



**UPAYA PENINGKATAN RENDEMEN EKSTRAKSI MINYAK DAUN  
CENGKEH (*SYZYGIUM AROMATICUM*) MENGGUNAKAN  
METODE FERMENTATIF DENGAN *ASPERGILLUS NIGER***

**SKRIPSI**

Ditujukan untuk memenuhi persyaratan  
memperoleh gelar Sarjana Teknik



**RB. MOH. MIFTAHOL ARIFIN**  
**NIM. 125061100111009**

**KRISNANDA ALIF BAGUS WICAKSONO**  
**NIM. 125061100111045**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**  
**FAKULTAS TEKNIK**  
**MALANG**

**2016**

**LEMBAR PENGESAHAN****UPAYA PENINGKATAN RENDEMEN EKSTRAKSI MINYAK DAUN  
CENGKEH (*SYZYGIUM AROMATICUM*) MENGGUNAKAN  
METODE FERMENTATIF DENGAN *ASPERGILLUS NIGER*****SKRIPSI**

Ditujukan untuk memenuhi persyaratan  
memperoleh gelar Sarjana Teknik



**RB. MOH. MIFTAHOL ARIFIN**  
NIM. 125061100111009

**KRISNANDA ALIF BAGUS WICAKSONO**  
NIM. 125061100111045

Skrripsi ini telah direvisi dan disetujui oleh dosen pembimbing  
pada tanggal 23 Juni 2016

Mengetahui,  
Ketua Program Studi

  
**Ir. Bambang Poerwadi, MS.**  
NIP. 19600126 198603 1 001

Dosen Pembimbing

  
**Prof. Dr. Ir. Chandrawati Cahyani, MS.**  
NIP. 19520504 198002 2 001





## PERNYATAAN ORISINALITAS SKRIPSI

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya dan berdasarkan hasil penelusuran berbagai karya ilmiah, gagasan, dan masalah ilmiah yang diteliti dan diulas di dalam naskah Skripsi ini adalah asli dari pemikiran saya. Tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah Skripsi ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur jiplakan, saya bersedia Skripsi dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku (UU No. 20 Tahun 2003, pasal 25 ayat 2 dan pasal 70).

Malang, 23 Juni 2016

Mahasiswa I,



**RB. MOH. MIFTAHOL ARIFIN**

**NIM. 125061100111009**



## PERNYATAAN ORISINALITAS SKRIPSI

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya dan berdasarkan hasil penelusuran berbagai karya ilmiah, gagasan, dan masalah ilmiah yang diteliti dan diulas di dalam naskah Skripsi ini adalah asli dari pemikiran saya. Tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah Skripsi ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur jiplakan, saya bersedia Skripsi dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku (UU No. 20 Tahun 2003, pasal 25 ayat 2 dan pasal 70).

Malang, 23 Juni 2016

Mahasiswa II,



KRISNANDA ALIF BAGUS WICAKSONO

NIM. 125061100111045

## PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Tuhan Yang Maha Esa yang telah melimpahkan berkat dan rahmat-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan tugas akhir yang berjudul **“UPAYA PENINGKATAN RENDEMEN EKSTRAKSI MINYAK DAUN CENGKEH (*SYZYGIUM AROMATICUM*) MENGGUNAKAN METODE FERMENTATIF DENGAN *ASPERGILLUS NIGER*”** ini sebagai salah satu persyaratan untuk menyelesaikan Pendidikan Strata-1 di Program Studi Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Brawijaya.

Pembuatan skripsi ini bertujuan untuk memenuhi syarat memperoleh gelar sarjana teknik. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penyusun menyampaikan rasa terima kasih atas segala bimbingan dan bantuan kepada:

1. Ir. Bambang Poerwadi, MS., selaku Ketua Program Studi Teknik Kimia Universitas Brawijaya.
2. Prof. Dr. Ir. Chandrawati Cahyani, MS., selaku Dosen Pembimbing I mata kuliah Skripsi Rekayasa Hayati di Program Studi Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Brawijaya yang telah membimbing dan membantu kami dalam proses pelaksanaan skripsi.
3. Vivi Nurhadianty, ST., MT., selaku Dosen Pembimbing II mata kuliah Skripsi Rekayasa Hayati di Program Studi Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Brawijaya yang telah membimbing dan membantu kami dalam proses pelaksanaan skripsi.
4. AS. Dwi Saptati, ST., MT. selaku Koordinator Skripsi Program Studi Teknik Kimia Universitas Brawijaya yang telah membimbing dan membantu kami dalam proses pelaksanaan skripsi.
5. Ir. Bambang Ismuyanto, MS., Wa Ode Cakra Nirwana, ST., MT., Julianda, ST., M.Sc., Rama Oktavian, ST., M.Sc., dan Diah Agustina Puspitasari, ST., MT selaku dosen program studi Teknik Kimia Universitas Brawijaya atas bekal ilmu, wawasan serta pengalaman yang diajarkan selama mengikuti perkuliahan sampai akhir penulisan skripsi.
6. Rifa Rahma, ST., Agustina Rahayu, A.Md., dan Evi Sulviani Nengseh, A.Md. selaku PLP Laboratorium Teknik Kimia yang telah membantu selama penelitian skripsi.



7. Seluruh staf Program Studi Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Brawijaya serta semua pihak yang telah membantu dalam penyusunan skripsi.
8. Orangtua penulis dan keluarga tercinta atas segala perhatian dan kasih sayang, bantuan materi maupun non materi yang tak ternilai harganya dan doa-doa yang senantiasa dipanjatkan sehingga penyusunan laporan skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik.
9. Seluruh Keluarga Besar Mahasiswa Teknik Kimia yang telah membantu dan memberi semangat kepada penulis.

Penyusun mengharapkan saran dari semua pihak demi kebaikan penelitian ini. Demikian laporan ini penyusun susun, semoga dapat bermanfaat bagi semua pihak dan penyusun sendiri. Akhir kata penyusun ucapkan terima kasih.

Malang, 3 Juni 2016

Penulis

**DAFTAR ISI**

	Halaman
<b>PENGANTAR</b> .....	<b>i</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>iii</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>v</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>vi</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>viii</b>
<b>DAFTAR SIMBOLE</b> .....	<b>ix</b>
<b>RINGKASAN</b> .....	<b>x</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>xi</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	
1.1. Latar Belakang .....	1
1.2. Rumusan Masalah .....	3
1.3. Pembatasan Masalah .....	3
1.4. Tujuan Penelitian .....	3
1.5. Manfaat Penelitian .....	4
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1. Minyak Atsiri .....	5
2.2. Minyak Daun Cengkeh .....	5
2.2.1. Eugenol .....	7
2.2.2. $\beta$ -carryophyllene .....	7
2.3. Ekstraksi Minyak Daun Cengkeh .....	8
2.4. Fermentasi .....	11
2.4.1. Faktor yang mempengaruhi fermentasi selulotik padat .....	12
2.4.2. Bioreaktor fermentasi padat .....	13
2.5. <i>Aspergillus niger</i> .....	14
2.6. Enzim Selulase .....	18
2.7. Penelitian Terdahulu .....	20
<b>BAB III METODOLOGI PENELITIAN</b>	
3.1. Jenis Penelitian .....	21
3.2. Rancangan Penelitian .....	21
3.3. Alat dan Bahan .....	22
3.4. Desain Alat .....	22
3.5. Tahap Pelaksanaan Penelitian dan Analisa Data .....	24
3.5.1. Pretreatment Daun Cengkeh .....	24
3.5.2. Pembuatan Bahan Stater .....	25



3.5.3.	Pembuatan kurva pertumbuhan.....	25
3.5.4.	Kalibrasi alat <i>moisturemeter</i> .....	25
3.5.5.	Fermentasi daun cengkeh.....	26
3.5.6.	Distilasi daun cengkeh.....	26
3.5.7.	Pemurnian minyak daun cengkeh.....	27
3.5.8.	Pengukuran rendemen.....	27
3.5.9.	Uji data.....	27
3.5.9.1.	Uji SEM ( <i>Scanning Electron Microscopy</i> ) pada daun cengkeh.....	27
3.5.9.2.	Uji visual warna minyak.....	27
3.5.9.3.	Uji Spektrofotometer UV-VIS.....	27
3.5.9.4.	Uji bobot jenis minyak daun cengkeh.....	28
3.5.9.5.	Uji komposisi minyak daun cengkeh dengan GC ( <i>Gas Chromatography</i> ).....	28
3.6.	Diagram Alir Penelitian.....	30
3.6.1.	Pretreatment daun cengkeh.....	30
3.6.2.	Pengukuran massa sel kering.....	30
3.6.3.	Pembuatan media starter.....	31
3.6.4.	Fermentasi daun cengkeh.....	31
3.6.5.	Distilasi daun cengkeh.....	32
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN</b>		
4.1.	Pembuatan kurva pertumbuhan.....	33
4.2.	Pengaruh waktu fermentasi terhadap temperatur dan <i>moisture</i> .....	34
4.4.1.	Pengaruh waktu fermentasi terhadap temperatur fermentor pada <i>moisture</i> terkontrol.....	34
4.4.2.	Pengaruh waktu fermentasi terhadap temperature fermentor <i>moisture</i> tak dikontrol.....	35
4.3.	Pengaruh Waktu Fermentasi terhadap rendemen daun cengkeh.....	36
4.4.	Karakterisasi minyak daun cengkeh hasil fermentasi.....	39
4.4.1.	Kadar eugenol dan $\beta$ -caryophyllene.....	39
4.4.2.	SEM ( <i>Scanning Electron Microscope</i> ).....	41
4.4.3.	Warna minyak daun cengkeh.....	41
4.4.4.	Bobot Jenis.....	44
<b>BAB V PENUTUP</b>		
5.1.	Kesimpulan.....	47
5.2.	Saran.....	47
<b>DAFTAR PUSTAKA</b>		
<b>LAMPIRAN</b>		



## DAFTAR TABEL

No.	Judul	Halaman
Tabel 2.1	Standar Mutu Minyak Cengkeh	6
Tabel 2.2	Kedudukan spesies <i>Aspergillus niger</i>	15
Tabel 2.3	Penelitian-penelitian terdahulu mengenai produksi enzim selulase dengan <i>Aspergillus niger</i>	20
Tabel 3.1	Hubungan tiap variabel dalam penelitian	21
Tabel 3.2.	Komposisi Bahan untuk Membuat Media Cair	25
Tabel 4.1.	Warna minyak daun cengkeh pada perlakuan kontrol <i>moisture</i> (KM) tanpa kontrol <i>moisture</i> (TM)	42



## DAFTAR GAMBAR

No.	Judul	Halaman
Gambar 2.1.	Tanaman Cengkeh	5
Gambar 2.2.	Struktur rumus kimia eugenol	7
Gambar 2.3.	Struktur rumus kimia $\beta$ -caryophyllene	8
Gambar 2.4.	Morfologi <i>Aspergillus niger</i>	16
Gambar 2.5.	Mekanisme hidrolisis Selulosa	17
Gambar 2.6.	Pertumbuhan mikroorganisme pada media batch	17
Gambar 2.7.	Skema hidrolisis selulosa oleh sistem nonkomplek selulase (A) dan kompleks selulase (B)	19
Gambar 3.1.	Desain alat fermentor substrat padat.	23
Gambar 3.2.	Desain alat distilasi dengan kapasitas 31,54 Liter (30% air dan 70% bahan)	24
Gambar 4.1.	Kurva pertumbuhan <i>Aspergillus niger</i> pada kondisi aerobik.	33
Gambar 4.2.	Grafik hubungan temperatur dan waktu fermentasi dengan <i>moisture</i> terkontrol.	34
Gambar 4.3.	Grafik hubungan temperatur dan waktu fermentasi tanpa <i>moisture</i> terkontrol.	35
Gambar 4.4.	Rendemen minyak daun cengkeh dengan berbagai perlakuan beserta <i>moisture</i> total.	37
Gambar 4.5.	Perbandingan penampakan daun cengkeh yang ditumbuhi jamur pengganggu (a) setelah fermentasi kontrol <i>moisture</i> selama 4 hari dan 8 hari, dengan daun cengkeh yang ditumbuhi <i>Aspergillus niger</i> (b).	38
Gambar 4.6.	Kromatogram untuk minyak daun cengkeh tanpa fermentasi (0 hari).	39
Gambar 4.7.	Kandungan eugenol dan $\beta$ -caryophyllene pada berbagai perlakuan.	40
Gambar 4.8.	Perubahan morfologi daun cengkeh (a) tanpa fermentasi (b) fermentasi 4 hari (c) fermentasi 8 hari.	41
Gambar 4.9.	Grafik Adsorbansi minyak daun cengkeh tanpa fermentasi	43





**DAFTAR LAMPIRAN**

No.	Judul	Halaman
Lampiran 1	Contoh Perhitungan	53
Lampiran 2	Dokumentasi Penelitian	59
Lampiran 3	Hasil Uji <i>Gas Chromatograph</i> Minyak Daun Cengkeh	62
Lampiran 4	Hasil Uji Absorbansi Minyak Daun Cengkeh	69
Lampiran 5	Data Penelitian	71
Lampiran 6	Riwayat Hidup	74



**DAFTAR SIMBOL**

Besaran Dasar	Satuan dan Singkatannya	Simbol
Massa	gram atau gr	m
Jumlah molekul	mol	n
Temperatur dalam celcius	Derajat celcius atau °C	T
Volume	mililiter atau mL	V
Waktu	menit	t

## RINGKASAN

**RB. Moh. Miftahol Arifin dan Krisnanda Alif Bagus Wicaksono**, Program Studi Teknik Kimia, Universitas Brawijaya, Juni 2016, *Upaya Peningkatan Rendemen Ekstraksi Minyak Daun Cengkeh (Syzygium Aromaticum) Menggunakan Metode Fermentatif dengan Aspergillus niger*, Dosen Pembimbing: Chandrawati Cahyani dan Vivi Nurhadianty.

Minyak atsiri merupakan produk unggulan Indonesia yang banyak digunakan dalam berbagai bidang. Salah satunya yaitu minyak daun cengkeh sebagai *flavour and fragrance ingredients*, industri kosmetik, dan lainnya. Namun rendemen minyak atsiri yang didapat dari daun cengkeh melalui distilasi uap hanya sekitar 1,68%. Langkah yang dapat dilakukan untuk meningkatkan rendemennya yaitu dengan perlakuan awal pada bahan daun cengkeh dengan fermentasi selulolitik. Fermentasi selulolitik menggunakan kapang penghasil enzim selulase untuk mendegradasi selulosa yang menjebak minyak atsiri dalam daun cengkeh. Sehingga ketika dilakukan distilasi uap, minyak daun cengkeh akan lebih mudah menguap dan rendemen minyak meningkat. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh lama waktu fermentasi dan kondisi *moisture* fermentor yang optimal menggunakan kapang *Aspergillus niger* yang mampu menghasilkan enzim selulase.

Penelitian ini menggunakan substrat daun cengkeh kering berumur 2 bulan sejak panen yang difermentasi selama 0 hari (tanpa fermentasi), 2 hari, 4 hari, dan 8 hari dengan kapang *Aspergillus niger* dalam kondisi fermentor *moisture* terkontrol dan *moisture* tidak terkontrol. Tahapan penelitian ini yaitu pembersihan daun cengkeh dari kontaminan, pembuatan bahan stater untuk pertumbuhan media *Aspergillus niger*, pembuatan kurva pertumbuhan untuk mengetahui waktu yang tepat dilakukan inokulasi *Aspergillus niger* pada daun cengkeh, fermentasi daun cengkeh yang dijaga pada suhu 25-30°C dan pH 7, distilasi daun cengkeh selama 6 jam pada suhu air mendidih pada tekanan barometrik dan pemurnian minyak daun cengkeh.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa degradasi selulosa optimal terjadi pada fermentasi selama 8 hari. Namun rendemen minyak daun cengkeh dan kandungan senyawa aktif pada minyak daun cengkeh, yaitu eugenol, semakin menurun seiring bertambahnya waktu fermentasi. Rendemen dan kandungan senyawa aktif terbaik didapat dari minyak daun cengkeh tanpa fermentasi yaitu 1,96% dan 79,40%. Fermentasi tanpa kontrol *moisture* menghasilkan rendemen minyak yang lebih tinggi daripada fermentasi dengan kontrol *moisture*. Maka dari itu, dari hasil ini perlu didesain kembali fermentor selulolitik daun cengkeh yang tidak menurunkan rendemen minyak daun cengkeh serta eugenol. Selain itu perlu dikaji kembali penggunaan enzim selulase secara langsung atau imobilisasi sel *Aspergillus niger* pada fermentasi selulolitik untuk menjaga dari sifat *antifungal* eugenol.

**Kata kunci:** minyak daun cengkeh, fermentasi selulolitik, *Aspergillus niger*, selulosa, eugenol.

## SUMMARY

**RB. Moh. Miftahol Arifin** and **Krisnanda Alif Bagus Wicaksono**, Chemical Engineering Program, Faculty of Engineering, University of Brawijaya, in June 2016, *Improving Yield of clove leaf (*Syzygium aromaticum*) Oil Extraction Using the fermentative method by *Aspergillus niger**, Lecturer: Chandrawati Cahyani and Vivi Nurhadianty.

Essential oil a natural product of Indonesia that widely used in various fields. One of them is clove oil as a flavor and fragrance ingredients, the cosmetics industry, and others. But the yield of essential oils obtained from clove leaf through steam distillation is only about 1.68%. Steps available to increase the yield is by pretreatment on materials by fermentation cellulotic clove leaf. Cellulotic fermentation uses fungi producing cellulase enzymes to degrade cellulose that trap clove essential oils inside leaves. So when steam distillation performed, clove leaf oil would be more volatile and oil yield increases. This study conducted to know the effect of long fermentation time and moisture conditions for fermentor using *Aspergillus niger* which capable of producing cellulase enzymes.

This study uses substrate dried clove leaf with ages from 2 months since harvest fermented for 0 days (unfermented), 2 days, 4 days and 8 days with *Aspergillus niger* under conditions of moisture fermentor controlled and uncontrolled moisture. Stages of this study is clove leaf cleanup of contaminants, preparing of starter for the growth of *Aspergillus niger* media, preparing the growth curve to determine the right time to do inoculation of *Aspergillus niger* on clove leaf, clove leaf fermentation which maintained at a temperature of 25-30°C and pH 7, distillation clove leaf for 6 hours at a temperature of boiling water at barometric pressure and purification of clove leaf oil.

The results showed that the optimum cellulose degradation occurs in fermentation for 8 days. However clove leaf oil yield and content of the active compound in clove oil, eugenol ie, decreases exponentially with time of fermentation. The best yield and active compound content derived from clove leaf without fermentation are 1.96% and 79.40%. Fermentation without control moisture produce a higher oil yield than fermentation with moisture control. Therefore, from these results, there needs to redesigned Cellulotic fermentor for clove leaf that does not degrade the yield of clove oil and eugenol. In addition, it should be reviewed using cellulase enzymes directly or immobilized cell fermentation of *Aspergillus niger* on Cellulotic fermentor to keep on the antifungal properties of eugenol.

**Keywords:** *clove leaf oil, Cellulotic fermentation, Aspergillus niger, cellulose, eugenol.*



## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Minyak atsiri adalah produk alam yang memiliki karakteristik fisikokimia yang berguna sehingga memiliki nilai tambah di masyarakat. Produk ini dapat digunakan dalam berbagai bidang, yaitu kedokteran (sebagai anti bakteri), industri makanan (bahan pengawet), industri parfum (bahan pewangi), dll (Asbahani dkk, 2015). Pada tanaman, minyak atsiri dihasilkan dalam tubuh tanaman dan tersimpan dalam kelenjar internal dan ekstenal tanaman. Minyak ini tersimpan diantara sel epidermis dan dinding sel tumbuhan (Koensoemardiyah, 2010:3-6).

Salah satu produk unggulan Indonesia yang memiliki komoditas besar dalam dunia minyak atsiri adalah tanaman cengkeh (*Syzygium aromaticum*). Minyak atsiri cengkeh sangat diperlukan dalam berbagai industri seperti bahan baku dalam perisa maupun pewangi makanan (*flavour and fragrance ingredients*), industri kosmetik dan lainnya (Wijaya, dkk, 2015). Tiga minyak atsiri yang bisa didapat dari tanaman cengkeh adalah minyak bunga cengkeh, minyak batang cengkeh, dan minyak daun cengkeh. (Alma, dkk, 2007). Namun yang biasa digunakan masyarakat untuk disuling adalah minyak daun cengkeh karena mudah didapat dan ekonomis. Sedangkan bunga cengkeh mahal dan tidak tersedia sepanjang tahun (Dinas Perkebunan Jawa Timur, 2013:28). Pada daun cengkeh hanya sekitar 1,68% minyak yang dapat diambil dengan metode distilasi uap (Wijaya dkk, 2015).

Perdagangan minyak atsiri yang begitu pesat menuntut para peneliti untuk terus menemukan metode yang terbaru dan tepat untuk meningkatkan rendemen hasil ekstraksi minyak atsiri. Nasruddin (2009) menyatakan bahwa perlakuan pendahuluan pada bahan mampu mempertinggi rendemen dan mutu minyak atsiri. Perlakuan sebelum penyulingan tersebut antara lain pengecilan ukuran bahan (perajangan), pengeringan, dan fermentasi daun menggunakan aktivitas selulolitik dari kapang (Supriyati, dkk, 2010). Kapang selulolitik tersebut adalah jenis *Trichoderma* (*T. viride*, *T. reesei*, *T. harzianum*) dan *Aspergillus* (*A. niger*, *A. oryzae*) (Supriyati dkk, 2010). Aktifitas selulolitik dari enzim selulase dihasilkan dari fermentasi substrat padat atau cair oleh kapang dengan substrat berupa *biomass*. Fermentasi substrat padat lebih menguntungkan karena biaya instalasi murah, medium fermentasi sederhana, tidak membutuhkan kontrol yang teliti dan menghasilkan limbah cair yang lebih sedikit (Bansal dkk, 2012).

Peningkatan rendemen minyak atsiri daun cengkeh dapat dilakukan dengan fermentasi selulotik. Penelitian Wijaya (2015) membandingkan peningkatan rendemen minyak daun cengkeh dari tiga metode berbeda yaitu secara kimia (delignifikasi dengan NaOH 0,25%), biologi (fermentasi selulotik dengan *Trichoderma harzianum*), dan gabungan keduanya. Penelitian ini menunjukkan bahwa proses fermentasi memberikan hasil terbaik dengan kenaikan rendemen sebesar 57,7% dibandingkan dengan delignifikasi yaitu 39,9%. Namun pada penelitian lainnya, yaitu Ashary (2011), yang membandingkan enzim selulotik dari *Aspergillus* dan *Trichoderma*, aktifitas enzim selulase dari kapang *Aspergillus niger* lebih tinggi dibanding kapang jenis *Trichoderma reesei*, yaitu 2,312 U/ml dibanding 1,0927 U/ml. Selain itu, kapang genus *Aspergillus* adalah kapang yang komersial digunakan dalam produksi enzim, biosurfaktan dan asam organik (Santos dkk, 2011). Bansal dkk (2012) meneliti faktor lingkungan yang berpengaruh pada produksi enzim selulase dari *Aspergillus niger*, salah satunya yaitu kandungan moisture substrat. Dari penelitian ini, didapat moisture yang terbaik adalah 50-55%. Sehingga perlu adanya pengkajian terhadap penggunaan kapang *Aspergillus niger* pada perlakuan awal daun cengkeh dengan perbedaan kandungan moisture untuk mengetahui pengaruhnya terhadap rendemen minyak atsiri daun cengkeh.

### 1.2. Rumusan Masalah

Rendemen minyak atsiri daun cengkeh telah dapat ditingkatkan dengan perlakuan awal fermentasi selulotik dari kapang jenis *Trichoderma*. Namun kapang *Aspergillus niger* memiliki aktivitas enzim selulase yang lebih baik. Maka dari itu perlu ditinjau bagaimana pengaruh lama fermentasi selulotik daun cengkeh serta moisture substrat terhadap rendemen minyak daun cengkeh yang dihasilkan.

### 1.3. Pembatasan Masalah

Untuk memfokuskan arah penelitian maka batasan masalah ini meliputi:

1. Tanaman cengkeh yang digunakan adalah bagian daun cengkeh dari Wlingi, Blitar, Jawa Timur.
2. Fermentasi yang digunakan adalah fermentasi aerobik substrat padat.
3. Mikroorganismen yang digunakan adalah kapang *Aspergillus niger* dari Laboratorium Bioproses, Program Studi Teknik Kimia FT-UB
4. Proses penyulingan dilakukan secara *steam distillation* pada tekanan barometrik.
5. pH disangga dengan pemberian *buffer* hingga pH 7.



6. Pengujian sampel hanya dilakukan setiap 24 jam di Laboratorium Bioproses, Program Studi Teknik Kimia FT-UB
7. Moisturemeter yang digunakan memiliki ketelitian lapang.
8. Pengendalian moisture dilakukan dengan penyemprotan sejumlah air ke substrat tanpa memperhitungkan serapan oleh daun cengkeh.
9. Laju aerasi sebesar 10 L/menit tanpa digunakan distributor gas.
10. Humiditas udara tidak dikontrol selama fermentasi.

#### 1.4. Tujuan Penelitian

Mengetahui pengaruh fermentasi selulolitik menggunakan *Aspergillus niger* terhadap rendemen dan karakteristik minyak daun cengkeh pada fermentasi substrat padat.

#### 1.5. Manfaat Penelitian

Penelitian ini memberikan manfaat sebagai berikut.

1. Manfaat teoritik dan aplikatif berupa informasi data rendemen dan karakteristik minyak atsiri daun cengkeh yang dapat digunakan untuk *scale up*.
2. Alternatif baru untuk peningkatan rendemen minyak atsiri yang mudah diaplikasikan secara industri mikro.





## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Minyak Atsiri

Minyak atsiri adalah senyawa volatil kompleks yang dihasilkan dari organisme hidup dan diisolasi dengan cara fisik. Pada tumbuhan, minyak atsiri berguna sebagai senyawa pelindung melawan herbivora sekaligus menarik serangga untuk membantu penyerbukan tanaman (Baser dan Buchbauer, 2010:39-40).

Semua tumbuhan memiliki kemampuan untuk memproduksi senyawa volatil namun dalam kadar yang sedikit. *Secretory idioblast* adalah sel individu yang memproduksi minyak atsiri dalam jumlah besar serta menyimpannya dalam *essential oil idioblast* yang berada dekat dengan lapisan lignin dan endodermis tumbuhan (Baser dan Buchbauer, 2010:39-40).

### 2.2. Minyak Daun Cengkeh

Cengkeh (*Syzygium aromaticum*) termasuk dalam family *Myrtaceae* dan merupakan salah satu tanaman rempah asli Indonesia yang berasal dari kepulauan Maluku. Tanaman Cengkeh merupakan jenis tanaman penghasil minyak atsiri yang tumbuh subur di Indonesia. Hal ini menunjang potensi Indonesia sebagai penghasil minyak cengkeh dalam jumlah besar (Guenther, 1972). Produk minyak atsiri cengkeh Indonesia cukup dominan menguasai pasar dunia yaitu sekitar 2500 ton per tahun (Gunawan, 2009).



**Gambar 2.1** Tanaman Cengkeh  
Sumber : Dinas Perkebunan Jawa Timur, 2013

Tanaman cengkeh (Gambar 2.1) memiliki kandungan minyak atsiri dengan jumlah cukup besar, baik dalam bunga (10-20%), tangkai (5-10%) maupun daun (1-4%) (Nurdjannah, 2004). Bagian bunga mengandung *fixed oil* (lemak), resin, tannin, protein, selulosa, pentosan dan mineral dengan minyak atsiri sebagai komponen yang paling banyak (Purseglove *et al.*, 1981). Secara umum, daun dan ranting cengkeh mengandung eugenol dengan konsentrasi lebih banyak dibandingkan bunga cengkeh. Pada minyak yang dihasilkan dari daun cengkeh terdapat 82-88% eugenol, dan pada ranting mencapai 90-95%. Dibandingkan minyak dari bunga cengkeh yang hanya mengandung 60-80% eugenol, sisanya adalah eugenyl asetat, caryophyllene dan senyawa minor lainnya. (Nurhadjannah, 2004). Minyak cengkeh diperoleh dari daun cengkeh yang telah gugur. Komposisi minyak yang dihasilkan bervariasi tergantung dari keadaan daun serta cara destilasinya. Mutu minyak atsiri sangat ditentukan oleh sifat dan senyawa kimia yang terkandung di dalamnya (Wijaya dkk, 2015).

Kualitas minyak cengkeh dievaluasi dari kandungan fenol, terutama eugenol (Guenther, 1990). Besarnya komponen kimia minyak atsiri cengkeh dapat berbeda tergantung pada faktor iklim, musim, lokasi geografis, geologi, bagian tanaman dan metode yang digunakan untuk memperoleh minyak atsiri (Viuda *et al.*, 2007). Rendemen dan mutu minyak atsiri juga dipengaruhi oleh mutu bahan dan penanganan bahan sebelum penyulingan. Standar mutu minyak cengkeh menurut Standar Nasional Indonesia (SNI) : 06-4267-1996 meliputi aspek warna, bobot jenis, indek bias, putaran optik, kelarutan dalam etanol dan kandungan eugenol seperti yang tercantum pada Tabel 2.1.

**Tabel 2.1.** Standar Mutu Minyak Cengkeh

No	Jenis Uji	Satuan	Peryaratan
1	Keadaan		
1.1	Warna	-	Kuning – coklat tua
1.2	Bau	-	Khas minyak cengkih
2	Bobot Jenis 20°C / 20°C		1.025 – 1.049
3	Indek bias ( <sup>n</sup> D <sub>20</sub> )	-	1.528 – 1.535
4	Kelarutan dalam etanol 70%	-	1 : 2 jernih
5	Eugenol Total	% v/v	Minimum 78
6	Beta Caryophyllene	%	Maksimum 17

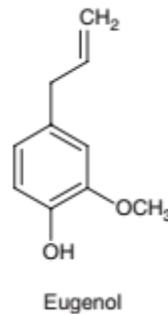
Sumber : SNI:06-2387-2006



### 2.2.1. Eugenol

Eugenol adalah unsur utama dari minyak atsiri yang terdapat dalam golongan *Myrtaceae* dan *Lauraceae*, contohnya seperti minyak cengkeh, biji dan daun pimento, dan daun kayu manis. Dalam beberapa tanaman eugenol terlihat seperti glukosa. Senyawa ini dipakai dalam industri parfum, penyedap, dan farmasi sebagai penyuci hama dan pembius lokal, selain itu eugenol dapat dipakai untuk membuat vanillin. Overdosis eugenol menyebabkan gangguan yang disebabkan oleh darah seperti diare, nausea, ketidaksadaran, pusing atau meningkatnya denyut jantung. Terdapat alergi yang disebabkan oleh eugenol. (Julianto, 2016 : 67)

Kandungan eugenol pada minyak cengkeh berkisar (70-85%) dan  $\beta$ -caryophyllene (5-12%) yang mewakili 99 % kandungan pada minyak cengkeh. Kandungan eugenol pada minyak cengkeh memiliki sifat antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan *Aspergillus niger*, *S.Cerevisae*, *Mycoderma sp.*, *Lactobacillus acidophilus* dan *B.Cereus*. (Parthasarathy, 2008 :158).



**Gambar 2.2.** Struktur rumus kimia Eugenol  
Sumber: Parthasarathy, 2008 :155.

Rumus struktur eugenol  $C_{10}H_{12}O_2$ , berat molekul 164.20 g/mol, tampilan cairan berwarna kuning kecoklatan dan memiliki aroma yang kuat dari tanaman cengkeh. Desitas  $1.06 \text{ g/cm}^3$ , titik didih  $256^\circ\text{C}$  (529 K,  $493^\circ\text{F}$ ), titik leleh  $-9^\circ\text{C}$  (264 K,  $16^\circ\text{F}$ ), titik beku  $-10.3^\circ\text{C}$ . (Julianto, 2016 : 68)

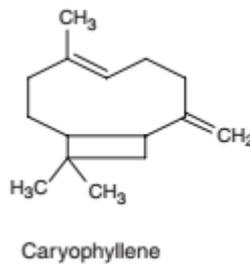
### 2.2.2. $\beta$ -caryophyllene

$\beta$ -caryophyllene adalah bisiklik alami sesquiterpene yang terkandung dalam banyak minyak atsiri terutama minyak cengkeh (minyak dari batang, daun dan bunga *Syzygium aromaticum*), minyak atsiri dari rami *Cannabis sativa*, rosemary *Rosmarinus officinalis*, dan hop. Caryophyllene biasanya ditemukan dalam



8

campuran isocaryophyllene ( $\gamma$ -Caryophyllene) dan ( $\alpha$ -Caryophyllene), isomer dengan cincin terbuka. Caryophyllene adalah salah satu senyawa kimia yang memberikan kontribusi terhadap rasa pedas dari lada hitam. (Julianto, 2016 : 70)



**Gambar 2.3.** Struktur rumus kimia  $\beta$ -caryophyllene

Sumber: Parthasarathy, 2008 :155

$\beta$ -caryophyllene merupakan kandungan kedua terbanyak pada minyak cengkeh yaitu sekitar (5-12 %). (Parthasarathy, 2008 :149). Dalam sebuah penelitian yang dilakukan oleh Jurg Gertsch et al. dari institut teknologi Federal Swiss (ETH Zurich)  $\beta$ -caryophyllene ditunjukkan untuk selektif mengikat ke reseptor cannabinoid tipe 2 (CB 2) dan dapat menangkal anti peradangan pada manusia. Sintesis total  $\beta$ -caryophyllene pertama pada tahun 1964 oleh EJ Corey dianggap salah satu pengagas sintesis senyawa organik pada saat itu. (Julianto, 2016 : 70)

### 2.3. Ekstraksi Minyak Daun Cengkeh

Ekstraksi minyak atsiri dari tumbuhan dapat dilakukan dengan tiga cara yaitu: (Harris, 1989:4)

1. Pengempaan (*Expression*)
2. Ekstraksi dengan pelarut (*Solvent Extraction*)
3. Penyulingan (*Distillation*)

Dari ketiga cara ini, metode yang umum digunakan adalah penyulingan menggunakan air dan/atau uap air (Guenther, 1987:131).

1. Pengempaan (*Expression*)

Sebagian besar pengempaan dilakukan untuk mendapatkan berbagai minyak jeruk. Seperti yang sering kita lihat, sel-sel buah jeruk sangat mudah melepaskan minyak. Proses pengempaan dilakukan dengan menekan bahan melalui sebuah alat, secara sederhana menggunakan kayu lumping yang diputar untuk menekan bahan dan mengeluarkan minyak pada bagian bawah (Harris, 1989:16-18).

Minyak yang diperoleh dari pengempaan ialah campuran minyak nabati dengan minyak atsiri. Sehingga perlu dilakukan pemisahan dengan penyulingan diatas titik didih minyak atsiri (Harris, 1989:16-18).

## 2. Ekstraksi dengan pelarut (*Solvent Extraction*)

Ekstraksi menggunakan pelarut adalah cara pengambilan minyak yang lebih halus. Cara ini tepat digunakan untuk mengambil minyak pada bunga yang kurang stabil dan dapat rusak oleh panas uap air. Bahan-bahan pelarut yang digunakan adalah *chloroform, ether, acetone, alcohol* dan *ether* minyak bumi (Harris, 1989:11-12).

Walaupun cara ini menguntungkan, namun proses yang digunakan tidak mudah untuk dilakukan. Cara ini menggunakan alat yang rumit dan mahal, dan juga membutuhkan tenaga kerja yang terlatih. Biaya ekstraksi relative mahal, dan sedikit saja kesalahan dalam proses dapat mengakibatkan kerugian yang besar (Guenther, 1987:243-244).

## 3. Penyulingan (*Distillation*)

Penyulingan ini dibagi menjadi tiga cara, yaitu

### a. Penyulingan dengan air (penyulingan langsung)

Pada metode ini, bahan yang akan disuling kontak langsung dengan air mendidih. Bahan tersebut mengapung di atas air atau terendam secara sempurna tergantung bobot jenis bahan (Guenther, 1987:133). Kekurangan dari proses ini adalah penurunan mutu dan hasil dari minyak. Penyulingan langsung mengakibatkan pengasaman (oksidasi) dan menimbulkan aneka hasil sampingan yang tidak dikehendaki (Harris, 1989:4).

### b. Penyulingan dengan uap langsung

Pada metode penyulingan ini, bahan olah dietakkan di atas rak-rak berlubang. Ketel suling diisi dengan air hingga permukaan air berada tidak jauh dibawah saringan. Ciri khas dari metode ini, adalah uap selalu dan keadaan panas, jenuh dan tidak terlalu panas, dan bahan yang disuling hanya berhubungan dengan uap dan tidak dengan air panas (Guenther, 1987:134). Ilustrasinya dapat dilihat pada

### c. Penyulingan dengan uap tidak langsung

Prinsip dari penyulingan ini sama dengan penyulingan air uap, tapi air tidak diisikan dalam ketel. Uap yang digunakan adalah uap jenuh atau uap *superheated*. Uap dialirkan melalui pipa ap berlingkar yang berpori yang terletak dibawah bahan,



dan uap bergerak ke atas melalui bahan yang terletak diatas rak (Guenther, 1987:134).

Peristiwa pokok yang terjadi pada prose penyulingan dengan air dan/atau uap air atau disebut hidro destilasi , yaitu:

1. Difusi minyak atsiri dan air pana melalui membrane tanaman, disebut hidro difusi

Pada bahan yang dirajang, sebagian kecil minyak atsiri keluar ke permukaan bahan dan segera menguap oleh uap panas. Minyak selebihnya keluar ke permukaan dengan proses difusi melalui selaput tipis yang terdiri dari jaringan tanaman (Guenther, 1987:135-136).

Dalam penyulingan uap tidak terjadi penetrasi oleh uap ke dalam sel membran yang kering. Hal ini dibuktikan dengan menyuling dengan uap *superheated* menyebabkan bahan mengering. Apabila dilanjutkan dengan penyulingan jenuh, akan dihasilkan minyak atsiri yang tertinggal dalam bahan (Guenther, 1987:135-136).

Penyulingan menciptakan kondisi yang lebih baik untuk proses osmosis minyak, karena suhu tinggi dan pergerakan air yang diakibatkan oleh kenaikan suhu dalam ketel penyuling mempercepat proses difusi. Dalam keadaan seperti itu seluruh minyak atsiri yang terdapat dalam jaringan tanaman akan terekstrak.

Penyelidikan secara mikroskopik menunjukkan bahwa dinding sel tanaman bersifat tidak *permeable* terhadap minyak atsiri (Guenther, 1987:135-136).

Proses hidrodifusi pada penyulingan tanaman dapat digambarkan sebagai berikut. Pada suhu air mendidih, sebagian minyak atsiri akan larut dalam air yang terdapat dalam kelenjar. Campuran minyak dalam air ini berdifusi ke luar dengan peristiwa osmosis, melalui selaput membran tumbuhan hingga sampai di permukaan bahan, dan selanjutnya menguap. Kecepatan penguapan minyak dalam proses hidroddestilasi bahan tidak dipengaruhi oleh sifat mudah menguapnya komponen-komponen minyak, melainkan lebih banyak oleh derajat kelarutannya dalam air (Guenther, 1987:135-136).

2. Hidrolisa terhadap beberapa komponen minyak atsiri

Hidrolisa didefinisikan sebagai reaksi kimia antara air dengan beberapa persenyawaan dalam minyak atsiri. Komponen dalam minyak sebagian terdiri dari ester, dan beberapa jenis minyak bahkan mengandung ester dari asam organik dan



alkohol. Adanya air, apalagi pada suhu tinggi, menyebabkan ester bereaksi dengan air sehingga membentuk asam dan alkohol (Guenther, 1987:139).

### 3. Dekomposisi yang biasanya disebabkan oleh panas.

Pada umumnya persenyawaan minyak atsiri bersifat tidak stabil pada suhu tinggi.

Agar diperoleh minyak yang bermutu tinggi maka perlu diusahakan sehingga penyulingan minyak atsiri (bahan tanaman) berlangsung pada suhu rendah (Guenther, 1987:140).

Walapun ketiga peristiwa tadi dijelaskan terpisah, namun pada prakteknya proses ini akan terjadi secara bersamaan. Pada umumnya untuk mendapatkan rendemen yang tinggi dan mutu minyak atsiri yang baik diusahakan agar: (Guenther, 1987:141).

- Suhu penyulingan dipertahankan serendah mungkin dengan mengingat bahwa kecepatan serta besarnya jumlah minyak juga ditentukan oleh suhu.

Pada penyulingan uap, jumlah air yang kontak dengan bahan yang disuling, diusahakan sesedikit mungkin, tetapi harus diingat bahwa air harus ada untuk membantu kelancaran proses difusi.

## 2.4. Fermentasi

Fermentasi berasal dari bahasa latin “fervere” yang berarti merebus (*to boil*). Arti kata dari Bahasa latin tersebut dapat dikaitkan dengan kondisi cairan bergelembung atau mendidih. Keadaan ini disebabkan adanya aktivitas ragi pada ekstraksi buah-buahan atau biji-bijian (Suprihatin, 2010).

Salah satu proses fermentasi adalah fermentasi selulotik. Proses fermentasi ini menggunakan aktivitas enzim selulosa. Proses fermentasi ini dapat mendegradasi komponending sel jaringan daun sehingga minyak atsiri lebih banyak didapatkan selama proses destilasi. Fermentasi secara umum dibagi menjadi 2 model utama yaitu fermentasi media padat (*solid state fermentation*) dan fermentasi media cair (*submerge fermentation*). (Raharjo & Retnowati, 2012).

Fermentasi cair adalah fermentasi yang terjadi pada medium yang konsistensinya cair. Dalam menjalankan fermentasi susbtrat cair ditentukan oleh sifat-sifat mikroorganisme dalam mengambil oksigen untuk kehidupannya. Miroorganisme aerob tumbuh diatas, anerob tumbuh didasar, fakultatif tumbuh disemua bagaian. Syarat bahan yang dpat digunakan sebagai substrat antara lain adalah tahan sterilisasi dan bebas dari racun yang berbahaya bagi mikroorganisme dan konsumen. (Sabrina,2012)

Fermentasi substrat padat adalah fermentasi yang terjadi pada substrat yang berbentuk padat, mikroorganisme yang dipilih yang memang mampu hidup dengan baik pada substrat padat bahkan dalam keadaan ketiadaan dan hampir ketiadaan air bebas. Fermentasi substrat padat merupakan fungsi (absorbansi) dengan demikian kadarnya tergantung dari substrat yang digunakan. Fermentasi Substrat padat telah digunakan pada produksi berbagai macam produk makanan di Asia (Waite, 2001).

#### 2.4.1. Faktor yang mempengaruhi fermentasi selulotik padat

Fermentasi substrat padat memiliki mekanisme control yang lebih sederhana dibandingkan dengan fermentasi substrat cair. Control lingkungan menggunakan bioreaktor sangat susah digunakan khususnya dalam control secara simultan suhu dan moisture optimal. Beberapa faktor yang mempengaruhi fermentasi substrat padat antara lain :

##### 1. Aktifitas Air $A_w$

Air akan hilang selama fermentasi dikarenakan evaporasi dan aktifitas metabolik. Keadaan ini biasanya diatasi dengan penambahan air secara periodik. Pada kelembapan rendah, substrat akan susah di konsumsi sehingga pertumbuhan mikroba berkurang. Sedangkan pada keadaan moisture tinggi dapat mengurangi porositas substrat, mengurangi laju difusi oksigen dan secara umum dapat mengurangi transfer gas. Sehingga mengakibatkan, laju degradasi substrat menurun dan rentan terhadap kontaminan (Waite, 2001:106).

##### 2. Suhu

Timbulnya panas dapat menjadi masalah dan berpengaruh pada moisture dalam fermentasi. Suhu pada fermentasi substrat padat sebagian besar dikendalikan oleh aerasi dan agitasi dari substrat. (Waite, 2001:106).

##### 3. Aerasi

Kebanyakan fermentasi substrat padat berlangsung pada kondisi aerobik. Laju aerasi juga terkait dengan kebutuhan menghilangkan panas,  $CO_2$  dan senyawa volatil yang lain yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Laju perpindahan oksigen sangat dipengaruhi oleh ukuran partikel substrat, yang menentukan ruang kosong yang berhubungan pada moisture karena sebagian oksigen akan dapat larut pada lapisan air disekitar partikel substrat. (Waite, 2001:106).

#### 2.4.2. Bioreaktor fermentasi padat

Bioreaktor digunakan untuk menyediakan kondisi dan lingkungan yang sesuai untuk pertumbuhan mikroorganisme pada material padat dan produksi metabolit.

Reaktor harus memenuhi beberapa persyaratan yaitu: menampung substrat (tertutup atau semi-tertutup); mencegah terjadinya kontaminasi dari mikroorganisme luar sebanyak mungkin; mencegah mikroorganisme fermentasi keluar dari lingkungan; menjaga suhu dan humiditas yang sesuai untuk fermentasi; menyediakan oksigen yang cukup untuk mikroorganisme aerobik; menyediakan kondisi anaerobik untuk mikroorganisme anaerobik; kemudahan pengadukan dan perpindahan material; dan memfasilitasi ekstraksi produk fermentasi sebanyak mungkin (Chen, 2013:129)

Bioreaktor substrat padat dikategorikan menjadi dua, yaitu statis dan dinamis fermentasi tergantung dari medium kulturnya. Keadaan statis artinya medium kultur dibiarkan diam, sedangkan keadaan dinamis artinya kultur medium digerakkan secara kontinu atau berkala (Chen, 2013:131).

Faktor yang mempengaruhi desain bioreaktor yaitu sebagai berikut (Chen, 2013:131-132).

##### 1. Penukaran udara yang digunakan dalam bioreaktor

Faktor ini dibedakan menjadi pertukaran udara secara alami dan dipaksa. Sebagian besar fermentasi padat adalah aerobik. Penukaran udara dan agitasi secara berkala mampu mencapai kondisi sebagian besar produk fermentasi padat, tapi volume udara dan kecepatan pengadukan perlu ditentukan secara eksperimental.

##### 2. Mode pengadukan

Fermentasi padat dibagi menjadi tiga tipe: fermentasi stasioner, fermentasi yang diaduk berkala, dan fermentasi yang diaduk secara kontinu. Agitasi memiliki efek positif pada suplai oksigen dan ventilasi; penghilangan panas, dan karbondioksida. Namun, pengadukan juga memiliki efek negatif. Pengadukan dapat menyebabkan rusaknya miselia, yang berakibat pada pertumbuhan mikroorganisme dan bahkan mempengaruhi sintesa metabolit.

Variabel utama dalam mengaplikasikan pengadukan adalah intensitas dan durasi.

##### 3. Kontrol humiditas dan suhu udara

Udara biasanya dipanaskan atau didinginkan melewati *heat exchanger* diluar reaktor.

#### 4. Kontrol suhu material

Masalah teknis yang paling sulit dalam fermentasi padat adalah bagaimana cara untuk menghilangkan panas metabolisme secara efektif. Metode dan efisiensi dari penghilangan panas sangat berbeda tergantung dari jenis bioreaktor. Metode yang biasa digunakan adalah *forced ventilation*; udara dapat membawa air yang ter evaporasi dengan panas evaporasi.

#### 5. Kontrol moisture material

Metode yang biasa digunakan adalah menyemprot air pada material secara langsung. Metode ini perlu dilanjutkan dengan pengadukan agar homogen.

#### 6. Pencegahan dan kontrol dari kontaminasi

Untuk memastikan *safetty* dari fermentasi, fermentasi yang murni adalah penting. Langkah preventif yang dapat dilakukan pada *raw material*, bioreaktor, dan sistem ventilasi.

### 2.5. *Aspergillus niger*

Koagulasi *Aspergillus* digunakan untuk menamai genus jamur yang bereproduksi secara aseksual. Morfologi dari konidia spora, struktur yang mengandung spora aseksual adalah karakter taksonomi yang sangat penting yang digunakan dalam taksonomi *Aspergillus*. Spesies *Aspergillus* sangat umum dan tersebar luas. Mereka adalah salah satu kelompok yang paling sukses dari jamur dan memiliki peranan penting dalam ekosistem alam dan manusia (Bennett,2008).

*Aspergillus niger* adalah jamur berfilamen yang biasanya terdapat di lingkungan dan umumnya dianggap tidak berbahaya. *Aspergillus* tumbuh secara aerobik pada materi organik dan toleran pada berbagai macam temperature dan pH (Beer,2008). *A.niger* dapat tumbuh pada temperature 6-47°C dengan temperature optimal pada 35-37 °C. dengan aktifitas air untuk tumbuh sebesar 0.88 yang mana lebih tinggi bila dibandingkan spesies *Aspergillus* yang lain. *Aspergillus niger* dapat tumbuh pada pH yang ekstrim diantara 1.4-9.8.

Kemampuannya dalam memproduksi konidiaspora yang sangat berlimpah yang di distribusikan melalui udara. Spesies *A.niger* ada dimana-mana dengan jumlah terbesar terdapat pada tempat yang hangat dan lembab (Schuster,2002).

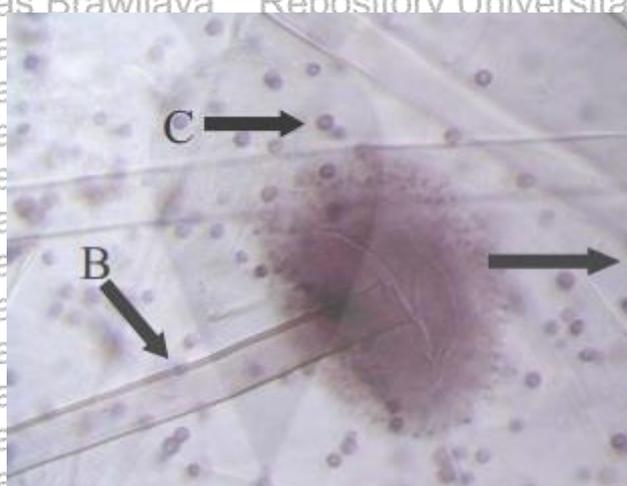


**Tabel 2.2** Kedudukan Spesies *Aspergillus Niger*

Kingdom	Fungi
Filum	<i>Ascomycota</i>
Klas	<i>Ascomycetes</i>
Ordo	<i>Eurotiales</i>
Famili	<i>Trichocomaceae</i>
Genus	<i>Aspergillus</i>
Spesies	<i>Aspergillus Niger</i>

Sumber : Samson, *et al.*, 1996

Ciri-ciri *Aspergillus niger* yaitu mempunyai kepala konidia yang besar, bulat dan berwarna hitam, coklat hitam atau ungu coklat. Konidianya kasar dan mengandung pigmen, hifa septat dan miselium bercabang. Konidiofora membengkak membentuk rantai berwarna hijau, coklat atau hitam. (Wuryanti, 2008)



**Gambar 2.4.** Morfologi *Aspergillus niger*, A. Kepala konidia . B. Konidiofora. C. Konidia

Sumber : Guillaume, 2004

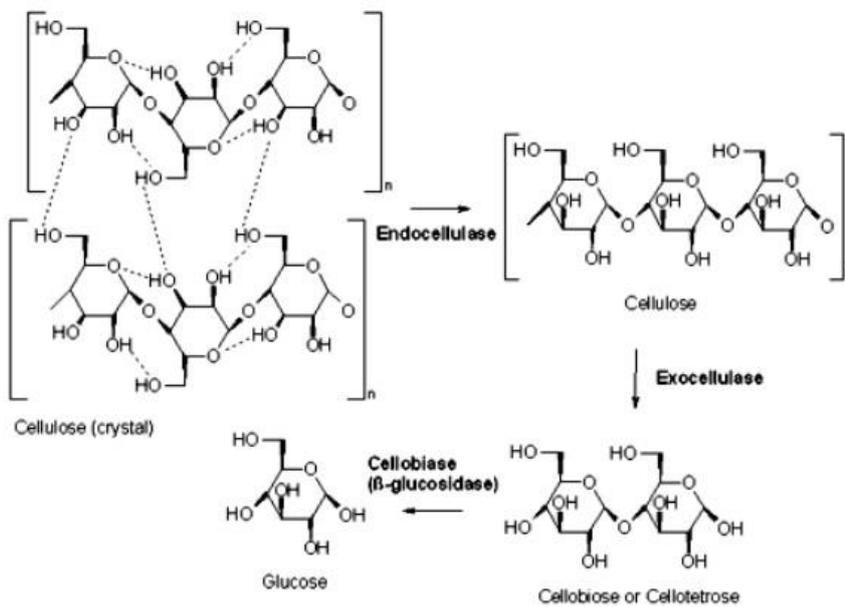
*Aspergillus niger* merupakan kapang yang dapat digunakan untuk menghasilkan berbagai jenis asam seperti asam oksalat, asam-2-hidroksipropana-1,2,3-trikarboksilat, asam glukanoat dan berbagai jenis enzim seperti pectinase,  $\alpha$ -amylase, asparaginase, selulose, proteinase, lipase, katalase, glukosa oksidase dan fitase. *Aspergillus niger* dalam pertumbuhannya berhubungan langsung dengan zat makanan yang terdapat dalam substrat, molekul sederhana yang terdapat di sekeliling hifa dapat langsung diserap sedangkan molekul yang lebih kompleks harus dipecah dahulu sebelum diserap ke dalam sel, dengan menghasilkan beberapa enzim ekstraseluler. Bahan organik dari substrat digunakan oleh

*Aspergillus niger* untuk aktivitas transport molekul, pemeliharaan struktur sel dan mobilitas sel (Wuryanti,2008).

*Aspergillus niger* dapat tumbuh dengan cepat dan digunakan secara komersial dalam produksi asam nitrat, asam glukanoat dan pembuatan beberapa enzim seperti amylase, pectinase, glukoamilase dan selulase. (Wuryanti,2008). Enzim selulase dapat menghidrolisis ikatan  $\beta(1-4)$  pada selulosa. Hidrolisis enzimatik yang sempurna memerlukan aksi sinergi dari tiga tipe enzim ini, yaitu :

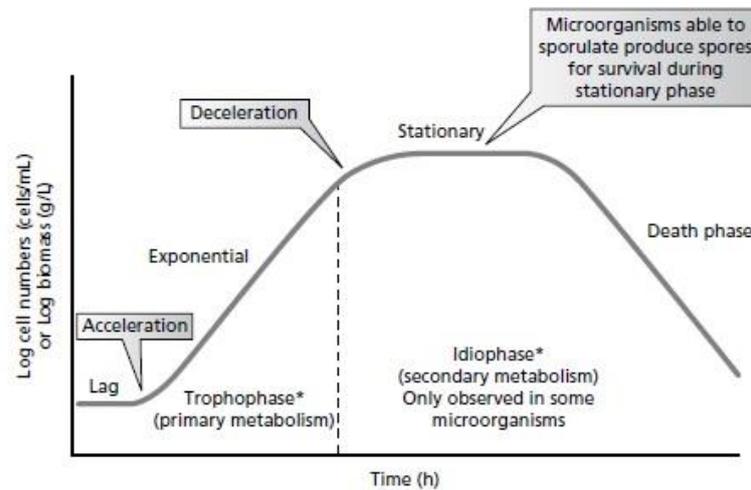
- Endo-1,4- $\beta$ -glucanase (endoselulase, carboxymethylcellulase atau CMCCase), yang mengurai polimer selulosa secara random pada ikatan internal  $\alpha$ -1,4-glikosida untuk menghasilkan oligodekstrin dengan panjang rantai yang bervariasi (Ikram dkk, 2005).
- exo-1,4- $\beta$ -glucanase (cellobiohydrolase), yang mengurangi selulosa dari ujung pereduksi dan non pereduksi untuk menghasilkan selobiosa dan atau glukosa (Ikram dkk,2005)
- $\beta$ -glucosidase (cellobiase), yang mengurangi selobiosa untuk menghasilkan glukosa (Ikram dkk,2005)

Mekanisme hidrolisis selulosa oleh enzim selulosa dapat dilihat pada Gambar 2.5.



**Gambar 2.5.** Mekanisme hidrolisis Selulosa

Sumber : Chapin dkk, 2002



**Gambar 2.6.** Pertumbuhan mikroorganisme pada media batch

Sumber: Waites, 2001

Selama fermentasi secara *batch* populasi dari mikroorganism mengikuti fasa pertumbuhan antara lain: fasa lag, akselerasi, eksponensial, stasioner dan fasa kematian (*dead*) (sesuai Gambar 2.4.) . Pada fasa lag secara visual tidak terjadi pertumbuhan dan populasi mikroba konstan. Namun pada periode ini terjadi aktivitas metabolik untuk beradaptasi pada lingkungan baru. Saat sell diinokulasikan pada media baru sell akan kurang enzim, vitamin atau kofaktor, sehingga mikroba harus mensintesis terlebih dahulu memanfaatkan nutrisi yang tersedia. Komposisi kimia dari media dapat mempengaruhi panjang dari fasa lag. Fasa lag yang lama biasanya dikarenakan karena perbedaan sumber karbon pada medium yang baru sehingga sell perlu mensintesis enzim untuk mengkatabolisme susbtrat baru (Waites, 2001:24).

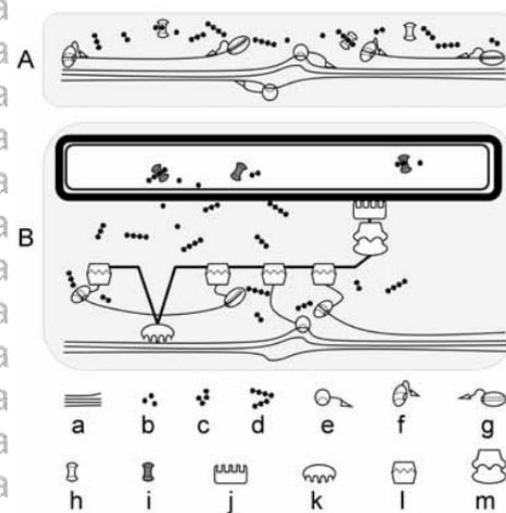
Sel memasuki fasa akselerasi beradaptasi pada lingkungan yang baru. Frekwensi pembelahan sell terus meningkat hingga pada laju pertumbuhan maksimum. Pada kondisi ini pertumbuhan secara eksponensial dimulai dan jumlah sell / biomass bertambah pada laju yang konstan. Pertumbuhan spesifik mikroorganism. Laju pertumbuhan spesifik mikroorganism terus melambat sampai semua subtract yang tersedia telah dikunakn untuk metabolime sell. Pertumbuhan tidak lagi berkelanjutan dan sel memasuki fase stasioner. Pada keadaan ini laju pertumbuhan menurun hingga nol dan tidak terjadi perubahan yang signifikan pada jumlah sell/biomass. Namun, mikroorganism tetap melakukan aktivitas metabolik dan dalam beberapa kasus memproduksi metabolit sekunder. Durasi dari fasa stasioner bervariasi berdasarkan mikroorganism yang digunakan dan kondisi lingkungan. Untuk sell yang tidak dapat bertahan dengan membentuk spora, akan

terjadi fasa kematian eksponensial saat sel mati dalam laju yang konstan. (Waite, 2001:25).

## 2.6. Enzim Selulase

Molekul Enzim adalah katalis biologis yang dapat mempercepat proses reaksi tanpa ikut bereaksi dalam suatu reaksi kimia organik. Seluruh enzim adalah protein. Substrat akan dipercepat perubahannya menjadi molekul lain jenis produk yang akan dihasilkan bergantung pada promotor. Enzim dapat bekerja dengan cara bereaksi dengan molekul substrat untuk menghasilkan senyawa intermediet melalui suatu reaksi kimia organik yang membutuhkan energy aktivasi lebih rendah, sehingga percepatan reaksi kimia terjadi (Palmer, 1995).

Salah satu jenis enzim yang dapat menghidrolisis ikatan  $\beta(1-4)$  pada selulosa adalah enzim selulase. Enzim selulase merupakan enzim yang memegang peranan penting dalam proses biokonversi limbah-limbah organik menjadi glukosa (Chalal, 1983). Enzim selulase dapat diproduksi oleh jamur, bakteri, protozoa, tumbuhan dan hewan. Mikroorganisme selulolitik memiliki dua cara untuk mensekresikan enzim selulasenya : dengan mensekresikan selulase nonkomplek dan kompleks selulase. Secara umum kebanyakan mikroorganisme aerobik selulolitik mendegradasi selulosa dengan cara mensekresikan satu set enzim selulase. Seperti pada Gambar 2.7.



**Gambar 2.7.** skema hidrolisis selulosa oleh sistem nonkomplek selulase (A) dan kompleks selulase (B) a, cellulose; b, glucose; c, cellobiose; d, oligosaccharides; e, endoglucanase dengan modul mengikat karbonhidrat (CMB); f, exoglucanase (acting on reducing ends); g, exoglucanase (acting on nonreducing ends); h,  $\beta$ -exoglucanase; i, cellobiose/cellodextrin phosphorylase; j, s-layer homology; k, CMB

Sumber : Zhou, 2013

Selulase merupakan enzim ekstraseluler yang terdiri atas kompleks endo  $\beta$ -1,4-glukonase, kompleks ekso- $\beta$ -1,4-glukonase dan  $\beta$ -1,4-glukosidase atau selobiase (Meryandini dkk., 2009). Enzim selulase adalah enzim yang dapat menghidrolisis selulosa dengan memutuskan ikatan glikosidik  $\beta$ -1,4 dalam selulosa, selodektrin, selobiosa dan turunan selulosa lainnya menjadi gula sederhana atau glukosa. (Silva *et al.*, 2005)

Tahapan hidrolisis selulosa tergantung kepada struktur selulosa, interaksi antara enzim selulase dengan serat selulosa, mekanisme hidrolisis enzim tersebut di alam dan inhibitor yang terbentuk. Fase adsorpsi dan pembentukan kompleks enzim substrat adalah fase kritis di dalam hidrolisis selulosa. Glukosa dan selobiosa adalah inhibitor enzim dalam menghidrolisis selulosa. Selobiosa menghambat enzim selobiohidrolase dan glukosa menghambat enzim penghidrolisis selobiosa yaitu  $\beta$ -glukosidase pada kompleks enzim selulase. Selobiosa mempunyai potensi lebih kuat menjadi inhibitor dibandingkan dengan glukosa. Laju hidrolisis enzim selulase ditentukan oleh struktur substrat. Struktur kristal lebih sulit dihidrolisis dibandingkan dengan struktur amorf maka hidrolisis dilakukan oleh enzim endoselulase atau endoglukanase (Coughlan 1985).

Faktor yang mempengaruhi aktivitas selulase adanya senyawa penghambat berupa ion logam. Penghambat tersebut dapat dinetralkan dengan menambahkan sistein sehingga aktivitas enzim dapat berlangsung kembali. Beberapa senyawa logam dan senyawa lainnya yang dapat menghambat aktivitas selulase ialah  $Hg^{2+}$ ,  $Ag^{2+}$ , dan  $Cu^{2+}$ , glukanolakton, surfaktan, senyawa pengkelat khususnya *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS), *Ethylene Diamine Tetraacetic Acid* (EDTA), laktat dalam konsentrasi agak rendah dan etanol serta alkohol lainnya. Senyawa penghambat tersebut dapat menekan seluruh kecepatan hidrolisis dengan menghambat adsorpsi eksoglukanase dan endoglukanase pada selulosa, dan menghambat aksi sinergis eksoglukanase dan endoglukanase yang bekerja pada permukaan selulosa. (Oikawa, 1994).

## 2.7. Penelitian Terdahulu

**Tabel 2.3.** Penelitian-penelitian terdahulu mengenai produksi enzim selulase dengan *Aspergillus niger*

Peneliti (Tahun)	Metode	Hasil
Choirul Ashary (2011)	Memproduksi enzim selulase dengan substrat jerami padi dari <i>Aspergillus niger</i> dan <i>Trichoderma reesei</i> . Enzim yang dihasilkan diuji aktifitasnya	- Aktifitas enzim dari <i>Aspergillus</i> 2,312 U/ml - Aktivitas enzim dari <i>Trichoderma</i> 1,0927 U/ml
Tamires Carvalho dos Santos, Ingrid Souza Cavalcanti, Renata Cristina Ferrera Bonomo, Nivio Batista Santana, Marcelo (2011)	Produksi enzim selulase dengan substrat residu mangga dari industri jus Mikroba yang digunakan adalah <i>Aspergillus niger</i> .	- <i>Aspergillus niger</i> komersial digunakan dalam produksi asam organik dan biosurfaktan, serta paling sering digunakan untuk produksi enzim -Aktivitas enzim selulase adalah 7,26 U/g setelah 74,51 jam fermentasi
Chandra Wijaya, Afghani Jayuska, Andi Hairil Alimuddin (2015)	Membandingkan rendemen minyak daun cengkeh dengan perlakuan awal delignifikasi NaOH 0,25%, Fermentasi selulotik <i>Trichoderma</i> , dan gabungan keduanya.	- Kenaikan rendemen delignifikasi 39,9% - Kenaikan rendemen fermentasi 57,7% -Penurunan rendemen proses gabungan 19,4%
Namita Bansal, Rupinder Tewari, Raman Soni, Sanjeev Kumar Soni (2012)	Meneliti kondisi lingkungan (kandungan moisture, suhu dan pH) untuk produksi enzim selulase <i>Aspergillus niger</i> pada berbagai substrat limbah rumah tangga.	Enzim selulase paling baik diproduksi pada -Range suhu (20-50°C) -pH level (3.0-8.0) -Kandungan Moisture (50-55%)



### BAB III METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1. Jenis Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Teknik Bioproses, Program Studi Teknik Kimia FT-UB. Penelitian ini bersifat eksperimental. Variabel yang digunakan adalah lama waktu fermentasi (0 hari, 2 hari, 4 hari, 8 hari) dan kontrol substrat (tanpa kontrol *moisture* dan dengan kontrol *moisture*). Penelitian dimulai dengan menyiapkan daun cengkeh sebagai substrat fermentasi selulotik serta persiapan perbanyakan mikroba. *Aspergillus niger* diinokulasikan ke dalam media cair steril untuk dibiakkan selama 5 hari sebelum ditumbuhkan pada substrat daun cengkeh. Setelah fermentasi, daun cengkeh diambil minyaknya menggunakan metode distilasi uap secara langsung.

#### 3.2. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah “Rancang Acak Kelompok (RAK)”. Faktor yang ditinjau adalah:

##### A. Lama waktu fermentasi

1. Nol hari (Tanpa fermentasi).
2. Dua hari.
3. Empat hari.
4. Delapan hari.

##### B. Kontrol substrat

1. Tanpa kontrol *moisture*.
2. Dengan kontrol *moisture*.

Faktor diatas disusun secara faktorial sehingga diperoleh kombinasi perlakuan seperti pada Tabel 3.1.

**Tabel 3.1.** Hubungan Tiap Variabel dalam Penelitian

B. Kontrol Substrat	A. Lama fermentasi			
	1. Nol hari	2. Dua hari	3. Empat hari	4. Delapan hari
1. Tanpa kontrol <i>moisture</i>	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub> B <sub>1</sub>	A <sub>3</sub> B <sub>1</sub>	A <sub>4</sub> B <sub>1</sub>
2. Dengan kontrol		A <sub>2</sub> B <sub>2</sub>	A <sub>3</sub> B <sub>2</sub>	A <sub>4</sub> B <sub>2</sub>

### moisture

Dari perlakuan tersebut akan didapat perlakuan terbaik yang ditinjau dari rendemen tertinggi yang dihasilkan.

### 3.3. Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain:

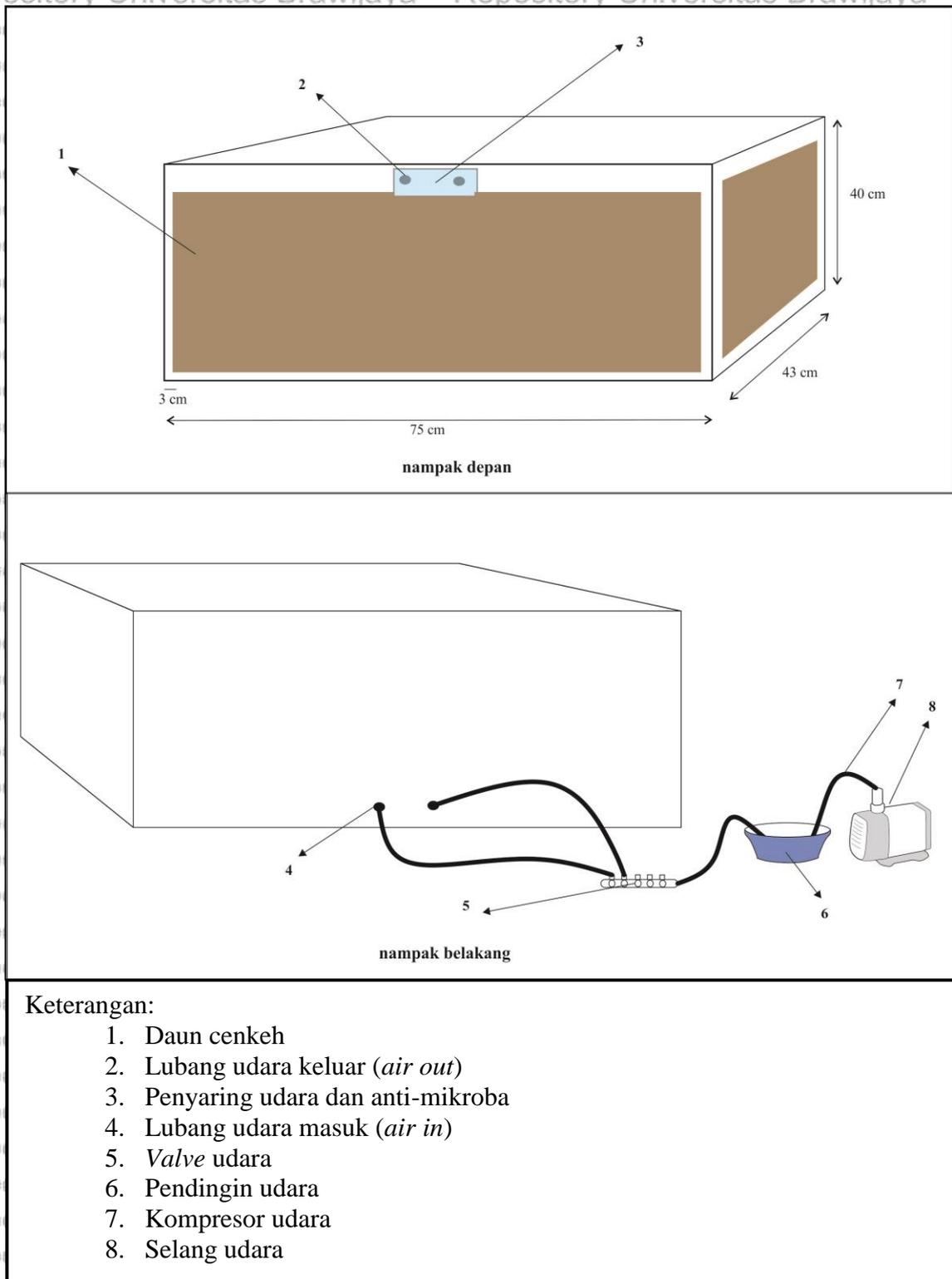
1. *Autoclave* merk HICLAVE HVE-50
2. Seperangkat alat distilasi uap skala pilot
3. Kompresor merk ACO-004
4. Corong pisah
5. Moisturemeter
6. Alat-alat gelas laboratorium
7. SEM (*Scanning Electrom Microscopy*) merk Hitachi TM3000
8. GC (*Gas Chromatography*) merk HP 5890
9. Spektrofotometer UV-VIS OPTIZEN POP

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain:

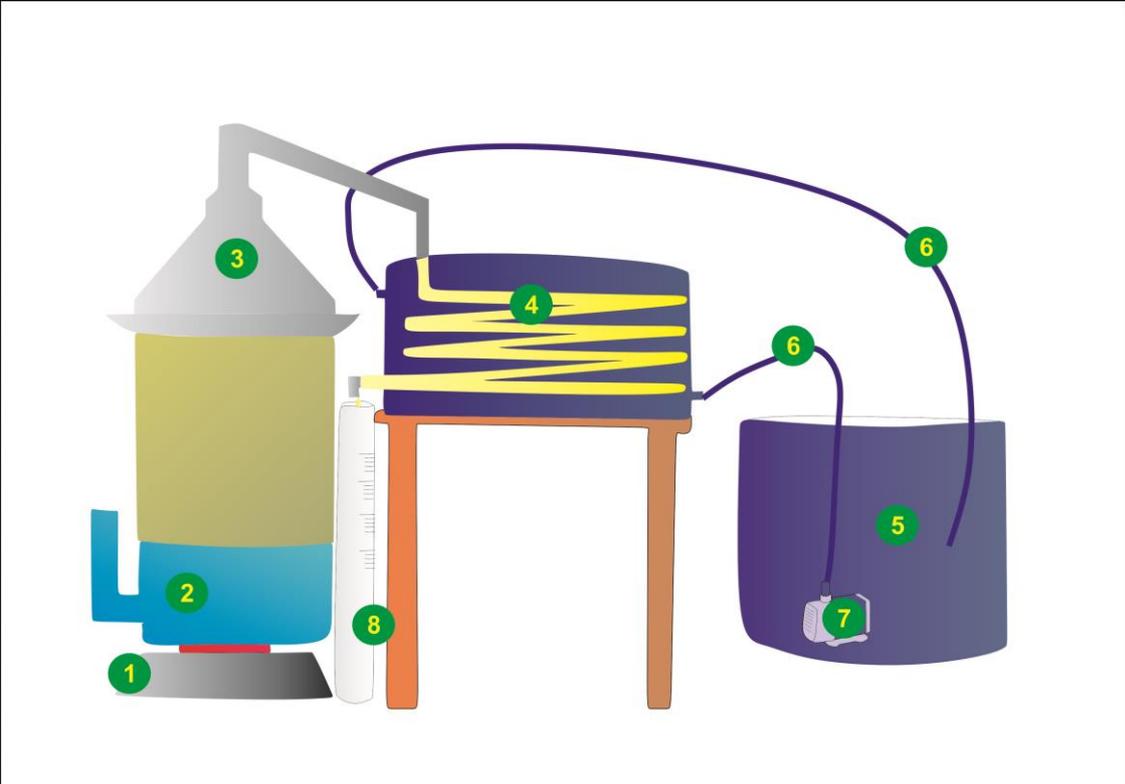
1. Daun cengkeh rakyat yang disimpan 2 bulan di daerah Wlingi, Blitar, Jawa Timur.
2. Biakan *Aspergillus niger* dari Laboratorium Bioproses Teknik Kimia FT-UB.
3. Bahan stater *Aspergillus niger* (Glukosa, Amonium Nitrat,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , Magnesium sulfat heptahidrat).

### 3.4. Desain Alat

Alat yang akan digunakan adalah fermentor substrat padat dan distilasi. Rangkaian alat fermentor dapat dilihat pada Gambar 3.1. Rangkaian alat distilasi yang digunakan dapat dilihat pada Gambar 3.2.



Gambar 3.1. Desain alat fermentor substrat padat.



- Keterangan:
1. Pemanas (bahan bakar LPG)
  2. Ketel Suling
  3. Saluran (pipa) uap
  4. Kondensor (579 cm pipa diameter 2 cm)
  5. Bak air sirkulasi
  6. Selang air
  7. Pompa sirkulasi air
  8. Penampung distilat

**Gambar 3.2.** Desain alat distilasi dengan kapasitas 37,54 Liter (30% air dan 70% bahan)

**3.5. Tahap Pelaksanaan Penelitian dan Analisa Data**

**3.5.1. Pretreatment Daun Cengkeh**

Daun cengkeh dibersihkan dengan cara dipisahkan daun cengkeh dengan kontaminan berupa pasir, sampah dan daun-daun lain yang bukan daun cengkeh.



### 3.5.2. Pembuatan Bahan Stater

Tabel 3.2. Komposisi Bahan untuk Membuat Media Cair

NO	Bahan	Kuantitas
1	Glukosa	75 gram /L
2	Amonium Nitrat	2.06 gram / L
3	Kalium Hydrogen Fosfat	0.34 gram /L
4	Magnesium Sulfat Heptahidrat	0.5 gram /L

Sebanyak bahan yang tercantum dalam Tabel 3.2 di larutkan dalam beaker gelas 1 L kemudian pH diatur sampai 7 dengan menambahkan *buffer* fosfat  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  sebanyak 0.17 gram/L. Larutan diencerkan dalam labu Erlenmeyer 1000 ml kemudian dituangkan pada botol coklat 1000 ml, botol ditutup dengan kapas dan aluminium foil, kemudian diikat dengan benang. Larutan disterilkan dalam autoklaf pada suhu  $121^\circ\text{C}$  dan tekanan 1 atm selama 15 menit. Medium didinginkan hingga suhu kamar.

### 3.5.3. Pembuatan Kurva Pertumbuhan

Pembuatan kurva pertumbuhan menggunakan metode *Cell Dry Weight* untuk mengetahui berat kering *Aspergillus niger*. digunakan perhitungan berat kering karena *aspergillus niger* adalah mikroorganisme yang memiliki hifa sehingga tidak dapat dihitung menggunakan coloni counter (Maryanty,2010). Sebanyak 60 ml media cair glukosa di tuangkan ke dalam Erlenmeyer 100 ml kemudian diinokulasikan *Aspergillus niger* sebanyak 2 goresan. Media cair yang telah diinokulasikan *Aspergillus niger* dirangkai dengan pompa akuarium (kompresor). Dirangkai sebanyak 12 media aklimatisasi, dengan setiap hari dilakukan *Cell Dry Weight* terhadap 2 media (duplo) yaitu dengan menyaring media dengan kertas saring kemudian di lakukan pengovenan hingga didapat massa sel kering yang konstan. Pembuatan kurva pertumbuhan dilakukan selama 6 hari pertumbuhan *Aspergillus niger*.

### 3.5.4. Kalibrasi Alat Moisturemeter

Moisturemeter yang digunakan hanya dapat menunjukkan *moisture* substrat sebanyak lima kisaran yaitu DRY, DRY+, NOR, WET, dan WET+ dimana DRY artinya substrat mengandung *moisture* rendah dan WET mengandung *moisture*

yang tinggi. Sehingga moisturemeter perlu dilakukan kalibrasi agar data moisture substrat yang diukur menjadi akurat dan dapat menunjukkan angka.

Daun cengkeh sebanyak 100 gram dimasukkan kedalam wadah ukuran 30cm x 30cm x 30cm. Diukur menggunakan moisturemeter hingga mendapatkan *moisture* bahan. Lalu diambil 5 gram daun cengkeh untuk dikeringkan hingga berat konstan. Lalu ditambahkan 20ml air kedalam wadah berisi daun cengkeh dan dihomogenkan. Diukur *moisture* dan diambil sampel daun cengkeh untuk dikeringkan hingga berat konstan. Prosedur ini terus diulang hingga moisturemeter menunjukkan *moisture* WET.

### 3.5.5. Fermentasi Daun Cengkeh

Daun cengkeh sebanyak 2000 gram disemprotkan dengan 1000 mL larutan starter (larutan nutrisi + *Aspergillus niger* 6% (60 ml) ) secara merata. Udara yang dialirkan kedalam fermentor sebelumnya telah disaring dengan penyaring udara dan mikroba.

Daun cengkeh dimasukkan kedalam wadah fermentor. Fermentasi dijaga pada kisaran suhu 25-30°C, pada pH 7. Fermentasi dilakukan selama 2 hari, 4 hari, dan 8 hari. *Moisture* dan temperatur substrat dilakukan pengecekan sekali setiap hari. Selama fermentasi dialirkan udara melalui kompresor untuk menjaga kondisi aerobik dan mengontrol temperatur dalam fermentor. *Moisture* dijaga pada kisaran 50-60% untuk variabel kontrol *moisture*. Pengadukan dan pembalikan pada bahan dilakukan sekali setiap hari untuk mengeluarkan panas, menjaga suhu dan menghomogenkan bahan stater dalam fermentor.

### 3.5.6. Distilasi Daun Cengkeh

Daun cengkeh hasil fermentasi dimasukkan kedalam ketel suling Penyulingan dilakukan secara *direct steam distillation*. Alat distilasi yang digunakan memiliki kapasitas bahan 37,54 L (64% kapasitas total) dengan kapasitas air 27% dari volume total. Distilasi dilakukan selama 6 jam pada suhu mendidih tekanan barometrik dimana setiap satu jam ditambahkan *make up water* dengan suhu mendidih tekanan barometrik.

### 3.5.7. Pemurnian Minyak Daun Cengkeh

Minyak daun cengkeh yang didapat dipisahkan dari distilat menggunakan corong pisah. Minyak daun cengkeh didiamkan dalam corong pisah hingga terpisah antara minyak (bagian bawah) dan air (bagian atas), sebelum dipisahkan.

Minyak yang telah dipisahkan, dikurangi kandungan airnya dengan ditambahkan  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidrat. Bahan dan minyak cengkeh dipisahkan menggunakan penyaringan dalam kondisi vakum.

### 3.5.8. Pengukuran Rendemen

Pengukuran rendemen minyak daun cengkeh menggunakan persamaan dibawah ini:

$$\text{Rendemen minyak daun cengkeh} = \frac{\text{Massa minyak daun cengkeh}}{\text{Massa daun cengkeh}} \times 100\%$$

### 3.5.9. Uji Data

Pengujian data dilakukan pada daun cengkeh tanpa fermentasi dan setelah fermentasi (0 hari, 2 hari, 4 hari, 6 hari), dan pada minyak daun cengkeh yang dihasilkan

#### 3.5.9.1. Uji SEM (*Scanning Electron Microscopy*) pada daun cengkeh.

Daun cengkeh yang telah di fermentasi dan dibersihkan dari kapang, dikeringkan dalam oven hingga berat konstan untuk persiapan bahan. SEM yang digunakan merk Hitachi TM3000.

#### 3.5.9.2. Uji Visual Warna Minyak

Minyak daun cengkeh sebanyak 10 ml dimasukkan kedalam tabung reaksi kapasitas 15 ml dan disandarkan pada kertas atau karton berwarna putih. Warna minyak diamati dengan mata langsung dengan jarak pengamatan 30 cm.

#### 3.5.9.3. Uji Spektrofotometer UV-VIS

Uji kepekatan warna dilakukan menggunakan spektrofotometer UV Vis. Minyak dilarutkan menggunakan etanol dengan perbandingan 1 minyak cengkeh : 35 etanol, kemudian sebanyak 3 ml larutan dimasukkan kedalam kuvet dan di lakukan uji menggunakan etanol sebagai blanko. Spesifikasi alat yang digunakan adalah:



- Sistem fotometrik : *Single Beam Type*

- Fotometrik

- Jarak : -3,0 – 3,0 ABS

- Akurasi :  $\pm 0,005$  ABS (pada 1,0 ABS)

- *Reproducibility*:  $\pm 0,003$  ABS (pada 1,0 ABS)

- Panjang gelombang

- Jarak : 190-1100 nm

- Akurasi :  $< \pm 0,5$  nm

- *Reproducibility*:  $< \pm 0,1$  nm

- *Setting* :  $< 0,1$  nm

- *Slew rate* : sekitar 7.800 nm/min

#### 3.5.9.4. Uji Bobot Jenis Minyak Daun Cengkeh

Metode ini digunakan untuk membandingkan massa minyak dan massa air pada suhu yang sama. Pengukuran massa minyak dan air diukur pada suhu 25°C menggunakan alat piknometer 10 ml.

Pengukuran bobot jenis minyak daun cengkeh menggunakan persamaan dibawah ini:

$$d_{25}^{25} = \frac{m_2 - m}{m_1 - m}$$

Dimana:

$m$  adalah massa piknometer kosong (gram);

$m_1$  adalah massa piknometer berisi air pada 25°C (gram);

$m_2$  adalah massa piknometer berisi minyak daun cengkeh pada 25°C (gram).

#### 3.5.9.5. Uji Komposisi Minyak Daun Cengkeh dengan GC (*Gas Chromatography*)

Metode ini digunakan untuk mengetahui kandungan senyawa aktif dari minyak daun cengkeh apakah terjadi perubahan yang signifikan atau tidak. Spesifikasi alat *Gas Chromatography* adalah sebagai berikut.

- Tipe : HP-5890

- Jenis kolom : CW 20 M

- Jenis detektor : FID
- Panjang kolom : 6 ft
- Suhu kolom : 99-249 °C
- Rate : 7,5% / menit
- Suhu injektor : 255 °C
- Suhu detektor : 275 °C
- Gas pembawa : N<sub>2</sub>
- Initial time : 3 menit





### 3.6 Diagram Alir Penelitian

#### 3.6.1 Pretreatment Daun Cengkeh

Daun Cengkeh

Pemisahan dari pengotor

Daun Cengkeh hasil pretreatment

#### 3.6.2 Pengukuran Massa sel kering

60 ml media cair  
glukosa

2 gores  
*Aspergillus niger*

Erlenmeyer 100 ml

Perangkaian dengan  
kompresor

Pembiaran hingga : 1-7  
hari

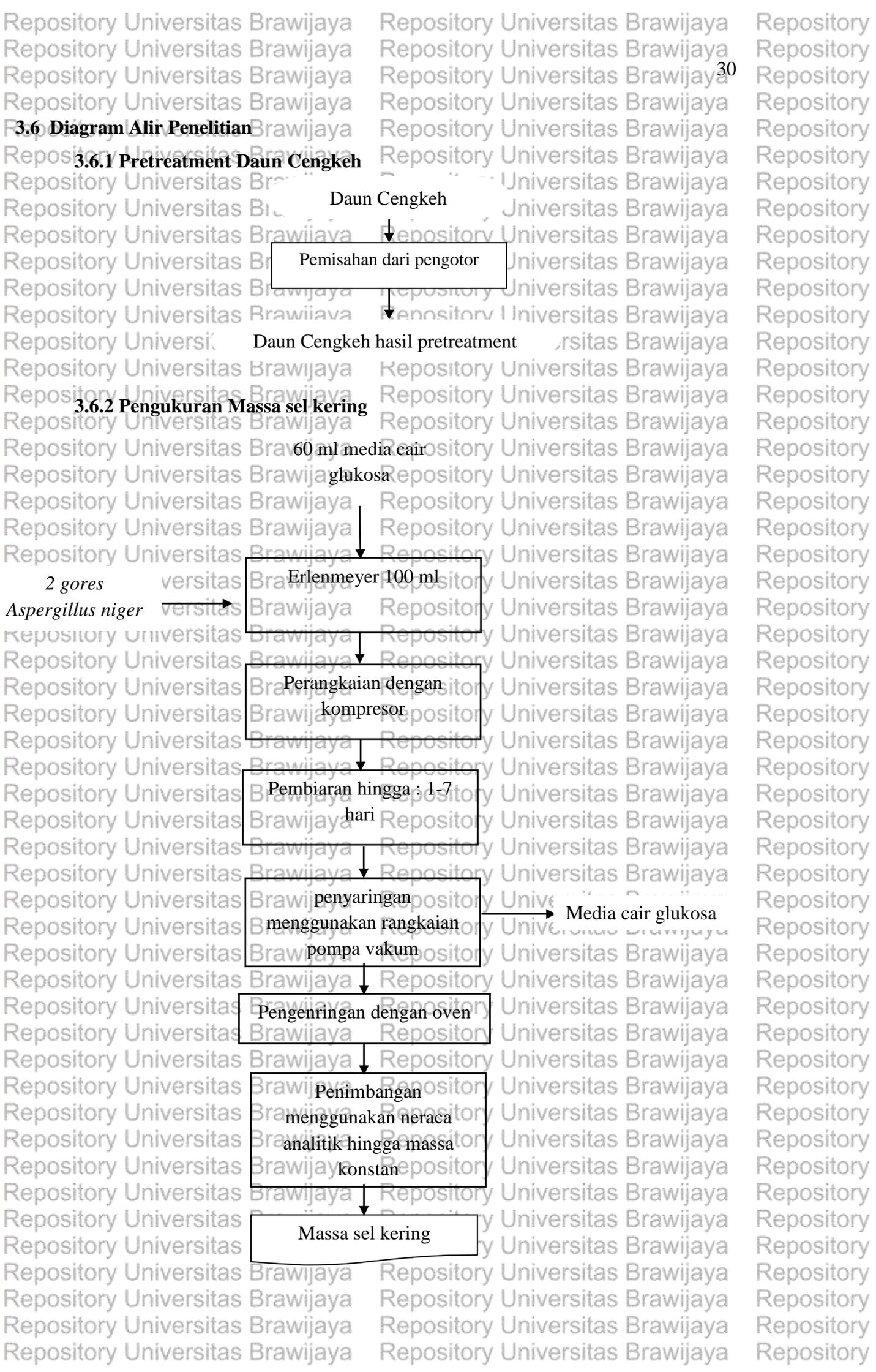
penyaringan  
menggunakan rangkaian  
pompa vakum

Media cair glukosa

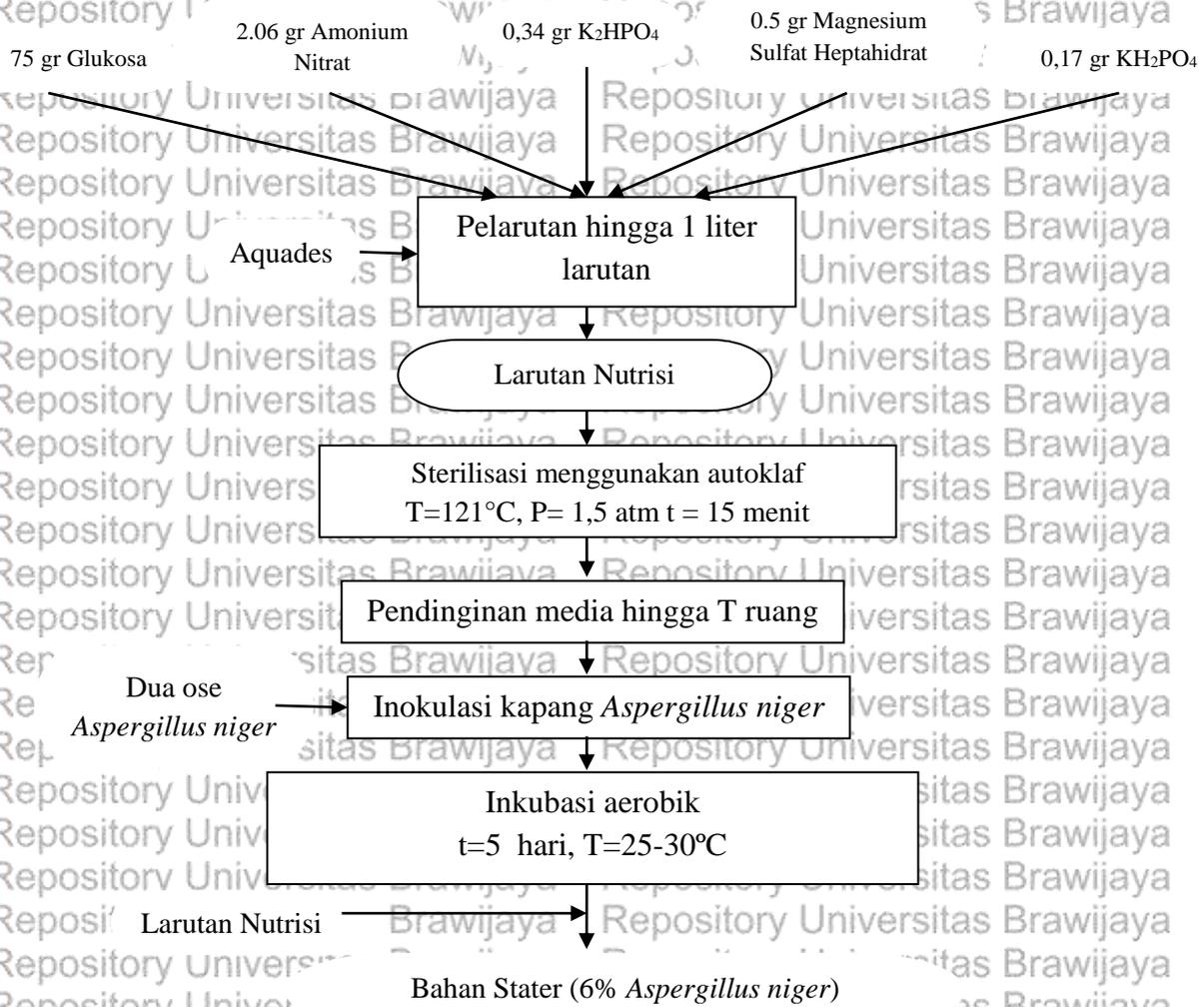
Pengeringan dengan oven

Penimbangan  
menggunakan neraca  
analitik hingga massa  
konstan

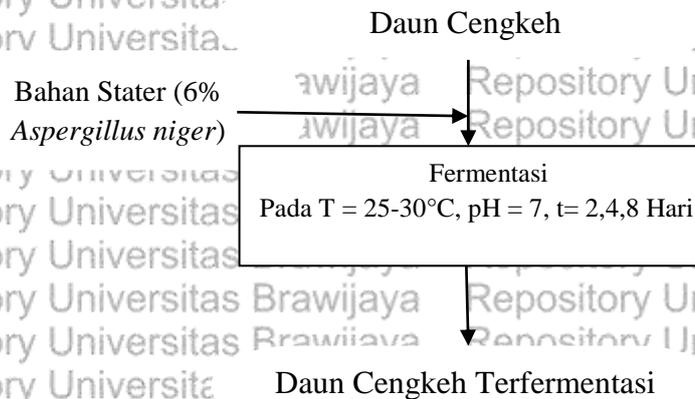
Massa sel kering



### 3.6.3 Pembuatan Media Starter

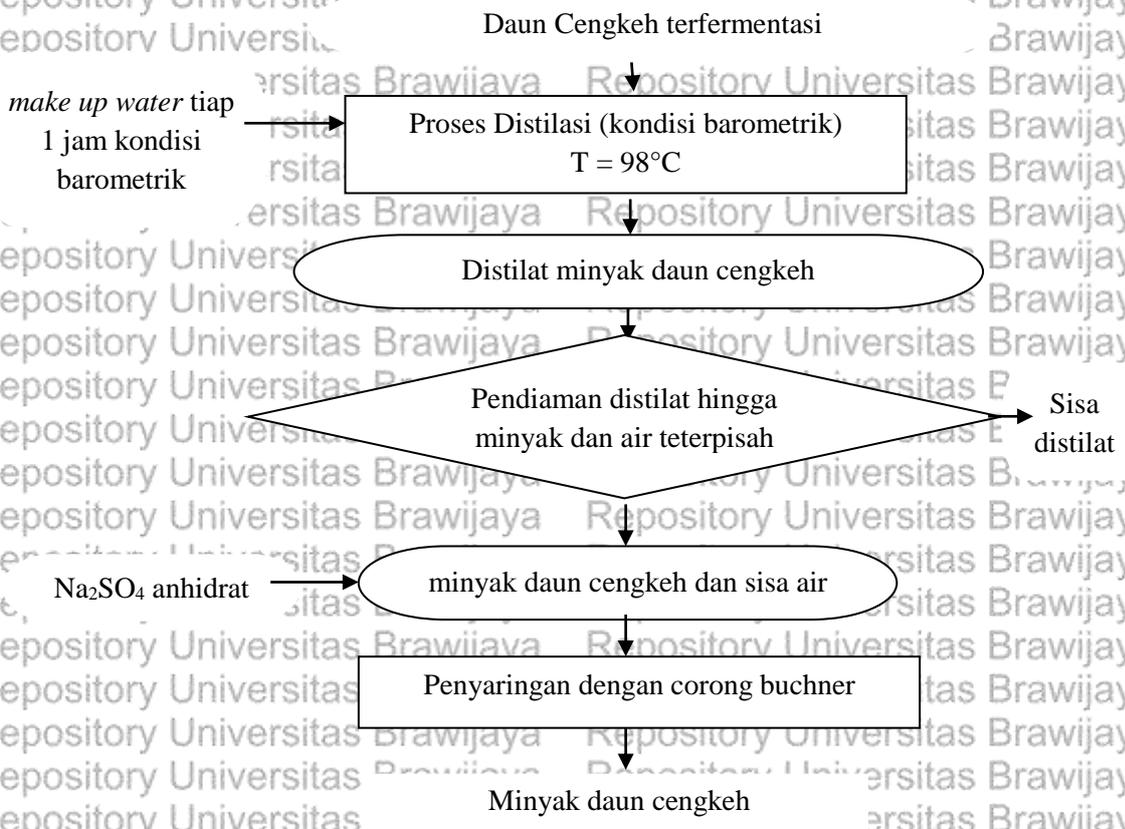


### 3.6.4 Fermentasi Daun Cengkeh





### 3.6.5 Distilasi daun cengkeh

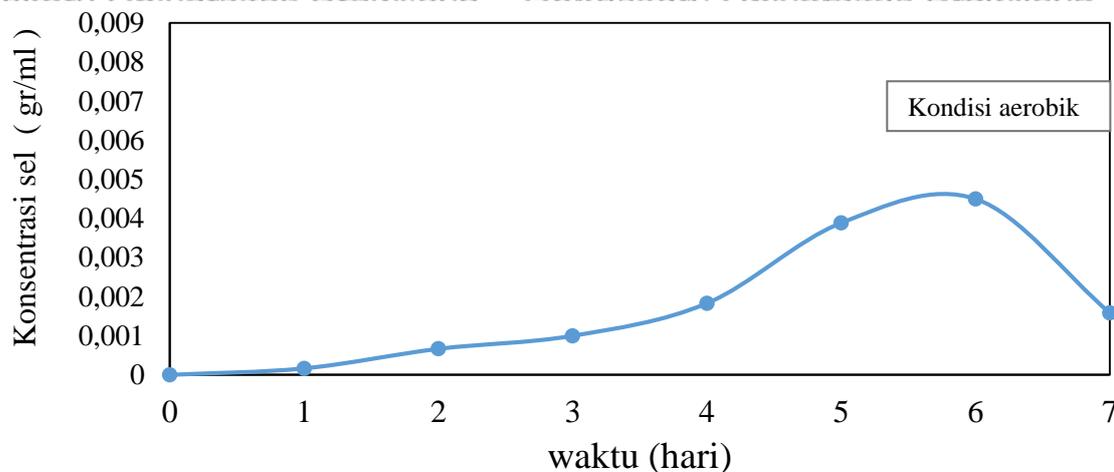




## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Pembuatan Kurva Pertumbuhan

Massa optimal *Aspergillus niger* yang akan diinokulasikan ke media daun cengkeh ditentukan dengan pembuatan kurva pertumbuhan menggunakan metode *Cell Dry Weight*. Penggunaan perhitungan berat kering karena *Aspergillus niger* adalah mikroorganisme yang memiliki hifa sehingga tidak dapat dihitung menggunakan *colony counter* (Maryanty,2010). Dari penelitian didapat data sebagai berikut :



**Gambar 4.1.** Kurva pertumbuhan *Aspergillus niger* pada kondisi aerobik.

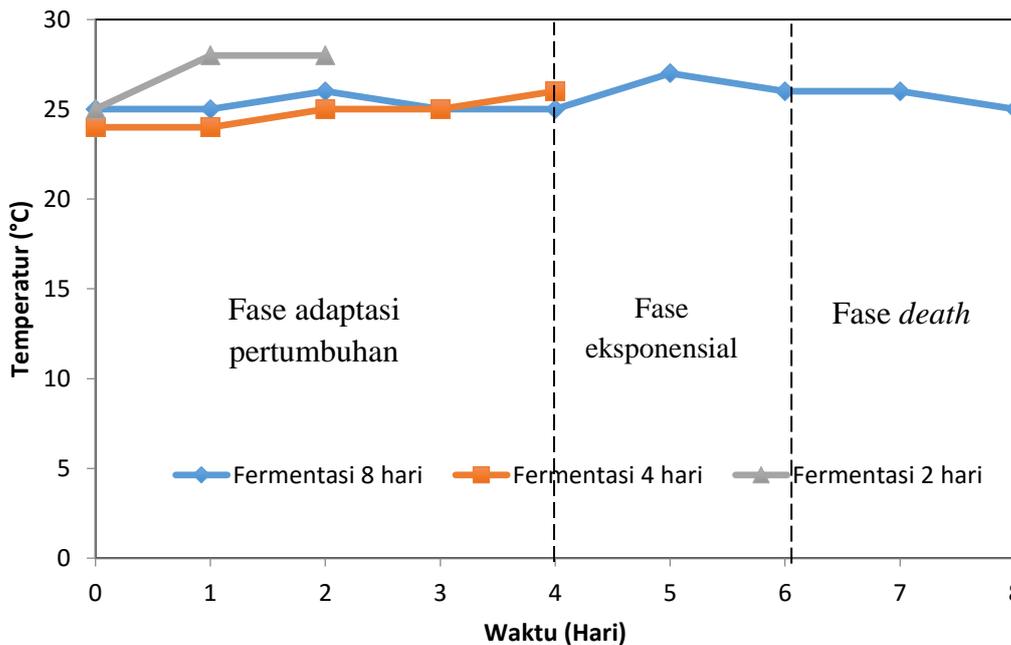
Gambar 4.1. menunjukkan pertumbuhan *Aspergillus niger* pada kondisi aerobik. Fasa adaptasi (*lag*) *Aspergillus niger* terjadi pada hari pertama. Menurut (Waites, 2001:24) pada fasa lag tidak terjadi pertumbuhan dan populasi *Aspergillus niger* relatif konstan, kondisi ini dapat terjadi karena adanya perubahan media dari media awal (*Potato Dextrose Agar*) ke media cair glukosa dimana jika mikroba dipindahkan ke suatu media yang baru akan mengalami adaptasi untuk menyesuaikan kondisi lingkungan disekitarnya. Fase akselerasi (*exponential*) terjadi pada hari ke dua hingga hari ke lima dimana terlihat perubahan massa sel kering yang sangat signifikan. Hal ini terjadi karena *Aspergillus niger* telah beradaptasi dengan lingkungan sehingga dapat tumbuh dengan baik. Puncak dari kurva pertumbuhan berada di hari ke enam dimana pada hari ke tujuh *Aspergillus niger* sudah mengalami fasa kematian (*dead*). Sedangkan fasa stasioner berada diantara hari ke 5 dan ke 6. Oleh karena itu inokulasi media starter kedalam fermentor dilakukan pada hari ke 5 saat *Aspergillus niger* berada pada akhir masa akselerasi (*exponential*).

## 4.2 Pengaruh waktu fermentasi terhadap temperatur dan *moisture*

Fermentasi daun cengkeh menggunakan enzim selulase dari *Aspergillus niger* dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti kandungan *moisture* dan temperatur fermentor.

Dimana pada penelitian ini dikaji terhadap dua kondisi yaitu fermentasi dengan *moisture* terkontrol dan fermentasi tanpa *moisture* terkontrol.

### 4.2.1. Pengaruh waktu fermentasi terhadap temperatur fermentor pada *moisture* terkontrol (50-55% *moisture*)



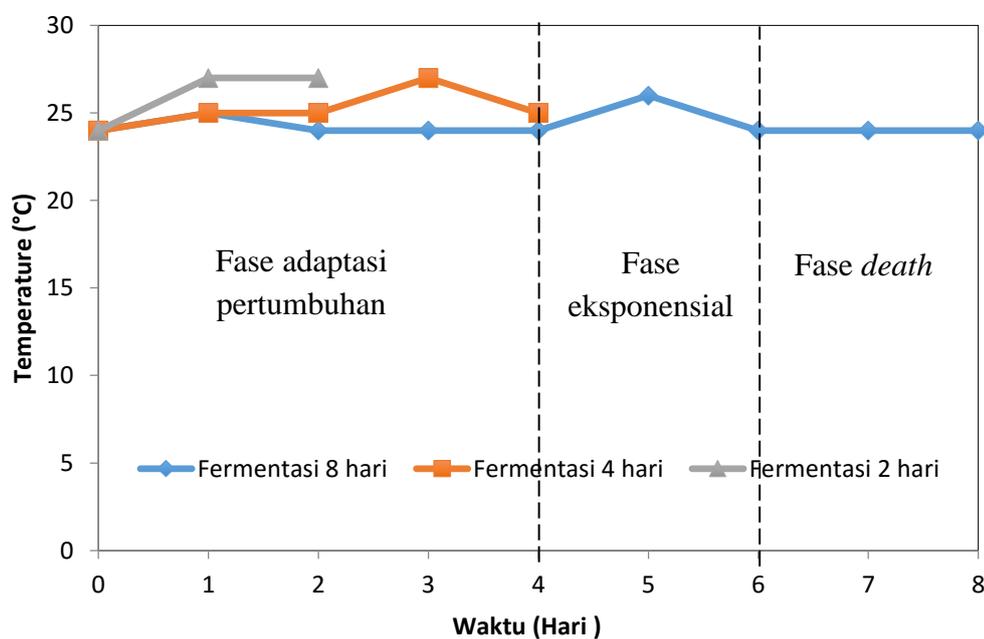
**Gambar 4.2.** Grafik hubungan temperatur dan waktu fermentasi dengan *moisture* terkontrol.

Gambar 4.2. menunjukkan temperatur substrat daun cengkeh selama fermentasi 2 hari, 4 hari dan 8 hari. Gambar tersebut menunjukkan temperatur yang identik antara fermentasi 4 hari dan 8 hari. Sedangkan pada fermentasi 2 hari, terjadi perbedaan temperatur  $\pm 3^{\circ}\text{C}$ . Namun temperatur ini masih berada dalam deviasi temperatur pembentukan enzim selulase yaitu  $25-30^{\circ}\text{C}$  (Bansal et. al., 2012).

Gambar 4.2. juga menunjukkan kecenderungan peningkatan temperatur seiring dengan bertambahnya waktu fermentasi. Hal ini terjadi karena beberapa hal yaitu metabolisme yang dilakukan *Aspergillus niger*, aerasi dan pengadukan. Pada hari ke 0 hingga hari ke 4 terjadi kenaikan temperatur karena *Aspergillus niger* mengalami perbanyakan sel (multiplikasi sel). Selanjutnya pada hari ke 4 dan 6 terjadi kenaikan temperatur karena terjadi sekresi enzim selulase oleh *Aspergillus*

*niger*. Penurunan temperatur pada hari ke 6-8 terjadi karena *Aspergillus niger* telah sampai pada fase *death*. Selain itu, sifat *antifungal* dari eugenol dapat menghambat pertumbuhan *Aspergillus niger* karena kontak selama penguapan minyak cengkeh. Kecenderungan suhu pada Gambar 4.2. ini sesuai dengan penelitian Bansal et. al. (2012) yang membandingkan lama fermentasi *Aspergillus niger* terhadap aktivitas enzim selulase.

#### 4.2.2. Pengaruh waktu fermentasi terhadap temperatur fermentor *moisture* tak dikontrol



**Gambar 4.3.** Grafik hubungan temperatur dan waktu fermentasi tanpa *moisture* terkontrol.

Pada Gambar 4.3. kenaikan suhu pada tiap variabel tidak stabil dan cenderung berbeda-beda. Fermentor tanpa control *moisture* (Gambar 4.3.) tidak menunjukkan keidentikan temperatur antara fermentasi 2 hari, 4 hari, dan 8 hari. Temperatur terlihat lebih fluktuatif dibanding fermentor dengan kontrol *moisture* (Gambar 4.2.).

Pada hari ke 0 hingga hari ke 4 terjadi kenaikan temperatur karena *Aspergillus niger* mengalami perbanyakan sel (multiplikasi sel). Selanjutnya pada hari ke 4 dan 6 terjadi kenaikan temperatur karena terjadi sekresi enzim selulase oleh *Aspergillus niger*. Penurunan temperatur pada hari ke 6-8 terjadi karena

*Aspergillus niger* telah sampai pada fase *death*. Hal ini menunjukkan aktivitas mikroba *Aspergillus niger* pada fermentor tanpa *moisture* kontrol (Gambar 4.3) sama dengan fermentor *moisture* terkontrol (Gambar 4.2.).

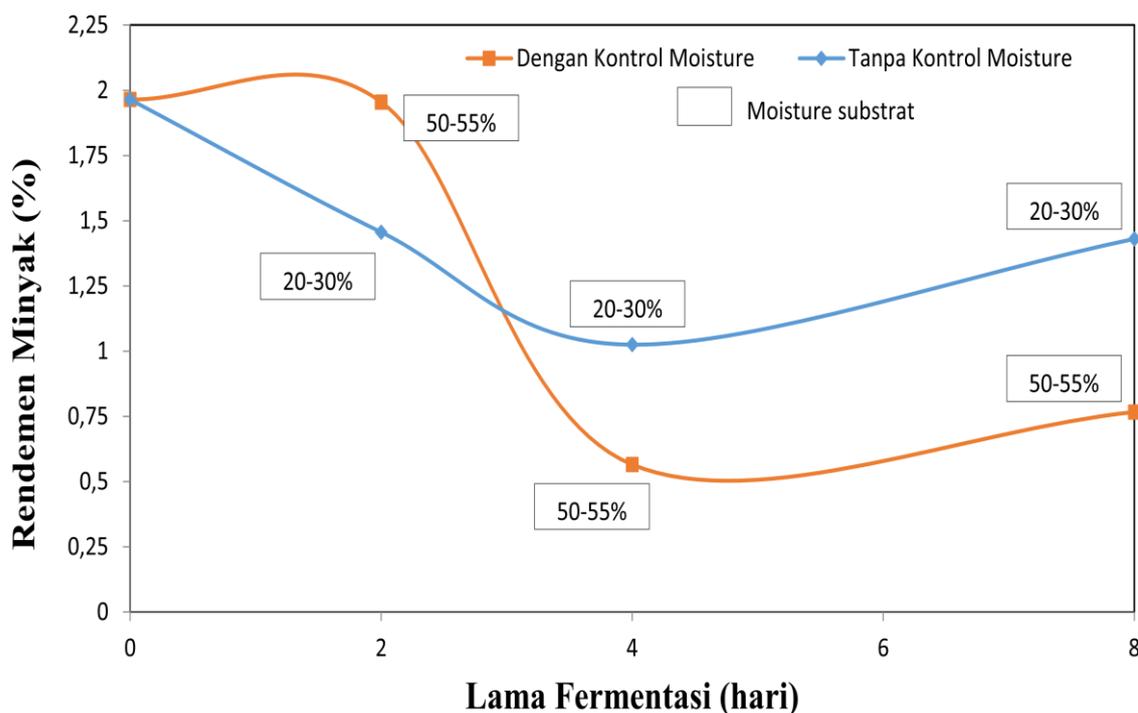
Gambar 4.2. dan Gambar 4.3. menunjukkan bahwa baik pada variabel kontrol *moisture* maupun tanpa kontrol *moisture*, terjadi kenaikantemperatur yang hampir sama. Pada fermentasi dua hari, temperatur meningkat hingga 27-28°C dan stabil. Pada fermentasi delapan hari terjadi fluktuasi temperatur dimana hari ke-2 temperatur fermentor naik hingga 25-26°C lalu turun dan meningkat hingga temperatur tertinggi dicapai pada hari ke-5 yaitu 26-27°C, sesuai dengan kurva pertumbuhan *Aspergillus niger* yang optimum pada hari ke-5. Namun temperatur fermentor stabil menurun hingga 24-25°C pada hari ke-8.

Fermentasi dengan *moisture* terkontrol memiliki temperatur yang lebih identik dibanding fermentasi tanpa kontrol *moisture* yang cenderung fluktuatif tiap harinya. Ini menandakan fermentasi dengan *moisture* terkontrol lebih mampu menjaga temperatur substrat daun cengkeh.

Kecenderungantemperatur kedua kondisi fermentor ini menandakan bahwa *Aspergillus niger* dapat melakukan metabolisme dengan baik pada fermentor dengan *moisture* tinggi (50-55%) hingga *moisture* yang rendah (20-30%). Namun terdapat ketidak identikan antara fermentor satu dengan fermentor lain dilihat dari kenaikan temperaturnya meski bahan, jamur, kondisi dan perlakuan dibuat sama.

#### 4.3 Pengaruh Waktu Fermentasi terhadap rendemen minyak daun cengkeh

Fermentasi selulotik dilakukan pada daun cengkeh selama 2 hari, 4 hari, dan 8 hari dengan adanya kontrol *moisture* dan tanpa kontrol *moisture*. Setelah fermentasi, dilakukan distilasi uap untuk mendapatkan minyak daun cengkeh. Rendemen minyak daun cengkeh yang didapat dengan berbagai perlakuan tersebut dapat dilihat pada Gambar 4.4. berikut.



**Gambar 4.4.** Rendemen minyak daun cengkeh dengan berbagai perlakuan beserta *moisture* bahan dan lingkungan.

Dari Gambar 4.4. terlihat rendemen semakin menurun seiring lamanya fermentasi. Terutama selama fermentasi dengan kontrol *moisture* hari ke-4 dan ke-8, rendemen minyak menurun hingga 0,56% dan 0,76%. Ini terjadi karena selama fermentasi selulolitik, selulosa pada daun cengkeh terdegradasi oleh enzim selulase yang dihasilkan oleh *Aspergillus niger*. Selulosa yang menjadi penjebak dari minyak daun cengkeh dalam vakuola daun, terdegradasi akibat aktivitas dari enzim selulase. Sifat minyak atsiri yang volatil (minyak terbang) menyebabkan minyak daun cengkeh terkontak dengan udaradan terbawa oleh udara aerasi. Selain itu, ketebalan daun cengkeh yang kurang dari 1mm membuat selulosa mudah terdegradasi oleh enzim selulase.

Pada fermentasi hari ke-4 dan ke-8, terlihat bahwa rendemen minyak yang dihasilkan paling rendah adalah fermentasi dengan kontrol *moisture*. Pengontrolan *moisture* dilakukan agar kandungan air terjaga sekitar 50-55%. Banyaknya kandungan air di daun cengkeh fermentasi 4 hari dan 8 hari menyebabkan lamanya minyak daun cengkeh untuk terekstrak menjadi distilat. Ini karena panas yang dihasilkan digunakan terlebih dahulu untuk menguapkan semua air pada daun cengkeh sebelum minyak dapat terekstrak. Sehingga membutuhkan waktu yang lebih lama untuk minyak dapat terekstrak.



(a)

(b)

**Gambar 4.5.** Perbandingan penampakan daun cengkeh yang ditumbuhi jamur pengganggu (a) setelah fermentasi kontrol *moisture* selama 4 hari dan 8 hari, dengan daun cengkeh yang ditumbuhi *Aspergillus niger*(b).

*Moisture* sangat dibutuhkan dalam metabolisme mikroba dan berefek dalam difusi larutan, gas serta perubahan pada *osmotic* sell. *Moisture level* yang tinggi dapat mengurangi porositas, memacu terbentuknya keadaan yang lengket dan transfer oksigen yang sedikit, sedangkan *moisture level* yang sedikit dapat mengurangi kelarutan nutrisi pada substrat padat (Anto et al. 2006). Pada penelitian ini, kandungan *moisture* dikontrol pada 50-55% sesuai dengan penelitian Bansal et. al. (2012). Namun kondisi ini menyebabkan daun cengkeh banyak ditumbuhi jamur pengganggu (Gambar 4.5.a.) pada hari ke 4-8 yang biasa tumbuh apabila *moisture* pada bahan terlalu tinggi. Sehingga kandungan *moisture* yang tinggi menutup jalan udara dalam substrat maka jamur pengganggu tumbuh pada bagian substrat dengan kelembaban yang terlampau tinggi.

Berdasarkan penelitian Graca & Canhoto (2006) menyatakan bahwa jamur pengganggu yang tumbuh pada daun cengkeh yang jatuh ketanah dan tumbuh karena adanya *moisture level* yang tinggi memiliki enzim *polygalacturonase cellulose* yang dapat mendegradasi kandungan selulosa pada daun cengkeh. Sehingga rendemen untuk minyak daun cengkeh dengan fermentasi kontrol *moisture* lebih rendah dari tanpa kontrol *moisture*. Selain itu, penambahan air untuk menjaga kandungan *moisture* tidak dapat menyebabkan *swelling* atau pengembangan ukuran daun. Ini disebabkan karena daun kering tidak memiliki kemampuan untuk menyerap air secara langsung ketika ditambahkan (*irreversible*). Sehingga air hanya menjaga humiditas dalam fermentor, namun tidak pada *moisture* dalam daun cengkeh.

Rendemen terbaik dengan kondisi fermentasi adalah fermentasi selama 2 hari, baik untuk fermentasi kontrol *moisture* maupun tanpa kontrol *moisture*. Ini disebabkan karena

enzim selulase yang dihasilkan *Aspergillus niger* belum banyak merusak selulosa yang menjebak minyak daun cengkeh dalam daun. Sehingga minyak daun cengkeh yang menguap ke lingkungan lebih sedikit dibanding selama fermentasi 4 hari dan 8 hari.

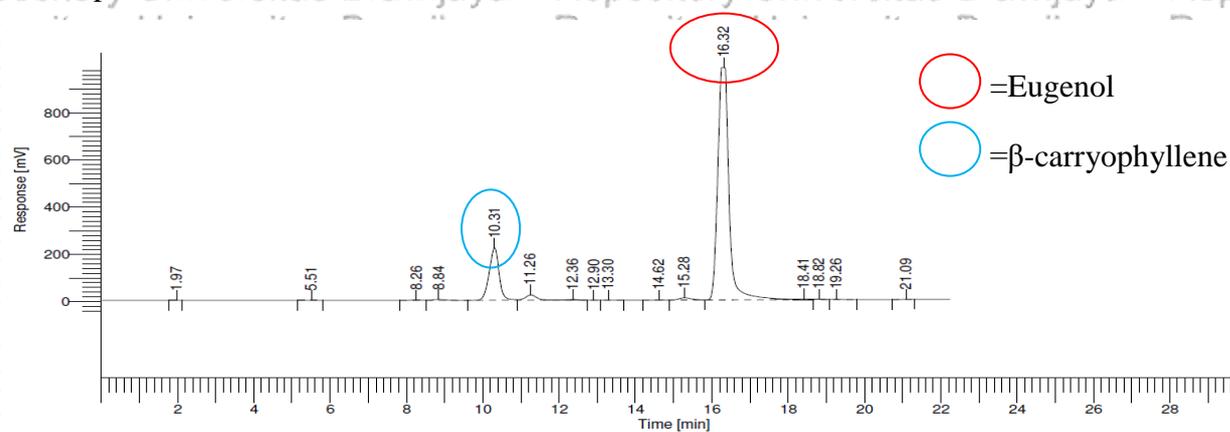
Kadar air pada fermentor kontrol *moisture* pada 4 hari dan 8 hari mampu menyebabkan hidrolisis pada minyak daun cengkeh. Kadar air yang rendah memperkecil terjadinya proses hidrolisis yang menyebabkan terbentuknya asam lemak bebas (Dalimunthe dkk, 2015). Sehingga kadar air yang tinggi pada fermentor mampu menyebabkan hidrolisis dan menurunkan kandungan minyak pada daun cengkeh.

#### 4.4 Karakterisasi minyak daun cengkeh hasil fermentasi

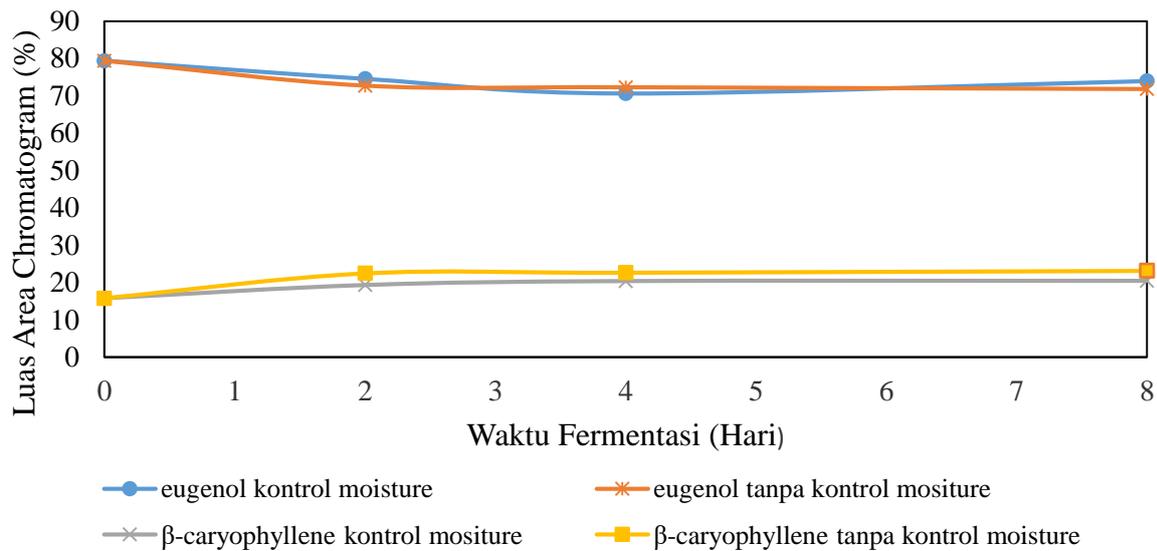
Karakterisasi minyak daun cengkeh berdasarkan SNI 06-2387-2006 meliputi pengujian kadar eugenol dan  $\beta$ -caryophyllene, warna serta bobot jenis.

##### 4.4.1 Kadar eugenol dan $\beta$ -caryophyllene

Senyawa aktif pada minyak daun cengkeh, yaitu eugenol dan  $\beta$ -caryophyllene, diukur komposisinya menggunakan *Gas Chromatography*. Gambar 4.6. merupakan kromatogram minyak daun cengkeh tanpa fermentasi. Gambar 4.7. merupakan kromatogram berbagai minyak daun cengkeh dengan berbagai perlakuan.



Gambar 4.6. Kromatogram untuk minyak daun cengkeh tanpa fermentasi (0 hari).



**Gambar 4.7.** Kandungan eugenol dan  $\beta$ -caryophyllene pada berbagai perlakuan.

Pada Gambar 4.6. dan 4.7., komponen kimia penyusun minyak daun cengkeh terbesar (peak tertinggi) adalah eugenol dan  $\beta$ -caryophyllene. Dari kedua komponen ini dapat dilihat bahwa terjadi penurunan pada kandungan eugenol dan peningkatan pada  $\beta$ -caryophyllene meskipun tidak signifikan, yaitu  $\pm 5\%$ .

Menurut Abbaszadeh et. al. (2014), eugenol memiliki kemampuan *antifungal* atau *antimicrobial* yang menurunkan secara signifikan pertumbuhan jamur. Kemampuan *antifungal* ini yaitu merusak membran sitoplasma, merusak aliran proton dan elektron (transpor aktif) dalam sel, dan koagulasi kandungan sel. Selain itu, menurut Mihai dan Mona (2015), semakin tinggi kandungan eugenol dalam media pertumbuhan *Aspergillus niger*, semakin terhambat pula pertumbuhannya. Sehingga, akibat dari rusaknya selulosa karena enzim selulase, minyak cengkeh menguap lebih cepat terbawa udara aerasi. Ini menyebabkan adanya kontak antara minyak cengkeh dan *Aspergillus niger* yang tumbuh di permukaan daun. Eugenol akan menghambat pertumbuhan *Aspergillus niger* dan persentase eugenol dalam minyak menurun akibat toksisitas dari eugenol terhadap *Aspergillus niger*. Sedangkan  $\beta$ -caryophyllene bukan merupakan senyawa *antifungal*.

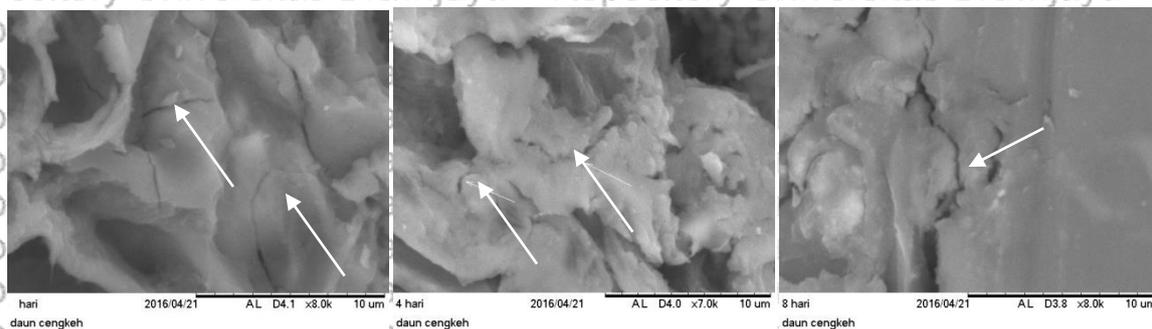
Berdasarkan SNI 06-2387-2006, kadar eugenol dan  $\beta$ -caryophyllene yang didapat melalui fermentasi tidak memenuhi SNI. Kualitas yang sesuai adalah daun cengkeh yang tanpa dilakukan fermentasi.

Penurunan kadar eugenol diikuti makin lamanya fermentasi. Hal ini sebanding dengan penurunan rendemen minyak daun cengkeh yang diikuti pula

oleh semakin lamanya fermentasi. Perusakan selulosa oleh enzim selulase *Aspergillus niger* menyebabkan minyak dan eugenol menguap bersamaan ke lingkungan.

#### 4.4.2 SEM (*Scanning Electron Microscope*)

Uji SEM pada daun cengkeh dilakukan untuk melihat degradasi selulosa selama fermentasi daun cengkeh. Uji SEM dilakukan terhadap 3 sampel yaitu daun cengkeh tanpa fermentasi, fermentasi 4 hari dan fermentasi 8 hari. Dari uji SEM didapatkan hasil sebagai berikut :



(a)

(b)

(c)

**Gambar 4.8.** Perubahan morfologi daun cengkeh (a) tanpa fermentasi (b) fermentasi 4 hari (c) fermentasi 8 hari.

Gambar 4.8. menunjukkan terjadinya degradasi selulosa pada fermentasi 4 hari (Gambar 4.8.b) yang ditunjukkan dengan adanya retakan pada penampang daun cengkeh hal ini sesuai dengan penelitian Kumar (2015) yang meneliti degradasi selulosa pada kertas saring. Pada fermentasi hari ke 8 (Gambar 4.8.c) terlihat retakan semakin besar dan lebar hal ini menunjukkan bahwa *Aspergillus niger* memiliki enzim selulase yang dapat mendegradasi selulosa pada daun cengkeh.

#### 4.4.3 Warna Minyak Daun Cengkeh

Warna merupakan salah satu parameter kualitas yang menjadi pertimbangan konsumen minyak daun cengkeh. Dari hasil penelitian diperoleh warna minyak yang ditunjukkan pada gambar berikut ini.

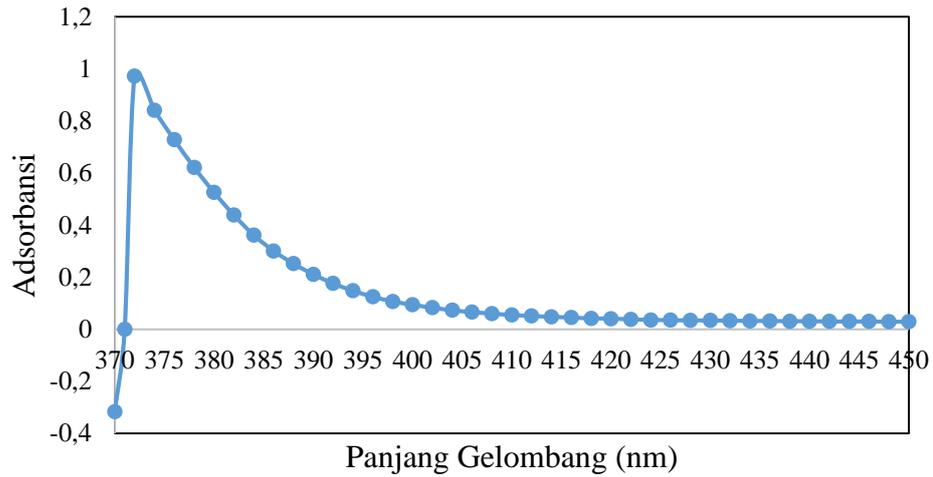
**Tabel 4.1** Warna minyak daun cengkeh pada perlakuan kontrol *moisture* (KM) dan tanpa kontrol *moisture* (TM)

Visual Warna Minyak Cengkeh	0 hari		2 hari		4 hari		8 hari	
	KM	TM	KM	TM	KM	TM	KM	TM
								

Pada Tabel 4.1 terlihat bahwa warna minyak daun cengkeh yang dihasilkan masih berada dalam standar yang telah ditetapkan SNI 06-2387-2006 yaitu kuning – coklat tua khas minyak cengkeh.

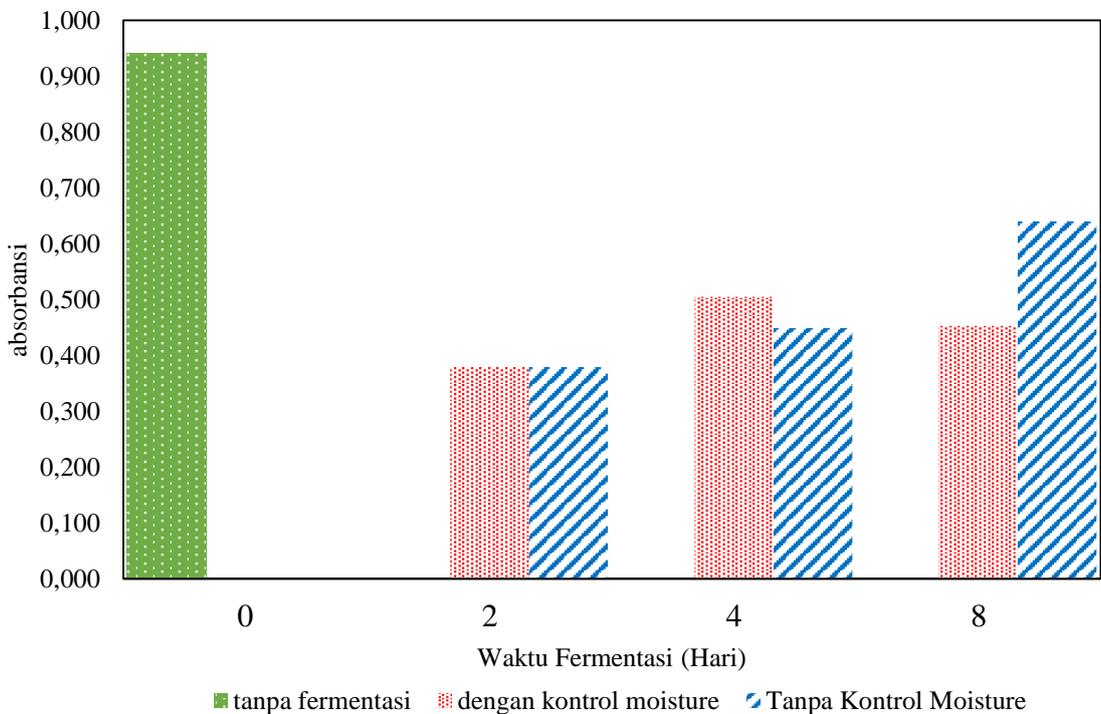
Selain itu dapat dilihat bahwa warna minyak daun cengkeh tanpa fermentasi paling coklat dan gelap. Hal ini disebabkan karena sifat fenolat pada eugenol sangat mempengaruhi warna minyak daun cengkeh, karena fenol bersifat reaktif terhadap udara. Sehingga terjadi reaksi oksidasi dimana oksigen akan diikat oleh fenol yang menyebabkan terjadinya pencoklatan pada minyak daun cengkeh (Putri, dkk., 2013). Oleh karena itu minyak daun cengkeh tanpa fermentasi memiliki warna yang lebih gelap dibandingkan variable yang lain dikarenakan kandungan eugenolnya yang lebih tinggi.

Dalam perdagangan minyak atsiri, warna minyak visual tidak bisa dijadikan sebagai patokan dalam menentukan kualitas dari minyak atsiri. Artinya belum tentu semakin pekat warna minyak daun cengkeh, maka kandungan eugenolnya semakin tinggi. Karena warna minyak dapat dipalsukan dengan berbagai macam bahan tambahan lain untuk menyesuaikan dengan standar SNI. Sehingga dilakukan uji Spectrofotometri UV VIS terhadap minyak daun cengkeh untuk mengetahui apakah ada korelasi antara absorbansi minyak terhadap komposisi senyawa aktif yang terkandung dalam minyak.



**Gambar 4.9.** Grafik Absorbansi maksimal minyak daun cengkeh.

Gambar 4.9 menunjukkan bahwa absorbansi maksimal minyak daun cengkeh terjadi pada panjang gelombang 372 nm yaitu sebesar 0,972. Dengan panjang gelombang yang sama di lakukan uji terhadap variabel lainnya, didapatkan hasil sebagai berikut.



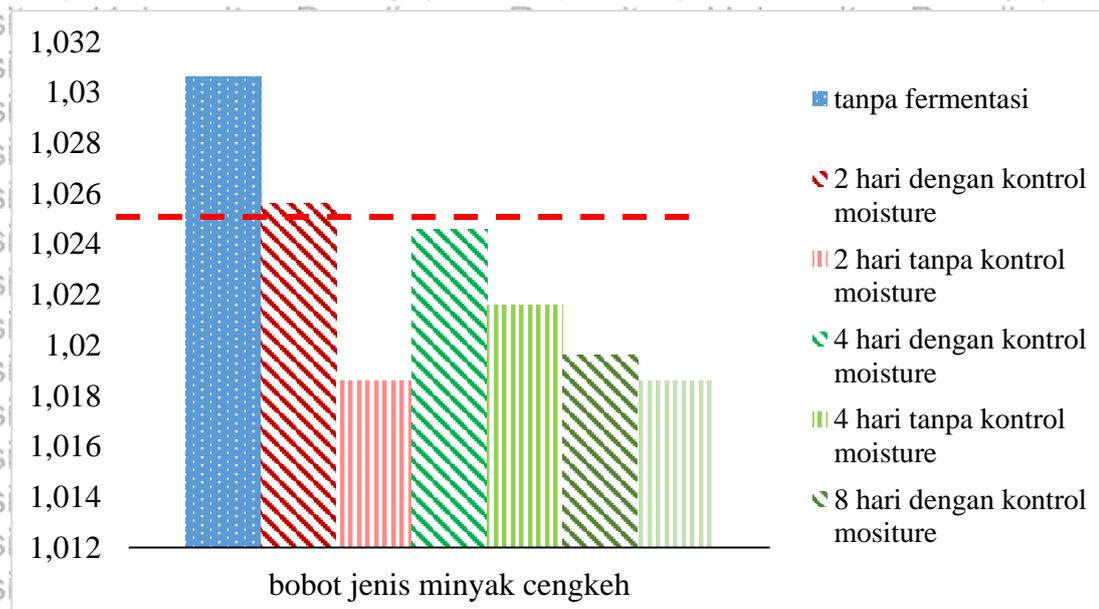
**Gambar 4.10.** Grafik absorbansi minyak daun cengkeh pada panjang gelombang 372 nm

Gambar 4.10. merupakan data absorbansi minyak cengkeh pada panjang gelombang 372 nm, absorbansi yang tinggi menunjukkan kepekatan senyawa eugenol yang terkandung dalam minyak cengkeh. Dari Gambar 4.10. terlihat bahwa absorbansi tertinggi terjadi pada minyak daun cengkeh tanpa fermentasi yaitu sebesar 0,972. Hal ini dikarenakan kandungan eugenol pada minyak cengkeh tanpa fermentasi lebih tinggi bila dibandingkan variable yang lain.

Selain itu terjadi penurunan absorbansi pada minyak daun cengkeh yang difermentasi. Pada kondisi moisture terkontrol, peningkatan terlihat fluktuatif dengan semakin lamanya fermentasi. Sedangkan pada kondisi tanpa kontrol moisture, terjadi peningkatan absorbansi seiring semakin lamanya fermentasi. Kecenderungan ini tidak berkorelasi dengan kepekatan warna, kadar eugenol, dan kadar  $\beta$ -caryophyllene pada minyak. Hal ini terlihat pada absorbansi minyak daun cengkeh yang difermentasi 8 hari tanpa kontrol moisture yang paling tinggi namun memiliki warna yang paling pucat serta kadar eugenol dan  $\beta$ -caryophyllene yang paling rendah.

#### 4.4.4 Bobot Jenis

Nilai bobot jenis minyak daun cengkeh yang dihasilkan dari setiap perlakuan secara keseluruhan masuk dalam rentang SNI 06-2387-2006 yaitu 1.025 – 1.049 seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.11.



**Gambar 4.11.** Bobot jenis minyak daun cengkeh berbagai perlakuan.

Pada Gambar 4.11, terlihat bahwa nilai bobot jenis minyak daun cengkeh yang dihasilkan masih dalam rentang standart SNI 06-2387-2006 untuk minyak cengkeh tanpa fermentasi dan fermentasi 2 hari, sedangkan untuk fermentasi 4 hari dan 8 hari sedikit diluar dari standard. Hal ini terjadi dikarenakan pada fermentasi hari ke 4 dan ke 8 kandungan eugenol pada minyak cengkeh banyak yang menguap sehingga menurunkan bobot jenis minyak cengkeh. Hal ini didukung dengan hasil uji GC (Gambar 4.7) dimana kandungan eugenol pada fermentasi 4 hari dan 8 hari mengalami penurunan. Penurunan bobot jenis juga dikarenakan pemisahan antara minyak cengkeh dan air yang kurang maksimal, sehingga pada minyak masih terkandung sedikit air yang menurunkan bobot jenis minyak cengkeh.







## BAB V KESIMPULAN

### 5.1. Kesimpulan

Kesimpulan yang diperoleh dari penelitian ini adalah:

1. Fermentasi substrat padat menggunakan kapang *Aspergillus niger* berhasil mendegradasi selulosa pada daun cengkeh. Degradasi terbaik terjadi pada fermentasi hari ke-8.
2. Rendemen minyak daun cengkeh semakin menurun seiring bertambahnya waktu fermentasi. Dimana rendemen terbaik didapat pada minyak daun cengkeh tanpa fermentasi, yaitu 1,96%.
3. Kandungan senyawa aktif pada minyak daun cengkeh, eugenol semakin menurun seiring bertambahnya waktu fermentasi. Dimana kandungan eugenol tertinggi didapat pada minyak daun cengkeh tanpa fermentasi, yaitu 79,40 %.
4. Fermentasi selulotik menggunakan *Aspergillus niger* tidak meningkatkan rendemen minyak daun cengkeh.
5. Fermentasi tanpa kontrol moisture menghasilkan rendemen minyak daun cengkeh lebih tinggi daripada fermentasi dengan kontrol moisture.

### 5.2. Saran

Beberapa saran yang dapat memperbaiki dan mengembangkan materi penelitian ini antara lain:

1. Perlu didesain kembali fermentor untuk fermentasi selulotik daun cengkeh yang tidak menurunkan rendemen minyak daun cengkeh serta eugenolnya.
2. Perlu dikaji kembali penggunaan enzim selulase secara langsung atau imobilisasi sel *Aspergillus niger* pada fermentasi selulotik untuk menjaga dari sifat *antifungal* eugenol.
3. Pengukuran absorbansi perlu dilakukan pada panjang gelombang eugenol dan  $\beta$ -caryophyllene agar absorbansi yang terbaca berkorelasi dengan banyaknya kandungan senyawa aktif pada minyak daun cengkeh.





## DAFTAR PUSTAKA

- A. El Asbahani, K. Miladi, W. Badri, M. Sala, E.H. Ait Addi, H. Casabianca, A. El Mousadik, D. Hartman, A. Jilale, F.N.R. Renaud, dan A. Elaissari. 2015. *Essential Oils: From Extraction to Encapsulation*. International Journal of Pharmaceutics 483. 220-243.
- Alma, M. Hakki, Murat Ertasy, Siegfrie Nitz, dan Hubert Kollmannsberger. 2007. *Chemical Composition and Content of Essential Oil from The Bud of Cultivated Turkish Clove (Syzygium aromaticum L.)*. Journal of Bioresource Vol.2 No.2. 265-269
- Anto, H., Ujival, T., Kamlesh , P. 2006. *Alpha Amylase Production by Bacillus cereus MTCC 1305 Using Solid State Fermentation*. Food Technology And Biotechnology.
- Ashary, Choirul. 2011. *Produksi Enzim Selulase dan Hidrolisis Enzimatik Pada Jerami Padi dengan Menggunakan Buffer Sitrat*. Skripsi. Surabaya: Institut Teknologi Sepuluh Nopember
- Badan Standar Nasional Indonesia. 2006. *Minyak Daun Cengkeh*. Jakarta: BSN.
- Bannett, W. Joan. 2010. *An Overview of the Genus Aspergillus*. Milton : Taylor & Francis Group , LLC.
- Bansal, Namita, Rupinder Tewari, Raman Soni, dan Sanjeev Kumar Soni. 2012. *Production of Cellulases from Aspergillus niger NS-2 in Solid State Fermentation on Agricultural and Kitchen Waste Residues*. Journal of Waste Management 32. 1341-1346.
- Baser, K. H Can , Gerhard Buchbauer. 2010. *Handbook of Essential Oils Science, Technology and Application*. London : CRC Press Taylor & Francis Group
- Beer, Z. Olempska, 2008. *Asparaginase From Aspergillus Niger Expressed In A. Niger Chemical and Technical Assessment (CTA)*. Fleminglaan : Delft.
- Bidang Produksi Dinas Perkebunan Provinsi Jawa Timur. 2013. *Budidaya Tanaman Cengkeh*. Surabaya.
- Chalal, D.S 1983. *Growth Characteristic Of Microorganism In Solid State Fermentation For Uppgrading Of Protein Values Of Lignocelluloses And Cellulose Production*. American Chemical Society.
- Chapin III, F.S., P.A. Matson, dan H.A. Mooney. 2002. *Principles of Terrestrial Ecosystem Ecology*. Springer-Verlag New York.

Chen, Hongzhang. 2013. *Modern Solid State Fermentation : Theory and Practice*. Beijing: Springer

Coughlan, M. (1985). *Cellulases: production, properties and applications*. Biochemical Society Transactions,

Dalimunthe, Hamjah, Lukman Adlin Harahap, dan Achwil Putra Munir. *Uji Pengaruh Suhu Uap pada Alat Penyuling Minyak Atsiri Tipe Uap Langsung terhadap Mutu dan Rendemen Minyak Nilam*. Jurnal Rekayasa Pangan dan Pertanian Vol.3 No.3 377-381

Graca, M. A.S., & Cristina Canhoto. 2006. *Leaf Litter Processing in Low Order Streams*. Deaprtement de Zoologia, Universidade de Coimbra. Portugal.

Guenther, E. 1972. *Minyak Atsiri Jilid1*, diterjemahkan oleh S. Ketaren, Universitas Indonesia, Jakarta.

Guillaume, Le Loch, Francoise Femenia, Jean-Jacques Fontaine, Sybille Lair-Fulleriger, Nadia Berkova, Dominique Huet, Narcisse Towanou, Faraso Rakotovao, Oumaima Granet, Pascal Arne. 2004. *Clinical. Mycological and Pathological Findings in Turkeys experimentally Infected by Aspergillus Fluingatus*. Milton : Taylor & Francis Group , LLC.

Gunawan, wien.. 2009. *Kualitas dan Nilai Minyak atsiri, Implikasi pada Pengembangan Turunnya. Seminar Nasional: Kimia Bervisi SETS (Science, Environment, Technology and Society)*. Semarang.

Julianto, Tatang S. 2016. *Minyak Atsiri Bunga Indonesia*. Sleman : deepublish

Koensoemardiyah, 2010. *Minyak Atsiri: Untuk Industri Makanan, Kosmetik, Dan Aromaterapi*. Andi Publisher. : Yogyakarta

Kumar M., Revathi K., Sunil K. 2015. *Biodegradation of Cellulosic and Lignocellulosic Waste by Pseudoxanthomonas sp R-28*. Elsevier. India. 22-28 agustus 2015.

Maryanty, Y, Hesti, P., Paulina, R. 2010. *Produksi Crude Lipase Dari Aspergillus niger Pada Substrat Ongok Menggunakan Metode Fermentasi Fasa Padat*. Seminar Rekayasa Kimia dan Proses. Semarang, 4- 5 Agustus 2010.

Mihai, Adriana Laura dan Mona Elena Popa. 2015. *In vitro activity of Natural Antimicrobial Compounds against Aspergillus Strains*. Agriculture and Agricultural Science Procedia 6. 585-592.

Nasruddin, Gatot Priyanto, dan Basuni Hamzah. 2009. *Pengaruh Delignifikasi Daun Nilam (Pogostemon Cablin Benth) Dengan Larutan NaOH dan Fermentasi Dengan Kapang Trichoderma viride Terhadap Minyak Hasil Penyulingan*. Jurnal Riset Industri Vol. III No. 2, Agustus 2009. 94-102.



Nurdjannah, N., 2004. *Deversifikasi Penggunaan Cengkeh*, Prespektif...

Oikawa, Hideaki, Kinya Katayama, Yuichi Suzuki dan Akitami Ichihara. 1994. *Enzymatic Activity Catalysing exo-Selective Diels-Alder Reaction in Salanapyrone Biosynthesis*. Journal of the Chemical Society, Chemical Communications was published between

Palmer, T., (1995), *Understanding Enzymes*, 4th edition. London Prentice Hall

Parthasarathy, V. A., Bhageerathy C., John Z. 2008 . *Chemistry of Spice*. India : CAB International.

Purseglove, J.W., E.G. Brown., C.L. Green and Robbins, 1981. *Spicies Vol. II. Tropical Agriculture Series*. Longman, London.

Putri, Retty L., Nur Hidayat, Nur Lailatul R. 2013. *Purification of Eugenol from Clove leaf oil with strong alkaline reactants KOH and Ba(OH)<sub>2</sub> (Study on the concentration of reactants)*. Malang: Universitas Brawijaya

Raharjo, S.J. dan Retnowati, R. 2012. *Yield increasing of patchouli oils of result steam distillation of patchouli leaf of dewaxing, fermentation, and drying process*. Journal Basic Science and Technology.

S. Abbaszadeh, A. Sharifzadeh, H. Shokri, A.R. Khosravi, dan A. Abbaszadeh. 2014. *Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi*. Journal de Mycologie Medicale 24: 51-56.

Samson, R.A., Hoekstra, E. S. and Oorschot, C. A. N., 1996, *Introduction to Food Borne Fungi*. Netherland : Centra Albureau for Schimmel Cultures.

Santos, Tamires Carvalho dos, Ingrid Souza Cavalcanti, Renata Critina Ferreira Bonomo, Nivio Batista Santana, dan Marcelo Franco. 2011. *Optimization of Productions of Cellulolytic Enzymes by Aspergillus niger using residue of mango a substrate*. Ciencia Rural vol.41 no.12

Santos, Tamires Carvalho dos, Ingrid Souza Cavalcanti, Renata Critina Ferreira Bonomo, Nivio Batista Santana, dan Marcelo Franco. 2011. *Optimization of Productions of Cellulolytic Enzymes by Aspergillus niger using residue of mango a substrate*. Ciencia Rural vol.41 no.12

Shuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J.C., van Dijck, P.W.M., 2002. *On the safety of Aspergillus niger - a review*. Appl. Microbiol. Biotechnol.

Silva, C.M.M.S., Soares de Melo, I., and Roberto de Oliveira, P. 2005. *Ligninolytic Enzyme Production by Gonaderma spp* : Enzym Microb. Technol.

Suprihatin. 2010. *Teknologi Fermentasi*. Surabaya: Unesa pres.



Supriyati, T, Haryati, I-G, M. Budiarsana dan Sutama, I-K. 2010. *Fermentasi Jerami Padi Menggunakan Trichoderma viride*. Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner.

Viuda, M. Martos, Yolanda Ruiz-Navajas, Juana Fernandez-Lopez, Jose Angel Perez-Alvarez. 2007. *Chemical Composition of the Essential Oils Obtained From Some Spices Widely Used in Mediterranean Region*. Spanyol: Univeritas Miguel Hernandez.

Waites, Michael J., Neil L. Morgan, John S. Rockey, dan Gary Higton. *Industrial Microbiology: An Introduction*. London: Blackwell Science

Wijaya, Chandra, Afghani Jayuska dan Andi Hairil Alimuddin. 2015. Peningkatan Rendemen Minyak Atsiri Daun Cengkeh (*Syzygium aromaticum*) dengan Metode Delignifikasi dan Fermentasi. ISSN 2303-1077 JKK Volume 4 (4). 15-20

Wuryanti. 2008. *Pengaruh Penambahan Biotin Pada Media Pertumbuhan Terhadap Produksi sel Aspergillus niger*. Semarang : ISSN

Zhou Xiao Zhang and Yi Heng Percival Zhang, 2013. *Cellulases: Characteristic, Sources, Production and Applications*. London : John Wiley & Sons, Inc.





## LAMPIRAN 1 CONTOH PERHITUNGAN

### A. Perhitungan Buffer Fosfat

$$\text{BM K}_2\text{HPO}_4 = 174 \text{ gr/mol}$$

$$\text{BM KH}_2\text{PO}_4 = 136 \text{ gr/mol}$$

$$\text{massa K}_2\text{HPO}_4 = 0.34 \text{ gr}$$

$$\text{pH} = 7$$

$$\text{K}_a \text{H}_2\text{PO}_4^- = 6.2 \times 10^{-8}$$

$$\text{pH} = -\log[\text{H}^+]$$

$$7 = -\log[\text{H}^+]$$

$$\text{H}^+ = 10^{-7}$$

$$\text{H}^+ = \text{K}_a \times \frac{a}{g}$$

$$10^{-7} = 6.2 \times 10^{-8} \times \frac{a}{g}$$

$$a = 1.613 \text{ g} \quad * n \text{ asam (K}_2\text{HPO}_4) = \frac{0.34 \text{ gr}}{174 \text{ gr/mol}} = 0.0019 \text{ mol}$$

$$0.019 \text{ mol} = 1.613 \text{ g}$$

$$g = 0.0012 \text{ mol}$$

$$g = 0.0012 \text{ mol} \times 136 \text{ gr/mol}$$

$$g = 0.17 \text{ gr}$$

### B. Perhitungan Komposisi Media

$$\text{BM C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 = 156 \text{ gr/mol}$$

$$\text{BM NH}_4\text{NO}_3 = 80 \text{ gr/mol}$$

$$\text{BM K}_2\text{HPO}_4 = 174 \text{ gr/mol}$$

$$\text{BM MgSO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O} = 450 \text{ gr/mol}$$

$$\text{BM KH}_2\text{PO}_4 = 136 \text{ gr/mol}$$

$$\text{massa C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 = 75 \text{ gr}$$

$$\text{massa NH}_4\text{NO}_3 = 2.06 \text{ gr}$$

$$\text{massa K}_2\text{HPO}_4 = 0.34 \text{ gr}$$

$$\text{massa MgSO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O} = 0.5 \text{ gr}$$

$$\text{massa KH}_2\text{PO}_4 = 0.17 \text{ gr}$$

$$\text{Ar C} = 12 \text{ gr/mol}$$

$$\text{Ar H} = 1 \text{ gr/mol}$$

$$\text{Ar O} = 16 \text{ gr/mol}$$

$$\text{Ar N} = 14 \text{ gr/mol}$$

$$\text{Ar K} = 39 \text{ gr/mol}$$

$$\text{Ar P} = 31 \text{ gr/mol}$$

$$\text{Ar Mg} = 24 \text{ gr/mol}$$

$$\text{Ar S} = 32 \text{ gr/mol}$$

Volume media = 1 L

Konsentrasi C

$$= \frac{\text{Ar C} \times 6}{\text{BM C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6} \times \text{massa C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$$

$$= \frac{12 \text{ gr/mol} \times 6}{156 \text{ gr/mol}} \times 175 \text{ gr}$$

$$= 34.6154 \text{ gr}$$

Konsentrasi N

$$= \frac{\text{Ar N} \times 2}{\text{BM NH}_4\text{NO}_3} \times \text{massa NH}_4\text{NO}_3$$

$$= \frac{14 \text{ gr/mol} \times 2}{80 \text{ gr/mol}} \times 2.06 \text{ gr}$$

$$= 0.7210 \text{ gr}$$

Konsentrasi P

$$= \frac{\text{Ar P}}{\text{BM K}_2\text{HPO}_4} \times \text{K}_2\text{HPO}_4 + \frac{\text{Ar P}}{\text{BM KH}_2\text{PO}_4} \times \text{KH}_2\text{PO}_4$$

$$= \frac{31 \text{ gr/mol}}{174 \text{ gr/mol}} \times 0.34 \text{ gr} + \frac{31 \text{ gr/mol}}{136 \text{ gr/mol}} \times 0.17 \text{ gr}$$

$$= 0.0993 \text{ gr}$$

Konsentrasi S

$$= \frac{\text{Ar S}}{\text{BM MgSO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}} \times \text{massa MgSO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$$

$$= \frac{32 \text{ gr/mol}}{450 \text{ gr/mol}} \times 0.5 \text{ gr}$$

$$= 0.0355 \text{ gr}$$

### C. Perhitungan Massa Sel kering

- Media A hari-1 (60 ml biakan *Aspergillus niger*)

$$\text{Massa kertas saring} = 0.62 \text{ gr}$$

$$\text{Massa kertas saring} + \text{Aspergillus niger} = 0.63 \text{ gr}$$

$$\text{Massa Aspergillus niger} = 0.63 \text{ gr} - 0.63 \text{ gr}$$

$$= 0.01 \text{ gr}$$

$$\text{Konsentrasi Aspergillus niger} = \frac{0.01 \text{ gr}}{60 \text{ ml}}$$

$$= 1.67 \times 10^{-4} \text{ gr/ml}$$

- Media B hari-1

$$\text{Massa kertas saring} = 0.62 \text{ gr}$$

$$\text{Massa kertas saring} + \text{Aspergillus niger} = 0.63 \text{ gr}$$

$$\text{Massa Aspergillus niger} = 0.63 \text{ gr} - 0.63 \text{ gr}$$

$$= 0.01 \text{ gr}$$

$$\text{Konsentrasi Aspergillus niger} = \frac{0.01 \text{ gr}}{60 \text{ ml}}$$

$$= 1.67 \times 10^{-4} \text{ gr/ml}$$

Perhitungan yang sama dilakukan untuk media hari ke-2 hingga hari ke-7 dan didapatkan massa sel kering sebagai berikut :

**Tabel C1.1.** Massa sel kering *Aspergillus niger*

Hari	Massa media A (gr)	Massa media B (gr)
1	0.01	0.01
2	0.04	0.04
3	0.06	0.06
4	0.09	0.11
5	0.22	0.37
6	0.27	0.31
7	0.12	0.07

**Tabel C1.2.** Konsentrasi sel *Aspergillus niger*

Hari	Media A (gr/ml)	Media B (gr/ml)
1	0.000167	0.000167
2	0.000667	0.000667
3	0.001	0.001
4	0.0015	0.001833
5	0.003667	0.006167
6	0.0045	0.005167
7	0.002	0.001167

#### D. Perhitungan Kalibrasi *Moisture Meter*

- Tanda alat DRY + (tanpa penambahan air)

Massa sampel cengkeh (a) = 5 gram

Massa cawan+cengkeh (b) = 64,44 gram

Massa konstan setelah pengeringan (c) = 63,95 gram

Massa air (d) = (b) – (c)

= 64,44 gr – 63,95 gr

= 0,49 gr

$$\% \text{ moisture} = \frac{(d)}{(a)}$$

$$= \frac{0,49 \text{ gram}}{5 \text{ gram}}$$

$$= 9,8\%$$

- Tanda alat DRY (penambahan air 80 ml)

Massa sampel cengkeh (a) = 5 gram

Massa cawan+cengkeh (b) = 88,4 gram

Massa konstan setelah pengeringan (c) = 86,76 gram

$$\text{Massa air (d)} = (b) - (c)$$

$$= 88,4 \text{ gr} - 86,76 \text{ gr}$$

$$= 1,64 \text{ gr}$$

$$\% \text{ moisture} = \frac{(d)}{(a)}$$

$$= \frac{1,64 \text{ gram}}{5 \text{ gram}}$$

$$= 32,8\%$$

**Tabel D1.1.**Data Kalibrasi *Moisture* meter

M cengkeh (gr)	M cawan+cengkeh (gr)	M konstan (gr)	M air (gr)	% moisture	Tanda Alat	Kesimpulan
5	64.44	63.95	0.49	9.80%	DRY +	DRY + 0 - 32.8 %
5	88.4	87.34	1.06	21.20%		
5	64.44	62.92	1.52	30.40%		
5	88.4	86.67	1.73	34.60%	DRY	DRY 32.8 - 52 %
5	88.4	86.76	1.64	32.80%		
5	82.06	79.91	2.15	43.00%		
5	64.48	62.08	2.4	48.00%		
5	61.57	59.03	2.54	50.80%	NOR	NOR 52 - 64.8 %
5	88.44	85.84	2.6	52.00%		
5	82.06	79.01	3.05	61.00%		
5	88.45	85.47	2.98	59.60%	WET	WET > 64.8 %
5	88.44	85.2	3.24	64.80%		
5	64.48	61.16	3.32	66.40%		

### E. Perhitungan Bobot Jenis

- Minyak Cengkeh Tanpa Fermentasi

Massa pikno kosong = 14.56 gr

$$\text{Massa pikno} + \text{air} = 24.57 \text{ gr}$$

$$\text{Massa pikno} + \text{minyak} = 24.91 \text{ gr}$$

$$\text{Bobot jenis minyak} = \frac{24.91 \text{ gr} - 14.56 \text{ gr}}{24.57 \text{ gr} - 14.56 \text{ gr}} = 1.0339$$

\*bobot jenis minyak pada 24°C, untuk membandingkan dengan bobot jenis pada SNI 06-2387-2006. Maka di perlu dikurangi dengan faktor koreksi

Faktor koreksi untuk minyak cengkeh = 0.00085/1°C (Guenther, 1972)

$$\begin{aligned} \text{Bobot jenis minyak pada } 20^\circ\text{C} &= 1.0339 \times 0.00085/1^\circ\text{C} \times (24-20)^\circ\text{C} \\ &= 1.0306 \end{aligned}$$

- Minyak Cengkeh Fermentasi Hari ke-2 (Tanpa control *moisture*)

$$\text{Massa pikno kosong} = 14.54 \text{ gr}$$

$$\text{Massa pikno} + \text{air} = 24.57 \text{ gr}$$

$$\text{Massa pikno} + \text{minyak} = 24.79 \text{ gr}$$

$$\text{Bobot jenis minyak} = \frac{24.57 \text{ gr} - 14.54 \text{ gr}}{24.79 \text{ gr} - 14.54 \text{ gr}} = 1.022$$

$$\begin{aligned} \text{Bobot jenis minyak pada } 20^\circ\text{C} &= 1.022 \times 0.00085/1^\circ\text{C} \times (24-20)^\circ\text{C} \\ &= 1.0186 \end{aligned}$$

Perhitungan dilakukan untuk fermentasi hari ke-4 hingga hari ke-8 dan didapatkan bobot jenis minyak cengkeh sebagai berikut :

**Tabel E1.1.** Bobot jenis minyak berbagai perlakuan

Variable	Bobot jenis minyak	
	Dengan kontrol <i>moisture</i>	Tanpa kontrol <i>moisture</i>
0 Hari		1.0306
2 Hari	1.0256	1.0186
4 hari	1.0246	1.0216
8 Hari	1.0196	1.0186

## F. Perhitungan Rendemen Minyak Cengkeh

- Minyak Cengkeh Tanpa Fermentasi

$$\text{Densitas air pada } 24^\circ\text{C} = 0.9964 \text{ gr/ml}$$

$$\text{Volume minyak cengkeh} = 38 \text{ ml}$$

$$\text{Densitas minyak Cengkeh} = 1.0306 \times 0.9964 = 1.0269 \text{ gr/ml}$$

$$\text{Massa Daun Cengkeh} = 2000 \text{ gr}$$

$$\text{Rendemen Minyak Cengkeh} = \frac{\text{massa minyak}}{\text{massa daun cengkeh}} \times 100\%$$

$$= \frac{38 \text{ ml} \times 1.0269 \text{ gr/ml}}{2000 \text{ gr}} \times 100\%$$

$$= 1.9511\%$$

Perhitungan dilakukan untuk fermentasi hari ke-4 hingga hari ke-8 dan didapatkan hasil rendemen minyak cengkeh sebagai berikut :

**Tabel F1.1.** Rendemen minyak daun cengekeh berbagai perlakuan

Variable	Rendemen minyak dauncengkeh	
	Dengan kontrol <i>moisture</i>	Tanpa kontrol <i>moisture</i>
0 Hari	1.9511 %	
2 Hari	1.9416 %	1.4463 %
4 hari	0.5615 %	1.0179 %
8 Hari	0.7619 %	1.4209 %

## LAMPIRAN 2 DOKUMENTASI PENELITIAN

### A. Penentuan Kurva Pertumbuhan Menggunakan Metode *Cell Dry Weight*



2. Aklimatisasi *Aspergillus niger* pada media cair glukosa



1. Pemisahan *Aspergillus niger* dengan media.



3. *aspergillus niger* kering setelah di keringkan

**Gambar A2.1.** Tahap Penentuan Kurva Pertumbuhan Menggunakan Metode *Cell Dry Weight*

### B. Fermentasi Daun Cengkeh Menggunakan *Aspergillus niger*



2. Daun Cengkeh dimasukkan ke dalam Fermentor



1. Media starter



3. Inokulasi media starter



4. Pengecekan Temperatur dan *Moisture* Fermentor

Gambar B2.1 Tahap inokulasi media starter ke dalam fermentor

C. Pengambilan Minyak Daun Cengkeh Menggunakan Metode *Steam Distilasi*



2. Daun cengkeh dimasukkan kedalam ketel



1. Proses distilasi uap



3. Pemisahan distilat menggunakan corong pisah



4. Rendemen minyak daun cengkeh





6. Pemisahan minyak & air menggunakan Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>



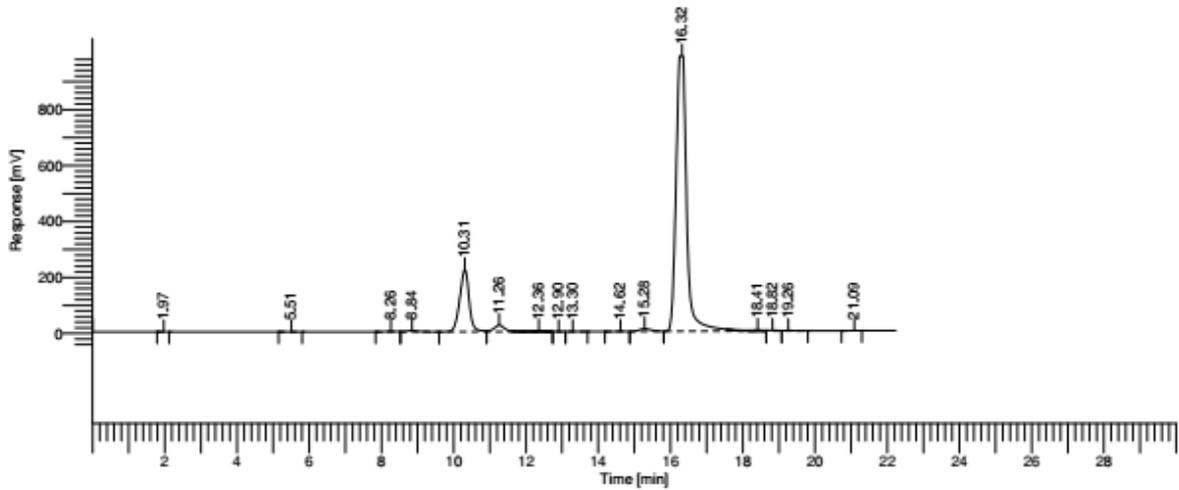
5. Minyak daun cengkeh setelah dipisahkan menggunakan Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Gambar C2.1 Tahap pengambilan minyak cengkeh menggunakan metode *steam* distilasi

### LAMPIRAN 3

## HASIL UJI GAS CHROMATOGRAPHY MINYAK DAUN CENGKEH

### A. Minyak Daun Cengkeh Tanpa Fermentasi



### DEFAULT REPORT

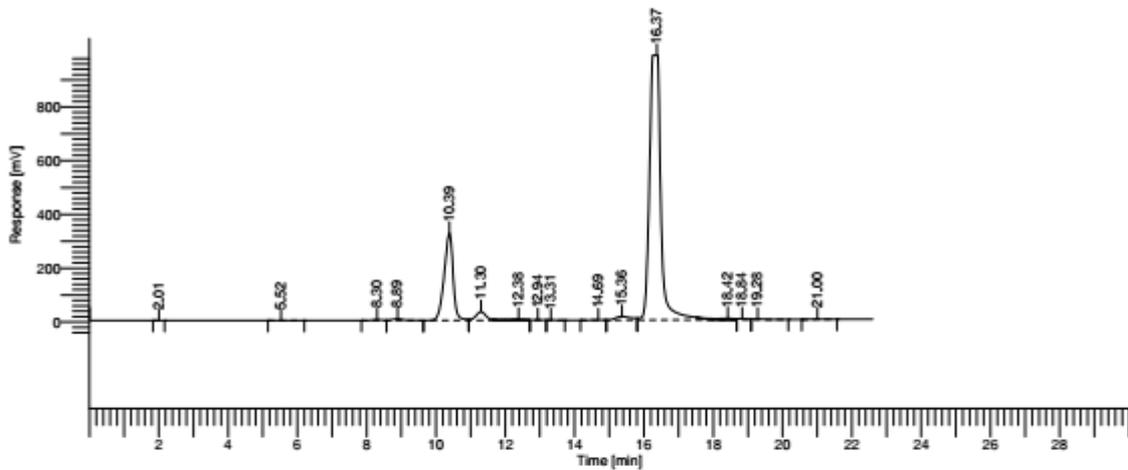
Peak #	Time [min]	Area [uV*sec]	Height [uV]	Area [%]
1	1.972	353.22	36.92	0.00
2	5.506	1879.39	93.40	0.01
3	8.257	34840.29	1891.49	0.14
4	8.843	88730.25	4272.73	0.35
5	10.306	4013946.32	222372.96	15.80
6	11.257	484396.93	23127.13	1.91
7	12.358	92850.81	2910.85	0.37
8	12.902	11712.28	631.91	0.05
9	13.296	14247.51	746.54	0.06
10	14.618	14441.89	661.75	0.06
11	15.285	225416.36	9708.41	0.89
12	16.321	20169147.19	993536.41	79.40
13	18.410	146908.29	3420.26	0.58
14	18.824	58514.52	2806.81	0.23
15	19.265	39227.75	1947.74	0.15
16	21.088	5504.52	307.74	0.02
		25402117.51	1.27e+06	100.00

#### Missing Component Report

Component Expected Retention (Calibration File)

All components were found

**B. Minyak Cengkeh Fermentasi 2 hari dengan kontrol *moisture***



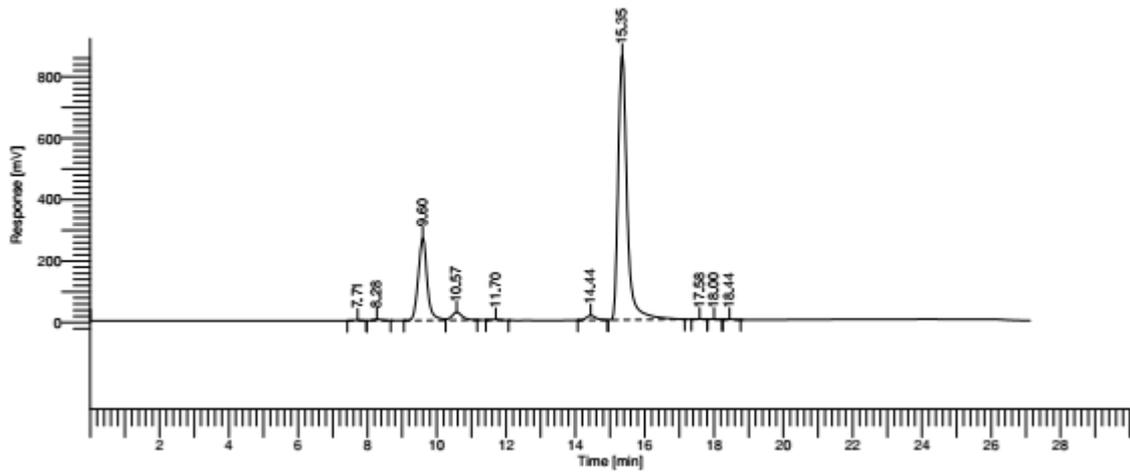
**DEFAULT REPORT**

Peak #	Time [min]	Area [uV*sec]	Height [uV]	Area [%]
1	2.007	292.33	35.38	0.00
2	5.525	5658.27	223.84	0.02
3	8.303	49767.77	2749.29	0.17
4	8.889	118832.47	5838.08	0.40
5	10.385	5805795.38	324563.70	19.35
6	11.296	655316.73	32208.08	2.18
7	12.382	117925.00	3653.02	0.39
8	12.939	36755.00	1908.76	0.12
9	13.311	15045.34	902.58	0.05
10	14.686	24505.95	1080.84	0.08
11	15.364	416163.77	13394.93	1.39
12	16.372	22365950.14	993637.55	74.56
13	18.420	220818.06	4922.45	0.74
14	18.837	75502.63	3650.17	0.25
15	19.278	62161.40	2636.04	0.21
16	21.004	26637.85	1114.54	0.09
		29997128.10	1.39e+06	100.00

Missing Component Report  
 Component Expected Retention (Calibration File)

All components were found

### C. Minyak Cengkeh Fermentasi 2 hari tanpa kontrol *moisture*



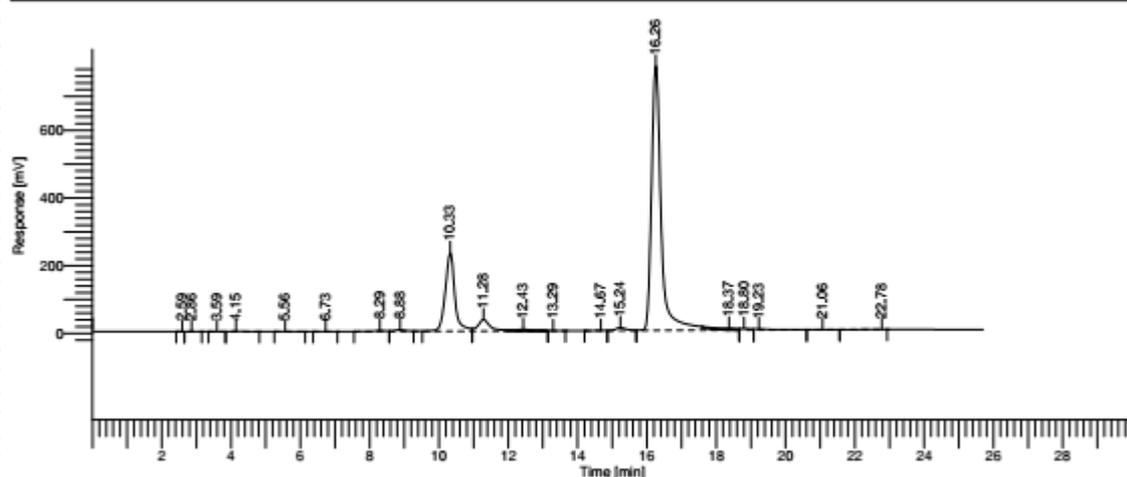
### DEFAULT REPORT

Peak #	Time [min]	Area [uV*sec]	Height [uV]	Area [%]
1	7.713	33024.86	1912.02	0.16
2	8.276	75605.86	4138.85	0.35
3	9.597	4785443.12	268557.24	22.47
4	10.575	527914.01	25540.80	2.48
5	11.702	40069.05	2295.54	0.19
6	14.440	287915.35	15210.62	1.35
7	15.348	15488389.72	861507.24	72.71
8	17.584	19442.66	1264.80	0.09
9	18.001	20495.73	1445.26	0.10
10	18.445	22743.58	1565.53	0.11
		21301043.95	1.18e+06	100.00

Missing Component Report  
 Component Expected Retention (Calibration File)

All components were found



D. Minyak Cengkeh Fermentasi 4 hari dengan kontrol *moisture*

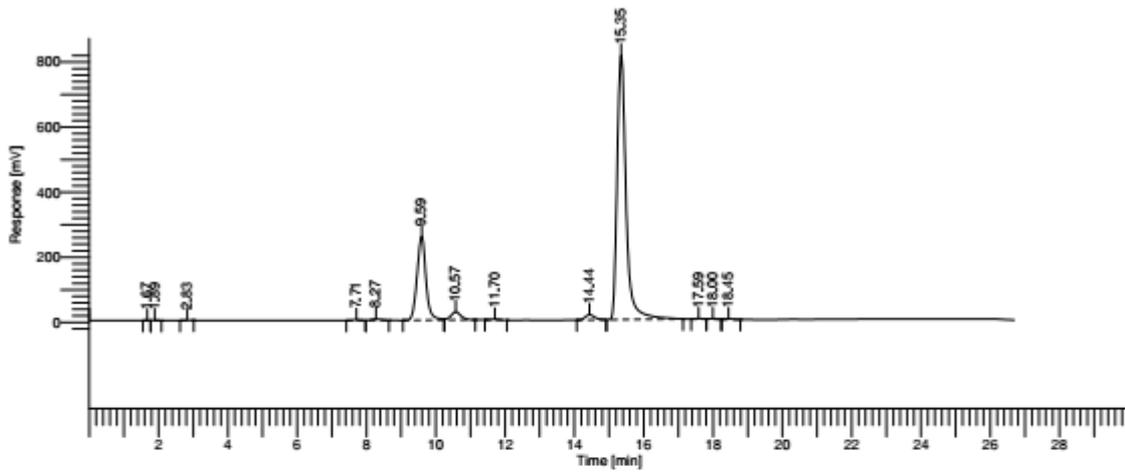
## DEFAULT REPORT

Peak #	Time [min]	Area [uV*sec]	Height [uV]	Area [%]
1	2.590	310.06	39.03	0.00
2	2.859	5549.20	485.76	0.03
3	3.591	2373.85	153.33	0.01
4	4.146	20544.53	1132.49	0.10
5	5.562	4702.21	195.61	0.02
6	6.729	1910.42	88.40	0.01
7	8.293	48084.06	2503.24	0.22
8	8.876	95789.54	4492.37	0.44
9	10.326	4413035.68	231867.03	20.41
10	11.284	821751.26	33553.58	3.80
11	12.433	173051.96	4703.20	0.80
12	13.290	10425.89	607.29	0.05
13	14.667	13627.73	582.92	0.06
14	15.236	190347.69	8956.70	0.88
15	16.257	15278855.57	782728.60	70.65
16	18.370	263007.06	5468.10	1.22
17	18.802	100857.24	4536.70	0.47
18	19.234	134416.07	3319.31	0.62
19	21.065	29212.53	738.93	0.14
20	22.776	17862.17	88.93	0.08
		21625714.70	1.09e+06	100.00

Missing Component Report  
Component Expected Retention (Calibration File)

All components were found

E. Minyak Cengkeh Fermentasi 4 hari tanpa kontrol *moisture*



DEFAULT REPORT

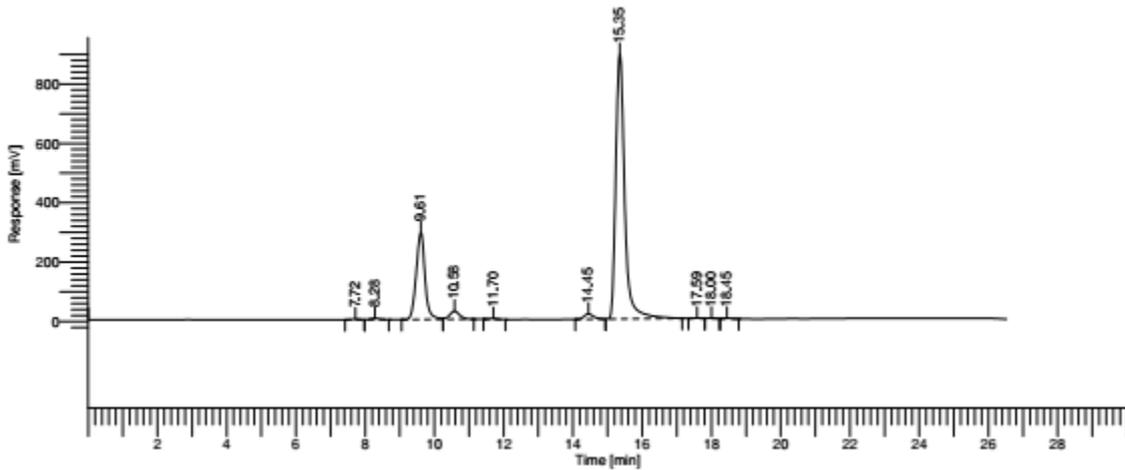
Peak #	Time [min]	Area [uV*sec]	Height [uV]	Area [%]
1	1.671	8098.27	973.00	0.04
2	1.887	11494.61	1127.63	0.06
3	2.831	8769.39	737.04	0.04
4	7.710	31411.55	1811.45	0.16
5	8.272	69625.27	3822.26	0.34
6	9.590	4578828.76	258087.12	22.65
7	10.574	495761.27	24586.76	2.45
8	11.699	37413.87	2196.77	0.19
9	14.436	298111.05	15798.85	1.47
10	15.346	14609365.61	813183.02	72.28
11	17.586	19114.11	1209.19	0.09
12	17.997	20134.84	1380.35	0.10
13	18.447	23753.23	1619.35	0.12
		20211881.83	1.13e+06	100.00

Missing Component Report  
 Component Expected Retention (Calibration File)

All components were found



### G. Minyak Cengkeh Fermentasi 8 hari dengan tanpa moisture



### DEFAULT REPORT

Peak #	Time [min]	Area [uV*sec]	Height [uV]	Area [%]
1	7.718	37035.82	2129.34	0.17
2	8.280	80924.94	4394.42	0.36
3	9.607	5164952.96	294578.42	23.15
4	10.578	550940.17	27575.84	2.47
5	11.700	42169.57	2479.59	0.19
6	14.445	343333.12	17884.11	1.54
7	15.353	16019437.58	892062.76	71.81
8	17.587	23375.77	1454.03	0.10
9	18.003	21747.46	1512.21	0.10
10	18.449	25701.58	1754.37	0.12
		22309618.97	1.25e+06	100.00

Missing Component Report  
 Component Expected Retention (Calibration File)  
 All components were found



**LAMPIRAN 4**  
**HASIL UJI ABSORBANSI MINYAK DAUN CENGKEH**

**Tabel A4.1** Hubungan Panjang Gelombang dengan Absorbansi Minyak Daun Cengkeh

Panjang Gelombang (nm)	adsorbansi
370	-0,316
371	0
372	<b>0,972</b> → Panjang gelombang maksimal
374	0,841
376	0,728
378	0,622
380	0,526
382	0,439
384	0,362
386	0,301
388	0,252
390	0,211
392	0,176
394	0,148
396	0,125
398	0,107
400	0,094
402	0,083
404	0,073
406	0,066
408	0,06
410	0,055
412	0,051
414	0,048
416	0,045
418	0,042
420	0,041
422	0,038
424	0,036
426	0,035
428	0,034
430	0,034
432	0,033
434	0,032
436	0,032
438	0,031
440	0,031
442	0,03
444	0,03
446	0,03
448	0,029





**Tabel A4.2.** Adsorbansi minyak daun cengkeh pada panjang gelombang 375 nm

NO	Perlakuan pada daun cengkeh	Adsorbansi
1	Tanpa Fermentasi	0.972
2	Fermentasi 2 hari Kontrol <i>Moisture</i>	0.379
3	Fermentasi 4 hari Kontrol <i>Moisture</i>	0.505
4	Fermentasi 8 hari Kontrol <i>Moisture</i>	0.453
5	Fermentasi 2 hari Tanpa Kontrol <i>Moisture</i>	0.668
6	Fermentasi 4 hari Tanpa Kontrol <i>Moisture</i>	0.449
7	Fermentasi 8 hari Tanpa Kontrol <i>Moisture</i>	0.640



**LAMPIRAN 5  
DATA PENELITIAN**

**A. Data Distilasi Daun Cengkeh**

**Tabel A5.1. Distilasi Daun Cengkeh Tanpa Kontrol Moisture**

Variabel	Hasil Minyak (ml)	Rendemen m/m %	Bobot Jenis (24°C)	Lama tetes pertama (menit)	V distilat (L)	V air steam (L)	V air sisa (L)	V air teruapkan (L)
0 hari	38	1.9646	1.034	43	5.2	13	2.83	10.17
2 hari	38	1.9551	1.029	28	5	14	4.13	9.87
4 hari	11	0.5654	1.028	72	4	10	2.7	7.3
8 hari	15	0.76725	1.023	70	3	10	2.4	7.6

**Tabel A5.2. Distilasi Daun Cengkeh dengan kontrol moisture**

Variabel	Hasil Minyak (ml)	Rendemen m/m %	Bobot Jenis (24°C)	Lama tetes pertama (menit)	V distilat (L)	V air steam (L)	V air sisa (L)	V air teruapkan (L)
0	38	1.9646	1.034	43	5.2	13	2.83	10.17
2	28.5	1.45635	1.022	57	5.25	10	2.08	7.92
4	20	1.025	1.025	108	5.2	11	1	10
8	28	1.4308	1.022	40	6	11	0.93	10.07

**B. Data Suhu Fermentasi Daun Cengkeh**

**Tabel B5.1. Suhu Fermentasi 2 hari tanpa kontrol moisture**

Hari ke-	Suhu (°C)	pH	Moisture
0	24	7	dry
1	27	7	dry+
2	27	7	dry+

**Tabel B5.2. Suhu fermentasi 4 hari tanpa kontrol moisture**

Hari ke-	Suhu (°C)	pH	Moisture
0	24	7	dry
1	25	7	dry+
2	25	7	dry+
3	27	7	dry+
4	25	7	dry+



**Tabel B5.3.** Suhu fermentasi 8 hari tanpa kontrol moisture

Hari ke-	Suhu (°C)	pH	Moisture
0	24	7	dry
1	25	7	dry
2	24	7	dry+
3	24	7	dry+
4	24	7	dry+
5	26	7	dry+
6	24	7	dry+
7	24	7	dry+
8	24	7	dry+

**Tabel B5.4.** Suhu fermentasi 2 hari dengan kontrol moisture

Hari ke-	Suhu (°C)	pH	Moisture	Ket
0	25	7	dry+	+300ml aq
1	28	7	dry	+250ml aq
2	28	7	dry	

**Tabel B5.5.** Suhu fermentasi 4 hari dengan kontrol moisture

Hari ke-	Suhu (°C)	pH	Moisture	Ket
0	24	7	nor	
1	24	7	dry	
2	25	7	dry+	+250ml aq
3	25	7	dry	+250ml aq
4	26	7	dry+	

**Tabel B5.6.** Suhu fermentasi 8 hari dengan kontrol moisture

Hari ke-	Suhu (°C)	pH	Moisture	Ket
0	25	7	dry	
1	25	7	dry	
2	26	7	dry	+250ml aq
3	25	7	nor	
4	25	7	dry+	+250ml aq
5	27	7	dry+	+250ml aq
6	26	7	dry+	+250ml aq
7	26	7	dry+	+250ml aq
8	25	7	dry+	

**C. Data Hasil Gas Chromatograph**

**Tabel C5.1.** Kandungan eugenol dan  $\beta$ -caryophyllene berdasarkan luas area kromatogram

No	Perlakuan pada daun cengkeh	Kandungan senyawa aktif pada minyak daun cengkeh (%)	Eugenol	$\beta$ -caryophyllene
1	Tanpa Fermentasi		79.4	15.8
2	Fermentasi 2 hari Kontrol Moisture		74.56	19.35
3	Fermentasi 4 hari Kontrol Moisture		70.65	20.41
4	Fermentasi 8 hari Kontrol Moisture		73.96	20.48
5	Fermentasi 2 hari Tanpa Kontrol Moisture		72.71	22.47
6	Fermentasi 4 hari Tanpa Kontrol Moisture		72.28	22.65
7	Fermentasi 8 hari Tanpa Kontrol Moisture		71.81	23.15

## LAMPIRAN 6 RIWAYAT HIDUP

### MAHASISWA 1

RB. Moh. Miftahol Arifin, Sumenep 4 Maret 1994 anak dari ayah R. Ach. Bustami dan ibu RA. Rohani, lulus dari TK Jaya Kusuma Malang, SDN Pangarangan 1 Sumenep, SMPN 1 Sumenep, SMAN 1 Sumenep, lulus progra, sarjana Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Brawijaya tahun 2016. Pengalaman kerja pada Praktek Kerja Lapang di Departemen Produksi IIIA PT. Petrokimia Gresik tahun 2015. Semifinalis *Plant Design Compettition Indonesia Chemical Engineering Challenge* (I-CheC) oleh Himpunan Mahasiswa Teknik Kimia ITB dengan judul karya ilmiah “*Plant Design of Alumina From Bauxite in Ledo, Bengkayang, West Kalimantan*”. Peserta Lolos Pendanaan Program Kewirausahaan Mahasiswa Universitas Brawijaya dengan produk “Jelly Pon Empon (Kreasi Makanan Agar Jelly Berkhasiat Jamu)”. Peserta SEALS (*South East Asian Leaders Summit*) 2014 dengan Tema “*Empowering Nusantara Young Leaders for a Betterment of Southeast Asia*”.

**MAHASISWA 2**

Krisnanda Alif Bagus Wicaksono, Malang 5 Juli 1994 anak dari ayah Sasmito dan ibu Naning Zulaicha, lulus dari TK Kemala Bhayangkari 13 Kepanjen, SDN 2 Tegallalang, SMPN 1 Tegallalang, SMAN 1 Ubud, lulus program sarjana Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Brawijaya tahun 2016. Pengalaman kerja pada Praktek Kerja Lapang di PT Pertamina (persero) RU IV Cilacap unit *Fuel Oil Complex* 1 tahun 2015, sempat menjadi asisten laboratorium untuk mata kuliah Kimia Analisis, Mikrobiologi Industri, Kimia Fisika dan Kimia Organik sebagai kordinator asisten. Finalis Lomba Program Kreatifitas Mahasiswa – Gagasan Tertulis (PKM-GT 2012) Tingkat Fakultas, Lolos pendanaan PKM-K (Program Kreativitas Mahasiswa Kewirausahaan) Tahun 2013 dengan judul “BIMBOR EDAN” : Biskuit Mbote Kelor Enak Kaya Antioksidan dan PKM-P (Program Kreativitas Mahasiswa Penelitian) Tahun 2013 dengan judul Media berbasis SOB TAOCO ( Selulosa Bakterial dari Nata de Coco) pada Biofiltrasi Limbah Cair Industri Tahu. Finalis Lomba Karya Tulis Ilmiah “Innovation Development on Renewable Energy to Improve National Energy Stability” Universitas Riau dan Finalis Poster Competition pada 2015 International Student Conference on Environment and Sustaibility (ISCES 2015) Sanghar.





## UPAYA PENINGKATAN RENDEMEN EKSTRAKSI MINYAK DAUN CENGKEH (*SYZYGium AROMATICUM*) MENGGUNAKAN METODE FERMENTATIF DENGAN *ASPERGILLUS NIGER*

R.B. Moh. Miftahol Arifin, Krisnanda Alif Bagus W., Chandrawati Cahyani\*, Vivi Nurhadianty

Program Studi Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Brawijaya  
Jalan Mayjend Haryono 167 Malang Indonesia 65145 – Telp (0341)574140. 2016.  
\*[rbmohmiftaholarifin@gmail.com](mailto:rbmohmiftaholarifin@gmail.com)

### ABSTRAK

Minyak atsiri merupakan produk unggulan Indonesia yang banyak digunakan dalam berbagai bidang. Salah satunya yaitu minyak daun cengkeh sebagai *flavour and fragrance ingredients*, industri kosmetik, dan lainnya. Namun rendemen minyak atsiri yang didapat dari daun cengkeh melalui distilasi uap hanya sekitar 1,68%. Langkah yang dapat dilakukan untuk meningkatkan rendemennya yaitu dengan perlakuan awal pada bahan daun cengkeh dengan fermentasi selulolitik. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh lama waktu fermentasi dan kondisi *moisture* fermentor yang optimal menggunakan kapang *Aspergillus niger* yang mampu menghasilkan enzim selulase. Fermentasi daun cengkeh dijaga pada suhu 25-30°C dan pH 7, distilasi daun cengkeh selama 6 jam pada suhu air mendidih pada tekanan barometrik. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa degradasi selulosa optimal terjadi pada fermentasi selama 8 hari. Namun rendemen minyak daun cengkeh dan kandungan senyawa aktif pada minyak daun cengkeh, yaitu eugenol, semakin menurun seiring bertambahnya waktu fermentasi. Rendemen dan kandungan senyawa aktif terbaik didapat dari minyak daun cengkeh tanpa fermentasi yaitu 1,96% dan 79,40%. Fermentasi tanpa kontrol *moisture* menghasilkan rendemen minyak yang lebih tinggi daripada fermentasi dengan kontrol *moisture*.

**Kata kunci:** *minyak daun cengkeh, fermentasi selulolitik, Aspergillus niger, selulosa, eugenol.*

### ABSTRACT

Essential oil a natural product of Indonesia that widely used in various fields. One of them is clove oil as a flavor and fragrance ingredients, the cosmetics industry, and others. But the yield of essential oils obtained from clove leaf through steam distillation is only about 1.68%. Steps available to increase the yield is by pretreatment on materials by fermentation cellulotic clove leaf. This study conducted to know the effect of long fermentation time and moisture conditions for fermentor using *Aspergillus niger* which capable of producing cellulase enzymes. Leaf fermentation which maintained at a temperature of 25-30°C and pH 7, distillation clove leaf for 6 hours at a temperature of boiling water at barometric pressure. The results showed that the optimum cellulose degradation occurs in fermentation for 8 days. However clove leaf oil yield and content of the active compound in clove oil, eugenol ie, decreases exponentially with time of fermentation. The best yield and active compound content derived from clove leaf without fermentation are 1.96% and 79.40%. Fermentation without control moisture produce a higher oil yield than fermentation with moisture control.

**Keywords:** *clove leaf oil, Cellulotic fermentation, Aspergillus niger, cellulose, eugenol.*

## PENDAHULUAN

Minyak atsiri adalah produk alam yang memiliki karakteristik fisikokimia yang berguna sehingga memiliki nilai tambah di masyarakat. Salah satu produk unggulan Indonesia yang memiliki komoditas besar dalam dunia minyak atsiri adalah tanaman cengkeh (*Syzygium aromaticum*). Minyak atsiri cengkeh sangat diperlukan dalam berbagai industri seperti bahan baku dalam perisa maupun pewangi makanan (*flavour and fragrance ingredients*), industri kosmetik dan lainnya (Wijaya,dkk, 2015). Tiga minyak atsiri yang bisa didapat dari tanaman cengkeh adalah minyak bunga cengkeh, minyak batang cengkeh, dan minyak daun cengkeh. (Alma,dkk, 2007). Namun yang biasa digunakan masyarakat untuk disuling adalah minyak daun cengkeh karena mudah didapat dan ekonomis. (Dinas Perkebunan Jawa Timur, 2013:28). Pada daun cengkeh hanya sekitar 1,68% minyak yang dapat diambil dengan metode distilasi uap (Wijaya dkk, 2015).

Perdagangan minyak atsiri yang begitu pesat menuntut para peneliti untuk terus menemukan metode yang terbaru dan tepat untuk meningkatkan rendemen hasil ekstraksi minyak atsiri. Nasruddin (2009) menyatakan bahwa perlakuan pendahuluan pada bahan mampu mempertinggi rendemen dan mutu minyak atsiri. Perlakuan sebelum penyulingan tersebut antara lain pengecilan ukuran bahan (perajangan), pengeringan, dan fermentasi daun menggunakan aktivitas selulotik dari kapang (Supriyati,dkk, 2010). Kapang selulotik tersebut adalah jenis *Trichoderma* (*T. viride*, *T. reesei*, *T.harzianum*) dan *Aspergillus* (*A. niger*, *A. oryzae*) (Supriyati dkk, 2010). Aktifitas selulotik dari enzim selulase dihasilkan dari fermentasi substrat padat atau cair oleh kapang dengan substrat berupa *biomass*. Fermentasi substrat padat lebih menguntungkan karena biaya instalasi murah, medium fermentasi

sederhana, tidak membutuhkan kontrol yang teliti dan menghasilkan limbah cair yang lebih sedikit (Bansal dkk, 2012).

Peningkatan rendemen minyak atsiri daun cengkeh dapat dilakukan dengan fermentasi selulotik. Penelitian Wijaya (2015) membandingkan peningkatan rendemen minyak daun cengkeh dari tiga metode berbeda yaitu secara kimia (delignifikasi dengan NaOH 0,25%), biologi (fermentasi selulotik dengan *Trichoderma harzianum*), dan gabungan keduanya. Penelitian ini menunjukkan bahwa proses fermentasi memberikan hasil terbaik dengan kenaikan rendemen sebesar 57,7% dibandingkan dengan delignifikasi yaitu 39,9%. Namun pada penelitian lainnya, yaitu Ashary (2011), yang membandingkan enzim selulotik dari *Aspergillus* dan *Trichoderma*, aktifitas enzim selulase dari kapang *Aspergillus niger* lebih tinggi dibanding kapang jenis *Trichoderma reesei*, yaitu 2,312 U/ml dibanding 1,0927 U/ml. Selain itu, kapang genus *Aspergillus* adalah kapang yang komersial digunakan dalam produksi enzim, biosurfaktan dan asam organik (Santos dkk, 2011). Sehingga perlu adanya pengkajian terhadap penggunaan kapang *Aspergillus niger* pada perlakuan awal daun cengkeh untuk mengetahui pengaruhnya terhadap rendemen dan karakteristik minyak atsiri daun cengkeh.

## METODE

**Bahan** yang digunakan dalam penelitian antara lain: Daun cengkeh rakyat dari Wlingi, Blitar yang telah disimpan selama dua bulan, biakan *Aspergillus niger* dari Laboratorium Bioproses Teknik Kimia FT-UB dan Bahan stater *Aspergillus niger* (Glukosa, Amonium Nitrat,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , Magnesium sulfat heptahidrat).

**Peralatan** yang digunakan untuk penelitian ini adalah *Autoclave* merk HICLAVE HVE-50, distilator sekala pilot, kompresor merk ACO-004, corong pisah, *moisturemeter*, GC (*Gas*



*Chromatography*) merk HP 5890, Spektrofotometer UV-VIS OPTIZEN POP

### Cara kerja

#### 1. Pembuatan Kurva Pertumbuhan

Pembuatan kurva pertumbuhan menggunakan metode *Cell Dry Weight* untuk mengetahui berat kering *Aspergillus niger*. Sebanyak 60 ml media cair glukosa di tuangkan ke dalam Erlenmeyer 100 ml kemudian diinokulasikan *Aspergillus niger* sebanyak 2 goresan. Media cair yang telah diinokulasikan *Aspergillus niger* dirangkai dengan pompa akuarium (kompresor). Dirangkai sebanyak 12 media aklimatisasi, dengan setiap hari dilakukan *Cell Dry Weight* terhadap 2 media (duplo) yaitu dengan menyaring media dengan kertas saring kemudian dilakukan pengovenan hingga didapat massa sel kering yang konstan. Pembuatan kurva pertumbuhan dilakukan selama 7 hari pertumbuhan *Aspergillus niger*.

#### 2. Fermentasi Daun Cengkeh

Daun cengkeh sebanyak 2000 gram disemprotkan dengan 1000 mL larutan starter (larutan nutrisi + *Aspergillus niger* 6% (60 ml)) secara merata. Daun cengkeh dimasukkan kedalam wadah fermentor. Fermentasi dijaga pada kisaran suhu 25-30°C, pada pH 7. Fermentasi dilakukan selama 2 hari, 4 hari, dan 8 hari. *Moisture* dan temperatur substrat dilakukan pengecekan sekali setiap hari. Selama fermentasi dialirkan udara melalui kompresor untuk menjaga kondisi aerobik dan mengontrol temperatur dalam fermentor. *Moisture* dijaga pada kisaran 50-60% untuk variabel kontrol *moisture*. Pengadukan dan pembalikan pada bahan dilakukan sekali setiap hari untuk mengeluarkan panas, menjaga suhu dan menghomogenkan bahan stater dalam fermentor.

#### 3. Distilasi Daun Cengkeh

Daun cengkeh hasil fermentasi dimasukkan kedalam ketel suling. Penyulingan dilakukan secara *direct*

*steam distillation*. Alat distilasi yang digunakan memiliki kapasitas bahan 37,54 L (64% kapasitas total) dengan kapasitas air 27% dari volume total. Distilasi dilakukan selama 6 jam pada suhu mendidih tekanan barometrik dimana setiap satu jam ditambahkan *make up water* dengan suhu mendidih tekanan barometric. Minyak daun cengkeh yang didapat dipisahkan dari distilat menggunakan corong pisah. Minyak yang telah dipisahkan, dikurangi kandungan airnya dengan ditambahkan  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidrat. Pengukuran rendemen minyak daun cengkeh menggunakan persamaan berikut :

$$\text{Rendemen minyak daun cengkeh} = \frac{\text{Massa minyak daun cengkeh}}{\text{Massa daun cengkeh}} \times 100\%$$

#### 4. Uji Data

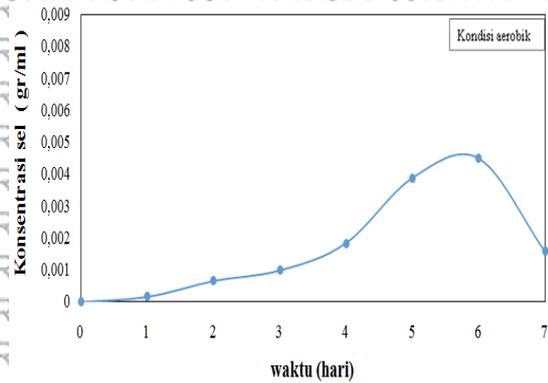
Pengujian data dilakukan pada daun cengkeh tanpa fermentasi dan setelah fermentasi (0 hari, 2 hari, 4 hari, 6hari), dan pada minyak daun cengkeh yang dihasilkan. Uji yang dilakukan antara lain : Uji SEM (*Scanning Electron Microscopy*) pada daun cengkeh, Uji Visual Warna Minyak, Uji Spektrofotometer UV-VIS, Uji Bobot Jenis Minyak Daun Cengkeh, Uji Komposisi Minyak Daun Cengkeh dengan GC (*Gas Chromatography*)

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### Pembuatan Kurva Pertumbuhan *Aspergillus niger*

Massa optimal *Aspergillus niger* yang akan diinokulasikan ke media daun cengkeh ditentukan dengan pembuatan kurva pertumbuhan menggunakan metode *Cell Dry Weight*. Gambar 1 menunjukkan pertumbuhan *Aspergillus niger* pada kondisi aerobik. Fase Lag terjadi hari ke 0 hingga hari pertama yang ditandai dengan tidak berubahnya konsentrasi sel yang signifikan. Fase akselerasi (*exponential*) terjadi pada hari ke dua hingga hari ke lima dimana terlihat perubahan massa sel kering yang

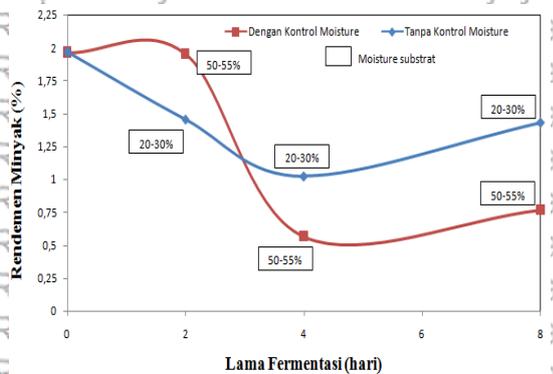
sangat signifikan. Puncak dari kurva pertumbuhan berada di hari ke enam dimana pada hari ke tujuh *Aspergillus niger* sudah mengalami fasa kematian (*dead*). Sedangkan fasa stasioner berada diantara hari ke 5 dan ke 6. Oleh karena itu inokulasi media starter kedalam fermentor dilakukan pada hari ke 5 saat *Aspergillus niger* berada pada akhir masa akselerasi (*exponential*).



**Gambar 1.** Kurva pertumbuhan *Aspergillus niger* pada kondisi aerobik.

### Pengaruh Waktu Fermentasi Terhadap Rendemen Minyak Daun Cengkeh

Fermentasi selulolitik dilakukan pada daun cengkeh selama 2 hari, 4 hari, dan 8 hari dengan adanya kontrol *moisture* dan tanpa kontrol *moisture*. Rendemen minyak daun cengkeh yang didapat dengan berbagai perlakuan tersebut dapat dilihat pada Gambar 2 berikut.

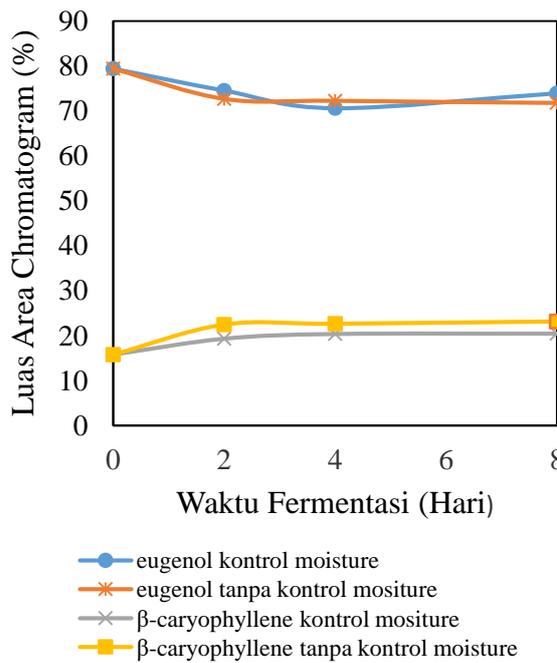


**Gambar 2.** Rendemen minyak daun cengkeh dengan berbagai perlakuan beserta *moisture* bahan dan lingkungan.

Dari Gambar 2, terlihat rendemen semakin menurun seiring lamanya fermentasi. Ini terjadi karena selama fermentasi selulolitik, selulosa pada daun cengkeh terdegradasi oleh enzim selulase yang dihasilkan oleh *Aspergillus niger*. Sifat minyak atsiri yang volatil (minyak terbang) menyebabkan minyak daun cengkeh terkontak dengan udara dan terbawa oleh udara aerasi. Pada fermentasi hari ke-4 dan ke-8, terlihat bahwa rendemen minyak yang dihasilkan paling rendah adalah fermentasi dengan kontrol *moisture*. Pengontrolan *moisture* dilakukan agar kandungan air terjaga sekitar 50-55%. *Moisture* sangat dibutuhkan dalam metabolisme mikroba dan berefek dalam difusi larutan, gas serta perubahan pada *osmotic sell* (Anto et al, 2006). Namun kondisi *moisture* ini menyebabkan tumbuhnya jamur pengganggu yang secara alami ada pada daun kering. Jamur ini menghasilkan enzim *polygalacturonase cellulose* yang dapat mendegradasi kandungan selulosa pada daun cengkeh.

### Kadar Eugenol dan $\beta$ -caryophyllene Minyak Daun Cengkeh

Senyawa aktif pada minyak daun cengkeh, yaitu eugenol dan  $\beta$ -caryophyllene, diukur komposisinya menggunakan *Gas Chromatography*. Kadar eugenol dan  $\beta$ -caryophyllene (Gambar 3.) mengacu pada SNI 06-2387-2006.



**Gambar 3.** Kandungan eugenol dan  $\beta$ -caryophyllene pada berbagai perlakuan.

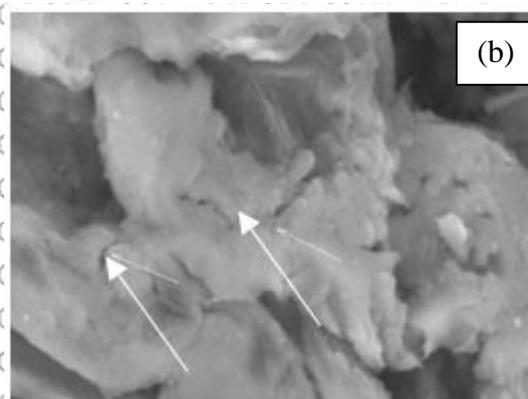
Komponen kimia penyusun minyak daun cengkeh terbesar (peak tertinggi) adalah eugenol dan  $\beta$ -caryophyllene. Dari kedua komponen ini dapat dilihat bahwa terjadi penurunan pada kandungan eugenol dan peningkatan pada  $\beta$ -caryophyllene meskipun tidak signifikan, yaitu  $\pm 5\%$ . Penurunan kadar eugenol diikuti makin lamanya fermentasi. Hal ini sebanding dengan penurunan rendemen minyak daun cengkeh yang diikuti pula oleh semakin lamanya fermentasi. Perusakan selulosa oleh enzim selulase *Aspergillus niger* menyebabkan minyak dan eugenol menguap bersamaan ke lingkungan. Berdasarkan SNI 06-2387-2006, kadar eugenol dan  $\beta$ -caryophyllene yang didapat melalui fermentasi tidak memenuhi SNI. Kualitas yang sesuai adalah daun cengkeh yang tanpa dilakukan fermentasi.

**Penampak Selulosa Daun dengan SEM (Scanning Electrom Microscope)**

Uji SEM pada daun cengkeh dilakukan untuk melihat degradasi selulosa selama fermentasi daun cengkeh.



(a) hari daun cengkeh 2016/04/21 AL D4.1 x8.0k 10 um



(b) 4 hari daun cengkeh 2016/04/21 AL D4.0 x7.0k 10 um



(c) 8 hari daun cengkeh 2016/04/21 AL D3.8 x8.0k 10 um

**Gambar 4.** Perubahan morfologi daun cengkeh (a) tanpa fermentasi (b) fermentasi 4 hari (c) fermentasi 8 hari.

Gambar 4. menunjukkan terjadinya degradasi selulosa pada fermentasi 4 hari (Gambar 4.b) yang ditunjukkan dengan adanya retakan pada penampang daun cengkeh. Pada fermentasi hari ke 8 (Gambar 4.c) terlihat retakan semakin besar dan lebar hal ini menunjukkan bahwa *Aspergillus niger* memiliki enzim



selulase yang dapat mendegradasi

selulosa pada daun cengkeh.

**Tabel 1.** Warna minyak daun cengkeh pada perlakuan kontrol *moisture* (KM) dan tanpa kontrol *moisture* (TM)

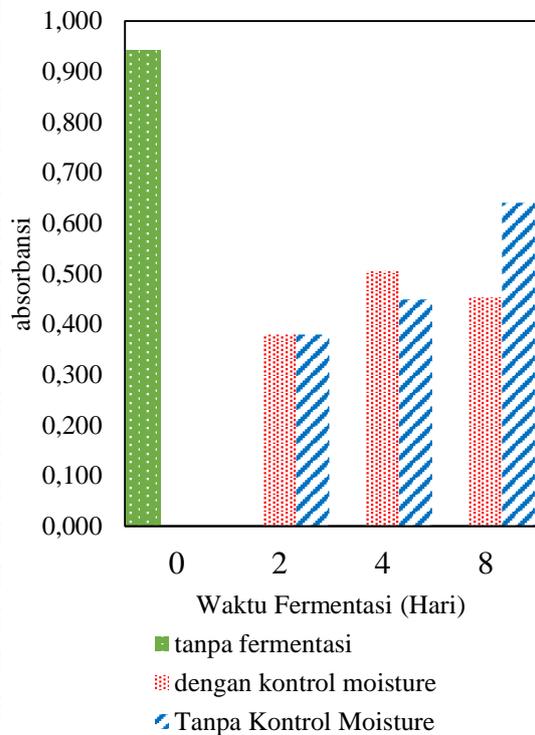
Visual Warna Minyak Cengkeh	0 hari		2 hari		4 hari		8 hari	
	KM	TM	KM	TM	KM	TM	KM	TM

**Warna Minyak Daun Cengkeh**

Warna minyak daun cengkeh dilakukan secara visual sesuai SNI 06-2387-2006. Pada Tabel 1. terlihat bahwa warna minyak daun cengkeh yang dihasilkan masih berada dalam standar yang telah ditetapkan SNI 06-2387-2006 yaitu kuning – coklat tua khas minyak cengkeh. Warna minyak daun cengkeh tanpa fermentasi terlihat paling gelap. Hal ini disebabkan karena sifat fenolat pada eugenol sangat mempengaruhi warna minyak daun cengkeh, karena fenol bersifat reaktif terhadap udara. Sehingga terjadi reaksi oksidasi dimana oksigen akan diikat oleh fenol yang menyebabkan terjadinya pencoklatan pada minyak daun cengkeh (Putri, dkk., 2013).

Dalam perdagangan minyak atsiri, warna minyak visual tidak bisa dijadikan sebagai patokan dalam menentukan kualitas dari minyak atsiri. Sehingga dilakukan uji Spectrofotometri UV VIS terhadap minyak daun cengkeh untuk mengetahui apakah ada korelasi antara absorbansi minyak terhadap komposisi senyawa aktif yang terkandung dalam minyak. Absorbansi minyak daun cengkeh diukur pada panjang gelombang maksimumnya, yaitu 372 nm. Gambar 5 menunjukkan absorbansi pada minyak daun cengkeh pada berbagai perlakuan. Pada kondisi *moisture* terkontrol, peningkatan terlihat fluktuatif dengan semakin lamanya fermentasi. Sedangkan

pada kondisi tanpa kontrol *moisture*, terjadi peningkatan absorbansi seiring semakin lamanya fermentasi. Kecenderungan ini tidak berkorelasi dengan kepekatan warna, kadar eugenol, dan kadar  $\beta$ -caryophyllene pada minyak. Hal ini terlihat pada absorbansi minyak daun cengkeh yang difermentasi 8 hari tanpa kontrol *moisture* yang paling tinggi namun memiliki warna yang paling pucat serta kadar eugenol dan  $\beta$ -caryophyllene yang paling rendah.

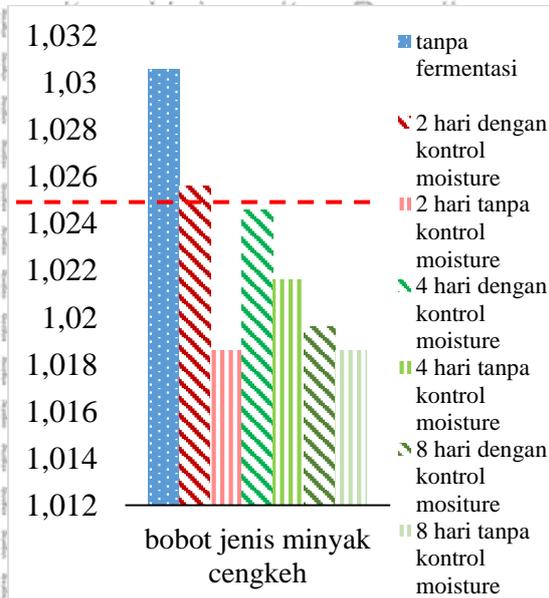


**Gambar 5.** Grafik absorbansi minyak daun cengkeh pada panjang gelombang 372 nm.



### Bobot Jenis Minyak Daun Cengkeh

Nilai bobot jenis minyak daun cengkeh menggunakan acuan SNI 06-2387-2006 yang ditunjukkan pada Gambar 6.



**Gambar 6.** Bobot jenis minyak daun cengkeh berbagai perlakuan.

Pada Gambar 6, terlihat bahwa nilai bobot jenis minyak daun cengkeh yang dihasilkan masih dalam rentang standart SNI 06-2387-2006 untuk minyak cengkeh tanpa fermentasi dan fermentasi 2 hari, sedangkan untuk fermentasi 4 hari dan 8 hari sedikit diluar dari standard. Hal ini didukung dengan hasil uji GC (Gambar 4.7) dimana kandungan eugenol pada fermentasi 4 hari dan 8 hari mengalami penurunan. Penurunan bobot jenis juga dikarenakan pemisahan antara minyak cengkeh dan air yang kurang maksimal, sehingga pada minyak masih terkandung sedikit air yang menurunkan bobot jenis minyak cengkeh.

### KESIMPULAN DAN SARAN

Fermentasi substrat padat menggunakan kapang *Aspergillus niger* berhasil mendegradasi selulosa pada daun cengkeh. Degradasi terbaik terjadi pada fermentasi hari ke-8. Namun terjadi penurunan rendemen minyak daun cengkeh dan kandungan senyawa aktif

seiring bertambahnya lama waktu fermentasi. Selain itu kondisi substrat dengan moisture tidak terkontrol menghasilkan rendemen yang lebih tinggi dibandingkan tanpa kontrol moisture.

Untuk memperbaiki dan mengembangkan penelitian ini, perlu dilakukan desain ulang fermentor yang tidak menurunkan rendemen minyak. Penggunaan enzim selulase secara langsung atau imobilisasi sel *Aspergillus niger* juga perlu dilakukan untuk menjaga dari sifat *antifungal* eugenol.

### DAFTAR PUSTAKA

Alma, M. Hakki, Murat Ertasy, Siegfrie Nitz, dan Hubert Kollmannsberger. 2007. *Chemical Composition and Content of Essential Oil from The Bud of Cultivated Turkish Clove (Syzygium aromaticum L.)*. Journal of Bioresource Vol.2 No.2. 265-269

Ashary, Choirul. 2011. *Produksi Enzim Selulase dan Hidrolisis Enzimatik Pada Jerami Padi dengan Menggunakan Buffer Sitrat*. Skripsi. Surabaya: Institut Teknologi Sepuluh Nopember

Bansal, Namita, Rupinder Tewari, Raman Soni, dan Sanjeev Kumar Soni. 2012. *Production of Cellulases from Aspergillus niger NS-2 in Solid State Fermentation on Agricultural and Kitchen Waste Residues*. Journal of Waste Management 32. 1341-1346.

Dinas Perkebunan Proyinsi Jawa Timur. 2013. *Budidaya Tanaman Cengkeh*. Surabaya

Nasruddin, Gatot Priyanto, dan Basuni Hamzah. 2009. *Pengaruh Delignifikasi Daun Nilam (Pogostemon Cablin Benth) Dengan Larutan NaOH dan Fermentasi Dengan Kapang Trichoderma viride Terhadap Minyak Hasil*



*Penyulingan*. Jurnal Riset Industri  
Vol. III No. 2, Agustus 2009. 94-  
102.

Santos, Tamires Carvalho dos, Ingrid  
Souza Cavalcanti, Renata Critina  
Ferreira Bonomo, Nivio Batista  
Santana, dan Marcelo Franco. 2011.  
*Optimization of Productions of  
Cellulolytic Enzymes by Aspergillus  
niger using residue of mango a  
substrate*. Ciencia Rural vol.41 no.12

Supriyati, T, Haryati, I-G. M. Budiarsana  
dan Utama, I-K. 2010. *Fermentasi  
Jerami Padi Menggunakan  
Trichoderma viride*. Prosiding  
Seminar Nasional Teknologi  
Peternakan dan Veteriner

Wijaya, Chandra, Afghani Jayuska dan  
Andi Hairil Alimuddin. 2015.  
Peningkatan Rendemen Minyak  
Atsiri Daun Cengkeh (*Syzygium  
aromaticum*) dengan Metode  
Delignifikasi dan Fermentasi. ISSN  
2303-1077 JKK Volume 4 (4). 15-20