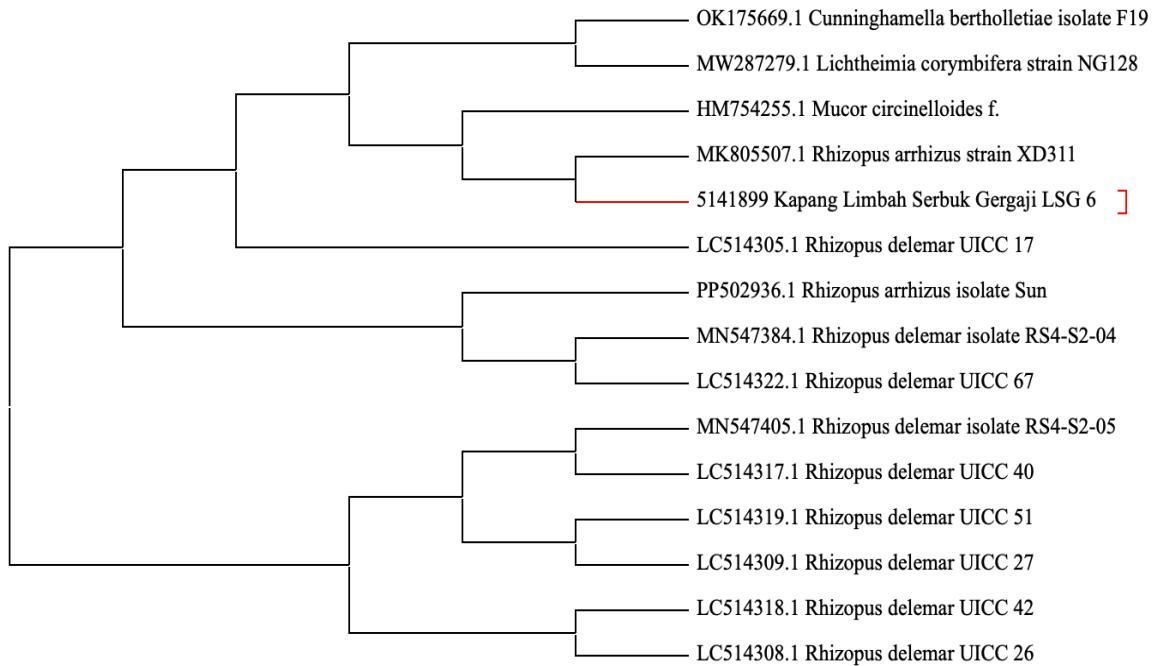
Konstruksi pohon filogenetik kapang LSG 3 menunjukkan dua klad. Isolat kapang LSG 3 berada pada klad golongan *Aspergillus* dan memiliki kedekatan genetik dengan *Aspergillus niger* clone EF394. *Out group* yang digunakan dalam konstruksi pohon ini membentuk klad tersendiri menandakan spesies tersebut memiliki perbedaan genetik yang signifikan. Kapang limbah serbuk gergaji berada pada garis terluar dan jarak evolusi terjauh dari spesies *Aspergillus niger* lainnya hal ini menunjukkan kapang limbah serbuk gergaji memiliki gen yang lebih primitif dari *Aspergillus niger* lainnya.



**Gambar 4. 9 Pohon Filogenetik Kapang Limbah Serbuk Gergaji LSG 5**

Secara genetik, isolat kapang LSG 5 dari limbah serbuk gergaji berkerabat dekat dengan KF201295.1 *Trichoderma harzianum* UMAS SD14 dan MT102399.1 *Trichoderma pyramidal* isolate Tpyle24 berdasarkan analisis sekuens DNA dan pohon filogenetik. Tingkat kesamaan sekuens DNA yang tinggi dan posisi cabang filogenetik yang berdekatan menunjukkan bahwa mereka memiliki hubungan evolusi yang erat. Pohon ini menunjukkan adanya keragaman genetik yang tinggi di antara isolat *Trichoderma harzianum*. Keragaman ini

mungkin disebabkan oleh faktor-faktor seperti lingkungan, adaptasi, dan pertukaran genetik (Honnay, 2013).



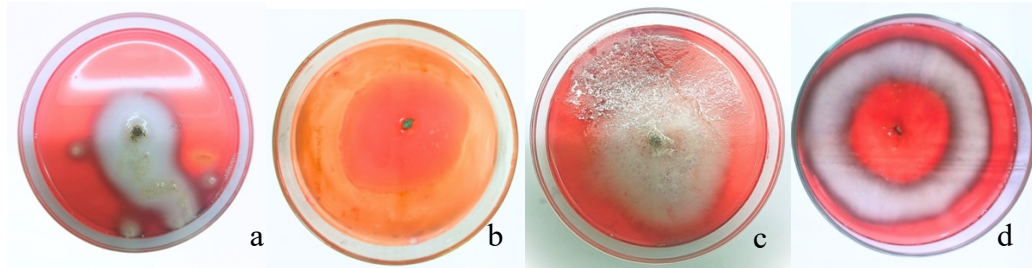
**Gambar 4.10 Pohon Filogenetik Kapang Limbah Serbuk Gergaji LSG 6**

Isolat kapang limbah serbuk gergaji LSG-6 memiliki kedekatan genetik dengan *Rhizopus arrhizus*. Dalam pohon filogenetik yang dibagun dapat terlihat bahwa *Rhizopus arrhizus* memiliki kedekatan genetik terhadap *Rhizopus delemar* sedangkan *Mucor circinelloides*. merupakan spesies yang lebih dekat pada *Rhizopus arrhizus* dan *Rhizopus delemar* bila dibandingkan dengan *Cunninghamella bertholletiae* dan *Lichtheimia corymbifera* dikarenakan *Mucor circinelloides*. merupakan spesies yang memiliki famili sama namun berbeda genus.

#### **4.2 Aktivitas selulolitik kapang limbah serbuk gergaji**

Kapang yang telah diperoleh dari purifikasi diuji kemampuannya menggunakan media padat dengan CMC sebagai sumber karbon utama dan diinkubasi selama 4 hari setelah itu kapang diwarnai dengan congo red untuk

mendeteksi adanya zona bening (*clearing zone*). Berdasarkan hasil yang diperoleh terdapat kapang dengan kemampuan mengurai selulosa sebagai berikut :



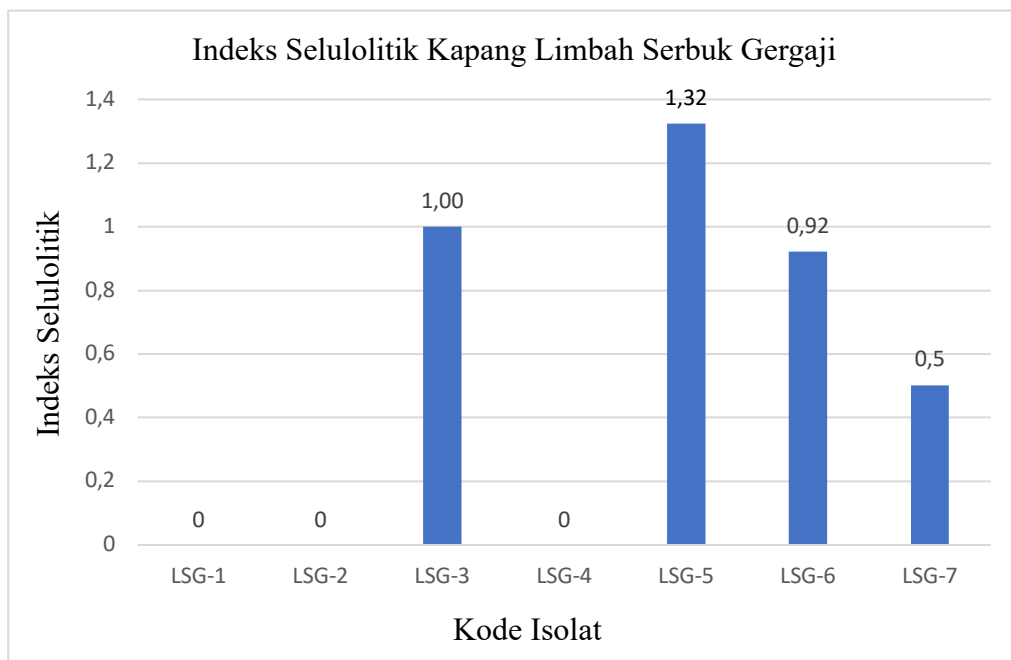
**Gambar 4. 11** Isolat kapang yang menampilkan zona bening a. LSG-3, b. LSG-5, c. LSG-6, dan d. LSG 7

Melalui uji biokimia kapang diperoleh empat isolat kapang dengan zona bening yang sangat jelas yakni isolat LSG-3, LSG-5, LSG-6, dan LSG 7. Zona bening yang muncul dikarenakan tidak terwarnai oleh *congo red* menandakan adanya enzim selulase yang telah mendegradasi selulosa pada media CMC. Hal ini terjadi karena media CMC dikondisikan sebagai sumber karbon utama pada media sehingga kapang akan mengurai selulosa untuk nutrisi pertumbuhan hal ini sesuai dengan Darwesh *et al.*, (2020) dengan menjadikan CMC sebagai sumber karbon utama pada media dapat menjadi indikator terjadinya penguraian selulosa.

Zona bening yang muncul disebabkan *congo red* dapat berikatan kuat dengan polisakarida dijelaskan (P. Liu *et al.*, 2018) bahwa *congo red* dapat membentuk ikatan dengan polisakarida. Ikatan yang terjadi pada *congo red* bersifat spesifik pada polisakarida dengan ikatan  $\beta$ -1,4 yang juga terkandung dalam CMC pada media yang digunakan dalam penelitian ini sehingga jika terjadi degradasi oleh enzim selulase dengan produk gula sederhana monosakarida maka tidak terjadi ikatan kompleks dengan *congo red* (Restu Nugraha *et al.*, 2014). Dengan demikian maka warna merah pada media tidak dapat muncul.

Zona bening pada media dapat terlihat jelas setelah pencucian dengan menggunakan NaCl 1M dikarenakan NaCl dapat melunturkan congo red pada media sebab merupakan garam natrium benzidinediazo-bis-1-naphthylamine-4 asam sulfonat ( $C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$ ) sehingga zona bening akan terlihat jelas (Yusnia *et al.*, 2019).

Zona bening yang muncul pada media kemudian dihitung indeks selulolitiknya untuk mengetahui kemampuan kapang dalam mengurai selulosa. berdasarkan zona bening yang diperoleh indeks selulolitik kapang yang diisolasi dari serbuk gergaji kayu adalah sebagai berikut :



**Gambar 4. 12 Indeks selulolitik kapang limbah serbuk gergaji pada media agar CMC (*Carboxymethyl cellulose*)**

Indeks selulolitik yang diperoleh menunjukkan empat isolat dengan aktivitas selulolitik. Indeks selulolitik terbesar secara berurutan terdapat pada isolat kapang LSG-5 kemudian LSG-3, LSG-6 dan LSG-7 memperoleh indeks selulolitik terendah pada 0,5 sehingga dalam penelitian ini kapang yang digunakan

untuk uji selanjutnya adalah LSG-5, LSG-3, dan LSG-6. Menurut Rahardyan & Moko, (2023) indeks selulolitik  $<1$  tergolong rendah sedangkan  $1 \leq$  dan  $\leq 2$  tergolong sedang dan  $> 2$  tergolong tinggi, sehingga dapat diketahui bahwa dari ketiga kapang LSG-5 dan LSG-3 tergolong memiliki indeks selulolitik sedang, sedangkan kapang LSG-6 tergolong rendah.

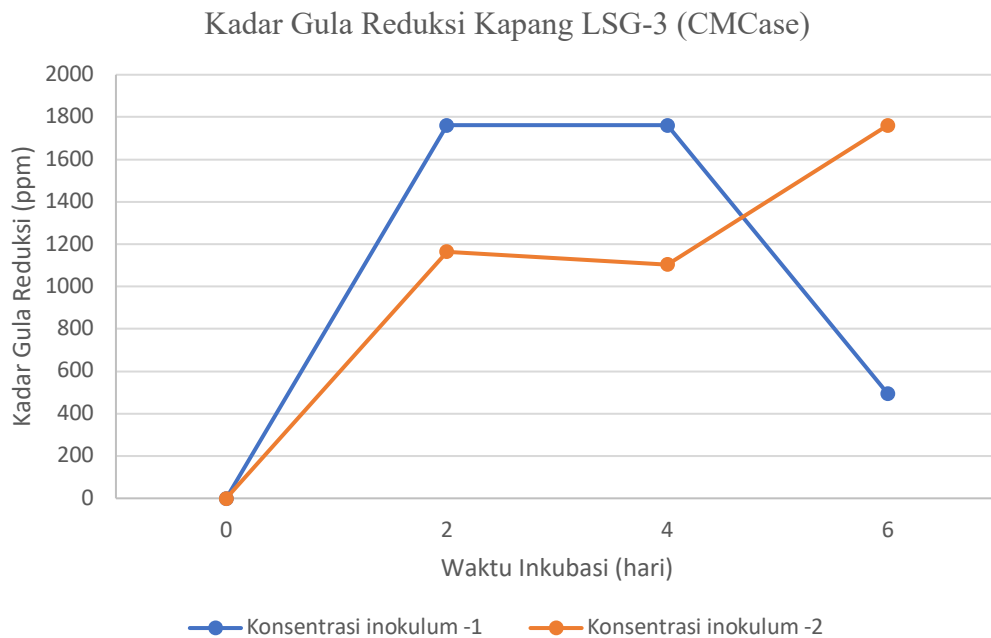
Aktivitas enzim selulase kapang limbah serbuk gergaji pada penelitian ini diukur berdasarkan kadar gula pereduksi yang diperoleh dari metode CMC<sub>Case</sub> dan FPase yang menggambarkan ketersediaan selulosa untuk industri yakni dalam bentuk selulosa bebas seperti pada larutan CMC dan selulosa padat dalam kertas saring (*filter paper*) yang menggambarkan ketersediaan selulosa di alam. Metode CMC<sub>Case</sub> dan FPase juga menggambarkan kinerja enzim dalam kompleks enzim selulase terutama pada exoglukanase dan endoglukanase (Champreda *et al.*, 2019).

Perlakuan yang diberikan dalam penelitian ini adalah konsentrasi inokulum dan waktu inkubasi untuk mengetahui konsentrasi spora dan waktu terbaik dalam menghasilkan enzim selulase dari kapang selulolitik limbah serbuk gergaji. Pengukuran aktivitas enzim dilakukan dengan memposisikan enzim untuk menghidrolisis selulosa pada CMC dan Kertas saring (*filter paper*) selama 60 menit. Kemudian, sampel diukur gulapereduksinya menggunakan DNS dan didapatkan data U/mL. Pengukuran kadar gulareduksi yang dilakukan secara tidak langsung menggambarkan aktivitas enzim selulase yang dihasilkan oleh kapang karena proses degradasi selulosa yang telah dilakukan pada CMC dan kertas saring.

Pengukuran aktivitas enzim pada penelitian ini didasarkan pada gula

reduksi yang dihasilkan oleh reaksi enzimatik selulase terhadap selulosa, dengan terdegradasinya selulosa glukosa yang dihasilkan kemudian diukur menggunakan reagen DNS pada spektrofotometer dengan tingginya kadar gula reduksi yang diperoleh menunjukkan aktivitas enzim yang tinggi, begitupun sebaliknya.

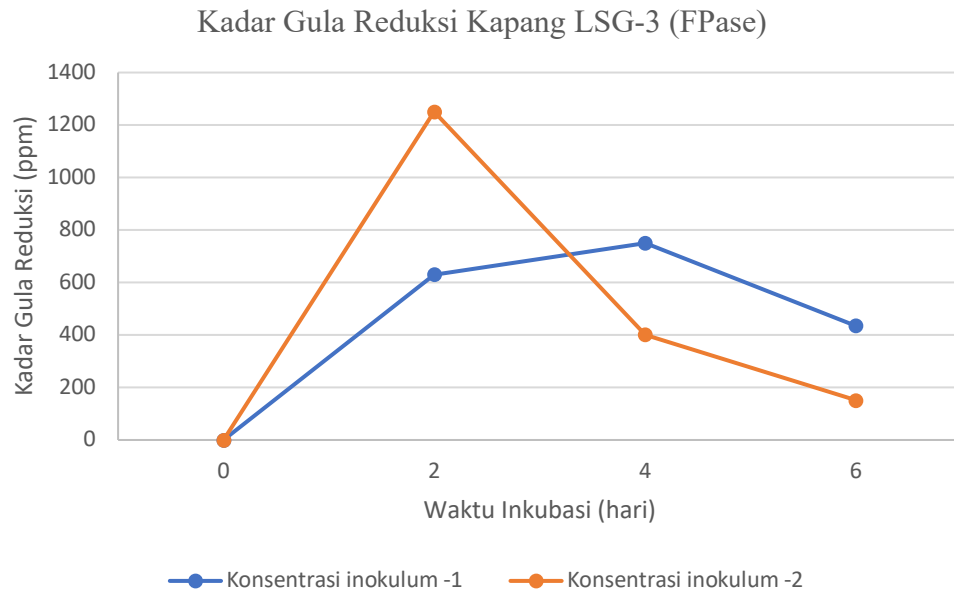
### Kadar gula reduksi isolat LSG-3



**Gambar 4. 13** Grafik kadar gula reduksi kapang LSG-3 metode CMCase

Konsentrasi -1 menunjukkan aktivitas awal yang tinggi pada hari 2 dan 4, tetapi mengalami penurunan signifikan pada hari 6. Ini dapat disebabkan oleh beberapa faktor seperti pengurangan substrat, inaktivasi enzim, atau berubahnya glukosa menjadi senyawa lanjutan yang tidak terbaca sebagai gula reduksi. Konsentrasi -2 menunjukkan peningkatan aktivitas yang lebih rendah dibandingkan Konsentrasi -1 pada hari 2 dan 4, tetapi kemudian meningkat drastis pada hari 6. Ini menunjukkan bahwa ada faktor yang mungkin mempengaruhi

aktivitas enzim lebih lambat dibandingkan Konsentrasi -1, atau mungkin ada adaptasi enzim terhadap kondisi pada hari ke-6 yang meningkatkan aktivitasnya.

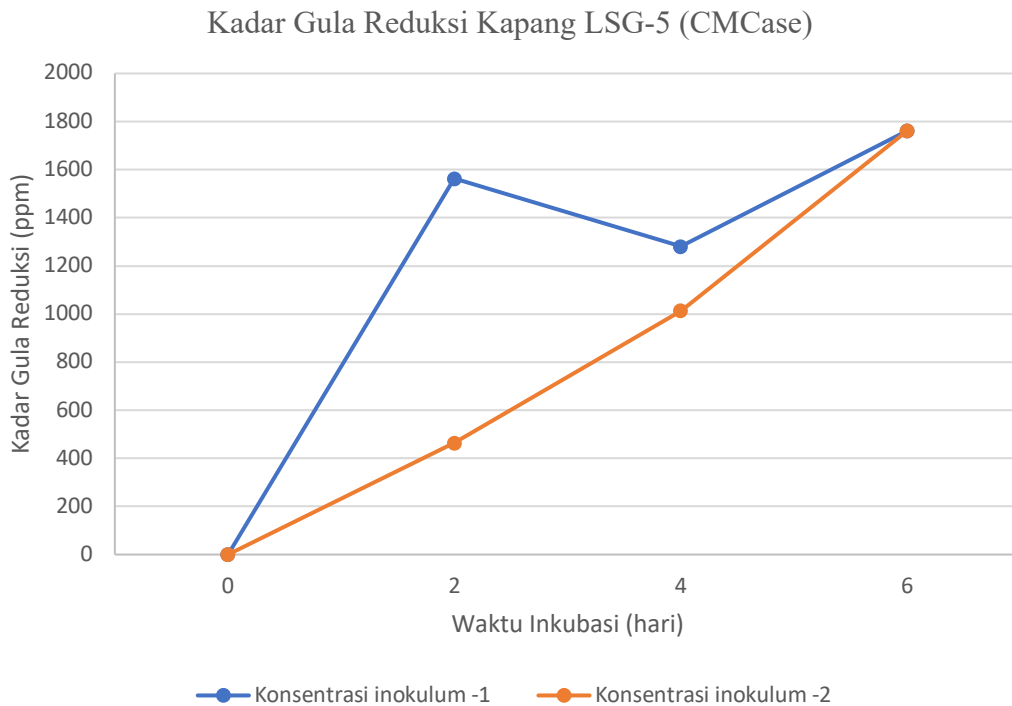


**Gambar 4. 14 Grafik kadar gula reduksi kapang LSG-3 metode FPase**

Konsentrasi -1 menunjukkan peningkatan awal dalam aktivitas enzim pada hari 2 dan 4, namun aktivitas menurun pada hari 6. Ini menunjukkan bahwa aktivitas enzim mencapai puncaknya pada hari 4 dan kemudian menurun, kemungkinan karena pengurangan substrat, inaktivasi enzim, atau faktor lingkungan yang mempengaruhi aktivitas enzim. Konsentrasi -2 menunjukkan aktivitas yang lebih tinggi daripada Konsentrasi -1 pada hari 2, tetapi aktivitas enzim menurun drastis pada hari 4 dan terus menurun pada hari 6. Penurunan tajam ini bisa menunjukkan bahwa kondisi konsentrasi-2 tidak mendukung aktivitas enzim dalam jangka waktu yang lebih lama, atau ada faktor penghambat yang muncul setelah hari 2.

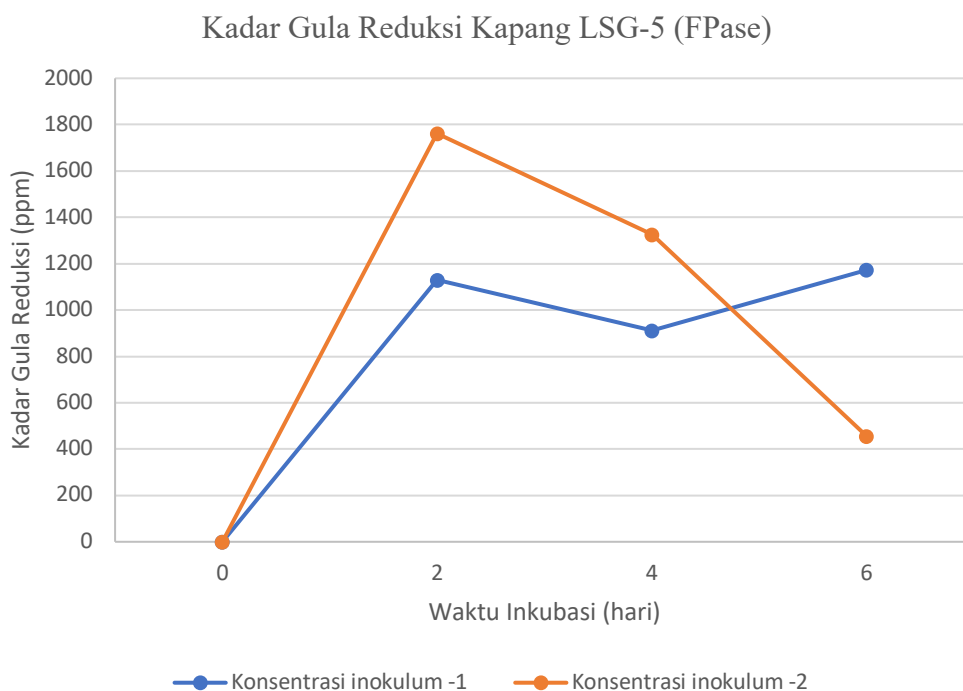


## Kadar gula reduksi isolat LSG-5



**Gambar 4. 15** Grafik kadar gula reduksi kapang LSG-5 metode CMCase

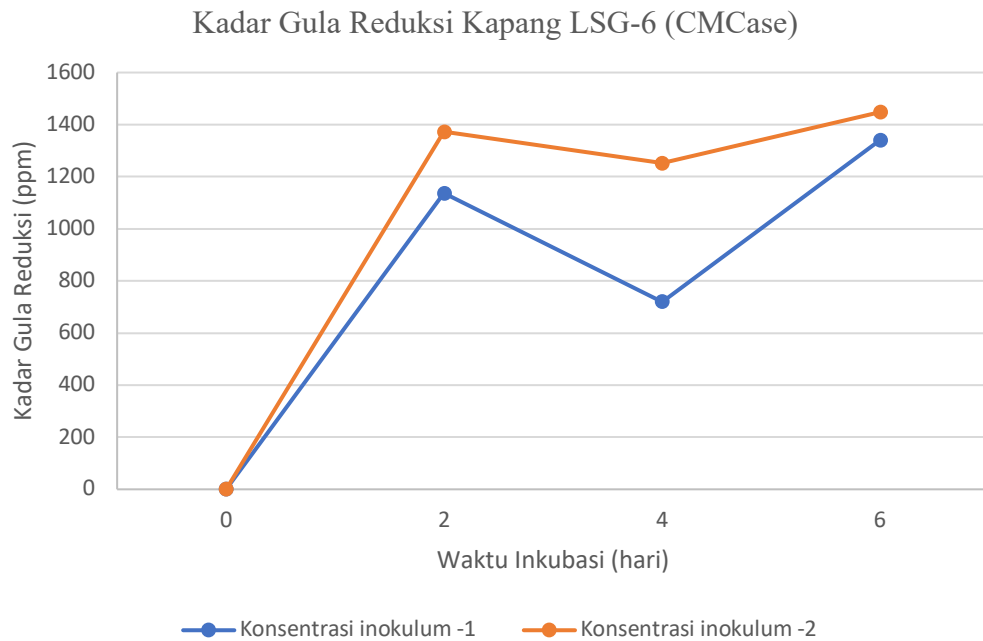
Konsentrasi -1 menunjukkan aktivitas awal yang tinggi pada hari 2, sedikit menurun pada hari 4, dan kemudian meningkat lagi pada hari 6. Ini menunjukkan bahwa aktivitas enzim eksoglukanase mungkin dipengaruhi oleh faktor-faktor seperti ketersediaan substrat atau adaptasi enzim terhadap kondisi lingkungan. Konsentrasi -2 menunjukkan aktivitas awal yang lebih rendah pada hari 2, tetapi meningkat secara signifikan pada hari 4 dan terus meningkat hingga mencapai aktivitas yang sama dengan Konsentrasi -1 pada hari 6. Ini menunjukkan bahwa enzim membutuhkan waktu lebih lama untuk mencapai aktivitas optimal pada konsentrasi ini.



**Gambar 4. 16 Grafik kadar gula reduksi kapang LSG-5 metode FPase**

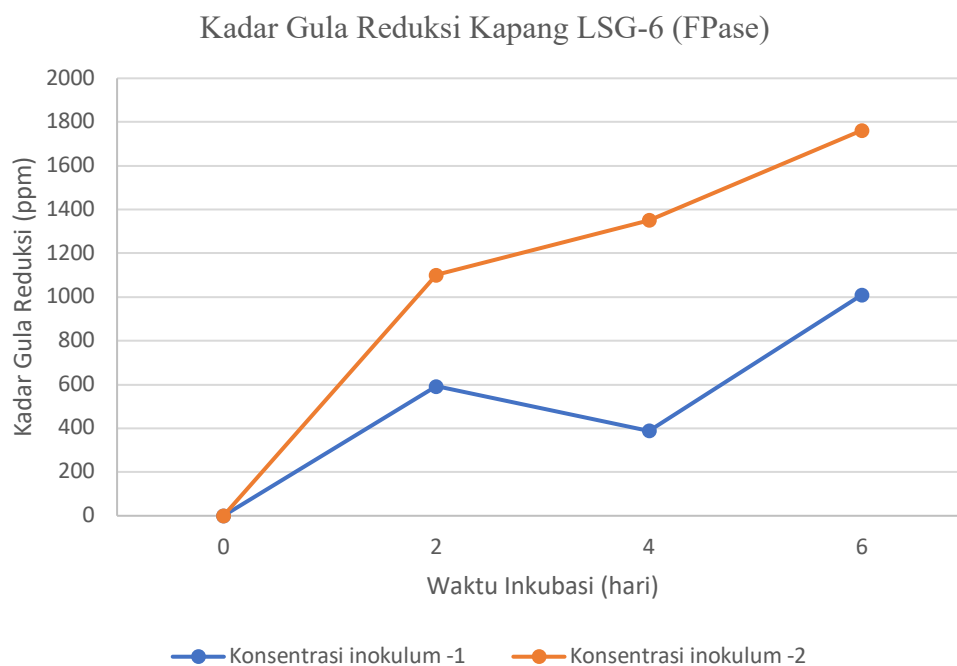
Konsentrasi -1 menunjukkan peningkatan aktivitas pada hari 2, penurunan pada hari 4, dan peningkatan kembali pada hari 6. Pola ini mungkin menunjukkan siklus penyesuaian enzim terhadap substrat atau kondisi lingkungan yang berbeda. Konsentrasi -2 menunjukkan aktivitas awal yang lebih tinggi pada hari 2, diikuti oleh penurunan pada hari 4 dan penurunan tajam pada hari 6. Aktivitas yang sangat tinggi pada hari 2 dan kemudian penurunan drastis bisa menunjukkan kelelahan enzim atau pengurangan substrat yang cepat dalam konsentrasi ini.

## Kadar gula reduksi isolat LSG-6



**Gambar 4. 17 Grafik kadar gula reduksi kapang LSG-6 metode CMCase**

Konsentrasi -1 menunjukkan peningkatan awal pada hari 2, penurunan pada hari 4, dan kemudian peningkatan lagi pada hari 6. Pola ini menunjukkan bahwa enzim mungkin mengalami siklus adaptasi terhadap substrat atau kondisi lingkungan yang berbeda. Konsentrasi -2 menunjukkan aktivitas awal yang lebih tinggi pada hari 2, sedikit penurunan pada hari 4, dan kemudian peningkatan lagi pada hari 6. Aktivitas enzim yang lebih tinggi secara konsisten pada Konsentrasi -2 dibandingkan Konsentrasi -1 menunjukkan bahwa konsentrasi substrat yang lebih tinggi mendukung aktivitas enzim yang lebih besar.

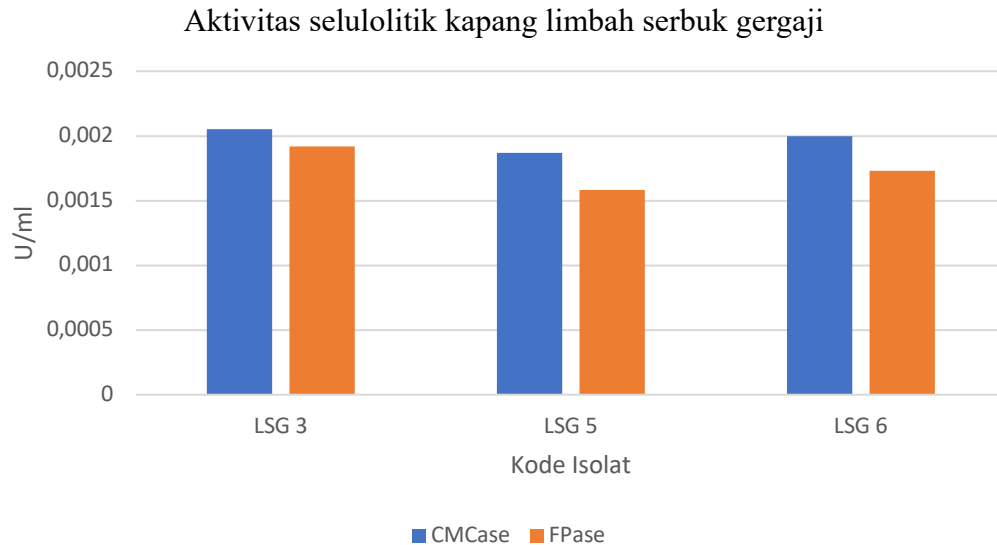


**Gambar 4. 18 Grafik kadar gula reduksi kapang LSG-6 metode FPase**

Konsentrasi -1 menunjukkan peningkatan aktivitas pada hari 2, penurunan pada hari 4, dan peningkatan signifikan pada hari 6. Pola ini menunjukkan bahwa enzim mungkin mengalami siklus adaptasi terhadap substrat atau kondisi lingkungan yang berbeda, dengan aktivitas puncak pada hari 6. Konsentrasi -2 menunjukkan peningkatan aktivitas yang konsisten dari hari 2 hingga hari 6. Aktivitas yang lebih tinggi secara konsisten pada Konsentrasi -2 dibandingkan Konsentrasi -1 menunjukkan bahwa konsentrasi substrat yang lebih tinggi mendukung aktivitas enzim yang lebih besar dan berkelanjutan.

### 4.3 Kapang Limbah Serbuk Gergaji dengan Aktivitas Selulolitik Terbaik

Berdasarkan kadar gula reduksi yang telah diperoleh dapat disimpulkan aktivitas enzim selulolitik kapang limbah serbuk gergaji sebagai berikut.



**Gambar 4. 19 Aktivitas Enzim Selulolitik Kapang Limbah Serbuk Gergaji**

Berdasarkan hasil pengujian aktivitas enzim selulase selama 60 menit, diperoleh data bahwa isolat LSG 3 memiliki aktivitas enzim CMCase sebesar 0.00205 U/ml dan aktivitas enzim FPase sebesar 0.00192 U/ml. Menunjukkan LSG 3 memiliki kemampuan tertinggi dalam mengkatalisis hidrolisis substrat menjadi gula pereduksi di antara isolat yang diuji. Sementara itu, isolat LSG 5 menunjukkan aktivitas enzim terendah, dengan aktivitas CMCase sebesar 0.00187 U/ml dan FPase sebesar 0.00158 U/ml, menunjukkan efisiensi yang lebih rendah dalam memproduksi gula pereduksi. Isolat LSG 6 memiliki aktivitas enzim yang sedikit lebih rendah daripada LSG 3, dengan aktivitas CMCase sebesar 0.00200 U/ml dan FPase sebesar 0.00173 U/ml. Secara keseluruhan, LSG 3 adalah isolat yang paling efektif dalam menghidrolisis substrat dalam kondisi yang diuji LSG-3 yakni pada konsentrasi spora pengenceran satu kali dan waktu inkubasi selama dua hari pada perolehan kadar gula reduksi tertinggi kemudian LSG 6 dan LSG 5.

## **BAB V PENUTUP**

### **5.1 Kesimpulan**

Kesimpulan dari penelitian tentang produksi enzim kapang yang diisolasi dari limbah serbuk gergaji ini adalah sebagai berikut :

1. Berdasarkan karakteristik makroskopik dan mikroskopik diperoleh tujuh kapang limbah serbuk gergaji. karakteristik molekuler pada tiga kapang dengan indeks selulolitik tertinggi diketahui LSG-3 merupakan *Aspergillus niger* (kecocokan 100%), LSG-5 merupakan *Trichoderma harzianum* (kecocokan 99.83%), dan LSG-6 merupakan *Rhizopus arrhizu* (kecocokan 99.83%).
2. Berdasarkan kadar gula reduksi kapang dengan kemampuan terbaik mengurai selulosa adalah LSG-3, LSG-5 kemudian LSG-6.
3. Kapang dengan aktivitas selulolitik terbaik dalam penelitian ini adalah LSG-3 pada konsentrasi spora pengenceran satu kali dan waktu inkubasi selama dua hari.

### **5.2 Saran**

Saran untuk peneliti selanjutnya yakni untuk mengisolasi kapang pada saat musim hujan dikarenakan kondisi substrat yang lembab memungkinkan lebih banyaknya spesies kapang yang dapat diisolasi. Penelitian ini terbatas pada penggunaan *crude enzyme* yang masih mengandung senyawa-senyawa non enzim sehingga dapat mempengaruhi hasil pengukuran aktivitas enzim yang didapatkan disarankan untuk memurnikan enzim terlebih dahulu. Peran kompleks enzim selulase juga bisa diteliti lebih lanjut untuk penyesuaian penggunaan enzim pada industri yang dituju.

## DAFTAR PUSTAKA

- 6Wresearch. (2023, July). *Indonesia Technical Enzymes Market (2024-2030) Outlook Revenue, Industry, Trends, Value, Share, Growth, Analysis, Companies, Size & Forecast*. 6Wresearch.
- Akpomie, O. O., Okonkwo, K. E., Gbemre, A. C., Akpomie, K. G., Ghosh, S., Ahmadi, S., & Banach, A. M. (2021). Thermotolerance and Cellulolytic Activity of Fungi Isolated from Soils/Waste Materials in the Industrial Region of Nigeria. In *Current Microbiology* (Vol. 78, Issue 7, pp. 2660–2671). Springer.
- Amaike, S., & Keller, N. P. (2011). *Aspergillus flavus*. *Annual Review of Phytopathology*, 49(1), 107–133.
- AppliedBiosystems. (2009). *Chemistry Guide DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis Applied Biosystems Chemistry Guide | Second Edition* (Second Edition). AppliedBiosystems.
- Arnthong, J., Siamphan, C., Chuaseeharonnachai, C., Boonyuen, N., & Suwannarangsee, S. (2020). Towards a miniaturized culture screening for cellulolytic fungi and their agricultural lignocellulosic degradation. In *Journal of Microbiology and Biotechnology* (Vol. 30, Issue 11, pp. 1670–1679).
- Becton, D. and C. (2009). *Difco™ & BBL™ Manual Manual of Microbiological Culture Media Second Edition* (Second Edi). Becton, Dickinson and Company.
- Bergman, N. H. (2007). *Comparative Genomics* (Vols. 1 & 2). Humana Press Inc.
- Bhatt. S.M. (2022). *Enzymology and Enzyme Technology*. S Chand & Company Limited.
- Campbell, C. K., Johnson, E. M., & Warnock, D. W. (2013). Identification of Moulds. In *Identification of Pathogenic Fungi* (pp. 11–16). Wiley.
- Champreda, V., Mhuantong, W., Lekakarn, H., Bunternngsook, B., Kanokratana, P., Zhao, X. Q., Zhang, F., Inoue, H., Fujii, T., & Eurwilaichitr, L. (2019). Designing cellulolytic enzyme systems for biorefinery: From nature to application. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 128(6), 637–654.
- Chapman, J., Ismail, A. E., & Dinu, C. Z. (2018). Industrial applications of enzymes: Recent advances, techniques, and outlooks. In *Catalysts* (Vol. 8, Issue 6). MDPI.
- Coffey, D. G., Bell, D. A., & Henderson, A. (1995). *Cellulose and cellulose derivatives*. Marcel Dekker Inc.
- Cyrus, E., & Juwon, A. (2015). Isolation and Identification of Cellulytic Fungi from Agrowastes and Sawmill Soils. *British Biotechnology Journal*, 7(3), 147–159.
- Danazumi, I. B., Umar, J., Abdullahi, H. J., Abdullahi, R. I., & Isah, A. (2020). Isolation and Identification of Fungi Assosiated With Fermented Cow Milk Sold in Samaru Market, Kaduna State, Nigeria. *FUW Trends in Science & Technology Journal*, 5(2), 633–637.
- Darwesh, O. M., El-Maraghy, S. H., Abdel-Rahman, H. M., & Zaghloul, R. A. (2020). Improvement of paper wastes conversion to bioethanol using novel cellulose degrading fungal isolate. *Fuel*, 262, 116518.
- Delfiyana, Yunilas, S Umar, N Ginting, & Hasnudi. (2018). Isolation and Characteristics of Corn-Based Cellulolytic Fungi as Fibrous Feed Bioactivators. *Jurnal Peternakan Integratif*, 6(3), 1815–1820.

- Díaz, G. V., Coniglio, R. O., Chungara, C. I., Zapata, P. D., Villalba, L. L., & Fonseca, M. I. (2021). *Aspergillus niger* LBM 134 isolated from rotten wood and its potential cellulolytic ability. *Mycology*, *12*(3), 160–173.
- El-Mansi, E. M. T., Nielsen, J., Mousdale, D., Allman, T., & Carlson, R. (2018). *Fermentation Microbiology and Biotechnology, Fourth Edition*. CRC Press.
- Eviva Science. (2019). *Mold Identification Guide*.
- Fenta, L., Mekonnen, H., & Kabtimer, N. (2023). The Exploitation of Microbial Antagonists against Postharvest Plant Pathogens. *Microorganisms*, *11*(4), 1044.
- Fitria, L., Wulandari, R. A., Hermawati, E., & Susanna, D. (2008). Kualitas Udara dalam Ruang Perpustakaan Universitas "X" Ditinjau dari Kualitas Biologi, Fisik, dan Kimiawi. *Makara, Kesehatan*, *12*(2), 77–83.
- Freitas, G. A. de, Almeida, A. F. de, and Conceição, et al. (2019). Fungi with Cellulolytic Potential: Screening, Inoculum, and Methodology for Isolation. *International Journal of Advanced Engineering Research and Science*, *6*(6), 520–527.
- Gautam, S. P., Bundela, P. S., Pandey, A. K., Khan, J., Awasthi, M. K., & Sarsaiya, S. (2011). Optimization for the production of cellulase enzyme from municipal solid waste residue by two novel cellulolytic fungi. *Biotechnology Research International*, *2011*, 810425.
- Gbenro, T. J., Kamaraj, M., & Adesanmi, A. (2019). Isolation and Identification of Cellulolytic Bacteria from Wood Industry Soil in Kancheepuram, Chennai. *International Journal of Advances in Scientific Research and Engineering*, *5*(7), 144–149.
- Géry, A., Rioult, J.-P., Heutte, N., Séguin, V., Bonhomme, J., & Garon, D. (2021). First Characterization and Description of *Aspergillus* Series *Versicolores* in French Bioaerosols. *Journal of Fungi*, *7*(8), 676.
- Gultom, D. T., Tjiptoleksono, & Mus, S. (2019). Identifikasi Kapang yang Diisolasi dari Katsuobushi Ikan Cakalang (*Katsuwonus pelamis*) Selama Proses Fermentasi. *Jurnal Online Mahasiswa Bidang Perikanan Dan Ilmu Kelautan*, *8*(2), 1–11.
- Gurung, N., Ray, S., Bose, S., & Rai, V. (2013). A broader view: Microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. In *BioMed Research International* (Vol. 2013). <https://doi.org/10.1155/2013/329121>
- Heather, J. M., & Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. In *Genomics* (Vol. 107, Issue 1, pp. 1–8). Academic Press Inc.
- Honnay, O. (2013). Genetic Drift. In *Brenner's Encyclopedia of Genetics* (pp. 251–253). Elsevier.
- Horikawa, Y. (2022). Structural diversity of natural cellulose and related applications using delignified wood. *Journal of Wood Science*, *68*(1).
- Houfani, A. A., Anders, N., Spiess, A. C., Baldrian, P., & Benallaoua, S. (2020). Insights from enzymatic degradation of cellulose and hemicellulose to fermentable sugars— a review. *Biomass and Bioenergy*, *134*, 105481.
- Ilić, N., Milić, M., Beluhan, S., & Dimitrijević-Branković, S. (2023). Cellulases: From Lignocellulosic Biomass to Improved Production. In *Energies* (Vol. 16, Issue 8). MDPI.



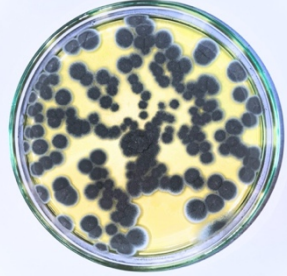
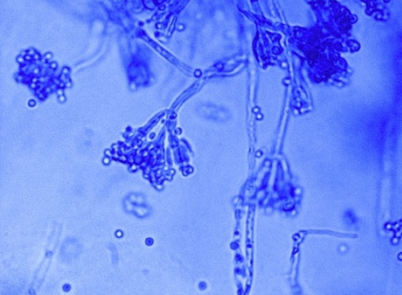
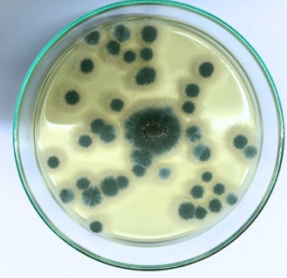
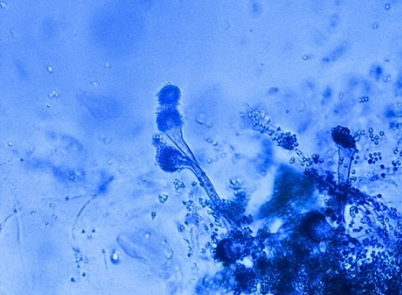
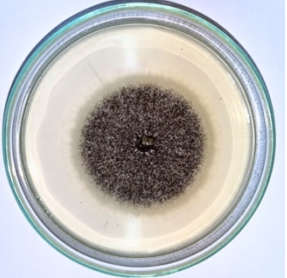
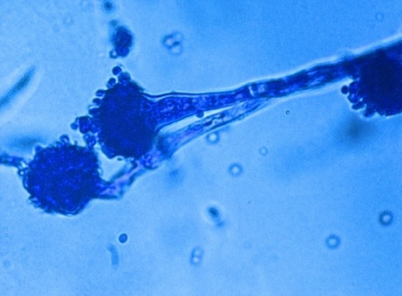
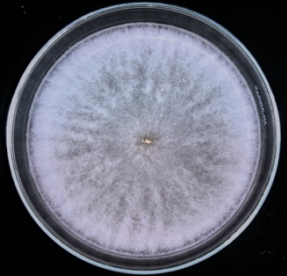
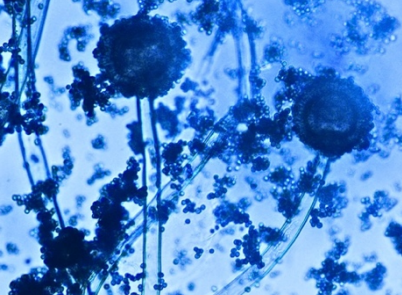
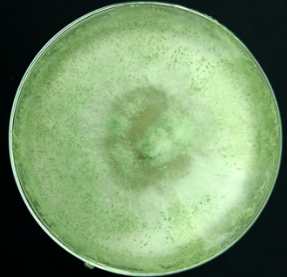
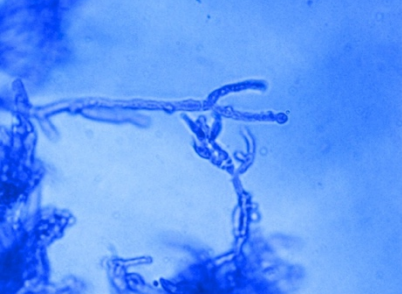
- Imran, M., Anwar, Z., Irshad, M., Asad, M. J., & Ashfaq, H. (2016). Cellulase Production from Species of Fungi and Bacteria from Agricultural Wastes and Its Utilization in Industry: A Review. In *Advances in Enzyme Research* (Vol. 04, Issue 02, pp. 44–55).
- Iwen, P. C., Hinrichs, S. H., & Rupp, M. E. (2002). Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. *Medical Mycology*, *40*(1), 87–109.
- Jannah, A., Aulanniam, Ardyati, T., & Suharjo. (2018). Isolation, cellulase activity test and molecular identification of selected cellulolytic bacteria indigenous rice bran. *Indonesian Journal of Chemistry*, *18*(3), 514–521.
- Jannah, M., Sari, N. and K., Mushlih, et al.(2021). Metode Biologi Molekuler. In *Widina Bhakti Persada Bandung*.
- Jumare, F. I., Ahmad, M. I., Abdulkadir, N., Bello, A. Y., Gani, M., & Usman, M. H. (2022). Characterization of microorganisms associated with the degradation of sawdust and woodchips. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, *15*(1), 69–73.
- Karmakar, M., Lahiri, D., Nag, M., Dutta, B., Dash, S., Sarkar, T., Pandit, S., Upadhye, V. J., & Ray, R. R. (2023). Purification, Characterization, and Application of Endoglucanase from *Rhizopus oryzae* as Antibiofilm Agent. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *195*(9), 5439–5457.
- Kaschuk, J. J., de Alexandria Santos, D., Frollini, E., Canduri, F., & Porto, A. L. M. (2020). Influence of pH, temperature, and sisal pulp on the production of cellulases from *Aspergillus* sp. CBMAI 1198 and hydrolysis of cellulosic materials with different hemicelluloses content, crystallinity, and average molar mass. *Biomass Conversion and Biorefinery*, *10*(2), 483–494.
- Kaur, J., Taggar, M. S., Kalia, A., Sanghera, G. S., Kocher, G. S., & Javed, M. (2023). Valorization of Sugarcane Bagasse into Fermentable Sugars by Efficient Fungal Cellulolytic Enzyme Complex. *Waste and Biomass Valorization*, *14*(3), 963–975.
- Khdiar, M. Y., Mahmood, A. A., Shihab, L. A., & St J Hardy, G. E. (2023). Isolation of Fungi from Petroleum-Contaminated Soil and Evaluation of Their Ability to Degrade Crude Oil. In *Iraqi Journal of Applied Physics* (Vol. 19, Issue 1).
- Legodi, L. M., La Grange, D. C., & van Rensburg, E. L. J. (2023). Production of the Cellulase Enzyme System by Locally Isolated *Trichoderma* and *Aspergillus* Species Cultivated on Banana Pseudostem during Solid-State Fermentation. *Fermentation*, *9*(5), 412.
- Li, H., Dou, M., Wang, X., Guo, N., Kou, P., Jiao, J., & Fu, Y. (2021). Optimization of cellulase production by a novel endophytic fungus *Penicillium oxalicum* R4 isolated from *taxus cuspidata*. *Sustainability (Switzerland)*, *13*(11).
- Liu, K., Du, H., Zheng, T., Liu, H., Zhang, M., Zhang, R., Li, H., Xie, H., Zhang, X., Ma, M., & Si, C. (2021). Recent advances in cellulose and its derivatives for oilfield applications. *Carbohydrate Polymers*, *259*(December 2020), 117740.
- Liu, P., Xue, J., Tong, S., Dong, W., & Wu, P. (2018). Structure Characterization and Hypoglycaemic Activities of Two Polysaccharides from *Inonotus obliquus*. *Molecules*, *23*(8), 1948.
- Lodha, A., Pawar, S., & Rathod, V. (2020). Optimised cellulase production from fungal co-culture of *Trichoderma reesei* NCIM 1186 and *Penicillium citrinum*

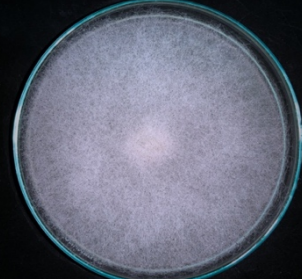
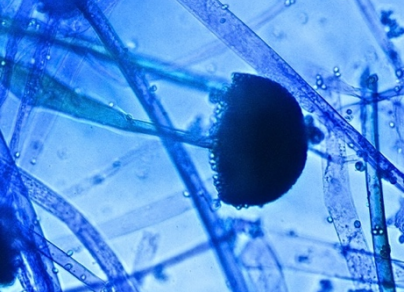
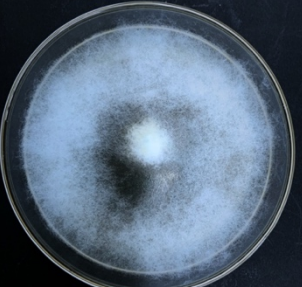
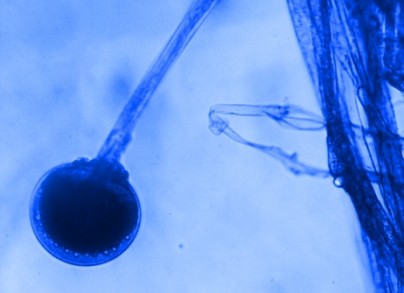
- NCIM 768 under solid state fermentation. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8(5), 103958.
- Maghraby, Y. R., El-Shabasy, R. M., Ibrahim, A. H., & Azzazy, H. M. E. S. (2023). Enzyme Immobilization Technologies and Industrial Applications. In *ACS Omega* (Vol. 8, Issue 6, pp. 5184–5196). American Chemical Society.
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428.
- Mrudula, S., & Murugammal, R. (2011). Production of cellulose by *Aspergillus niger* under submerged and solid state fermentation using coir waste as a substrate. *Brazilian Journal of Microbiology: [Publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 42(3), 1119–1127.
- Nompo, S., Meryandini, A., & Sunartid, C. (2019). Produksi Enzim Selulase Oleh Aktinomiset Menggunakan Frond Sagu. In *Jurnal Penelitian Pascapanen Pertanian* | (Vol. 16, Issue 2).
- Oduwobi, O. (2023a). *the Cellulolytic Potentiality of Microbes Isolated From Gbogidi Saw Mill ' S Sawdust , Ilaro , Ogun State*. 1–8.
- Oduwobi, O. (2023b). *the Cellulolytic Potentiality of Microbes Isolated From Gbogidi Saw Mill ' S Sawdust , Ilaro , Ogun State*. 1–8.
- Okal, E. J., Aslam, M. M., Karanja, J. K., & Nyimbo, W. J. (2020). Mini review: Advances in understanding regulation of cellulase enzyme in white-rot basidiomycetes. *Microbial Pathogenesis*, 147.
- Ouedraogo, J.-P., & Tsang, A. (2021). Production of Native and Recombinant Enzymes by Fungi for Industrial Applications. In *Encyclopedia of Mycology* (pp. 222–232).
- Pabbathi, N. P. P., Mootapally, C., Velidandi, A., Dave, K., Nathani, N. M., & Baadhe, R. R. (2020). Living soil of fifty-year-old saw mill: Dawn bioresource with differential hydrolytic potentials. *Ecological Genetics and Genomics*, 16(June), 100061.
- Patantis, G., & Fawzya, Y. N. (2009). Teknik Identifikasi Mikroorganisme Secara Molekuler. *Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology*, 4(2), 72.
- Pujiati, & Widiyanto, J. (2017). *Kapang Selulolitik*. Program Studi Pendidikan Biologi FPMIPS IKIP PGRI Madiun.
- Purwanto, D. (2009). Analisa Jenis Limbah Kayu Pada Industri. *Jurnal Riset Industri Hasil Hutan*, 1, 14–20.
- Putrika, A., Anita, N., Bowolaksono, dan A., Hemelda, dkk(2023). *Biologi Terapan Untuk Masa Depan & Kemajuan Bangsa*. Yayasan Pustaka Obor Indonesia.
- Rahardiyana, D., & Moko, E. M. (2023). Isolation and Molecular Screening of Fungus as Agents in Cellulolytic Transformation Materials from Symbiotic Lichen. *Biosaintifika*, 15(3), 412–422.
- Ramadhani, I., & Wahyuni. (2020). Dasar-dasar Praktikum Biologi. In *Pena Persada* (Vol. 53, Issue 9). Pena Persada.
- Restu Nugraha, Tri Ardyati, & Suharjono. (2014). Eksplorasi Bakteri Selulolitik yang Berpotensi Sebagai Agen Biofertilizer dari Tanah Perkebunan Apel Kota Batu, Jawa Timur. *Jurnal Biotropika* |, 2(3).
- Rizzo, C. (2010). Wood waste derived fuel: state of the art and development prospects in france. *Royal Institute Of Technology*.

- Romruen, O., Karbowski, T., Tongdeesoontorn, W., Shiekh, K. A., & Rawdkuen, S. (2022). Extraction and Characterization of Cellulose from Agricultural By-Products of Chiang Rai Province, Thailand. *Polymers*, *14*(9), 1–13.
- Seddiqi, H., Oliaei, E., Honarkar, H., Jin, J., Geonzon, L. C., Bacabac, R. G., & Klein-Nulend, J. (2021). Cellulose and its derivatives: towards biomedical applications. In *Cellulose* (Vol. 28, Issue 4). *Springer Netherlands*.
- Seddouk, L., Jamaï, L., Tazi, K., Ettayebi, M., Alaoui-Mhamdi, M., Aleya, L., & Janati-Idrissi, A. (2022). Isolation and characterization of a mesophilic cellulolytic endophyte *Preussia africana* from *Juniperus oxycedrus*. *Environmental Science and Pollution Research*, *29*(30), 45589–45600.
- Shen, X., & Sun, R. (2021). Recent advances in lignocellulose prior-fractionation for biomaterials, biochemicals, and bioenergy. *Carbohydrate Polymers*, *261*(December 2020), 117884.
- Singh, N., Sithole, B., & Govinden, R. (2023). Screening for cellulases and preliminary optimisation of glucose tolerant  $\beta$ -glucosidase production and characterisation. *Mycology*, *14*(2), 91–107.
- Srinivasan, R., Prabhu, G., Prasad, M., Mishra, M., Chaudhary, M., & Srivastava, R. (2020). *Penicillium*. In *Beneficial Microbes in Agro-Ecology* (pp. 651–667). *Elsevier*.
- Stanley M., Roberts Nicholas, J. Turner Andrew, J. Willetts Michael, & K. Turner. (1995). *Introduction to Biocatalysis Using Enzymes and Micro-organisms*. University of Cambridge.
- Surya, A. H., Ali, M., & Venita, Y. (2022). Seleksi Jamur Endofit Tanaman Nipah (*Nypa fruticans* Wurmb.) dan Uji Antagonisme Terhadap *Ganoderma boninense* Pat. Penyebab Penyakit Busuk Pangkal Batang Kelapa Sawit Serta Identifikasinya. *LUMBUNG*, *21*(2), 63–84.
- Suryani, Y., Taupiqurrahman, O., & Kulsum, Y. (2020). *Mikologi*. PT. Freeline Cipta Granesia.
- Suryani, Y., Taupiqurrahman, O., & Yuni, K. (2020). *Mikologi*. Freline Cipta Granesia.
- Sutari, N. W. S. (2020). Isolasi dan Identifikasi Morfologi Jamur Selulolitik dari Limbah Rumah Tangga di Desa Sanur Kauh, Bali. *Agrovigor: Jurnal Agroekoteknologi*, *13*(2), 100–105.
- Szablewski, T., Szwajkowska-Michałek, L., Pędzik, M., Rogoziński, T., & Stuper-Szablewska, K. (2021). Contamination with microscopic fungi measured by the concentration of ergosterol in dusts of various types of wood with different granulation. *Forestry and Wood Technology*, *113*, 98–103.
- Tasma, I. M. (2015). Pemanfaatan Teknologi Sekuensing Genom untuk Mempercepat Program Pemuliaan Tanaman. *J. Litbang Pert*, *34*(4), 160–168.
- Taufani, D., Yuniarti, Y., & Sutiya, B. (2023). Karakteristik Briket Arang Dari Limbah Serbuk Penggergajian Kayu Karet Dan Limbah Serbuk Penggergajian Kayu Meranti Merah. *Jurnal Sylva Scientiae*, *6*(5), 740.
- Thapa, S., Mishra, J., Arora, N., Mishra, P., Li, H., O'Hair, J., Bhatti, S., & Zhou, S. (2020). Microbial cellulolytic enzymes: diversity and biotechnology with reference to lignocellulosic biomass degradation. In *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* (Vol. 19, Issue 3, pp. 621–648). Springer.


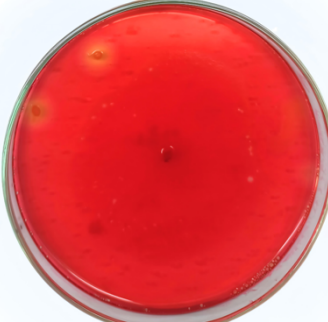
- Torres-Garcia, D., Gené, J., & García, D. (2022). New and interesting species of *Penicillium* (Eurotiomycetes, Aspergillaceae) in freshwater sediments from Spain. *MycKeys*, 86, 103–145.
- UN. (2023, September). *17 Goals to Transform Our World*. UN SDG Action Campaign.
- United Nations Industrial Development Organization (UNIDO). (2023). *International Yearbook of Industrial Statistics*.
- Valente Brasileiro, B. T. R., Moura Coimbra, M. R., De Moraes, M. A., & De Oliveira, N. T. (2004). Genetic variability within *Fusarium solani* specie as revealed by PCR-fingerprinting based on PCR markers. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35(3), 205–210.
- Venkataraman, S., & Athijayamani, A. (2021). An overview on natural cellulose fiber reinforced polymer composites. *Materials Today: Proceedings*, 37(Part 2), 3620–3624
- Visagie, C. M., Houbraken, J., Frisvad, J. C., Hong, S.-B., Klaassen, C. H. W., Perrone, G., Seifert, K. A., Varga, J., Yaguchi, T., & Samson, R. A. (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, 78, 343–371.
- Wang, B. T., Hu, S., Yu, X. Y., Jin, L., Zhu, Y. J., & Jin, F. J. (2020). Studies of cellulose and starch utilization and the regulatory mechanisms of related enzymes in Fungi. In *Polymers* (Vol. 12, Issue 3). MDPI AG.
- Wibowo, R. L. M. S. A., Yuliatmo, R., Maryati, T., & Pahlawan, I. F. (2021). *Enzyme for Leather*. Sepadan Putra Mandiri.
- Wijayanti, S. D., Oliviani, K., Kusrini, J., & Putri, R. A. C. (2020). Characterization of crude cellulase enzyme produced by *Bacillus licheniformis* P12 isolate. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 475(1).
- Yadav, R., Vasundhara, M., Rajamani, T., Suryanarayanan, T. S., & Reddy, S. M. (2022). Isolation and characterization of thermostable and alkali-tolerant cellulase from litter endophytic fungus *Bartalinia pondoensis*. *Folia Microbiologica*, 67(6), 955–964.
- Yamaguchi, S. (2017). The quest for industrial enzymes from microorganisms. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 81(1), 54–58.
- Yusnia, E. D., Wayan Gunam, I. B., & Semadi Antara, N. (2019). Isolasi Dan Skrining Bakteri Selulolitik Dari Beberapa Tanah Hutan Di Bali. *Jurnal Rekayasa Dan Manajemen Agroindustri*, 7(1), 11.
- Zhang, C., Mo, J., Fu, Q., Liu, Y., Wang, S., & Nie, S. (2021). Wood-cellulose-fiber-based functional materials for triboelectric nanogenerators. *Nano Energy*, 81, 105637.


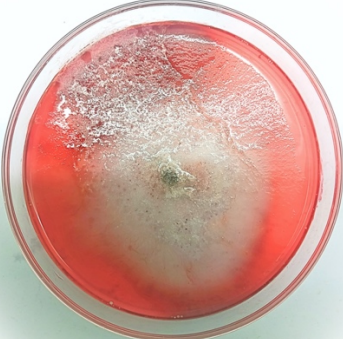
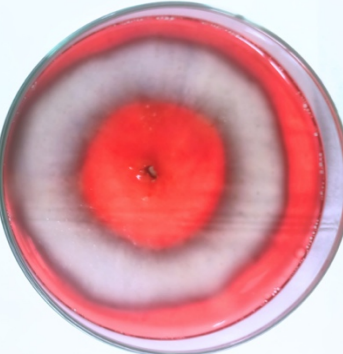
Lampiran 1. Karakteristik kapang secara makroskopik dan mikroskopik

| makroskopik   | mikroskopik  | perbesaran |                  |
|---|--|------------|------------------|
|    |    | 600x       | L<br>S<br>G<br>1 |
|    |   | 400x       | L<br>S<br>G<br>2 |
|  |  | 600x       | L<br>S<br>G<br>3 |
|  |  | 600x       | L<br>S<br>G<br>4 |
|  |  | 600x       | L<br>S<br>G<br>5 |

|   |  |  |      |                  |
|---|--|--|------|------------------|
|  |  |  | 600x | L<br>S<br>G<br>6 |
|  |  |  | 600x | L<br>S<br>G<br>7 |

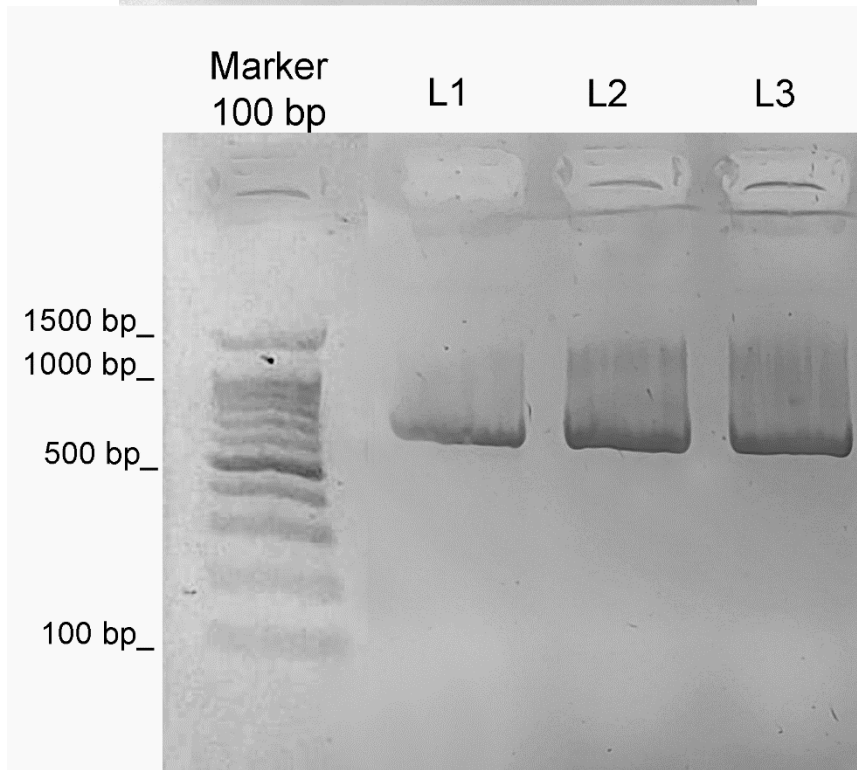
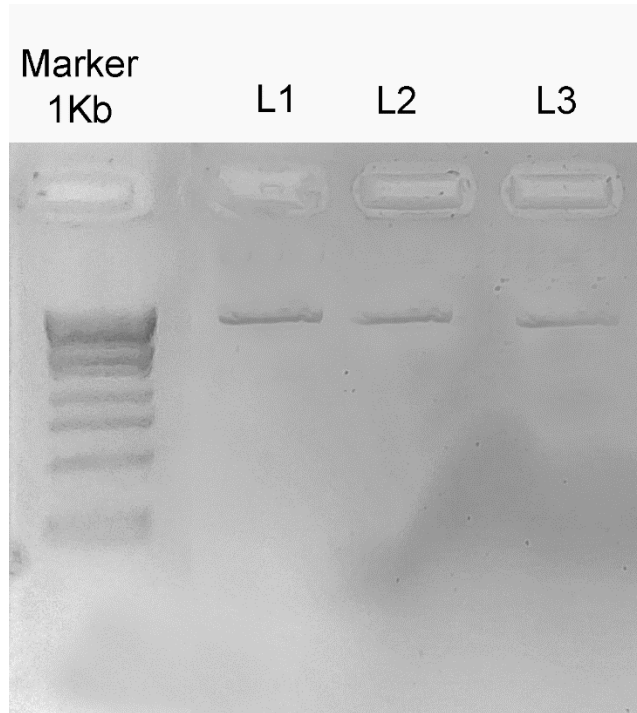
Lampiran 2. Hasil uji biokimia kapang

| foto  | Lebar koloni | Lebar zona bening |
|---|--------------|-------------------|
|    | -            | -                 |
|   | -            | -                 |
|  | 15,10 mm     | 30,21 mm          |
|  | -            | -                 |

|  |          |          |
|--|----------|----------|
|   | 48,72 mm | 90 mm    |
|   | 14,57 mm | 45,24 mm |
|  | 37,48 mm | 56,25 mm |

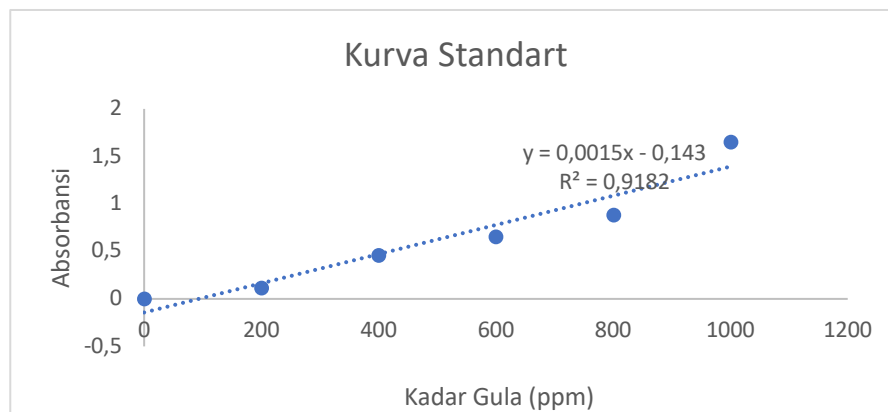


Lampiran 3. Hasil visualisasi elektroforesis



Lampiran 4. Kurva standar

| Kadar gula (ppm) | nilai adsorbansi |
|------------------|------------------|
| 0                | 0                |
| 200              | 0,114            |
| 400              | 0,452            |
| 600              | 0,653            |
| 800              | 0,881            |
| 1000             | 1,65             |



Untuk menghitung kadar gula reduksi menggunakan persamaan regresi linear yaitu  $y=0.0015x-0.143$  dimana  $y$  adalah nilai absorbansi dan  $x$  adalah konsentrasi gula reduksi, substitusi nilai absorbansi ke dalam persamaan untuk menemukan  $x$ .

$$0.802=0.0015x-0.143$$

$$0.802+0.143=0.0015x$$

$$0.945=0.0015x$$

$$X = \frac{0.945}{0.0015x}$$

$$x = 630$$

Lampiran 5. Perhitungan indeks selulolitik

$$\text{Indeks selulolitik} = \frac{\text{Diameter zona bening}}{\text{Diameter koloni}}$$

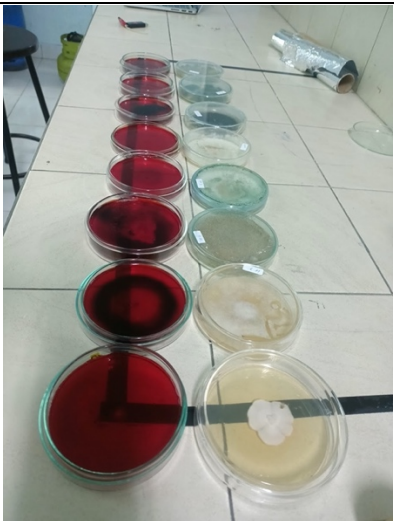

1. LSG 3 =  $\frac{30,21}{15,10} = 2,00$

2. LSG 5 =  $\frac{90}{48,72} = 1,85$

3. LSG 6 =  $\frac{45,24}{14,57} = 3,11$

4. LSG 7 =  $\frac{56,25}{37,48} = 1,50$

| Dokumentasi   | Keterangan  |
|---|---|
|    | <p>Isolasi DNA</p>  |
|   | <p>Pengujian kadar gula reduksi</p>                       |
|  | <p>Ekstraksi enzim selulase kasar dengan sentrifugasi</p> |

|   |  |
|---|--|
|    | <p>Pengujian biokimia kapang selulolitik</p>                                 |
|   | <p>Karakterisasi kapang secara makroskopik dalam <i>Laminar air flow</i></p> |
|  | <p>Isolasi kapang menggunakan <i>serial dilution</i></p>                     |