



# PRODUKSI ENZIM SELULASE OLEH *Penicillium nalgiovense* SS240 PADA SUBSTRAT TANDAN SAWIT

RONI NUGRAHA



PROGRAM STUDI BIOKIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
INSTITUT PERTANIAN BOGOR  
BOGOR  
2006

© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



## ABSTRAK

RONI NUGRAHA. Produksi Enzim Selulase oleh *Penicillium nalgioense* SS240 pada Substrat Tandan Sawit. Dibimbing oleh EMAN KUSTAMAN dan TRESNAWATI PURWADARIA

Hidrolisis selulosa secara enzimatik membutuhkan penggunaan enzim selulase, sebuah kompleks enzim yang terdiri atas endo 1,4- $\beta$ -D-glukanase, ekso 1,4- $\beta$ -D-glukanase dan  $\beta$ -glukosidase. Produksi enzim selulase dipengaruhi oleh ketersediaan karbon dan nitrogen. Variasi perlakuan substrat sebagai media tumbuh mikroorganisme, sumber nitrogen dan konsentrasi nitrogen diamati terhadap produksi enzim selulase oleh *P. nalgioense* SS240.

*P. nalgioense* SS240 ditumbuhkan masing-masing pada substrat tandan sawit dengan perlakuan NaOH, tanpa perlakuan NaOH dan polard perlakuan NaOH dengan metode kultur terendam untuk mencari sumber karbon terbaik bagi produksi enzim selulase. Penelitian dilanjutkan untuk mencari sumber nitrogen yang paling baik untuk produksi selulase. Sumber nitrogen yang digunakan adalah amonium sulfat + urea dan natrium nitrat. Sumber nitrogen terbaik digunakan untuk penelitian berikutnya yaitu optimalisasi produksi enzim dengan memvariasikan konsentrasi nitrogen yaitu sebesar 0.017%, 0.034% dan 0.068%. Uji aktivitas sakarifikasi terhadap dedak digunakan sebagai parameter uji untuk ketiga tahap penelitian. Adapun uji aktivitas CMC<sub>Case</sub> dan  $\beta$ -glukosidase dilakukan untuk penelitian tahap ketiga.

Hasil pengamatan menunjukkan tandan sawit tanpa perlakuan menghasilkan enzim dengan aktivitas sakarifikasi yang lebih baik dibandingkan tandan sawit dengan perlakuan NaOH dan polard perlakuan NaOH. Sumber nitrogen yang paling baik bagi produksi enzim selulase adalah natrium nitrat dengan aktivitas sakarifikasi sebesar 215.3  $\mu$ mol/ml. Perbedaan sumber nitrogen tidak memberikan pengaruh yang nyata ( $p > 0.05$ ) terhadap aktivitas enzim. Aktivitas CMC<sub>Case</sub>,  $\beta$ -glukosidase dan sakarifikasi tertinggi untuk penelitian tahap ketiga dihasilkan pada nitrogen dengan konsentrasi sebesar 0.017% yaitu 0.027 U/ml, 0.046 U/ml dan 172.4  $\mu$ mol/ml.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



## ABSTRACT

RONI NUGRAHA. Production of cellulase by *Penicillium nalgiovense* SS240 on Palm Oil Bunch. Under the direction of EMAN KUSTAMAN and TRESNAWATI PURWADARIA

The enzymatic hydrolysis of cellulose requires the use of cellulase, a multiple enzyme system consisting of endo 1,4- $\beta$ -D-glucanase, exo 1,4- $\beta$ -D-glucanase and  $\beta$ -glucosidase. The production of microbial cellulase will be influenced by the intake of carbon and nitrogen. The optimal production of these enzymes by using *P. nalgiovense* SS240 was observed at different pretreated substrates and level of nitrogen.

*P. nalgiovense* SS240 grown on palm oil bunch treated NaOH, non-treated palm oil bunch and pollard treated NaOH for each by submerged fermentation method to find the best carbon source for production of cellulase. Research continued to find the best nitrogen source for enzyme production. Nitrogen source varied that are ammonium sulphate + urea and sodium nitrate. The best nitrogen source then used for next stage of research that is optimisation of enzyme production by varied nitrogen level on medium as 0,017%, 0,034% and 0,068%. Saccharification on rice bran used as parameter for cellulase activities in all research stage. CMCase and  $\beta$ -glucosidase activity tested only in third stage of research.

Experiment results showed that non-treated palm oil bunch yield better saccharification activity than palm oil bunch treated NaOH and pollard NaOH. The best nitrogen source showed by sodium nitrate with saccharification activity was 215,3  $\mu$ mol/ml. Various nitrogen source didn't give different significant level ( $p < 0,05$ ) toward cellulase activities. The highest CMCase,  $\beta$ -glucosidase and saccharification reached on nitrogen level 0.017% that 0,017% yaitu 0,027 U/ml, 0,046 U/ml and 172,4  $\mu$ mol/ml respectively.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



# **PRODUKSI ENZIM SELULASE OLEH *Penicillium nalgiovense* SS240 PADA SUBSTRAT TANDAN SAWIT**

**RONI NUGRAHA**

Skripsi

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Sains pada  
Program Studi Biokimia

**PROGRAM STUDI BIOKIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
INSTITUT PERTANIAN BOGOR  
BOGOR  
2006**

© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



Judul : Produksi Enzim Selulase oleh *Penicillium nalgiovense* SS240 pada Substrat Tandan Sawit

Nama : Roni Nugraha

NIM : G44101002

Disetujui  
Komisi Pembimbing

Ir. Eman Kustaman  
Ketua

Dr. Tresnawati Purwadaria  
Anggota

Diketahui  
Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Dr. Ir. Yonny Koesmaryono, M.S.  
NIP 131473999

Tanggal Lulus :

- Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
    - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
    - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
  2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



## RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Ciamis pada tanggal 21 April 1983 sebagai anak pertama dari dua bersaudara, putra dari pasangan Ajo (Alm) dan Aah.

Tahun 2001 penulis lulus dari SMU Negeri 2 Ciamis dan pada tahun yang sama masuk IPB pada Program Studi Biokimia melalui jalur Undangan Seleksi Masuk IPB (USMI). Bulan Juli – Agustus 2004 penulis melaksanakan praktik lapangan di Laboratorium Teknologi Pakan, Balai Penelitian Ternak, Ciawi dan melaksanakan penelitian di laboratorium yang sama pada bulan Maret – Oktober 2005.

Selama mengikuti perkuliahan, penulis pernah menjadi asisten dosen Kimia Dasar Program Studi Teknologi Industri Pertanian (TIN) dan Ilmu dan Teknologi Kelautan (ITK) pada alih semester dan Program Studi Fisika pada semester 1 tahun ajaran 2003 – 2004. Penulis juga aktif sebagai pengurus di beberapa organisasi internal dan eksternal kampus diantaranya anggota Komisi Internal Dewan Perwakilan Mahasiswa (DPM) FMIPA IPB, staf Badan Kerohanian Islam Mahasiswa (BKIM) IPB, staf DKM Himpunan Alumni IPB dan Ketua Harian DKM Himpunan Alumni IPB. Penulis pernah menerima beasiswa PPA, Crescent dan selama dua tahun mendapat beasiswa dari Yayasan Goodwill International.

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



## PRAKATA

Alhamdulillah, segala puji hanyalah milik Allah Rabbul ‘Alamin yang telah memberikan rahmat dan karunia kepada penulis sehingga karya ilmiah ini berhasil diselesaikan. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Pakan, Balai Penelitian Ternak Ciawi mulai bulan Maret hingga Oktober 2005 dengan judul Produksi Enzim Selulase *Penicillium nalgiovense* SS240 pada Substrat Tandan Sawit.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Bapak Ir. H. Eman Kustama selaku dosen pembimbing yang telah memberikan saran dan kritik serta arahnya, Ibu Dr. Tresnawati Purwadaria selaku pembimbing yang telah menerima dan membimbing penulis selama melakukan penelitian dan penyusunan karya ilmiah ini. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Ibu Emi, Ibu Ema, Mbak Nila, Ibu Tuti, Ibu Susan, Pak Tyas, Pak Helmi, Pak Iyus dan rekan-rekan di Laboratorium Teknologi Pakan yang telah membantu kelancaran penelitian ini, juga kepada rekan-rekan Biokimia angkatan 38 terutama Waras dan Irdham atas bantuan dan dorongannya. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada ibu atas doa dan dukungan yang diberikan, Moissa, Mas Ali, rekan-rekan seperjuangan di Bogor Tengah, dan Desi atas bantuan analisis statistiknya. Semoga karya ilmiah ini bermanfaat.

Bogor, Januari 2006

*Roni Nugraha*

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
DAFTAR TABEL .....	vii
DAFTAR GAMBAR .....	viii
DAFTAR LAMPIRAN .....	ix
PENDAHULUAN .....	1
TINJAUAN PUSTAKA	
Tandan Sawit .....	2
<i>Penicillium nalgiovense</i> .....	2
Selulosa .....	3
Kompleks Enzim Selulase .....	3
Represi Katabolit .....	4
BAHAN DAN METODE	
Alat dan Bahan .....	5
Metode .....	5
HASIL DAN PEMBAHASAN	
Optimasi Produksi Selulase dengan Variasi Perlakuan Substrat .....	7
Optimasi Produksi Selulase dengan Variasi Sumber Nitrogen dalam Medium .....	8
Optimasi Produksi Selulase dengan Variasi Konsentrasi Sumber Nitrogen dalam Medium .....	9
SIMPULAN DAN SARAN	
Simpulan .....	10
Saran .....	10
DAFTAR PUSTAKA .....	10
LAMPIRAN .....	13

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.





- Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
    - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
    - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
  2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

## DAFTAR TABEL

	<b>Halaman</b>
1 Analisis proksimat tandan buah kosong dan sabut kelapa sawit .....	3
2 Aktivitas sakarifikasi selulase dari kapang <i>E. javanicum</i> BS4 dan <i>P. nalgioense</i> SS240 pada substrat tandan dan polard .....	7
3 Aktivitas selulase <i>P. nalgioense</i> SS240 pada berbagai konsentrasi sumber nitrogen .....	9

## DAFTAR GAMBAR

	<b>Halaman</b>
1 Skema tahap-tahap selulolisis .....	4
2 Aktivitas sakarifikasi <i>E. javanicum</i> BS4 dan <i>P. nalgioense</i> SS240 dengan sumber nitrogen amonium sulfat + urea dan natrium nitrat .....	8
3 Aktivitas CMCase dan $\beta$ -glukosidase serta spesifik CMCase dan $\beta$ -glukosidase <i>P. nalgioense</i> SS240 dengan variasi konsentrasi sumber nitrogen .....	10

## DAFTAR LAMPIRAN

	<b>Halaman</b>
1 Diagram alir penelitian .....	14
2 Komposisi media dan pereaksi dalam 1 liter larutan .....	17
3 Standar glukosa dan nitrofenol .....	18
4 Analisis varian .....	20

## PENDAHULUAN

Pakan ternak merupakan faktor yang paling esensial dalam industri peternakan unggas. Sebanyak 65-70% biaya total produksi ternak merupakan biaya pengadaan pakan. Pada umumnya bahan baku pakan unggas di Indonesia merupakan bahan impor, sehingga harga pakan cukup tinggi. Sebagai contoh, untuk mencukupi kebutuhan energinya, digunakan jagung sebagai bahan baku sedangkan protein menggunakan kedelai atau tepung ikan.

Sekarang ini para peternak unggas sedang dalam kondisi yang tidak menguntungkan. Harga pakan melonjak naik sebagai akibat naiknya bahan baku dan biaya pengapalan. Kondisi demikian mendorong penggunaan bahan baku lokal sebagai alternatif bahan pakan. Limbah agroindustri merupakan salah satu bahan alternatif yang biasa digunakan sebagai bahan baku pakan ternak. Limbah ini cukup beragam dan dalam jumlah yang besar.

Pada umumnya, bahan limbah agroindustri mengandung kadar serat yaitu hemiselulosa, selulosa dan lignin yang tinggi. Berbeda dengan ruminansia, saluran pencernaan ternak unggas tidak dapat mencerna hemiselulosa dan selulosa. Saat ini telah diketahui bahwa fermentasi terjadi dalam saluran pencernaan ternak unggas yang diakibatkan aktivitas mikroba (Josefiak *et al.* 2004). Proses fermentasi tersebut dapat menguraikan selulosa dan hemiselulosa dalam jumlah yang sedikit. Penambahan enzim selulase dan hemiselulase dalam pakan unggas mampu meningkatkan berat badan, efisiensi penggunaan pakan, ketersediaan energi dan ketercernaan bahan kering (Campbell dan Bedford 1992). Keefektifan enzim berhubungan dengan aktivitas enzim yang ditambahkan.

Kapang memiliki kemampuan memproduksi selulase yang mampu menghidrolisis selulosa kristal (kertas saring), yang merupakan komponen yang utama dalam selulosa alami. Selulase merupakan kelompok enzim hidrolitik yang mampu menghidrolisis selulosa menjadi komponen gula yang lebih kecil seperti oligosakarida dan glukosa. Enzim selulolitik berperan penting dalam proses biodegradasi alami. Dalam bidang industri, enzim selulolitik ini telah digunakan dalam produksi dan pemrosesan bahan-bahan kimia, makanan, dan pembuatan bahan-bahan seperti kertas, rayon dan selofan. Selulase telah banyak dimanfaatkan untuk ekstraksi komponen-komponen bermanfaat dari sel

tanaman dan peningkatan nilai makanan hewan dengan meningkatkan kecernaannya.

Aktivitas enzim yang dihasilkan oleh kapang dalam proses fermentasi dipengaruhi oleh beberapa hal antara lain ketersediaan oksigen yang berhubungan dengan luas permukaan substrat, sumber nitrogen, sumber karbon dan efek represi. Selulosa dan komponen selulolitik dalam substrat lignoselulosa esensial dalam pembentukan mRNA untuk mendukung pembuatan selulase secara maksimal pada tingkat transkripsi. Glukosa merepresi sintesis selulase dengan mekanisme represi katabolit pada tingkat transnasional (Ponce-Noyola 2001).

Rajoka (2004) melaporkan bahwa nitrat merupakan sumber nitrogen yang paling baik dan mendukung lebih banyak produksi massa sel, selobiohidrolase dan FPase pada *Cellulomonas flavigena*. Nitrat juga dilaporkan menginduksi produksi protein ekstraselular secara maksimum, gula pereduksi dan persentasi sakarifikasi (Kashem *et al.* 2004). Nitrogen dibutuhkan oleh sel sebagai senyawa nutrisi kunci pada pertumbuhan sel dan membantu penghancuran bahan-bahan organik. Kandungan nitrogen dalam medium Dubos yang digunakan Rajoka (2004) untuk meningkatkan aktivitas enzim pada bakteri *C. flavigena* hampir dua kali lipat dibandingkan kandungan nitrogen dalam medium Mandels yang menggunakan  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  dan urea sebagai medium dasar pertumbuhan kapang.

Polard banyak digunakan sebagai substrat dalam proses fermentasi kultur terendam. Substrat ini banyak mengandung pati terlarut dan asam-asam amino esensial sehingga dalam penggunaannya memiliki beberapa kekurangan. Enzim kapang *Eupenicillium javanicum* BS4 memiliki aktivitas selulase yang rendah dalam substrat polard dikarenakan efek represi katabolit oleh gula terlarut dalam polard (Rakhmani *et al.* 2005). Kapang lain yaitu *Penicillium nalgiovense* S11 mampu memproduksi selulase dengan aktivitas yang tinggi apabila dilakukan perlakuan NaOH pada substrat polardnya (Purwadaria *et al.* 2004). Mutan *P. nalgiovense* SS240 mampu mengatasi efek represi katabolit yang dihasilkan oleh gula terlarut dalam substrat. Kapang ini mampu menghasilkan FPase dan  $\beta$ -glukosidase lebih tinggi dibandingkan tipe liarnya dalam substrat polard (Ginoga 2004). Enzim kasar SS240 pada substrat polard dapat meningkatkan daya cerna pakan ayam pedaging.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

- Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
    - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
    - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
  2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Selulase yang dihasilkan oleh *E. javanicum* BS4 memiliki aktivitas yang lebih tinggi pada substrat tandan sawit dibandingkan substrat polard. Oleh karena itu diperlukan suatu penelitian untuk membandingkan aktivitas enzim yang dihasilkan *P. nalgiovense* SS240 dalam substrat tandan sawit dan pengaruh senyawa nitrogen terhadap aktivitas enzim yang dihasilkan.

Penelitian ini bertujuan meningkatkan produksi enzim pemecah serat *P. nalgiovense* SS240 menggunakan substrat tandan sawit dan sumber nitrogen garam nitrat.

Hipotesis yang diambil pada penelitian ini adalah tandan sawit dan Natrium nitrat mampu meningkatkan produksi enzim selulase dari *P. nalgiovense*.

## TINJAUAN PUSTAKA

### Tandan Sawit

Luas tanaman kelapa sawit di Indonesia dilaporkan mencapai 2.014.000 ha pada tahun 2000 dengan laju pertumbuhan setiap tahunnya mencapai 12.6% (Liwang 2003). Sebagai konsekuensi makin meningkatnya luas tanaman kelapa sawit adalah meningkatnya produk samping hasil olahan kelapa sawit yang sedikit banyak akan menimbulkan problem baru dan perlu diantisipasi.

Selain menghasilkan *Crude Palm Oil* (CPO) sebagai komoditas utama, industri kelapa sawit juga menghasilkan beberapa jenis hasil samping yang potensial untuk digunakan sebagai bahan pakan ternak, yakni serabut mesokarp (*palm press fibre*/PPF), lumpur sawit (*palm oil sludge*/POS), dan bungkil inti sawit (*palm kernel cake*/PKC) yang diperoleh dari pabrik pengolahan kelapa sawit, serta pelepah sawit (*oil palm frond*/OPF) dan batang pohon sawit (*oil palm trunk*/OPT) yang diperoleh dari kebun kelapa sawit. Tandan kosong sawit merupakan limbah pada pabrik kelapa sawit yang jumlahnya sekitar 23% dari tandan buah segar

yang diolah (Elisabeth dan Ginting 2004). Pemanfaatan tandan kosong yang diketahui mengandung serat kasar tinggi dan diindikasikan dengan kandungan serat deterjen asam (ADF) sejumlah 61% memiliki nilai biologis yang rendah. Hingga saat ini produk samping tersebut masih dimanfaatkan sebagai bahan penutup tanah perkebunan sawit dan bahan baku pembuatan kompos. Upaya peningkatan nilai nutrisi produk samping tersebut khususnya sebagai pakan ruminansia belum banyak dilakukan (Diwyanto *et al.* 2003). Tandan sawit memiliki potensi sebagai substrat produksi enzim selulase karena tingginya kadar serat. Tabel 1 memperlihatkan hasil analisis proksimat tandan dan sabut kelapa sawit yang berasal dari limbah pengolahan sawit kelapa sawit PTP IX Sumatra Utara.

### Produksi selulase pada *P. nalgiovense*

*P. nalgiovense* merupakan salah satu jenis kapang yang termasuk dalam kelas Fungi Imperfecti. Kapang ini merupakan mikroba selulolitik yang secara spesifik mampu menghasilkan komponen selulase. Enzim selulase yang berasal dari *P. nalgiovense* S11 ini telah berhasil diproduksi pada medium cair Mendels yang diinkubasi selama 3 hari pada suhu 30° C dengan konsentrasi substrat polard 2% dan kecepatan agitasi 150 rpm (Nurbayti 2002). Adapun mengenai pengaruh gula pereduksi dan perlakuan substrat telah diteliti oleh Purwadaria *et al.* (2004). Produksi selulase tertinggi dihasilkan pada substrat polar 3% dengan dicuci NaOH terlebih dahulu dan penambahan glukosa 250 ppm. Penambahan 500 ppm glukosa menyebabkan penurunan aktivitas enzim yang menunjukkan adanya pengaruh represi gula pereduksi. Sanjaya (2003) telah memproduksi mutan *P. nalgiovense* yang lebih tahan terhadap represi gula pereduksi. Isolat-isolat mutan terpilih dihasilkan dari radiasi sinar UV. Ginoga (2004) telah menguji perbandingan aktivitas selulase pada tipe dan mutan SS125, SS141, SS170, SS178, SS204

Tabel 1 Analisis proksimat tandan buah kosong dan sabut kelapa sawit

Bahan	Air	Abu	Protei n	Lemak	Serat kasar	Pati	Selulosa	Hemi selulosa	Lignin
Tandan buah kosong	8.84	6.29	2.65	6.04	40.51	18.36	32.55	31.70	22.09
Serabut	8.49	7.13	3.57	9.25	41.44	19.34	28.28	34.78	21.56

Sumber : Darwis (1988)

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

dan SS240 yang diisolasi Sanjaya (2003). Hasil pengujian menunjukkan bahwa isolat mutan SS240 merupakan isolat mutan terpilih yang memproduksi aktivitas komponen selulase (CMCase, FPase,  $\beta$ -glukosidase) tertinggi pada medium 3% polard tanpa penambah glukosa dibandingkan isolat mutan lainnya dan tipe liarnya. Pada substrat polard dengan penambahan glukosa, isolat mutan SS240 juga menghasilkan FPase dan  $\beta$ -glukosidase lebih tinggi dibandingkan tipe liarnya. Hal ini membuktikan bahwa isolat mutan SS240 lebih tahan represi dibandingkan tipe liarnya.

### Selulosa

Selulosa merupakan komponen utama pembentuk dinding sel tanaman yang menyusun sekitar setengah dari tanaman keras dan sepertiga dari tanaman setahun. Setiap jutaan ton selulosa diproduksi oleh tanaman melalui fotosintesis. Produksi selulosa umumnya banyak digunakan dalam industri tekstil dan kertas. Sekarang ini terdapat dua cara utama yang dilakukan untuk mengonversi selulosa menjadi glukosa: kimiawi dan enzimatik. Penelitian terhadap kedua metode telah mendapat perhatian dari banyak peneliti di seluruh dunia. Setiap molekul selulosa mengandung 1000 sampai 1 juta unit D-glukosa yang dihubungkan bersama oleh ikatan  $\beta$ -1,4-glikosida. Selulosa dari berbagai sumber memiliki struktur molekuler yang sama. Namun selulosa dari berbagai sumber memiliki perbedaan dari struktur kristalnya dan ikatan dengan biomolekul lainnya.

Terdapat dua jenis ikatan hidrogen pada molekul selulosa yang terbentuk antara OH pada gugus C<sub>3</sub> dan oksigen pada cincin piranosa dalam molekul yang sama dan juga antara OH pada gugus C<sub>6</sub> dari satu molekul dengan oksigen oksigen pada ikatan glikosida dari molekul yang lain. Ikatan  $\beta$ -1,4-glikosida sendiri tidak terlalu sulit untuk dipecah. Namun karena ikatan hidrogen selulosa dapat membentuk kristal yang sangat kuat.

Derajat kristalisasi merupakan faktor penting yang mempengaruhi degradasi hidrolitik oleh selulase. Terdapat hubungan linear antara derajat kristalisasi dengan proses degradasi. Adanya asosiasi secara fisik dengan kristal lain seperti lignin dan hemiselulosa menghambat aktivitas hidrolitik. Kontak fisik antara enzim dan substrat sangat diperlukan untuk terjadinya aksi hidrolitik. Semakin tinggi area permukaan atau semakin

kecil partikel, semakin tinggi kemudahan proses hidrolisis.

### Kompleks enzim selulase

Selulase merupakan suatu kompleks multienzim yang bekerja bersama-sama menghidrolisis selulosa menjadi glukosa. Telah diketahui bersama saat ini bahwa setidaknya terdapat paling sedikit tiga enzim yang terlibat dalam hidrolisis sempurna selulosa menjadi glukosa: 1,4- $\beta$ -D-glukan selobiohidrolase (CBH) (eksoglukanase), yang secara spesifik memutus unit-unit selobiosa dari ujung nonpereduksi dari rantai selulosa; endo-1,4- $\beta$ -D-glukan 4-glukanohidrolase (endoglukanase), yang memutus ikatan internal selulosa; and  $\beta$ -D-glukosida-glukohidrolase atau  $\beta$ -D-glukosidase (selobiase), yang memutus secara spesifik unit glukosa dari ujung nonpereduksi dari selo-oligosakarida (Kim 1995).

Selobiohidrolase telah dijelaskan dalam banyak literatur terhadap aktivitasnya terhadap selulosa mikrokristal dengan selobiosa sebagai produk utama dan ketidakmampuannya menghidrolisis ikatan internal selulosa dari karboksimetil selulosa (CMC) (Kim 1995). Degradasi daerah selulosa diperkirakan terjadi sebagai hasil kerja CBH mengatalisis pelepasan selobiosa dari ujung nonpereduksi dari rantai selulosa. Kim (1995) melaporkan dalam hasil penelitiannya bahwa endoglukanase yang berasal dari bakteri *Bacillus circulans* mampu menghidrolisis avisel.

Aktivitas total selulase ditentukan dengan mengukur aktivitas campuran enzim yang menghidrolisis bahan yang mengandung selulosa dan menghasilkan glukosa sebagai produk akhir. Aktivitas total selulase menggambarkan pengaruh sinergisme antara enzim yang berbeda dan pengaruh hambatan dari produk akhir. Substrat yang digunakan adalah selulosa tak larut, sehingga diperlukan waktu reaksi yang cukup lama agar enzim dapat berdifusi ke dalam serat selulosa (Enari 1983). Substrat yang biasa digunakan adalah kertas saring Whatman No 1 atau avisel. Enzim yang menghidrolisis substrat ini dikenal sebagai FPase.

Gambar 1 memperlihatkan tahap-tahap pemecahan selulosa oleh kompleks enzim selulase. Tahap pertama, enzim endoglukanase menyerang daerah amorf dari selulosa secara acak dan membentuk makin banyak ujung-ujung nonpereduksi yang memudahkan kerja eksoglukanase. Enzim eksoglukanase selanjutnya menghidrolisis

- Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
    - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
    - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
  2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

daerah kristal dari selulosa dengan membebaskan dua unit glukosa. Kerja sama kedua enzim ini menghasilkan unit-unit sakarida yang lebih kecil yang selanjutnya dihidrolisis oleh  $\beta$ -glukosidase menghasilkan glukosa.

### Represi katabolit

Represi katabolit adalah kemampuan intermediet di dalam rangkaian reaksi katabolik yang dikatalisis enzim untuk merepresi sintesis enzim katabolik. Efek ini pertama-tama terlihat pada *E. coli* yang sedang tumbuh pada media bersumber karbon bukan glukosa. Penambahan glukosa merepresi sintesis enzim yang berhubungan dengan katabolisme sumber karbon tersebut. Fenomena ini mula-mula dinamakan sebagai efek glukosa. Istilah represi katabolit digunakan karena nutrien nonglukosa yang dapat dioksidasi juga menghasilkan efek

serupa. (Murray *et al.* 2004).

Represi katabolit berlangsung dengan perantaraan cAMP. cAMP bekerja melalui suatu reseptor protein (CRP). CRP merupakan protein dimer yang memiliki dua subunit identik yang masing-masing mampu mengikat satu molekul cAMP. CRP memiliki dua domain yang berbeda. Bagian ujung N mengikat cAMP dan bagian ujung C terikat pada DNA. Adanya cAMP menyebabkan CRP melakukan perubahan konfigurasi alosterik yang menyebabkan terbentuknya ikatan dengan bagian DNA yang spesifik dekat dengan daerah promotor operon yang bergantung cAMP. Ikatan ini memungkinkan RNA polimerase untuk terikat dan memulai transkripsi pada daerah sekitar 30 sampai 50 nukleotida dari daerah pengikatan CRP. Substrat yang mampu dimetabolisme seperti glukosa secara cepat meningkatkan konsentrasi ATP dan menurunkan cAMP sehingga merepresi operon yang bergantung pada cAMP (Fennington *et al.* 1984).

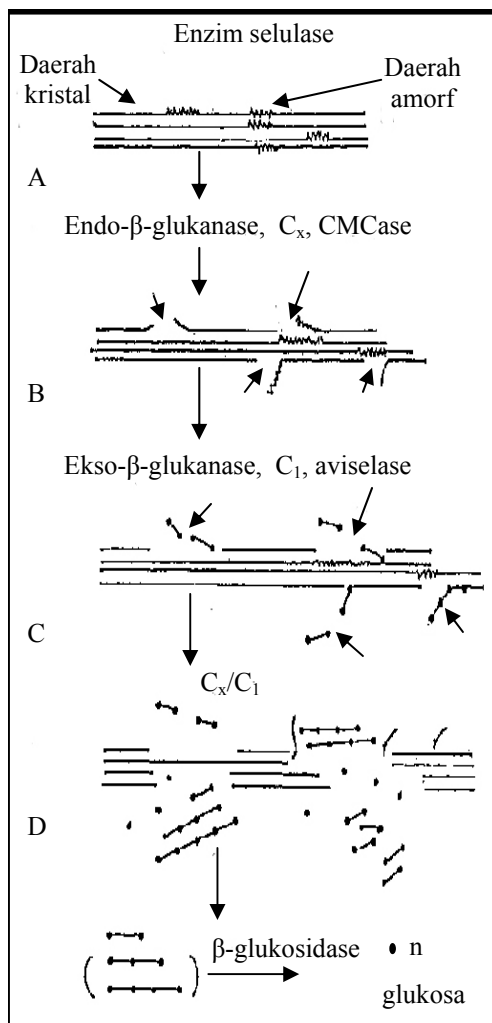
Selulase merupakan enzim induktif yang biosintesisnya dipengaruhi oleh induser dan represor. Selulosa, selobiosa, saforos dan laktosa merupakan induser selulase, sedangkan glukosa dan gliserol dikenal sebagai represor yang efektif. Hal ini sejalan dengan pernyataan Gong dan Tsao (1979) yang menyatakan bahwa berlebihnya gula terlarut di dalam pertumbuhan sel dapat menekan produksi enzim.

## BAHAN DAN METODE

### Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian yaitu autopipet 250-1000  $\mu$ l dan 40-200  $\mu$ l, sentrifus berpendingin Beckman GS-ISR, sentrifus Clements model B-Universal, spektrofotometer UV-Vis, neraca analitik, penangas air, inkubator bergoyang, *magnetic stirrer*, autoklaf, *Willey Mill*, oven, tanur, dan lemari pendingin.

Bahan-bahan yang dipakai yaitu kapang *Penicillium nalgiovense* SS240 dan *Eupenicillium javanicum* BS4 koleksi Balai Penelitian Ternak, *Potato Dextrose Agar* (PDA), *yeast extract*, bacto pepton, NaOH 0.5%, medium Mandels, tandan sawit, polard gandum, Natrium azida 20%, *Comassie Brilliant Blue* (CBB), *Bovine Serum Albumin* (BSA), asam dinitrosalisilat (DNS), bufer sitrat, glukosa, kertas saring Whatman no.1, p-nitrofenil-glukosida (p-NPC) dan p-nitrofenol.



Gambar 1 Skema tahap-tahap pemecahan selulosa

## Metode

### Perlakuan Substrat

Tandan sawit yang berasal dari perkebunan kelapa sawit Bengkulu dan polard digunakan sebagai substrat kapang *P. nalgiovense* SS240 dan *E. javanicum* BS4. Sebelum digunakan sebagai substrat, tandan dipelakukan terlebih dahulu yaitu dengan penggilingan tanpa pencucian NaOH yang digunakan sebagai kontrol dan penggilingan disertai pencucian dengan NaOH. Sedangkan polard dipelakukan dengan NaOH.

Tandan sawit sebelum digiling, digunting kecil-kecil terlebih dahulu kemudian tandan beserta polard digiling dengan *Willey Mill*. Metode perlakuan substrat dengan NaOH mengikuti metode Purwadaria (1988). Sebanyak 25 g tandan dan polard masing-masing dimasukkan ke dalam larutan NaOH 0.5% (w/v) selama 1 jam pada suhu 100° C. Setelah itu tandan dan polard disaring dan dicuci secara terus menerus hingga cairan hasil perasan memiliki pH netral yang diuji dengan kertas indikator universal. Tandan dan polard kemudian disimpan dalam oven suhu 40° C selama 2 hari. Tandan dan polard yang telah kering digiling kembali dengan *Willey Mill*.

### Produksi Enzim

Kapang *P. nalgiovense* SS240 dan *E. javanicum* BS4 ditanam dalam PDA miring hingga berspora merata selama 4 hari. Suspensi spora dibuat dengan menambahkan 2 ml larutan NaCl 0.9% ke dalam tabung PDA kemudian suspensi dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 ml yang berisi 50 ml medium Mandels, yeast extract 0.30% dan pepton 0.075%. Terdapat 3 jenis substrat yang digunakan untuk pertumbuhan kapang yaitu tandan sawit dengan perlakuan NaOH (Tn); tandan sawit tanpa perlakuan NaOH (To); polard dengan perlakuan NaOH (Pn). Substrat Tn dan To digunakan untuk pertumbuhan *E. javanicum* BS4 (E) dan *P. nalgiovense* SS240 (P). Sedangkan Pn digunakan sebagai substrat bagi *P. nalgiovense* SS240. Setiap substrat dimasukkan ke dalam Erlenmeyer sebanyak 3% dan diinokulasi. Setelah inokulasi selanjutnya diinkubasi pada suhu 37° C dalam inkubator bergoyang dengan kecepatan 150 rpm. Waktu inkubasi dipilih selama 4 dan 5 hari. Setelah waktu inkubasi selesai, ditambahkan natrium azida sebanyak 0.2% dari volume akhir medium. Kultur media disentrifugasi pada 7000 rpm pada suhu 4° C selama 20 menit. Supernatan diambil kemudian disimpan dalam freezer.

### Optimasi Produksi Selulase

Optimasi produksi selulase dilakukan melalui tiga tahap percobaan. Tahapan pertama dari penelitian ini adalah membandingkan aktivitas sakarifikasi selulase dari lima jenis perlakuan yaitu *E. javanicum* BS4 yang ditumbuhkan pada tandan sawit tanpa perlakuan NaOH (ETo), *E. javanicum* BS4 yang ditumbuhkan pada tandan sawit dengan perlakuan NaOH (ETn), *P. nalgiovense* SS240 yang ditumbuhkan pada tandan sawit tanpa perlakuan NaOH (PTo), *P. nalgiovense* SS240 yang ditumbuhkan pada tandan sawit dengan perlakuan NaOH (PTn) dan *P. nalgiovense* SS240 yang ditumbuhkan pada polard dengan perlakuan NaOH (PPn). Perlakuan terbaik untuk *E. javanicum* BS4 dan *P. nalgiovense* SS240 digunakan untuk tahapan selanjutnya.

Tahapan kedua dari penelitian ini adalah optimasi produksi selulase dengan merubah sumber nitrogen pada media Mandels. Sumber nitrogen yang digunakan adalah amonium sulfat + urea sebagai media standar dan natrium nitrat. Masing-masing sumber nitrogen dipakai dalam medium pertumbuhan pada kapang *E. javanicum* BS4 dan *P. nalgiovense* SS240. Perlakuan yang menghasilkan aktivitas sakarifikasi dipilih untuk tahapan ketiga. Tahap ketiga adalah dengan mengubah konsentrasi nitrogen dalam Mandels. Dalam medium Mandels, konsentrasi nitrogen dibuat setengah dan dua kali lipat dibandingkan konsentrasi awal. Enzim yang diamati pada tahapan ketiga ini adalah CMCCase,  $\beta$ -glukosidase dan sakarifikasi.

### Analisis Aktivitas CMCCase

Aktivitas CMCCase ditentukan berdasarkan metode Haggett *et al.* (1979). Ekstrak enzim dengan pengenceran yang tepat, bufer sitrat 0.05M, dan substrat (CMC 1% dalam larutan bufer pH 5.0 dan 1.0 ml NaN<sub>3</sub> 20%) masing-masing diprainskubasi lebih dahulu selama lima menit pada suhu 50° C. Enzim sebanyak 0.5 ml dicampur dengan bufer sitrat 0.5 ml lalu ditambah substrat 0.5 ml dan divorteks. Campuran kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu 50° C. DNS sebanyak 1.5 ml ditambahkan untuk menghentikan aktivitas enzim lalu dipanaskan dalam penangas air 100° C selama 15 menit dan divorteks. Kontrol dibuat dengan mencampurkan terlebih dahulu DNS dengan bufer sitrat dan substrat kemudian enzim ditambahkan. Blanko dibuat dengan mencampurkan 0.5 ml akuades dengan 1.0 ml bufer dan 1.5 ml DNS. Kontrol

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

dan blanko tidak diinkubasi terlebih dahulu namun langsung dipanaskan dalam penangas air 100° C selama 15 menit. Intensitas warna diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm dan dibandingkan dengan kurva standar glukosa. Larutan standar glukosa dibuat pada kisaran 0-750 µg/ml. Larutan standar glukosa sebanyak 0.5 ml, ditambah dengan bufer 0.5 ml, 0.5 substrat dan 1.5 ml DNS dipanaskan dalam penangas air 100° C selama 15 menit.

Satu unit aktivitas enzim adalah banyaknya enzim yang dapat memproduksi 1 µmol glukosa per menit pada kondisi percobaan dengan perhitungan sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas CMCCase (U/ml)} = \frac{[\text{gula sampel}] - [\text{gula kontrol}] \times \text{fp}}{\text{Waktu inkubasi (menit)} \times \text{BM glukosa}}$$

fp = faktor pengenceran enzim  
1 U = µmol gula produk/menit

### β-Glukosidase

Aktivitas β-glukosidase ditentukan berdasarkan metode Nurbayti (2002). Substrat yang digunakan adalah p-NPG 0.1% (b/v). Ekstrak enzim, larutan bufer sitrat pH 5.0 dan substrat diprainskubasi selama 10 menit pada suhu 50° C. Setelah itu ekstrak enzim dengan pengenceran yang tepat sebanyak 0.5 ml dicampurkan dengan 0.5 ml bufer sitrat dan 0.5 ml substrat. Larutan kemudian diinkubasi pada suhu 50° C selama 60 menit. Setelah waktu inkubasi selesai, ditambahkan larutan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M sebanyak 1.0 ml lalu divorteks dan diukur intensitas cahaya pada panjang gelombang 400 nm. Kontrol dibuat dengan komposisi yang sama namun enzim dicampur setelah penambahan larutan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M sebanyak 1.0 ml. Sebagai blanko digunakan 1 ml akuades, larutan bufer 0.5 ml dan 1 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Larutan standar dibuat dengan menggunakan larutan p-nitrofenol sebagai larutan standar. Kisaran konsentrasi standar adalah 0-30 µg/ml.

Satu unit (U) aktivitas enzim β-glukosidase adalah banyaknya enzim yang dapat menghasilkan 1 µmol nitrofenol dalam 1 menit pada kondisi percobaan, dengan perhitungan sebagai berikut

$$\text{Aktivitas } \beta\text{-glukosidase (U/ml)} = \frac{[\text{nitrofenol sampel-kontrol}] \times \text{fp}}{\text{Waktu inkubasi} \times \text{BM nitrofenol}}$$

fp = faktor pengenceran enzim  
1 U = µmol nitrofenol/menit

### Penentuan Aktivitas Sakarifikasi

Sebanyak 2 ml ekstrak enzim dimasukkan ke dalam tabung McCartney, dicampur

dengan 2 ml substrat dedak kemudian diinkubasi dalam inkubator bergoyang pada kecepatan 120 rpm pada suhu 42° C dengan waktu inkubasi 2 jam. Aktivitas enzim dihentikan dengan memasukkan tabung dalam air mendidih selama 10 menit. Kadar gula pereduksi diukur dengan metode DNS dengan mencampurkan 0.5 ml filtrat, 0.5 ml akuades dan 1.5 ml DNS.

$$\text{Aktivitas sakarifikasi (}\mu\text{mol/ml)} = \frac{[\text{glukosa sampel} - \text{kontrol}] \times \text{fp} \times 2}{\text{BM glukosa}}$$

fp = faktor pengenceran enzim

### Analisis Kadar Protein

Analisis kadar protein dilakukan untuk mengetahui aktivitas spesifik selulase. Metode yang digunakan adalah metode Bradford (1976), yaitu berdasarkan pengikatan zat warna CBB dengan protein. Sebanyak 0.2 ml ekstrak enzim ditambah 5 ml pereaksi CBB divorteks lalu diukur intensitas cahayanya pada panjang gelombang 595 nm setelah 10 menit. Standar dibuat dari larutan BSA sebanyak 0.2 ml dengan deret konsentrasi antara 0-800 µg/ml.

Aktivitas spesifik enzim diketahui dengan perhitungan sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas spesifik (U/mg)} = \frac{1000 \times \text{aktivitas enzim (U/ml)}}{\text{Kadar protein (}\mu\text{g/ml)}}$$

### Rancangan Penelitian

Uji statistika digunakan untuk mengetahui pengaruh dari suatu perlakuan. Penelitian tahap pertama menggunakan lima perlakuan yang berbeda yaitu *E. javanicum* BS4 yang ditanam pada substrat tandan sawit dengan perlakuan NaOH (ETn), *E. javanicum* BS4 yang ditanam pada substrat tandan sawit tanpa perlakuan (ETo), *P. nalgiovense* SS240 yang ditanam pada substrat tandan sawit perlakuan NaOH (PTn), *P. nalgiovense* SS240 yang ditanam pada substrat tandan sawit tanpa perlakuan (PTo) dan *P. nalgiovense* SS240 yang ditanam pada substrat polard (PPn). Perlakuan-perlakuan ini diuji dengan metode kontras ortogonal. Penelitian tahap dua diuji dengan metode Rancangan Acak Lengkap dua faktorial. Faktor pertama adalah jenis kapang yang terdiri dari *E. javanicum* BS4 dan *P. nalgiovense* SS240 sedangkan faktor kedua adalah sumber nitrogen yaitu amonium sulfat + urea dengan Natrium nitrat. Tahap ketiga penelitian ini diuji dengan Rancangan Acak Lengkap yaitu faktor konsentrasi nitrogen dalam media. Perlakuan yang menghasilkan perbedaan nyata ( $P < 0.05$ ) diuji lanjutan dengan uji Duncan dengan beda 0.05.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Optimasi Produksi Selulase dengan Variasi Perlakuan Substrat

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa aktivitas sakarifikasi enzim hasil optimasi dengan perlakuan substrat berbeda nyata ( $p < 0.05$ ) antar perlakuan (lampiran 4). *E. javanicum* BS4 yang ditanam pada substrat tandan sawit tanpa perlakuan (ETo) menghasilkan aktivitas sakarifikasi enzim paling tinggi yaitu 247.43  $\mu\text{mol/ml}$ . *P. nalgiovense* SS240 yang ditanam pada tandan sawit perlakuan (PTn) dan *P. nalgiovense* SS240 yang ditanam pada tandan sawit tanpa perlakuan (PTo) menghasilkan enzim dengan aktivitas yang tidak berbeda nyata ( $p > 0.05$ ). Adapun polard NaOH (PPn) menghasilkan enzim dengan aktivitas terendah yaitu sekitar 120.9  $\mu\text{mol/ml}$ . Begitu juga halnya dengan aktivitas spesifik, PTo dan PTn menghasilkan aktivitas yang tidak berbeda nyata satu sama lain ( $p > 0.05$ ) namun aktivitasnya lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan lain. Aktivitas spesifik yang dihasilkan oleh PTo adalah 2519  $\mu\text{mol/ml}$  dan PTn sekitar 2452  $\mu\text{mol/ml}$ . Tabel 2 memperlihatkan aktivitas sakarifikasi dan aktivitas spesifik enzim selulase yang dihasilkan oleh semua perlakuan.

*E. javanicum* BS4 merupakan kapang yang berhasil diisolasi dari inti buah sawit (Purwadaria *et al.* 1994). Komposisi tandan dan inti buah sawit tidak jauh berbeda sehingga kemiripan lingkungan yang ada dengan habitat aslinya mampu membuat *E. javanicum* BS4 bekerja lebih optimal dibandingkan lainnya. Aktivitas sakarifikasi yang dihasilkan oleh enzim ini lebih besar dibandingkan dengan enzim yang dihasilkan oleh enzim yang dihasilkan pada substrat

tandan tanpa perlakuan. Hasil penelitian ini berlawanan dengan hasil yang diperoleh pada penelitian yang dilakukan oleh Rakhmani *et al.* (2005). Beliau melaporkan bahwa aktivitas FPase yang dihasilkan oleh kapang ini yang ditanam pada substrat tandan sawit tanpa perlakuan lebih rendah dibandingkan yang ditanam pada substrat tandan sawit dengan perlakuan NaOH. Hasil uji tahap pertama ini juga memperlihatkan bahwa aktivitas enzim yang dihasilkan oleh *E. javanicum* BS4 lebih tinggi dibandingkan yang dihasilkan oleh *P. nalgiovense* SS240. Hal ini sejalan dengan penelitian Purwadaria *et al.* (2003) yang melaporkan bahwa *E. javanicum* BS4 menghasilkan enzim dengan aktivitas sakarifikasi yang lebih besar dibandingkan *Aspergillus niger* NRRL 337 pada substrat bungkil sawit dan lumpur sawit.

Aktivitas spesifik menggambarkan aktivitas enzim untuk setiap mg enzim. Tingginya aktivitas spesifik enzim yang dihasilkan oleh *P. nalgiovense* SS240 pada tandan tanpa perlakuan diakibatkan rendahnya protein yang dihasilkan. Protein terukur yang dihasilkan oleh *P. nalgiovense* SS240 pada substrat tandan sawit sebesar 72  $\mu\text{g/ml}$  (Tabel 2). Akan tetapi besarnya aktivitas spesifik enzim ini yang dihasilkan oleh *P. nalgiovense* SS240 yang ditanam pada substrat tandan sawit tanpa perlakuan tidak berbeda nyata ( $p < 0.05$ ) dengan aktivitas spesifik enzim yang dihasilkan oleh kapang ini yang ditanam pada substrat tandan sawit dengan perlakuan NaOH. Begitu pula dengan aktivitas sakarifikasi dan protein yang dihasilkan tidak ada perbedaan yang nyata.

Enzim yang dihasilkan oleh kapang *P. nalgiovense* SS240 yang ditanam pada substrat polard menghasilkan enzim dengan

Tabel 2 Aktivitas sakarifikasi selulase dari kapang *E. javanicum* BS4 dan *P. nalgiovense* SS240 pada substrat tandan dan polard

Sampel	Kandungan protein ( $\mu\text{g/ml}$ )	Aktivitas sakarifikasi ( $\mu\text{mol/ml}$ )*	Aktivitas spesifik sakarifikasi ( $\mu\text{mol/mg}$ )*
ETn	128	150.6 <sup>c</sup>	1221 <sup>b</sup>
ETo	257	247.4 <sup>a</sup>	978 <sup>b,c</sup>
PTn	83	201.8 <sup>b</sup>	2452 <sup>a</sup>
PTo	72	180.7 <sup>b,c</sup>	2519 <sup>a</sup>
PPn	178	120.9 <sup>d</sup>	692 <sup>c</sup>

Keterangan :

ETn = *E. javanicum* BS4 yang ditanam pada substrat tandan sawit perlakuan NaOH

ETo = *E. javanicum* BS4 yang ditanam pada substrat tandan sawit tanpa perlakuan NaOH

PTn = *P. nalgiovense* SS240 yang ditanam pada substrat tandan sawit perlakuan NaOH

PTo = *P. nalgiovense* SS240 yang ditanam pada substrat tandan sawit tanpa perlakuan NaOH

PPn = *P. nalgiovense* SS240 yang ditanam pada substrat polard perlakuan NaOH

\* Huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan beda nyata ( $p < 0.05$ )



- Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
    - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
    - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
  2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

aktivitas paling rendah. Rendahnya aktivitas ini mungkin berhubungan dengan lebih rendahnya kandungan selulosa dalam polard dan derajat kristalinitas. Selulase merupakan enzim yang produksinya diinduksi oleh suatu induser yang salah satunya adalah selulosa. Polard yang dicuci dengan NaOH mengandung selulosa sebesar 26.9% (Purwadaria *et al.* 2004) sedangkan tandan tanpa pencucian mengandung selulosa sebesar 32.6% (Darwis 1988). Selain itu polard juga mengandung gula pereduksi yang tinggi sehingga merepresi pembentukan enzim selulase. Adapun lebih tingginya protein yang dihasilkan pada perlakuan ini dibandingkan perlakuan lain dengan kapang yang sama berhubungan dengan tingginya kandungan protein dalam polard itu sendiri.

Lebih tingginya kandungan protein dan aktivitas sakarifikasi yang dihasilkan oleh *E. javanicum* BS4 yang ditanam pada substrat tandan sawit tanpa perlakuan menjadikan dasar pemilihan perlakuan ini untuk digunakan pada tahap penelitian selanjutnya. Aktivitas sakarifikasi dan protein yang dihasilkan kapang dengan perlakuan ini berbeda nyata dengan yang dihasilkan pada tandan dengan perlakuan. Adapun *P. nalgiovense* SS240 yang ditanam pada substrat tandan tanpa perlakuan dipilih untuk penelitian selanjutnya disebabkan aktivitas spesifiknya tertinggi. Enzim memiliki aktivitas sakarifikasi yang rendah tetapi dengan aktivitas spesifik yang tinggi, peningkatan protein akan meningkatkan produksi enzim. Walaupun protein dan aktivitas sakarifikasi yang dihasilkan oleh *P. nalgiovense* SS240 yang ditanam pada tandan dengan perlakuan NaOH lebih tinggi akan tetapi perbedaannya tidak berbeda nyata ( $p < 0.05$ ) dengan *P. nalgiovense* SS240 yang ditanam pada tandan tanpa perlakuan.

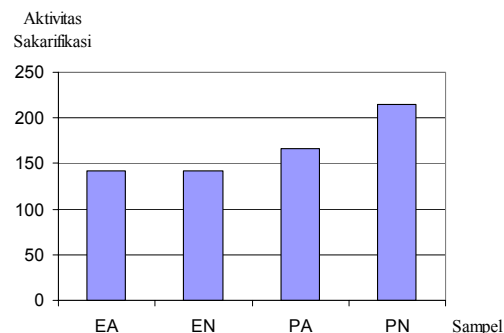
### Optimasi Produksi Enzim dengan Variasi Sumber Nitrogen dalam Medium

Hasil uji RAL dua faktorial menunjukkan bahwa tidak terdapat interaksi antara kapang dengan sumber nitrogen ( $p > 0.05$ ) terhadap aktivitas enzim (Lampiran 4). Perbedaan sumber nitrogen juga tidak menghasilkan aktivitas sakarifikasi dan spesifik yang berbeda nyata ( $p > 0.05$ ). Nitrat menghasilkan aktivitas sakarifikasi rata-rata sebesar 178.9  $\mu\text{mol/ml}$  sedangkan amonium menghasilkan aktivitas rata-rata sebesar 154.4  $\mu\text{mol/ml}$ . Perbedaan nyata ( $p < 0.05$ ) terjadi antar kapang yang digunakan. *P. nalgiovense* SS240 menghasilkan aktivitas sakarifikasi sebesar

191.0  $\mu\text{mol/ml}$  sedangkan *E. javanicum* BS4 menghasilkan aktivitas sakarifikasi sebesar 142.3  $\mu\text{mol/ml}$ .

Berdasarkan Gambar 2 sampel PN menghasilkan enzim dengan aktivitas sakarifikasi tertinggi yaitu sebesar 215.3  $\mu\text{mol/ml}$  dengan kandungan protein 135  $\mu\text{g/ml}$ . Hasil ini memperkuat penelitian Rajoka (2004) yang melaporkan bahwa penggunaan natrium nitrat sebagai sumber nitrogen menghasilkan aktivitas FPase paling tinggi dibanding sumber nitrogen lainnya pada bakteri *Cellulomonas flavigena*. Natrium nitrat, kalium nitrat dan amonium nitrat merupakan sumber nitrogen terbaik karena *C. flavigena* memiliki kandungan nitrat reduktase dengan aktivitas yang tinggi yang diinduksi oleh ion  $\text{NO}_3$  dan direpresi oleh ion amonium bebas dalam medium tumbuh. Selain itu senyawa ini mampu meningkatkan pertumbuhan massa sel dan produksi FPase.

Natrium nitrat mampu menghasilkan enzim dengan aktivitas yang lebih tinggi dibandingkan amonium sulfat pada kedua kapang yang digunakan. Secara rata-rata, natrium nitrat menghasilkan aktivitas sakarifikasi sebesar 178.9  $\mu\text{mol/ml}$  sedangkan amonium menghasilkan aktivitas sakarifikasi rata-rata sebesar 154.4  $\mu\text{mol/ml}$ . Krishna (1999) melaporkan bahwa penggunaan amonium sulfat ataupun natrium nitrat memberikan efek yang sama terhadap aktivitas enzim. Laju produksi selulase meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi amonium sulfat dan natrium nitrat dalam medium sampai 1% (w/w). Pada penelitian ini kadar protein rata-rata yang dihasilkan oleh sumber nitrogen yang berasal dari nitrat lebih besar dibandingkan yang dihasilkan dari sumber nitrogen amonium sulfat dan urea. Penelitian yang dilakukan



Gambar 2 Aktivitas sakarifikasi *E. javanicum* BS4 (E) dan *P. nalgiovense* SS240 (P) dengan sumber nitrogen amonium sulfat + urea (A) dan natrium nitrat (N)

oleh Kashem *et al.* (2004) menunjukkan bahwa penggunaan  $KNO_3$  mampu menginduksi produksi secara maksimal protein ekstraseluler, gula pereduksi dan persentase sakarifikasi.

Hasil uji ini dijadikan acuan bagi penelitian selanjutnya. Kapang *P. nalgiovense* SS240 dengan sumber nitrogen natrium nitrat (PN) digunakan sebagai sampel yang digunakan untuk tahap penelitian selanjutnya. Kapang ini menghasilkan aktivitas sakarifikasi tertinggi dibandingkan yang lain dan produksi enzim yang besar. Walaupun aktivitas spesifiknya lebih kecil dibandingkan perlakuan PA namun perbedaan ini tidak nyata ( $p>0.05$ ). Aktivitas spesifik untuk perlakuan PA adalah sebesar 2072  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  sedangkan untuk perlakuan PN adalah 1682  $\mu\text{mol}/\text{mg}$ . Apabila dibandingkan aktivitas sakarifikasi dari kedua kapang yang digunakan *P. nalgiovense* SS240 menghasilkan enzim dengan aktivitas sakarifikasi rata-rata sebesar 191.0  $\mu\text{mol}/\text{ml}$  sedangkan *E. javanicum* BS4 hanya menghasilkan aktivitas sakarifikasi rata-rata sebesar 142.2  $\mu\text{mol}/\text{mg}$ .

**Optimasi Produksi Enzim dengan Variasi Konsentrasi Sumber Nitrogen dalam Medium**

Optimasi produksi selulase pada *P. nalgiovense* SS240 pada tahap ini dilakukan dengan merubah konsentrasi sumber nitrogen yang terdapat dalam medium cair Mandels. Aktivitas sakarifikasi hasil optimasi produksi selulase pada tandan sawit dengan variasi konsentrasi sumber nitrogen disajikan pada Tabel 3. Konsentrasi nitrogen sebanyak 0.017% (w/v) menghasilkan enzim dengan aktivitas sakarifikasi tertinggi dibandingkan perlakuan lain yaitu 172.4  $\mu\text{mol}/\text{ml}$  namun aktivitas spesifiknya paling rendah yaitu 958  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  dikarenakan besarnya kadar protein yang dihasilkan, sedangkan aktivitas spesifik tertinggi dicapai oleh perlakuan dengan

konsentrasi 0.068% (w/v) yaitu sebesar 1284  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  dengan aktivitas sakarifikasi sebesar 170.0  $\mu\text{mol}/\text{ml}$ . Produksi selulase sensitif terhadap sumber nitrogen dan konsentrasi nitrogen dalam medium (Desai *et al.* 1982 di dalam Fadel 2000). Beberapa penelitian telah melaporkan bahwa penggunaan nitrogen organik atau anorganik seperti ekstrak khamir, tepung kedelai mempengaruhi produksi selulase. Aktivitas CMCase dan  $\beta$ -glukosidase disajikan pada Gambar 3a. Berdasarkan analisis ragam diketahui bahwa variasi konsentrasi nitrogen tidak memberikan perbedaan yang nyata antar perlakuan (Lampiran 4) tetapi medium dengan konsentrasi nitrogen 0.017% (w/v) menghasilkan aktivitas CMCase dan  $\beta$ -glukosidase paling tinggi yaitu sebesar 0.027 U/ml dan 0.046 U/ml. Medium dengan konsentrasi 0.034% dan 0.068% menghasilkan aktivitas CMCase sebesar 0.015 U/ml dan 0.017 U/ml serta aktivitas  $\beta$ -glukosidase sebesar 0.034 U/ml dan 0.046 U/ml. Adapun aktivitas spesifik kedua enzim ini disajikan pada Gambar 3b. Pada gambar tersebut terlihat bahwa aktivitas spesifik CMCase dari enzim yang dihasilkan oleh kapang *P. nalgiovense* SS240 dengan konsentrasi sumber nitrogen 0.017% (w/v) lebih tinggi dibandingkan perlakuan lain yaitu sebesar 0.147 U/mg protein. Sedangkan aktivitas spesifik  $\beta$ -glukosidase paling tinggi dihasilkan oleh enzim yang berasal dari kapang dengan konsentrasi 0.068% (w/v) yaitu sebesar 0.279 U/mg protein.

Protein yang dihasilkan makin rendah ketika konsentrasi nitrogen dinaikkan. Rendahnya protein yang diproduksi mungkin diakibatkan efek represi katabolit oleh nitrogen namun protein yang terepresi bukan protein enzim. Hal ini terlihat dari aktivitas enzim yang tinggi pada konsentrasi nitrogen yang tinggi. CIS2, gen yang mengkodekan  $\gamma$ -glutamyl-transpeptidase yang berperan dalam katabolisme glutation diinduksi oleh L-

Tabel 3 Aktivitas selulase *P. nalgiovense* SS240 pada berbagai konsentrasi sumber nitrogen

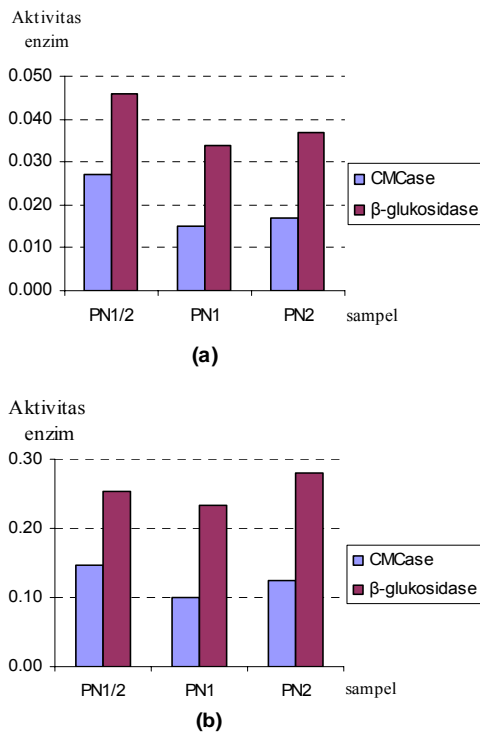
Sampel	Kandungan protein ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Aktivitas sakarifikasi ( $\mu\text{mol}/\text{ml}$ )	Aktivitas spesifik sakarifikasi ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$ )
PN $\frac{1}{2}$	180	172.4	958
PN1	148	160.3	1086
PN2	136	170.0	1284

Keterangan :

- PN $\frac{1}{2}$  = *P. nalgiovense* SS240 dengan konsentrasi nitrogen 0.017% (w/v)
- PN1 = *P. nalgiovense* SS240 dengan konsentrasi nitrogen 0.034% (w/v)
- PN2 = *P. nalgiovense* SS240 dengan konsentrasi nitrogen 0.068% (w/v)

- Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
    - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
    - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
  2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

- Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
    - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
    - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
  2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



Gambar 3 Aktivitas CMCCase dan β-glukosidase (a) dan spesifik CMCCase dan β-glukosidase (b) *P. nalgiovensis* SS240 dengan variasi konsentrasi sumber nitrogen

glutamat dan L-prolin namun direpresi oleh NH<sub>4</sub><sup>+</sup> atau L-glutamin (Springael dan Penninckx 2003). Karboksimetil selulase (CMCase) merupakan bagian dari endoglukanase yang memutus selulosa dengan mekanisme endo. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Fadel (2000) pada CMCase yang diproduksi oleh *Aspergillus niger*, glukosa dan maltosa mampu menginduksi produksi enzim ini. Hasil penelitian lain menunjukkan glukosa dalam konsentrasi rendah tidak merepresi sintesis CMCase namun ketika glukosa yang ditambahkan dalam konsentrasi tinggi (10%) sintesis CMCase dihambat (Sanyal *et al.* 1988 di dalam Fadel 2000).

## SIMPULAN DAN SARAN

### Simpulan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa proses perlakuan secara kimiawi terhadap tandan sawit tidak mampu meningkatkan aktivitas enzim yang dihasilkan oleh *E. javanicum* BS4 dan *P. nalgiovensis* SS240. Tandan sawit menghasilkan enzim dengan aktivitas yang lebih tinggi dibandingkan polard pada kapang *P. nalgiovensis* SS240.

Sumber nitrogen yang paling baik bagi produksi enzim selulase adalah natrium nitrat pada kapang *P. nalgiovensis* SS240 dengan aktivitas sakarifikasi sebesar 215.3 μmol/ml. Amonium sulfat 0.14% + urea 0.03% dan natrium nitrat 0.20% tidak memberikan pengaruh yang nyata (p>0.05) terhadap aktivitas enzim. Pada tahap ketiga aktivitas CMCase, β-glukosidase dan sakarifikasi tertinggi dihasilkan oleh perlakuan dengan konsentrasi nitrogen sebesar 0.017% yaitu dengan aktivitas sebesar 0.027 U/ml, 0.046 U/ml dan 172.4 μmol/ml. Namun perbedaan konsentrasi nitrogen juga tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap aktivitas enzim (p>0.05).

### Saran

Kapang *P. nalgiovensis* SS240 mampu menghasilkan enzim dengan aktivitas yang tinggi pada substrat tandan sawit. Salah satu kelemahan organisme mutan adalah kembalinya sifat yang dimiliki seperti tipe liarnya sehingga diperlukan penyimpanan yang baik agar tidak kembali seperti tipe liarnya. Selain itu, aplikasi langsung enzim terhadap pakan ternak perlu dilakukan untuk mengetahui keefektifan dan efisiensi enzim sebagai suplemen pakan.

### DAFTAR PUSTAKA

- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254
- Campbell L, Bedford MR. 1992. Enzyme application for monogastric feeds: a review. *Can. J. Anim. Sc.* **72**:449-466.
- Darwis AA, Bunasor T, Hartato L, Alisyahbana M. 1988. Studi Limbah Lignoselulolitik di Indonesia. Di dalam: Irawadi TT. 1991. Produksi enzim ekstraseluler (selulase dan xilanase) dari *Neurospora sitophila* pada substrat limbah padat kelapa sawit [disertasi]. Bogor. Fakultas Pascasarjana. IPB.
- Desai JD, Desai AJ, Patel NP. 1982. Production of cellulases and β-glucosidase by shake culture of *Scytalidium lignicola*. Di dalam: Fadel M. 2000. Production physiology of cellulases and β-glucosidase enzymes of *Aspergillus niger* grown under solid state fermentation conditions. *J Biol Sci* **1**: 401-411.

**Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang**

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

- Diwyanto K, Sitompul D, Manti I, Mathius IW, Soentoro. 2003. Pengkajian Pengembangan Usaha sistem integrasi kelapa sawit-sapi. Di dalam: Bambang Setiadi *et al.* editor. *Sistem integrasi Kelapa Sawit-Sapi. Prosiding Lokakarya Nasional. Bengkulu*, 9-10 September 2003. Bogor: Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Pemerintah Provinsi Bengkulu dan PT. Agrinical.
- Elisabeth J, Ginting SP. 2003. Pemanfaatan hasil samping industri kelapa sawit sebagai bahan pakan ternak sapi potong. di dalam: Bambang Setiadi *et al.* editor. *Sistem integrasi Kelapa Sawit-Sapi. Prosiding Lokakarya Nasional. Bengkulu*, 9-10 September 2003. Bogor: Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Pemerintah Provinsi Bengkulu dan PT. Agrinical.
- Enari TM. 1983. Microbial cellulases. Di dalam Fogarty WM, editor. *Microbial Enzymes and Biotechnology. Appl. Sci.* New York: Publisher.
- Fadel M. 2000. Production physiology of cellulases and  $\beta$ -glucosidase enzymes of *Aspergillus niger* grown under solid state fermentation conditions. *J Biol Sci* 1: 401-411.
- Fennington G, Neubauer D, Stutzenberger F. 1984. Cellulase biosynthesis in a catabolite repression-resistant mutant of *Thermomonospora curvata*. *Appl Environ Microbiol* 47: 201-204.
- Ginoga R. 2004. Perbandingan aktivitas selulase mutan *Penicillium nalgiovense* dengan tipe liarnya [skripsi]. Bogor: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Pakuan.
- Gong CS, Tsao GT. 1979. Cellulase and biosynthesis regulation. *Ann Repts Ferment Processes* 3: 111-139.
- Haggett KD, Gray PP, Dunn NW. 1979. Crystalline cellulose degradation by a strain of *Cellulomonas* and its mutants derivatives. *Eur J Appl Microb Biotechnol* 8:183-190
- Josefiak D, Rutkowski A, Martin SA. 2004. Carbohydrates fermentation in the avian ceca: a review. *Anim Feed Sci Technol* 113:1-15.
- Kashem MA, Manchur MA, Rahman MS, Anwar M. 2004. Effect of carbon and nitrogen source on the production of reducing sugars, extra-cellular protein and cellulolytic enzymes by two cellulolytic bacterial isolates. *Pak J Biol Sci* 7: 1660-1663.
- Kim C. 1995. Characterization and substrate specificity of an endo-b-1,4-d-glucanase I (avicelase II) from an extracellular multienzyme complex of *Bacillus circulans*. *Appl Environ Microbiol* 61: 959-965.
- Krishna C. 1999. Production of bacterial cellulases by solid state bioprocessing of banana wastes. *Bioresour Technol.* 69:231 – 239
- Liwang T. 2003. Palm Oil effluent management. *Burotrop* 19:38.
- Mandels M, Stenberg D. 1979. Recent advances in cellulase technology. *J Ferment Technol* 54: 267-276
- Murray RK, Daryl KG, Peter AM, Victor WR. 2004. *Biokimia Harper*. Edisi ke-25. Hartono A, penerjemah; Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC. Terjemahan dari: *Harper's Biochemistry*.
- Nurbayti S. 2002. Produksi dan karakterisasi selulase *Penicillium nalgiovense* Laxa dari sarang rayap [tesis]. Depok: Pascasarjana FMIPA UI.
- Ponce-Noyola T, De La Torre. 2001. Regulation of cellulase and xylanase from a derepressed mutant of *Cellulomonas flavigena* growing in sugar-cane bagasse in continuous culture [abstrak]. *Bioresour Technol* 80:91.
- Purwadaria T, Nirwana N, Ketaren PP, Pradono DI, Widyastuti Y. 2003. Synergistic activity of enzymes produced by *Eupenicillium javanicum* dan *Aspergillus niger* NRRL 337 on palm oil factory wastes. *Biotropia*. 20:1 – 10
- Purwadaria T, Haryati T, Darma J. 1994. isolasi dan seleksi kapang mesofilik penghasil mananase. *Ilmu dan Peternakan*. 7(2):26-29
- Purwadaria T, Kumalasari AT, Haryati T, Ketaren PP, Sinurat AP. 2004. Optimization of cellulase production with *Penicillium nalgiovense* S11 grown on pretreated wheat pollard. *Biotropia* 23:1-12.



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

- Rakhmani S, Zahra, Purwadaria T, Widyastuti Y. 2005. Enzymes production by *Aspergillus oryzae* Te3b, *Rhizopus oryzae* Ssa, and *Eupenicillium javanicum* BS4 in empty fruit bunch of palm oil industrial waste. Di dalam: Seki T *et al*, editor. *Biotechnology For Sustainable Utilization Of Biological Resources In The Tropics*; Bali, 3-4 Desember 2004. Osaka: Osaka University.
- Rajoka MI. 2004. Influence of various fermentation variables on exo-glucanase production in *Cellulomonas falvigena*. *Elect J Biotechnol* 7: 256-263.
- Sanjaya S. 2003. Produksi selulase mutan *Penicillium nalgiovense* S11 hasil radiasi dengan ultraviolet [skripsi]. Bogor. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Pakuan.
- Sanyal A, Kundu RK, Sinha SN, Dube DK. 1988. Extracellular cellulolytic enzymes system of *Aspergillus japonicus*. Di dalam: Fadel M. 2000. Production physiology of cellulases and  $\beta$ -glucosidase enzymes of *Aspergillus niger* grown under solid state fermentation conditions. *J Biol Sci* 1: 401-411.
- Springael JY, Penninckx MJ. 2003. Nitrogen-source regulation of yeast  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase synthesis involves the regulatory network including the GATA zinc-finger factors Gln3, Nil1/Gat1 and Gzf3. *Biochem. J.* 371: 589-595.

## LAMPIRAN



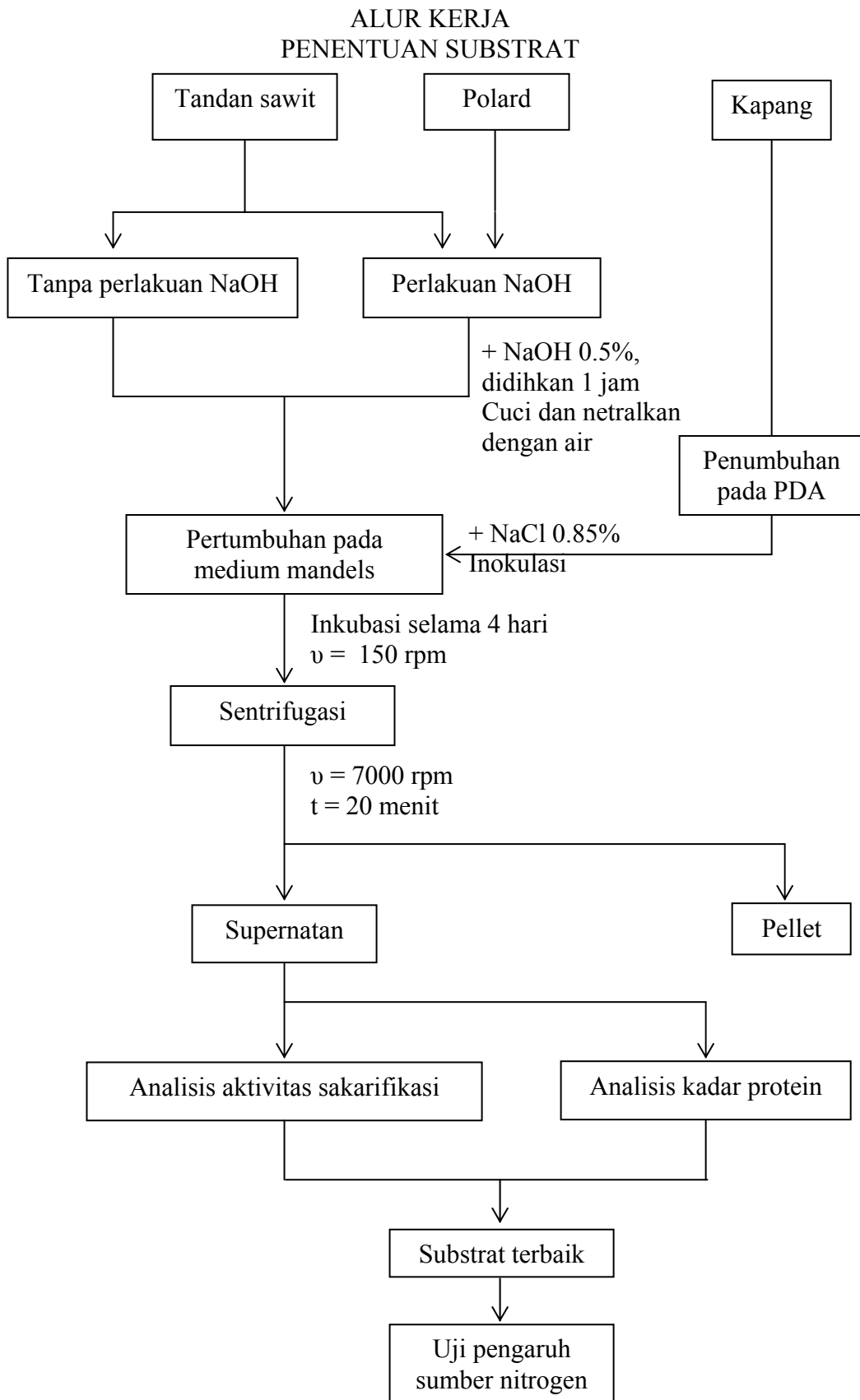
© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

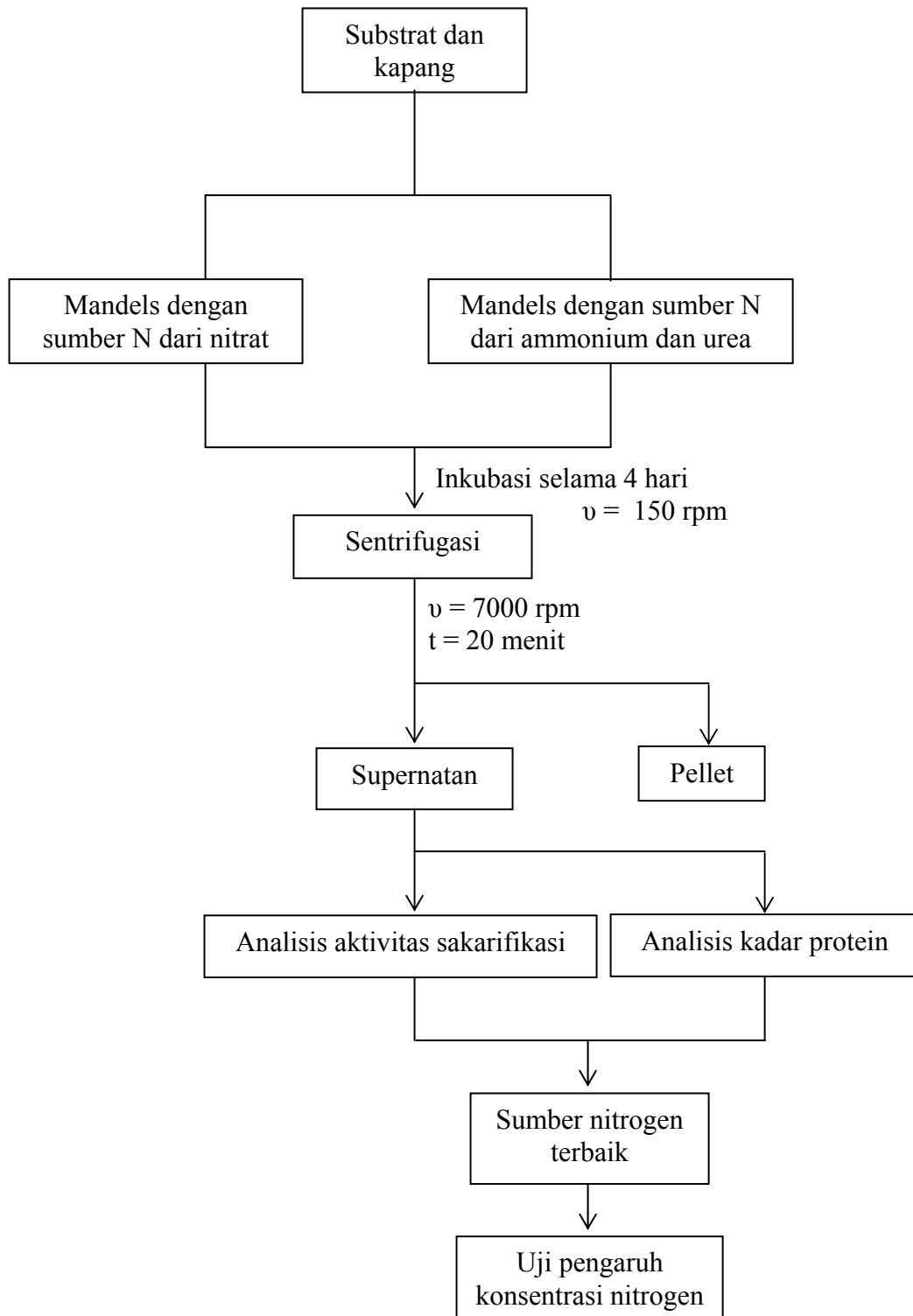
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Lampiran 1 Diagram alir penelitian



## Lampiran 1 (lanjutan)

ALUR KERJA  
ANALISIS PENGARUH SUMBER NITROGEN  
DALAM MEDIUM MANDELS



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University

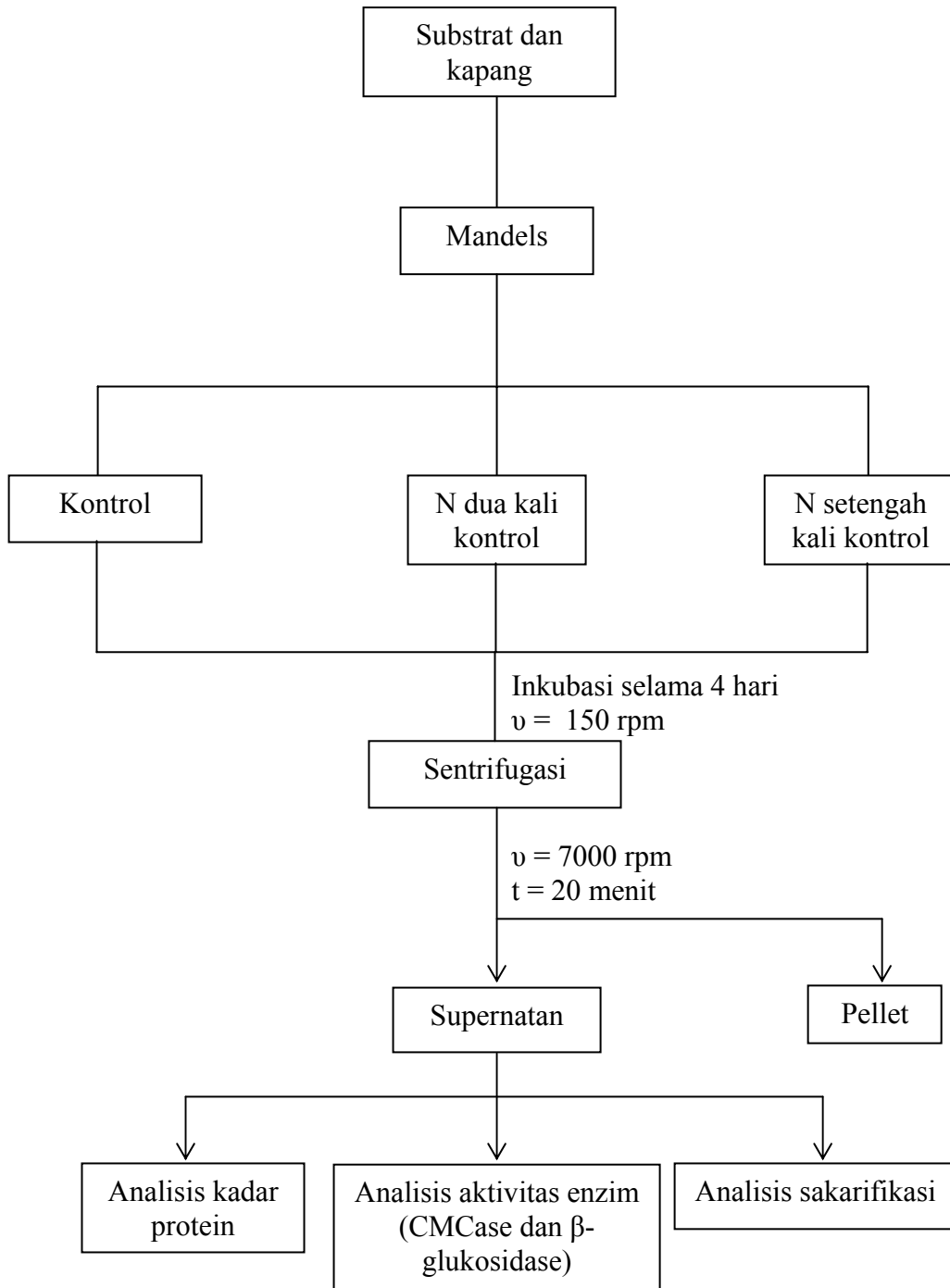
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



## Lampiran 1 (lanjutan)

ALUR KERJA  
ANALISIS PENGARUH KADAR NITROGEN

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

Bogor Agricultural University

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Lampiran 2 Komposisi media dan pereaksi dalam 1 liter

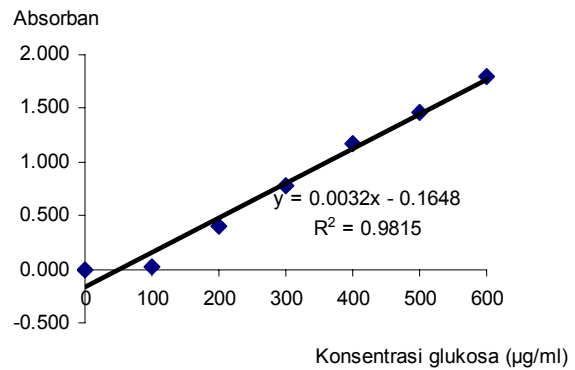
Nama media/pereaksi	Komposisi	
Medium Mandels	14% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10 ml
	20% KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 ml
	3% MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	10 ml
	3% Urea	10 ml
	30% CaCl <sub>2</sub>	1 ml
	0.5% FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1 ml
	1.6% MnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1 ml
	1.4% ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1 ml
	2.0% CoCl <sub>2</sub>	1 ml
	<i>Yeast Extract</i>	2% (w/v)
	Bactopepton	0.075% (w/v)
	Tween 80	0.2% (v/v)
Pereaksi DNS	NaOH	10 g
	K-Na-Tartrat	182 g
	DNS	10 g
	Fenol	2 g
	Na-Sulfit	0.5 g
Pereaksi Protein	<i>Coomassie Brilliant Blue</i>	100 mg
	Etanol	50 ml
	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	100 ml

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Lampiran 3 Standar glukosa dan nitrofenol

a. Standar glukosa untuk sakarifikasi tahap pertama

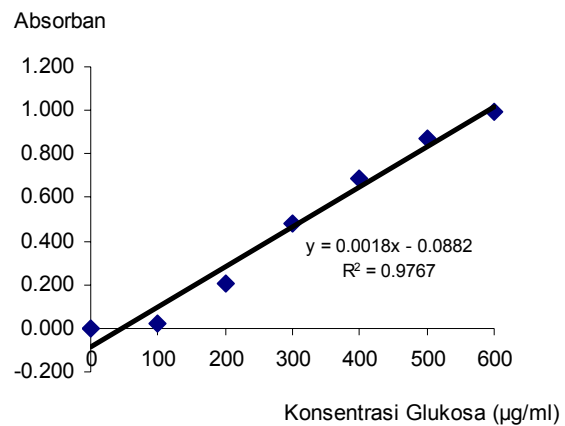
Konsentrasi Glukosa (µg/ml)	Absorban
0	0.000
100	0.025
200	0.396
300	0.784
400	1.165
500	1.456
600	1.803



Kurva standar glukosa untuk uji sakarifikasi tahap pertama

b. Standar glukosa untuk sakarifikasi tahap kedua

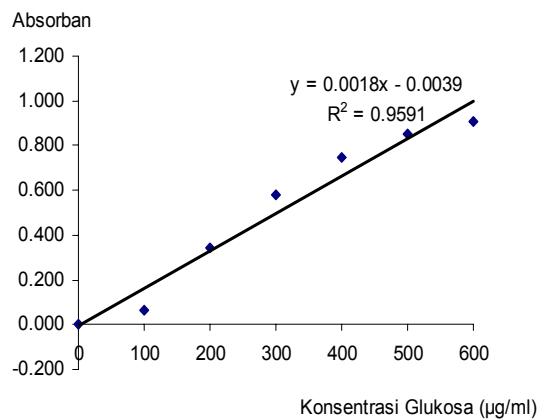
Konsentrasi Glukosa (µg/ml)	Absorban
0	0.000
100	0.023
200	0.202
300	0.483
400	0.686
500	0.870
600	0.997



Kurva standar glukosa untuk uji sakarifikasi tahap kedua

c. Standar glukosa untuk sakarifikasi tahap ketiga

Konsentrasi Glukosa (µg/ml)	Absorban
0	0.000
100	0.063
200	0.345
300	0.583
400	0.747
500	0.850
600	0.905

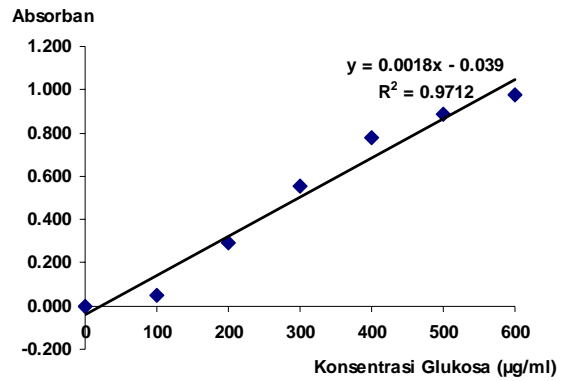


Kurva standar glukosa untuk uji sakarifikasi tahap ketiga

Lampiran 3 (lanjutan)

d. Standar glukosa untuk uji CMCase

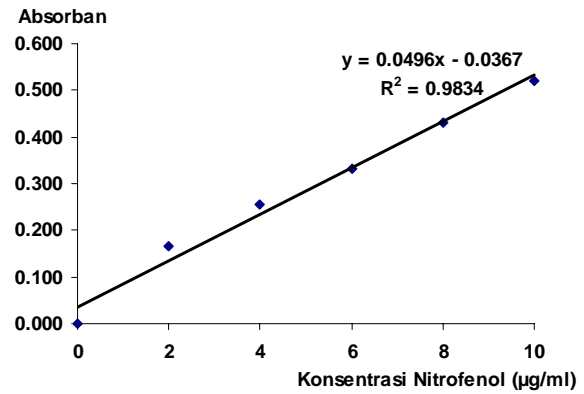
Konsentrasi Glukosa (µg/ml)	Absorban
0	0.000
100	0.063
200	0.345
300	0.583
400	0.747
500	0.850
600	0.905



Kurva standar glukosa untuk uji CMCase

e. Standar nitrofenol untuk uji β-glukosidase

Konsentrasi Nitrofenol (µg/ml)	Absorban
0	0.000
2	0.168
4	0.256
6	0.334
8	0.432
10	0.521



Kurva standar nitrofenol untuk uji β-glukosidase

- Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
    - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
    - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
  2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

Lampiran 4 Analisis varian

A Optimasi produksi selulase dengan perbedaan substrat

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Aktivitas sakarifikasi	Between Groups	28205,530	4	7051,382	129,820	,000
	Within Groups	543,166	10	54,317		
	Total	28748,695	14			
Aktivitas spesifik	Between Groups	8763773,468	4	2190943,367	63,945	,000
	Within Groups	342630,255	10	34263,026		
	Total	9106403,723	14			

B Hasil analisis RAL dua faktorial pada optimasi produksi selulase dengan variasi sumber nitrogen

General Linear Model: sakarifikasi versus kapang, nitrogen

Factor	Type	Levels	Values
kapang	fixed	2	1 2
nitrogen	fixed	2	1 2

Analysis of Variance for sakarifikasi, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
kapang	1	7132.1	7132.1	7132.1	11.27	0.010
nitrogen	1	1797.6	1797.6	1797.6	2.84	0.130
kapang*nitrogen	1	1739.3	1739.3	1739.3	2.75	0.136
Error	8	5062.3	5062.3	632.8		
Total	11	15731.3				

Analysis of Variance for spesifik, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
kapang	1	118944	118944	118944	0.86	0.380
nitrogen	1	157353	157353	157353	1.14	0.316
kapang*nitrogen	1	78039	78039	78039	0.57	0.473
Error	8	1101477	1101477	137685		
Total	11	1455813				

C Optimasi produksi selulase dengan perbedaan konsentrasi sumber nitrogen

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Aktivitas Sakarifikasi	Between Groups	245,270	2	122,635	2,436	,168
	Within Groups	302,083	6	50,347		
	Total	547,352	8			
Aktivitas spesifik	Between Groups	161841,318	2	80920,659	2,994	,125
	Within Groups	162168,668	6	27028,111		
	Total	324009,987	8			

### Lampiran 4 (Lanjutan)

Dependent Variable:  $\beta$ -glukosidase

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	0.00022022	0.00011011	0.85	0.4715
Error	6	0.00077333	0.00012889		
Corrected Total	8	0.00099356			

Dependent Variable: spesifik  $\beta$ -glukosidase

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	0.00322956	0.00161478	0.30	0.7504
Error	6	0.03214933	0.00535822		
Corrected Total	8	0.03537889			

Dependent Variable: CMCase

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	0.00023889	0.00011944	3.89	0.0824
Error	6	0.00018400	0.00003067		
Corrected Total	8	0.00042289			

Dependent Variable: spesifik CMCase

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	0.00317489	0.00158744	0.89	0.4581
Error	6	0.01068133	0.00178022		
Corrected Total	8	0.01385622			

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.