

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

untuk
Ibunda Tercinta
dan
Ayahanda Tercinta



*Jasa Ibu sungguh tak ternilai
Kasih Ibu nan tulus
teramat menyejukkan hati*



♥ Ananda Henny

**PENGARUH KOMPOSISI DAN UKURAN PARTIKEL
SUBSTRAT (TANDAN KOSONG DAN SABUT KELAPA SAWIT)
TERHADAP PRODUKSI SELULASE OLEH *Neurospora sitophila***

Oleh
HENNY RASMIATI
F 27. 1332



1 9 9 5
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
B O G O R

Henny Rasmiati. F 27.1332. Pengaruh Komposisi dan Ukuran Substrat (Tandan Kosong dan Sabut Kelapa Sawit) terhadap Produksi Selulase oleh *Neurospora sitophila*. Dibawah bimbingan A. Aziz Darwis, Illah Sailah dan Tun Tedja Irawadi.

RINGKASAN

Berdasarkan data PPKS (Pusat Penelitian Kelapa Sawit) pada tahun 1993 jumlah produksi minyak kelapa sawit adalah 3 276 000 ton. Tahun 1995 pemerintah memperkirakan produksi minyak kelapa sawit mencapai 4 500 000 ton, dengan limbah berupa tandan kosong sebanyak 4 950 000 ton dan sabut sebanyak 2 880 000 ton.

Tandan kosong dan sabut kelapa sawit dengan kandungan serat yang tinggi (62 - 64 % holoselulosa dan 21 - 23 % lignin) merupakan substrat yang potensial untuk memproduksi selulase. Selulase adalah enzim yang dapat memutuskan ikatan β -1,4 glikosidik pada selulosa, selodekstrin, selobiosa dan turunan selulosa lain menjadi gula-gula sederhana. Enzim ini terdiri dari tiga kelompok enzim, yaitu endoglukanase (CMC-ase), selobiohidrolase dan β -glukosidase.

Produksi selulase pada tandan kosong dan sabut kelapa sawit dipengaruhi oleh ukuran partikel substrat, dimana berhubungan dengan luas permukaan dan volume ruang kosong dalam substrat. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh perbandingan dan ukuran (tandan kosong dan sabut kelapa sawit) yang tepat sebagai substrat serta mendapatkan lama fermentasi terbaik dalam produksi selulase.



Ruang lingkup penelitian meliputi, (1) pengecilan ukuran partikel dan menentukan perbandingan tandan kosong dan sabut sebagai substrat dalam produksi selulase menggunakan *Neurospora sitophila* (2) optimasi lama fermentasi dan (3) pengujian aktivitas selulase.

Rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan faktorial split plot dengan empat faktor dan dua kali ulangan. Ukuran tandan kosong merupakan petak utama yang terdiri dari tiga taraf (10, 20 dan 30 mesh). Anak petak terdiri dari ukuran sabut (10, 20 dan 30 mesh) dan faktor perbandingan (tandan kosong : sabut kelapa sawit = 2 : 1, 1 : 1 dan 1 : 2) serta faktor lama inkubasi (2, 4, 6, 8, dan 10 hari).

Tandan kosong ukuran 10 mesh dan sabut ukuran 30 mesh menghasilkan aktivitas FP-ase tertinggi (2.591 IU/ml) pada hari ke-8 fermentasi. Sedangkan aktivitas CMC-ase tertinggi diperoleh pada perlakuan tandan kosong ukuran 20 mesh dan sabut ukuran 30 mesh yaitu 52.345 IU/ml pada hari ke-6 fermentasi.

Analisis statistik menunjukkan bahwa ukuran tandan kosong dan sabut kelapa sawit serta lama fermentasi berpengaruh nyata terhadap aktivitas FP-ase dan CMC-ase dengan selang kepercayaan 99 persen. Faktor perbandingan tandan kosong dan sabut kelapa sawit tidak berpengaruh terhadap aktivitas selulase pada selang kepercayaan 95 persen, namun demikian nilai aktivitas selulase tertinggi diperoleh pada perbandingan 1:2.



**PENGARUH KOMPOSISI DAN UKURAN PARTIKEL
SUBSTRAT (TANDAN KOSONG DAN SABUT KELAPA SAWIT)
TERHADAP PRODUKSI SELULASE OLEH *Neurospora sitophila***

Oleh

HENNY RASMIATI

F 27.1332

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
SARJANA TEKNOLOGI PERTANIAN
pada Jurusan **TEKNOLOGI INDUSTRI PERTANIAN,**
Fakultas Teknologi Pertanian,
Institut Pertanian Bogor

1995

**FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR**



INSTITUT PERTANIAN BOGOR
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN

**PENGARUH KOMPOSISI DAN UKURAN PARTIKEL
SUBSTRAT (TANDAN KOSONG DAN SABUT KELAPA SAWIT)
TERHADAP PRODUKSI SELULASE OLEH *Neurospora sitophila***

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
SARJANA TEKNOLOGI PERTANIAN
pada Jurusan **TEKNOLOGI INDUSTRI PERTANIAN,**
Fakultas Teknologi Pertanian,
Institut Pertanian Bogor

Oleh

HENNY RASMIATI

F 27.1332

Dilahirkan pada tanggal 26 Oktober 1972
di Dumai

Tanggal lulus : 3 Januari 1995

Dr. Ir. Illah Sailah,
Dosen Pembimbing II



Disetujui,
3 Januari 1995

Dr. Ir. H. A. Aziz Darwis, MSc.
Dosen Pembimbing I

Dr. Ir. Tun Tedja Irawadi, MS.

Dosen Pembimbing III

Halaman ini adalah bagian dari skripsi yang diajukan sebagai syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Teknologi Pertanian di Institut Pertanian Bogor. Hal ini merupakan dokumen resmi yang dikeluarkan oleh Institut Pertanian Bogor dan tidak dapat dipertanggungjawabkan oleh penulis. Untuk informasi lebih lanjut, silakan hubungi bagian Administrasi Akademik Institut Pertanian Bogor.

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, hanya dengan rahmat dan karunia Allah SWT penulis dapat menyusun skripsi dengan judul Pengaruh Komposisi dan Ukuran Partikel Substrat (Tandan Kosong dan Sabut Kelapa Sawit) terhadap Produksi Selulase oleh *Neurospora sitophila*.

Terima kasih penulis ucapkan kepada Bapak A. Aziz Darwis, Ibu Illah Sailah dan Ibu Tun Tedja Irawadi atas bimbingan, nasehat dan dorongan kepada penulis. Ucapan terima kasih juga penulis ucapkan kepada Inong, Zulfa, Kak Said, staf di Laboratorium Terpadu serta rekan-rekan di ARSIDA 4 yang telah banyak membantu selama penelitian.

Akhir kata semoga skripsi ini bermanfaat bagi yang membutuhkannya.

Bogor, Januari 1995

penulis



DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
I. PENDAHULUAN	1
II. TINJAUAN PUSTAKA	4
A. MEDIA FERMENTASI	4
B. SELULOSA	7
C. INOKULAN	9
D. FERMENTASI SUBSTRAT PADAT	10
E. SELULASE	15
F. PENGUJIAN AKTIVITAS SELULASE	19
1. Aktivitas FP-ase	21
2. Aktivitas CMC-ase	22
III. BAHAN DAN METODA	23
A. BAHAN DAN ALAT	23
B. METODA	24
C. KONDISI FERMENTASI	27
D. RANCANGAN PERCOBAAN	30
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	31
A. ANALISA KOMPOSISI SUBSTRAT	31
B. INOKULAN	32

C. UKURAN PARTIKEL SUBSTRAT	36
1. Aktivitas enzim FP-ase	37
2. Aktivitas enzim CMC-ase	44
E. PERBANDINGAN TANDAN KOSONG DAN SABUT KELAPA SAWIT	51
V. KESIMPULAN DAN SARAN	53
A. KESIMPULAN	53
B. SARAN	54
DAFTAR PUSTAKA	55
LAMPIRAN	58

Halaman ini adalah bagian dari dokumen yang diterbitkan oleh Institut Pertanian Bogor dan merupakan sumber daya intelektual yang tidak dapat dipisahkan dari institusi tersebut. Penggunaan kembali atau penyalinan tanpa izin dari Institut Pertanian Bogor adalah dilarang.

DAFTAR TABEL

Tabel 1.	Analisis kimia tandan kosong dan sabut	6
Tabel 2.	Analisis kandungan lignoselulosa tandan kosong kelapa sawit	6
Tabel 3.	Hidrolisis berbagai substrat oleh enzim selulolitik	21
Tabel 4.	Analisis komposisi substrat	31

DAFTAR GAMBAR

Gambar	1. Rumus molekul selulosa	8
Gambar	2. Mekanisme hidrolisis selulosa oleh selulase	18
Gambar	3. Sistem pembentukan enzim	19
Gambar	4. Diagram alir proses produksi selulase	26
Gambar	5. Contoh di dalam tabung plastik berlubang	28
Gambar	6. Sistem fermentasi MPB yang telah dimodifikasi	29
Gambar	7. <i>Neurospora sitophila</i> berumur 1 hari	33
Gambar	8. <i>N. sitophila</i> berumur 5 hari	34
Gambar	9. Aktivitas FP-ase tandan kosong ukuran 10 mesh pada berbagai ukuran sabut dan perbandingan	39
Gambar	10. Pertumbuhan <i>N. sitophila</i> pada substrat tandan kosong ukuran 10 mesh	40
Gambar	11. Aktivitas FP-ase tandan kosong ukuran 20 mesh pada berbagai ukuran sabut dan perbandingan	41
Gambar	12. Aktivitas FP-ase tandan kosong ukuran 30 mesh pada berbagai ukuran sabut dan perbandingan	42
Gambar	13. Aktivitas CMC-ase tandan kosong ukuran 10 mesh pada berbagai ukuran sabut dan perbandingan	45
Gambar	14. Aktivitas CMC-ase tandan kosong ukuran 20 mesh pada berbagai ukuran sabut dan perbandingan	46
Gambar	15. Hubungan aktivitas CMC-ase dengan gula pereduksi	48



Gambar 16. Aktivitas CMC-ase tandan kosong ukuran 30 mesh pada berbagai ukuran sabut dan perbandingan 49

Gambar 18. Pertumbuhan *N. sitophila* pada Tandan ukuran 10, sabut 20 mesh 53

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya ini tanpa izin penciptanya dan disediakan sumber
2. Diperbolehkan untuk memperbanyak untuk keperluan pribadi, pendidikan, penelitian, penerjemahan, dan lain-lain
3. Diperbolehkan untuk memperbanyak untuk keperluan pribadi, pendidikan, penelitian, penerjemahan, dan lain-lain
4. Diperbolehkan untuk memperbanyak untuk keperluan pribadi, pendidikan, penelitian, penerjemahan, dan lain-lain
5. Diperbolehkan untuk memperbanyak untuk keperluan pribadi, pendidikan, penelitian, penerjemahan, dan lain-lain
6. Diperbolehkan untuk memperbanyak untuk keperluan pribadi, pendidikan, penelitian, penerjemahan, dan lain-lain
7. Diperbolehkan untuk memperbanyak untuk keperluan pribadi, pendidikan, penelitian, penerjemahan, dan lain-lain
8. Diperbolehkan untuk memperbanyak untuk keperluan pribadi, pendidikan, penelitian, penerjemahan, dan lain-lain
9. Diperbolehkan untuk memperbanyak untuk keperluan pribadi, pendidikan, penelitian, penerjemahan, dan lain-lain
10. Diperbolehkan untuk memperbanyak untuk keperluan pribadi, pendidikan, penelitian, penerjemahan, dan lain-lain

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Komposisi nutrisi substrat	58
Lampiran 2. Prosedur analisis kimia dan aktivitas selulase	59
Lampiran 3. Data hasil analisis FP-ase	68
Lampiran 4. Data hasil analisis CMC-ase	69
Lampiran 5. Hasil analisis sidik ragam FP-ase	70
Lampiran 6. Hasil analisis sidik ragam CMC-ase	72

Has Cipta: IPB University
 1. Dilindungi sebagai bagian dari kekayaan intelektual yang akan dipertanggungjawabkan dan diperdagangkan kembali.
 2. Penggunaan tanpa izin untuk kepentingan komersial, reproduksi, penyalinan, atau untuk tujuan lain yang melanggar hak cipta.
 3. Pengutipan tidak diperbolehkan tanpa izin dari IPB University.
 4. Diperoleh dengan prosedur dan persyaratan yang berlaku di IPB University.

I. PENDAHULUAN

Berdasarkan data PPKS (Pusat Penelitian Kelapa Sawit) tahun 1993, jumlah produksi minyak kelapa sawit (CPO) adalah 3 276 000 ton. Untuk tahun 1995 pemerintah telah memperkirakan produksi minyak kelapa sawit sebanyak 4 500 000 ton.

Dalam pengolahan minyak kelapa sawit ini dihasilkan limbah berupa tandan kosong kelapa sawit dan sabut kelapa sawit yang memiliki nilai konversi dari minyak kelapa sawit berturut-turut sebesar 1.10 dan 0.64. Berdasarkan nilai konversi tersebut diperkirakan pada tahun 1995 dihasilkan tandan kosong kelapa sawit sebanyak 4 950 000 ton dan sabut kelapa sawit sebanyak 2 880 000 ton.

Di Indonesia, usaha untuk memanfaatkan limbah padat kelapa sawit (selain bungkil inti sawit) belum banyak dilakukan. Tandan kosong kelapa sawit baru dimanfaatkan sebagai pupuk kalium. Sabut dan cangkang kelapa sawit dimanfaatkan sebagai bahan bakar boiler atau dibuang di jalan-jalan di daerah perkebunan untuk mengeraskan jalan.

Beberapa penelitian dalam usaha pemanfaatan tandan kosong kelapa sawit telah dilakukan, diantaranya Pratiwi (1986) memanfaatkan tandan kosong kelapa sawit

sebagai bahan baku dalam pembuatan pulp kertas, hidrolisis tandan kosong kelapa sawit menghasilkan gula-gula sederhana secara kimiawi oleh Mikosari (1990) dan secara enzimatik oleh Fajarrini (1991), sedangkan Tarigan (1989) memanfaatkan tandan kosong kelapa sawit sebagai pakan ternak.

Tandan kosong dan sabut kelapa sawit menurut Sivalingan (1983) dalam Tun-Tedja-Irawadi (1991) merupakan limbah pertanian yang banyak mengandung lignoselulosa. Lignoselulosa terdiri dari komponen holoselulosa dan lignin. Kandungan Holoselulosa (selulosa dan hemiselulosa) dan lignin masing-masing berkisar antara 62-64 persen dan 21-23 persen.

Dengan kandungan serat (lignoselulosa) yang tinggi, diduga limbah ini dapat dimanfaatkan sebagai substrat yang baik untuk memproduksi selulase. Selulase dapat dimanfaatkan untuk proses biokonversi selulosa, dan dapat pula digunakan untuk meningkatkan daya cerna bahan selulosa sebagai pakan ternak. Tun-Tedja-Irawadi (1991) telah meneliti kemungkinan produksi selulase pada substrat tandan kosong dan sabut kelapa sawit menggunakan kapang *Neurospora sitophila*.

Produksi selulase pada tandan kosong dan sabut kelapa sawit diantaranya ditentukan oleh komposisi nutrisi substrat dan ukuran partikel substrat. Partikel yang berukuran lebih kecil mempunyai luas permukaan yang

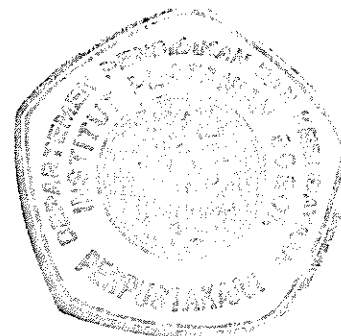


besar untuk transfer panas dan gas, sehingga menguntungkan bagi pertumbuhan kapang penghasil selulase.

Dipihak lain, ukuran partikel yang kecil mengurangi ruang kosong antar partikel yang cenderung mengurangi area pindah panas dan pertukaran gas dengan atmosfer disekitarnya, kondisi ini merugikan bagi pertumbuhan kapang. Dengan demikian, ukuran partikel substrat yang tepat serta perbandingan tandan kosong dan sabut yang sesuai akan menghasilkan kondisi optimal untuk pertumbuhan kapang dan akan mempengaruhi aktivitas enzim yang dihasilkan.

Ruang lingkup penelitian meliputi (1) pengecilan ukuran partikel dan menentukan perbandingan tandan kosong dan sabut sebagai substrat dalam produksi selulase menggunakan *N. sitophila* (2) optimasi lama fermentasi dan (3) pengujian aktivitas Filter Paperase (FPase) dan Karboksimetilselulase (CMC-ase).

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh perbandingan dan ukuran partikel substrat (tandan kosong dan sabut kelapa sawit) yang tepat serta lama fermentasi optimal dalam memproduksi selulase menggunakan *Neurospora sitophila*.



II. TINJAUAN PUSTAKA

A. MEDIA FERMENTASI

Sebagai hasil samping proses pengolahan kelapa sawit (*Elaeis guineensis* JAQC) menjadi minyak sawit, limbah lignoselulosa kelapa sawit sebagian besar telah terkumpul di pabrik. Tidak diperlukannya proses pengumpulan dan pengangkutan memudahkan pemanfaatan limbah lignoselulosa ini (Darnoko, 1992).

Menurut Judoamidjojo *et al.* (1989), bahan lignoselulosa merupakan sebutan yang diberikan pada bahan yang mengandung selulosa yang berasosiasi dengan lignin. Karena pada dasarnya selulosa tidak ditemui di alam dalam keadaan bebas. Tsao *et al.* (1978), mengatakan bahwa bahan lignoselulosa mengandung tiga komponen utama, yaitu selulosa, lignin dan hemiselulosa dengan perbandingan berat 4 : 3 : 3. Besar perbandingan tergantung pada jenis kayunya, sebagai contoh kayu lunak mengandung 42 persen selulosa, 25 persen hemiselulosa dan 28 persen lignin.

Hemiselulosa merupakan prekursor selulosa dan terdiri dari monomer gula (gula-gula anhidro) yang dapat dikelompokkan pada heksosa (glukosa, manosa dan galaktosa), pentosa (xilosa, arabinopiranososa, arabinofuranosa), asam heksuronat (glukuronat, metilglukuronat dan galakturonat) dan deoksiheksosa (rhamnosa dan

fukosa). Rantai utama hemiselulosa dengan satu macam monomer saja disebut (homopolimer), misalnya xilan, atau dapat terdiri dari dua atau lebih monomer (heteropolimer), misalnya glukomanan (Fengel dan Wegener, 1984 dalam Tun-Tedja-Irawadi 1991).

Menurut Bilgrami dan Verma (1978), xilan merupakan hemiselulosa yang paling penting pada tanaman tingkat tinggi dan memiliki struktur rantai bercabang dengan xilosa dalam keadaan berlimpah. Dalam dinding sel tanaman, hemiselulosa mungkin tersebar dalam keadaan tak beraturan antara selulosa mikrofibril.

Lignin umumnya tidak pernah ditemui dalam bentuk sederhana, tetapi selalu bergabung atau berikatan dengan polisakarida dinding sel. Hubungan molekular dan supra-molekular diantara komponen-komponen dinding sel (lignin, selulosa, hemiselulosa) masih belum banyak diketahui, hubungannya dapat digambarkan sebagai kompleks lignin-polisakarida atau kompleks lignin-karbohidrat. Kenyataannya ketiga komponen ini tidak dapat dipisahkan secara sempurna. Pada selulosa yang telah dimurnikan selalu ditemui lignin, begitu pula kebalikannya pada lignin yang telah dimurnikan selalu ditemui selulosa atau hemiselulosa (Lai dan Sarkanen, 1971 dalam Fengel dan Wegener, 1984 dalam Tun-Tedja-Irawadi, 1991).

Lignin yang terdapat pada struktur kristal selulosa jaringan tanaman, membatasi hidrolisis selulosa oleh



enzim ataupun asam. Perlakuan fisik (pengecilan ukuran) atau perlakuan kimiawi (penggunaan asam atau basa) merupakan perlakuan pendahuluan yang biasa dilakukan dalam proses delignifikasi limbah pertanian. Hasil analisis kimia substrat tandan kosong dan sabut kelapa sawit dapat dilihat pada Tabel 1 (Tun-Tedja-Irawadi, 1991). Sedangkan pada Tabel 2 dapat dilihat hasil analisis lignoselulosa tandan kosong kelapa sawit ukuran 20 mesh dan 40 mesh.

Tabel 1. Analisa kimia dari sabut dan tandan sawit^c (persen bahan kering)

Contoh	Lemak	Protein	Selulosa	Lignin	Hemiselulosa
Sabut	6.95	6.94	28.28	27.86 ^d	34.78 ^f
Tandan	5.35	4.45	32.55	28.54 ^d	31.70 ^f

^cIrawadi (1991)

^dMetoda Klason (Johnson 1937)

^fNDF-ADF

Tabel 2. Analisis kandungan lignoselulosa tandan kosong kelapa sawit^a

Komponen	20 mesh	40 mesh
Selulosa ^b	63.13	52.16
Hemiselulosa ^b	20.71	15.96
Lignin ^b	28.24	9.63

^aRiyadi (1995)

^bNDF-ADF

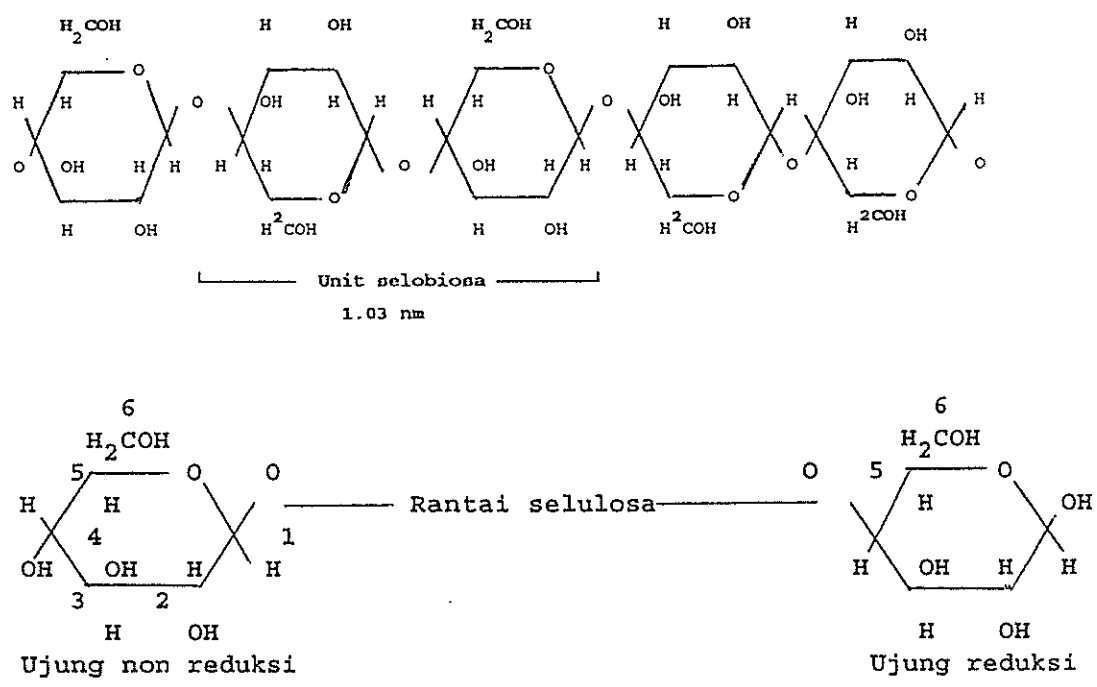
B. SELULOSA

Bilgrami dan Verma (1978) mengatakan bahwa selulosa merupakan unsur pokok utama dalam dinding sel tanaman. Selulosa terdiri dari suatu linier homopolimer unit anhidroglukosa (2 000 - 10 000 unit glukosa) yang diikat bersama dengan ikatan 1.4 β -glikosidik. Menurut Achmadi (1989), senyawa ini menyusun sekitar 0.5 dari tanaman keras dan sepertiga dari tanaman setahun. Bobot molekulnya tinggi, strukturnya teratur dan merupakan polisakarida yang paling banyak serta mudah diperoleh.

Menurut Chang et al. (1981), selulosa merupakan bahan yang unik, ia tidak hanya merupakan bahan berserat tetapi juga merupakan bahan yang bersifat menyerap dengan potensi permukaan internal yang tidak terbatas. Tun-Tedja-Irawadi (1991) menambahkan bahwa selulosa merupakan polimer karbohidrat atau polisakarida yang tersusun dari unit anhidroglukosa dengan rumus $C_6H_{10}O_5$. Dua unit glukosa yang berdekatan akan berikatan dengan melepaskan satu molekul air, yang terbentuk dari gugus hidroksil pada atom karbon ke satu dan ke empat. Posisi beta dari grup-OH pada C_1 akan berhubungan dengan unit glukosa lain pada C_4 membentuk unit selobiosa.

Ikatan hidrogen intramolekular mempertahankan kekakuan rantai selulosa, sedangkan ikatan intermolekular menyebabkan rantai selulosa saling berikatan membentuk mikrofibril. Beberapa mikrofibril ini kemudian memben-

tuk fibril dan akhirnya menjadi serat selulosa. Struktur fibril dan kuatnya ikatan hidrogen, menyebabkan selulosa bersifat tidak larut (Achmadi, 1989).



Gambar 1. Rumus molekul selulosa (Fengel dan Wegener, 1984 dalam Tun-Tedja-Irawadi, 1990)

Bagian selulosa yang mudah dihidrolisis disebut bagian amorf dari selulosa. Umumnya selulosa mengandung 15 persen bagian amorf dan 85 persen bagian kristalin. Setelah selulosa amorf dipisahkan, akan diperoleh partikel berbentuk batang dari selulosa kristalin (Fengel dan Wegener, 1984 dalam Tun-Tedja-Irawadi, 1991).

Hal-Cara Penelitian: Unsur-unsur
 1. Diteliti mengenai sebagian dari selulosa yang akan digunakan sebagai sumber dan sumber karbon
 2. Penelitian mengenai sifat-sifat selulosa yang akan digunakan sebagai sumber karbon
 3. Penelitian mengenai sifat-sifat selulosa yang akan digunakan sebagai sumber karbon
 4. Penelitian mengenai sifat-sifat selulosa yang akan digunakan sebagai sumber karbon
 5. Penelitian mengenai sifat-sifat selulosa yang akan digunakan sebagai sumber karbon
 6. Penelitian mengenai sifat-sifat selulosa yang akan digunakan sebagai sumber karbon
 7. Penelitian mengenai sifat-sifat selulosa yang akan digunakan sebagai sumber karbon
 8. Penelitian mengenai sifat-sifat selulosa yang akan digunakan sebagai sumber karbon
 9. Penelitian mengenai sifat-sifat selulosa yang akan digunakan sebagai sumber karbon
 10. Penelitian mengenai sifat-sifat selulosa yang akan digunakan sebagai sumber karbon

C. INOKULAN

Inokulan yang digunakan untuk memproduksi selulase pada penelitian ini adalah *Neurospora sitophila*. Menurut Alexopoulos dan Mims (1979), *Neurospora sitophila* merupakan kapang yang termasuk dalam Sub-divisi *Eumycophyta*, Kelas *Ascomycetes*, Ordo *Sphariales* dan Famili *Sordoriaceae*. Kapang ini mudah menyebar dan berkembang biak secara cepat terutama dengan aseksual, biasanya ditemukan pada tingkat konidia.

Di Indonesia kapang ini dikenal sebagai kapang oncom merah, karena kultur kapang yang diturunkan dari oncom merah menunjukkan ciri-ciri seperti *Neurospora sitophila* (Dwijoseputro, 1961 dalam Tun-Tedja-Irawadi 1991).

Kemampuan *Neurospora sitophila* dalam memproduksi selulase dan protein kapang telah diteliti oleh Oguntimain et al. (1991) yaitu produksi selulase dan β -glukosidase menggunakan kultur *Neurospora sitophila* pada media limbah padat jagung dan tebu serta Banerjee et al. (1994) menggunakan limbah jagung sebagai sumber karbon untuk memproduksi protein kapang oleh *Neurospora sitophila*.

Tun-Tedja-Irawadi (1991) menggunakan *Neurospora sitophila* yang diisolasi dari tandan kosong kelapa sawit sebagai inokulan pada substrat tandan kosong dan sabut kelapa sawit untuk memproduksi selulase. Menurut Maggy



T. Suhartono (1989) organisme pembentuk spora biasanya memproduksi enzim pada fase pasca eksponensial.

D. FERMENTASI SUBSTRAT PADAT

Menurut Smith (1990), fermentasi substrat padat menggunakan bahan lignoselulosa bisa menjadi industri dimasa depan untuk menghasilkan biomassa, etanol, metana dan beberapa produk yang bernilai komersial tinggi. Knapp dan Howel (1980) menambahkan bahwa fermentasi substrat padat menggunakan bahan hidrokarbon dan lignoselulosa sebagai substrat dapat menghasilkan enzim seperti protease, amilase dan selulase akan menjadi industri yang menguntungkan.

Fermentasi substrat padat pada produksi enzim umumnya memberikan hasil lebih baik karena jumlah substrat yang tersedia lebih banyak yaitu padatan sekitar 20-50%. Selain lebih banyak, enzim yang dihasilkan biasanya beragam. Cara fermentasi substrat padat disukai untuk menghasilkan berbagai enzim ekstraselular. Enzim ekstraselular menghidrolisis polimer substrat fermentasi menjadi nutrisi yang dapat dimanfaatkan (Maggy-T. Suhartono, 1989).

Lebih jauh Maggy-T. Suhartono (1989) menjelaskan bahwa pada fermentasi substrat padat, peranan enzim-enzim ini menjadi lebih nyata karena jumlah substrat yang perlu dihidrolisis lebih tinggi. Disamping itu,

jumlah substrat yang tinggi menginduksi sintesis enzim-enzim ekstraselular hidrolitik yang diperlukan untuk degradasi substrat itu sendiri.

Smith (1990) menjelaskan keuntungan dan kerugian penggunaan substrat padat sebagai media fermentasi. Keuntungannya antara lain substrat yang digunakan sederhana dengan komponen alami yang lebih murah dibandingkan dengan komponen sintesis yang mahal. Kontaminasi mikroorganisme rendah, sehingga seringkali tidak perlu sterilisasi serta proses hilir yang lebih mudah. Persyaratan aerasi dapat dipenuhi dengan mudah melalui difusi gas atau melalui aerasi yang tidak kontinu. Hasil produksi tinggi dan kebutuhan energi rendah dibandingkan dengan bioreaktor tangki berpengaduk.

Lebih jauh Smith (1990) menguraikan kerugian penggunaan fermentasi substrat padat, diantaranya proses terbatas hanya untuk jamur yang tahan terhadap tingkat kadar air rendah. Timbulnya panas hasil metabolisme dalam operasi berskala besar dapat menimbulkan masalah. Demikian pula pemantauan proses misalnya tingkat kadar air, biomassa, kadar O_2 dan CO_2 , sukar dilaksanakan dengan akurat serta rancangan bioreaktor belum sempurna dan laju pertumbuhan mikroorganisme lebih rendah.

Suatu sifat yang mencirikan fermentasi substrat padat adalah perlunya memberi perlakuan awal pada bahan mentah substrat untuk meningkatkan ketersediaan hara,



atau mengurangi ukuran partikel guna mengoptimalkan parameter fisik fermentasi yang bersangkutan. Ukuran partikel yang tepat dapat diperoleh melalui berbagai bentuk perlakuan fisik, misalnya *Ball Milling* (Smith, 1990). Chang et al. (1981) mengatakan bahwa penggilingan bahan selulosa dapat mengurangi ukuran partikel, merusak struktur berkrystal dan memutuskan ikatan kimia dari rantai panjang molekulnya.

Knapp dan Howel (1980) menambahkan bahwa dalam fermentasi substrat padat, berbagai metoda perlakuan pendahuluan bahan selulosa diantaranya dengan penggilingan untuk memperkecil ukuran telah dipelajari dan secara umum meningkatkan laju hidrolisis substrat, pertumbuhan mikroorganisme dan produksi selulase.

Ukuran partikel yang kecil memiliki luas permukaan yang besar untuk transfer panas dan gas, memberikan volume ruang kosong dan distribusi pori yang merata dan mempercepat transfer nutrisi. Dipihak lain, ukuran partikel yang kecil mengurangi ruang kosong antara partikel yang cenderung menurunkan area pindah panas dan pertukaran gas dengan atmosfer disekitarnya, kecuali apabila partikel mendapat agitasi yang cukup untuk memberikan tingkat pemisahan partikel yang tinggi (Liesbetini-Hartoto, 1992). Hal ini sesuai dengan pendapat Smith (1990) yang mengatakan bahwa ukuran partikel menentukan banyaknya ruang dalam substrat yang



dapat ditempati oleh udara. Hampir semua fermentasi melibatkan mikroorganisme aerobik dan perpindahan oksigen merupakan parameter kritis yang mengendalikan perkembangan pertumbuhan dan pembentukan produk.

Senyawa kimia yang dibutuhkan dalam produksi selulase umumnya hampir sama dengan substrat yang dibutuhkan untuk produksi enzim lainnya. Substrat dirancang agar mengandung unsur-unsur dasar antara lain karbon, nitrogen, kalsium dan mineral mikro seperti Fe, Cu, Co, Zn, Mg, Mo yang dibutuhkan untuk mendukung kerja fungsi sel (Frost dan Moss, 1987). Komponen substrat yang umum digunakan ialah yang dikembangkan oleh Mandels dan Reese (1957). Beberapa peneliti menggunakan substrat dengan komposisi yang hampir sama, hanya berbeda pada jumlah pepton, tween dan selulosa.

Sebagai sumber karbon substrat penghasil selulase digunakan selulosa murni atau selulosa alami. Selulosa alami yang biasa digunakan merupakan limbah hasil pertanian, seperti dari penggergajian kayu, tongkol jagung, sekam padi, bagas dan sebagainya. Semakin banyak selulosa yang digunakan maka semakin tinggi selulase yang dihasilkan (Chahal, 1985).

Sumber nitrogen yang umum digunakan pada substrat penghasil selulase bersumber dari nitrogen anorganik dan organik. Garam amonium sulfat merupakan nitrogen anorganik yang biasa digunakan. Walaupun ion amonium



dapat mencukupi kebutuhan nitrogen kapang untuk pertumbuhan, tetapi untuk mendapatkan aktivitas enzim maksimal masih dibutuhkan penambahan nitrogen organik (Mandels dan Weber, 1969 dalam Tun-Tedja-Irawadi, 1991).

Menurut Smith (1990), fermentasi substrat padat biasanya dilakukan dengan meletakkan substrat pada baki (*tray*) membentuk lapisan tipis atau menggunakan bioreaktor yang khusus. Lebih jauh, Maggy-T. Suhartono (1989) menjelaskan bahwa setelah substrat disterilkan dapat dibuat tiga bentuk pertumbuhan yaitu berupa lapisan tipis pada baki dan lapisan tebal serta menggunakan drum dimana keseluruhan media pertumbuhan diputar secara perlahan-lahan.

Fermentasi menggunakan baki menurut Lonsane et al. (1985) dapat menampung substrat setebal 1 - 2 inchi, dimana parameter pertumbuhan optimal dijaga untuk menghasilkan produksi maksimal. Selain menggunakan baki, sistem fermentasi media padat *Multiple Mini Packed Bed* telah dikembangkan oleh Gumbira-Said (1992).

Penggunaan sistem fermentasi media padat *Multiple Mini Packed Bed* memudahkan penelitian terutama dalam pengambilan contoh, disamping aerasi pada substrat menjadi lebih baik. Menurut Gumbira-Said (1992), sistem fermentasi substrat padat *Multiple Mini Packed Bed* berhubungan dengan ketersediaan O_2 pada substrat.

E. SELULASE

Selulase merupakan enzim ekstraselular. Menurut Tun-Tedja-Irawadi (1991), enzim ekstraselular adalah enzim yang bekerja menghidrolisis substrat-substrat berberat molekul tinggi. Pada mikroorganisme, enzim ini umumnya berfungsi memproduksi nutrisi dari polimer-polimer biologi yang terdapat disekeliling sel. Apabila konsentrasi substrat jumlahnya terbatas atau kondisi fermentasi tidak optimal bagi aktivitas enzim untuk dapat melakukan pemutusan secara efisien, maka enzim ini cenderung diproduksi dalam jumlah besar oleh sel.

Maggy-T. Suhartono (1989) menambahkan bahwa setelah dikeluarkan, enzim ekstraselular tidak lagi bisa dikontrol oleh sel. Hal ini mendorong produksi enzim dalam jumlah yang lebih besar, karena diluar sel enzim akan mengalami faktor pengenceran oleh lingkungan dan enzim juga harus tahan terhadap lingkungan ini.

Selulase adalah nama trivial enzim yang mempunyai nama sistematik β -1.4-glukan-4-glukanohidrolase (EC.3.2.1.4). Nama selulase merupakan nama umum bagi semua enzim yang dapat memutuskan ikatan glikosidik β -1.4 dalam selulosa, selodekstrin, selobiosa dan turunan selulosa yang lain (Enari, 1983)

Selulase biasanya dipanen setelah masa fermentasi yang lebih lama dibandingkan dengan produksi enzim amilase, yaitu minimum 5-6 hari, komponen β -glukosidase

bahkan memerlukan waktu fermentasi yang lebih lama lagi. Pada pelaksanaannya, waktu fermentasi bergantung pula pada keadaan atau lingkungan fermentasi (Maggy-T. Suhartono, 1989).

Menurut Gong dan Tsao (1979), paling sedikit ada tiga kelompok besar enzim dalam kompleks selulase,

- a. Endoglukanase (1.4- β -D-glukan, 4-glukanohidrolase atau endo- β -1.4-glukanase atau β -1.4-glukanoglukanohidrolase; EC.3.2.2.4) atau umumnya dikenal dengan nama CMC-ase atau C_x Selulase.
- b. Sellobiohidrolase (1.4- β -D-glukan cellobiohidrolase atau exo- β -1.4-glukanase atau β -1.4-glukan cellobiohidrolase (EC. 3.2.1.91) atau umumnya dikenal sebagai Avicelase atau C_1 selulase.
- c. β -glukosidase (β -D-glukoside glukohidrolase atau β -1.4-glukosidase: EC 3.2.1.21).

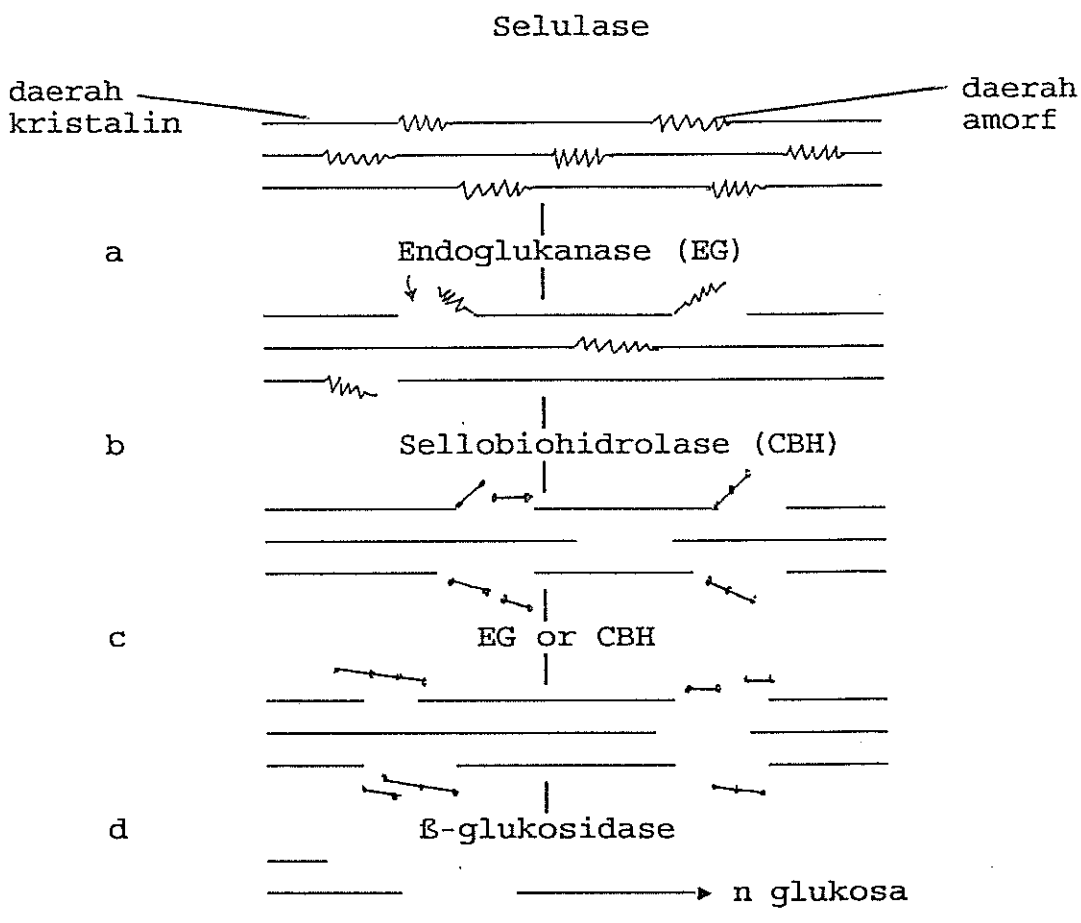
Mekanisme hidrolisis enzimatis yang dikemukakan Montenecourt dan Eveleigh (1979) dalam Enari (1983) disajikan pada Gambar 2, penjelasan Gambar tersebut adalah :

- a. Endoglukanase (C_x) menyerang bagian yang amorf dari serat selulosa sehingga membuka jalan bagi enzim selobiohidrolase (C_1).
- b. Selobiohidrolase membebaskan unit selobiosa dari ujung-ujung non reduksi rantai selulosa.

- c. Kerjasama antara kedua enzim (EG dan CBH) disebabkan karena substrat baru dari selobiohidrolase terbentuk akibat kerja enzim endoglukanase.
- d. β -glukosidase akan menghidrolisis selooligosakarida dan selobiosa menjadi glukosa.

Selulosa merupakan penginduksi yang universal dalam sintesis selulase. Beberapa penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa selulase diproduksi oleh sel dan dilepaskan ke medium pertumbuhan. Enzim ini kemudian menghidrolisis selulosa menjadi selobiosa yang akan bertindak sebagai penginduksi (Gong dan Tsao, 1979).

Selobiosa dapat memacu pertumbuhan kapang dan produksi enzim, khususnya apabila kapang tumbuh pada kondisi sub-optimal yang mengakibatkan pertumbuhan dibatasi (Enari, 1983). Selobiosa mempunyai peranan yang kompleks dalam sintesa selulase, karena pada konsentrasi rendah (0.1%) dapat menginduksi sintesis selulase, sedangkan pada konsentrasi tinggi (0.5%-1.0%) dapat menekan pembentukan enzim dan pada konsentrasi yang lebih tinggi lagi akan menghambat pembentukan enzim selulase (Mandels dan Weber, 1969 dalam Tun-Tedja-Irawadi, 1991). Pada Gambar 4 dibawah dapat dilihat peranan selobiosa pada sistem pembentukan selulase.



Selooligosakarida dan sellobiosa

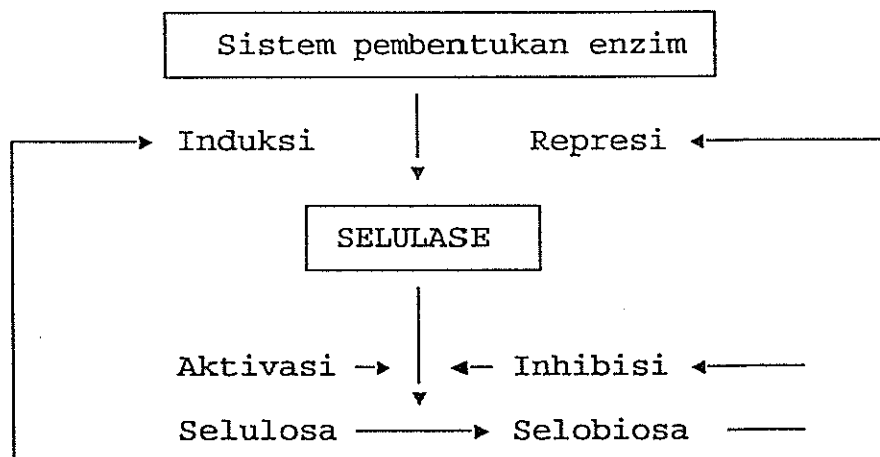
Keterangan :

- = selobiosa
- = selooligosakarida
- = satu unit glukosa

Gambar 2. Mekanisme hidrolisis selulosa oleh enzim selulase (Montenecourt dan Eveleigh, 1979 dalam Enari, 1983)

Mekanisme adsorpsi selulase pada selulosa belum dimengerti secara sempurna, dan merupakan masalah utama dalam hidrolisis enzimatik selulosa tak larut. Kecepatan reaksi enzim sangat dipengaruhi oleh adsorpsi enzim pada substrat. Semakin banyak selulase yang dapat

diserap maka semakin tinggi kecepatan reaksi hidrolisis enzim. Faktor yang mempengaruhi adsorpsi selulase pada selulosa adalah sifat substrat, konsentrasi enzim, perubahan struktur substrat selama hidrolisis dan inaktivasi selulase oleh produk-produk hidrolisis (Lee dan Fan, 1982 dalam Tun-Tedja-Irawadi 1991).



Gambar 3. Sistem pembentukan selulase (Mandels dan weber, 1969 dalam Tun-Tedja-Irawadi, 1991)

F. PENGUJIAN AKTIVITAS SELULASE

Semua enzim selulolitik dapat memutuskan ikatan β -1.4 glikosidik, perbedaan dari masing-masing enzim terletak pada kespesifikan struktur di sekeliling substrat. Perbedaan kespesifikan dari endoglukanase dan selobiohidrolase bersifat tidak mutlak karena keduanya dapat menghidrolisis ikatan β -1.4 glikosidik dari selulosa amorf. Penentuan aktivitas selulase akan sulit

apabila filtrat yang akan diukur aktivitas enzim merupakan campuran dari berbagai enzim selulolitik. Enzim-enzim bekerja secara sinergistik memecah substrat yang sama, menyebabkan aktivitas yang diukur sangat dipengaruhi oleh proporsi dari masing-masing enzim yang ada (Enari, 1983).

Selanjutnya Enari (1983) mengatakan bahwa substrat yang digunakan untuk analisis selulase dapat berupa selulosa alami atau turunannya. Sebagai substrat, selulosa alami memiliki kelemahan, karena seperti makromolekul lainnya, derajat kristalisasinya sukar untuk distandarisasikan serta kemurniannya sangat bervariasi. Turunan selulosa yang dapat diatur kelarutan dan kristalinitasnya merupakan substrat yang baik untuk analisis selulase.

1. Aktivitas FP-ase

Pengukuran aktivitas total selulase dilakukan untuk 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 dibutuhkan waktu reaksi yang

cukup lama agar enzim dapat berdifusi ke dalam serat selulosa (Enari, 1983).

Substrat yang biasa digunakan untuk penentuan aktivitas total selulase adalah kertas saring (Whatman no. 1) dan avisel, sedangkan produk yang diukur adalah glukosa. Enzim yang menghidrolisis substrat ini dikenal dengan nama Filter Paperase (FP-ase) dan aviselase (Mandels dan Weber, 1969 dalam Tun-Tedja-Irawadi, 1991).

Tabel 3. Hidrolisis berbagai substrat oleh Enzim selulolitik^a

Enzim	Substrat				
	Selulosa kristalin	CMC	Selulosa amorf	Selo-tetraosa	Selobiosa
Endoglukanase	-	+	+	+	-
Selobiohidrolase	+	-	+	+	-
β -glukosidase	-	-	-	+	+

^aEnari (1983)

2. Aktivitas CMC-ase

Karboksimetilselulosa (CMC) adalah turunan selulosa dapat larut yang digunakan sebagai substrat bagi enzim endoselulase (Lindner, 1983 dalam Tun-Tedja-Irawadi, 1991). Enzim yang dapat menghidrolisis CMC sering disebut sebagai karboksimetilselulase (CMC-ase). Pengukuran aktivitas endoglukanase selain

dilakukan dengan cara mengukur banyaknya gula reduksi yang dihasilkan selama hidrolisis substrat, juga dilakukan dengan cara mengukur penurunan kekentalan CMC selama hidrolisis (Canevascini dan Gattlen, 1976 dalam Tun-Tedja-Irawadi, 1990).



III. BAHAN DAN METODA

A. BAHAN DAN ALAT

1. Substrat

Pada penelitian ini digunakan substrat berupa tandan kosong kelapa sawit dan sabut kelapa sawit yang diperoleh dari pabrik pengolahan kelapa sawit Kertajaya, Banten Jawa Barat.

2. Mikroorganisme

Mikroorganisme yang digunakan sebagai inokulan adalah *Neurospora sitophila*. *N. sitophila* yang merupakan hasil isolasi dari tandan kosong kelapa sawit yang telah keluar 3 hari dari pabrik.

3. Bahan Kimia

Bahan kimia yang diperlukan adalah bahan nutrisi (Lampiran 1), Tween 80 0.1% untuk ekstraksi dan bahan-bahan untuk pengujian aktivitas FP-ase dan CMC-ase serta bahan untuk analisis peroksimat.

Halaman ini adalah bagian dari dokumen yang diterbitkan oleh IPB University. Untuk informasi lebih lanjut, silakan kunjungi website IPB University di www.ipb.ac.id.
1. Diizinkan untuk digunakan sebagai referensi.
2. Diperbolehkan untuk digunakan sebagai referensi dengan izin IPB University.

4. Peralatan

Peralatan yang digunakan adalah :

- a. Inkubator merk GCA/Precision scientific type Freas 815
- b. Sentrifuse Clements 2000, Australia
- c. Spektrofotometer Double Beam COLLEMAN-124 merk Perkin Elmer
- d. Autoklaf merk Heinicke C, Jerman barat
- e. Finn pippete diluter kapasitas 1 ml dengan tingkat pengenceran kamsimum 200 kali
- f. Alat-alat gelas, diantaranya pipet dengan berbagai ukuran volume, labu ukur, erlenmeyer, gelas ukur dan tabung reaksi.
- g. Alat-alat plastik berupa nampan plastik, tabung plastik dan tabung film.
- h. Alat-alat lain seperti pH meter, penggiling, pengayak, water bath dan inkubator goyang

B. METODA

1. Persiapan Bahan Baku

Tandan kosong dan sabut kelapa sawit masing-masing dikeringkan, digiling dan diayak dengan ayakan ukuran 10 mesh, 20 mesh dan 30 mesh. Bubuk yang diperoleh diukur kadar airnya dan disimpan ditempat yang kering.

2. Analisis Komposisi Substrat

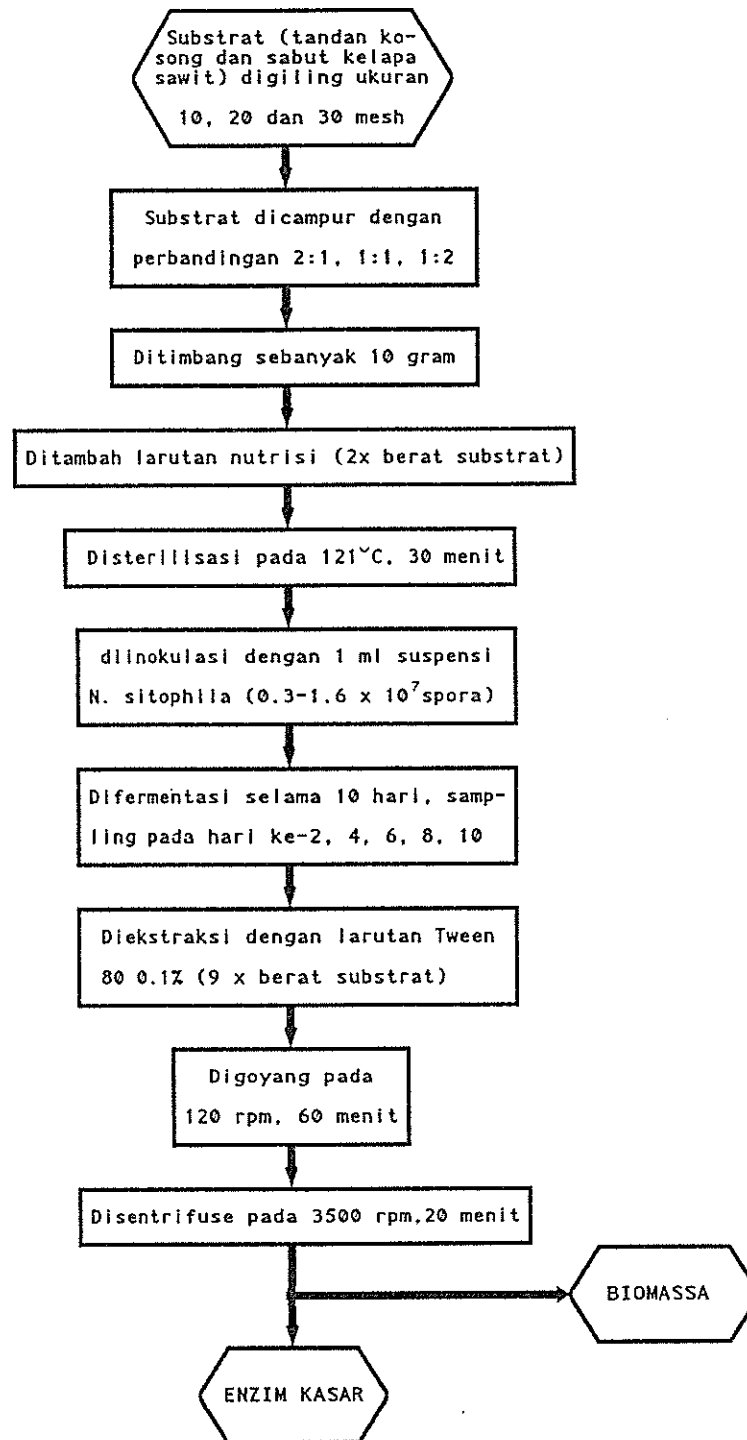
Analisis komposisi substrat dilakukan dengan menggunakan substrat yang berukuran 20 mesh. Analisis yang dilakukan adalah analisis kadar air, analisis kadar protein, analisis lemak, serat kasar, kadar abu, lignin, selulosa, hemiselulosa dan mineral (Lampiran 2).

3. Penyiapan Mikroorganisme

Kapang diisolasi dari tandan kosong kelapa sawit yang telah keluar 3 hari dari pabrik. Selanjutnya ditumbuhkan pada PDA dan dilakukan pemurnian sebanyak 3 tahap. Sebelum digunakan kapang ditumbuhkan di media agar miring selama 5 hari. Kemudian dalam setiap tabung agar miring dilarutkan 10 ml garam fisiologis. Suspensi merupakan inokulan yang siap digunakan.

4. Penentuan Perbandingan dan Ukuran Substrat yang Terbaik

Tandan kosong kelapa sawit dan sabut kelapa sawit yang telah digiling dicampurkan dengan perbandingan 2:1, 1:1 dan 1:2 masing-masing 10 gram dengan ukuran 10 mesh, 20 mesh dan 30 mesh. Setelah diberi nutrisi dan disterilisasi pada



Gambar 4. Diagram alir proses produksi selulase

tekanan 1 atm, suhu 121°C selama 30 menit. Substrat diinokulasi dengan 1 ml suspensi *N. sitophila* serta difermentasi selama 10 hari. Analisis aktivitas PF-ase dan CMC-ase (Lampiran 2) dilakukan pada hari ke-2, 4, 6, 8 dan 10.

C. KONDISI FERMENTASI

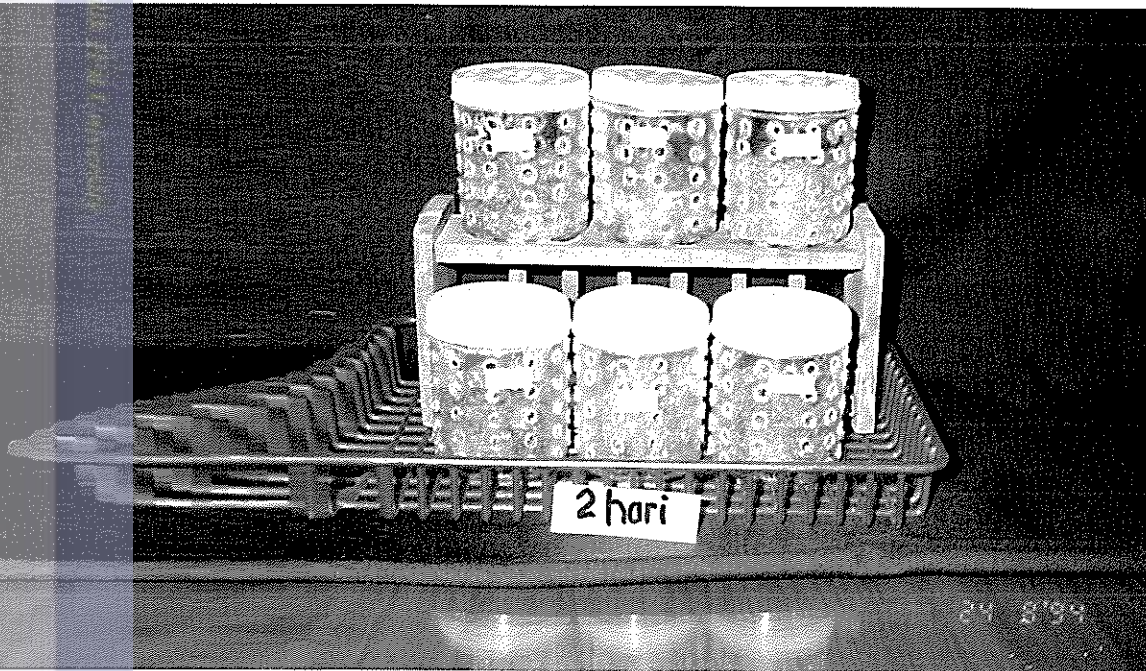
Fermentasi substrat padat merupakan jenis fermentasi paling efektif bagi kapang yang dapat hidup pada substrat dengan kadar air rendah. Menurut Smith (1990), fermentasi substrat padat hasil produksinya lebih tinggi dan kebutuhan energinya lebih rendah dibandingkan fermentasi cair.

Sistem fermentasi yang digunakan merupakan modifikasi dari sistem *Multiple Mini Packed Bed*. Fermentasi dilakukan dengan memasukan substrat ke dalam tabung plastik yang telah dilubangi untuk memperbaiki aerasi. Setiap tabung terdiri dari satu perlakuan untuk sekali pengambilan contoh, dengan demikian pengambilan contoh menjadi lebih mudah (Gambar 5).

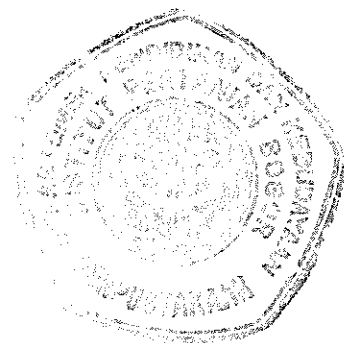
Tabung-tabung yang telah berisi substrat tersebut diletakkan di rak-rak plastik dan kemudian dimasukkan ke dalam inkubator seperti terlihat pada Gambar 6. Inkubator ini dilengkapi dengan kipas angin yang berfungsi menyebarkan udara agar merata ke seluruh ruang inkubator dan thermostat sebagai pengatur suhu. Untuk aerasi



kan ~~2~~ buah aerator merk Liman sebesar 0.008 vvm
e ~~per~~ volume permenit). Suhu diatur 28°C yaitu
ptimal ~~1~~ produksi selulase.



Contoh di dalam tabung plastik berlubang





Gambar 6. Sistem fermentasi MPB yang telah dimodifikasi

D. RANCANGAN PERCOBAAN

Penelitian ini menggunakan desain split plot dengan 4 faktor, yaitu ukuran tandan kosong, ukuran sabut dan perbandingan tandan dengan sabut serta lama inkubasi masing-masing 2 kali ulangan.

Faktor ukuran tandan kosong (A) terdiri dari 3 taraf, yaitu ukuran 10 mesh, 20 mesh dan 30 mesh merupakan petak utama. Sedangkan anak petak terdiri dari faktor ukuran sabut dengan 3 taraf yaitu ukuran 10 mesh, 20 mesh dan 30 mesh, faktor perbandingan tandan kosong dengan sabut (C) terdiri atas 3 taraf, yaitu 1:1, 1:2 dan 2:1 serta faktor lama fermentasi (D) dengan 5 taraf, yaitu hari ke-2, 4, 6, 8 dan 10. Persamaan rancangan percobaan adalah sebagai berikut:

$$Y_{ijklm} = \mu + A_i + \alpha_i + B_j + C_k + D_l + A_i B_j + A_i C_k + A_i D_l + B_j C_k + B_j D_l + C_k D_l + A^i B^j C^k + A^i B^j D^l + A^i C^k D^l + (ABCD)_{ijkl} + \epsilon_{ijklm}$$

α_i = error faktor ukuran tandan

ϵ_{ijklm} = error total

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. ANALISIS KOMPOSISI SUBSTRAT

Substrat yang digunakan sebagai media fermentasi terdiri dari tandan kosong dan sabut kelapa sawit. Sebelum digunakan, dilakukan analisis komposisi substrat. Hasil analisis dapat dilihat pada Tabel 4 dibawah ini.

Dari hasil analisis komposisi substrat terlihat bahwa kandungan selulosa substrat adalah cukup tinggi sehingga tepat digunakan sebagai substrat untuk memproduksi selulase. Disamping itu, analisis komposisi substrat juga bertujuan untuk mengetahui kandungan substrat

Tabel 4. Analisa komposisi substrat (% bahan kering)

Jenis analisa	Tandan kosong	Sabut
Kadar air (%)	7.76	11.46
Lemak (%)	6.52	8.34
Protein (%)	3.26	5.45
Mineral		
K (%)	1.15	0.43
Ca (%)	0.04	0.08
Mg (%)	0.11	0.10
Mn (%)	0.02	0.02
Zn (ppm)	42.69	25.41
Na (%)	0.13	0.08
Fe (%)	0.04	0.05
P ₂ O ₅ (%)	0.13	0.13
CO (%)	-	-
Selulosa (%)	39.63	31.82
Lignin* (%)	35.20	21.92
Hemiselulosa (%)	25.65	23.28
Serat kasar (%)	40.22	39.20
Kadar abu (%)	4.75	4.67

* Spektroskopi

agar penambahan nutrisi dapat disesuaikan. Kandungan protein dan mineral yang rendah pada substrat memerlukan penambahan nutrisi yang mengandung protein dan mineral. Protein digunakan oleh kapang sebagai sumber nitrogen organik untuk pertumbuhan. Hasil penelitian Mandels dan Reese (1957) menunjukkan bahwa mineral seperti kalsium, Mg, Zn, Fe dan Co dalam konsentrasi rendah diperlukan untuk produksi enzim, tetapi tidak dibutuhkan untuk pertumbuhan kapang.

Hasil analisis komposisi pada Tabel 4, memperlihatkan kandungan lignin yang sangat tinggi pada tandan kosong dibandingkan sabut. Menurut Tun-Tedja-Irawadi (1991), adanya lignin pada struktur kristal selulosa akan membatasi hidrolisis selulosa oleh enzim.

B. INOKULAN

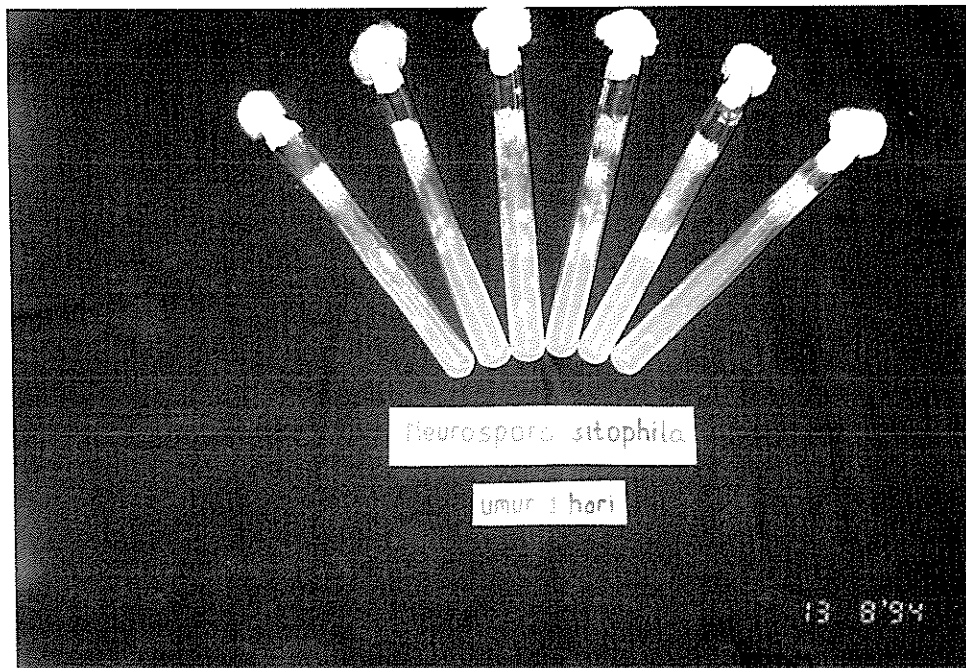
Neurospora sitophila merupakan salah satu jenis kapang yang dapat menghasilkan selulase. Kapang ini telah dikenal baik di Indonesia sebagai kapang oncom merah.

Penelitian menggunakan *Neurospora sitophila* yang telah dilakukan diantaranya produksi selulase pada bahan selulosa limbah jagung dan limbah tebu (Oguntumein, 1991) serta produksi enzim ekstraselular (selulase dan xilanase) pada substrat limbah padat kelapa sawit (Tun-Tedja-Irawadi, 1991). Sebelumnya, kapang jenis

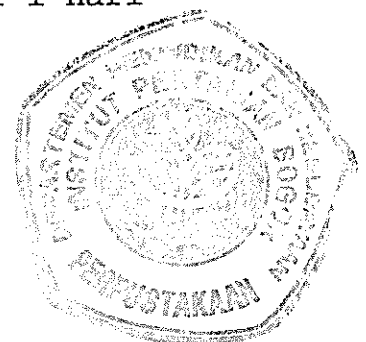


Aspergillus niger dan *Trichoderma viride* telah dikenal sebagai penghasil selulase yang baik.

Hasil penelitian Tun-Tedja-Irawadi (1991), menunjukkan *Neurospora sitophila* yang terbaik untuk digunakan sebagai inokulan adalah yang telah berumur 5 hari pada agar miring. Pertumbuhan *Neurospora sitophila* pada agar miring dimulai dengan munculnya hifa dan membentuk miselium berwarna putih menyerupai kapas. Setelah berumur 1 hari timbul spora yang berwarna orange kemerahan (Gambar 7). Selanjutnya semakin bertambah umur kapang,

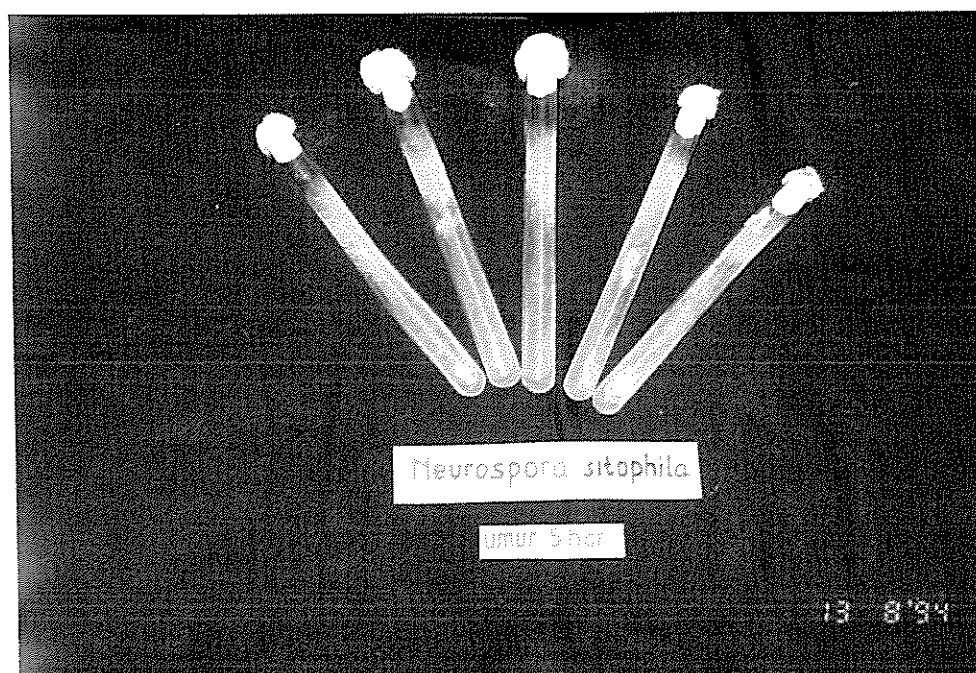


Gambar 7. *Neurospora sitophila* berumur 1 hari pada media agar miring



merah semakin hilang dan jumlah spora semakin banyak. Pada hari kelima kapang berwarna orange kekuningan (Gambar 8).

Pola tumbuh *Neurospora sitophila* pada agar miring adalah mendekati mulut tabung bukan pada agar miring (Gambar 7). Hal ini menunjukkan bahwa *Neurospora sitophila* adalah jenis kapang aerobik yang membutuhkan O_2 dalam pertumbuhannya. Sebelum digunakan, spora terlebih dahulu dilarutkan di dalam garam fisiologis, kemudian sebanyak 1 ml (mengandung $0.3 - 1.6 \times 10^7$ spora) digunakan sebagai inokulan pada substrat.



Gambar 8. *Neurospora sitophila* berumur 5 hari pada media agar miring

Pertumbuhan mikroorganisme termasuk kapang di dalam suatu kultur akan mengalami fase-fase tertentu. Menurut Fardiaz (1988), jika mikroorganisme dipindahkan ke dalam suatu medium, mula-mula akan mengalami fase adaptasi untuk menyesuaikan diri dengan keadaan disekitarnya. Lama fase adaptasi dipengaruhi oleh medium dan lingkungan pertumbuhan serta jumlah inokulan.

Fase pertumbuhan logaritmik ditandai dengan pembelahan sel yang cepat. Fase ini dipengaruhi oleh kondisi medium, pH, kandungan nutrisi, suhu dan kelembaban udara. Pada fase ini dibutuhkan energi cukup besar. Pertumbuhan lambat terjadi bila nutrisi yang tersedia sedikit. Pertumbuhan statis terjadi apabila terdapat hasil metabolisme yang beracun menghambat pertumbuhan. Selanjutnya bila nutrisi di dalam substrat telah habis maka mikroorganisme akan mulai mengalami kematian (Fardiaz, 1988). Menurut Maggy-T. Suhartono (1989), organisme pembentuk spora biasanya memproduksi enzim pada fase pasca eksponensial.

Masa siklus bagi tiap-tiap organisme berlainan satu dengan yang lain. Ada yang beberapa hari dan ada pula yang sampai seminggu. Siklus ini masih dipengaruhi lagi oleh ketersediaan nutrisi (Maggy-T. Suhartono, 1989). Gong dan Tsao (1979) menambahkan bahwa pada beberapa mikroorganisme, produksi selulase terjadi berkaitan

langsung dengan pertumbuhan dan kemampuan penetrasi miselium ke dalam substrat.

C. UKURAN PARTIKEL SUBSTRAT

Suatu sifat yang mencirikan berbagai fermentasi substrat padat adalah dengan memberi perlakuan awal berupa pengecilan ukuran partikel. Hasil penelitian Tanaka et al. (1988) menunjukkan bahwa perlakuan fisik berupa pengecilan ukuran merupakan perlakuan pendahuluan yang biasa dilakukan dalam proses delignifikasi limbah pertanian. Hal ini dapat meningkatkan kemampuan hidrolisis substrat oleh enzim serta mempermudah pemanfaatan unsur hara oleh *Neurospora sitophila*.

Pengecilan ukuran akan mempengaruhi luas permukaan partikel substrat dan ruang kosong antar partikel. Semakin kecil ukuran partikel substrat, maka luas permukaan semakin meningkat, namun diikuti dengan berkurangnya ruang kosong antar partikel substrat. Sedangkan yang dibutuhkan kapang adalah luas permukaan yang besar dengan ruang kosong antar partikel yang cukup untuk transfer oksigen. Hasil penelitian Knapp dan Howel (1980) menggunakan avicel sebagai substrat fermentasi dengan *Thermoactinomyces sp* mengatakan bahwa beberapa metoda perlakuan pendahuluan diantaranya pengecilan ukuran telah diuji dan umumnya memperlihatkan penambahan

laju dan tingkat hidrolisis substrat, pertumbuhan mikroorganisme dan produksi selulase.

Pemilihan taraf ukuran 10, 20 dan 30 mesh dilakukan secara *trial and error* berdasarkan pada hasil penelitian Tun-Tedja-Irawadi (1991) yang menggunakan substrat tandan kosong dan sabut kelapa sawit ukuran 20 mesh, yaitu ukuran yang biasa digunakan pada fermentasi substrat padat untuk memproduksi enzim. Dalam rangka optimalisasi, fermentasi dilakukan pada bioreaktor *Multiple Mini Packed Bed* dengan ukuran substrat 10, 20 dan 30 mesh. Perlakuan terbaik dilihat dari aktivitas selulase yang dihasilkan.

1. Aktivitas FP-ase

Aktivitas selulase lengkap menggambarkan pengaruh sinergis dari endoglukanase, selobiohidrolase dan β -glukanase. Substrat yang digunakan merupakan selulosa tidak larut, sehingga diperlukan waktu reaksi yang cukup yaitu selama 1 jam. Reaksi yang terjadi menurut Montenecourt dan Eveleigh (1979) dalam Enari (1983) ialah, pertama endoglukanase akan menyerang bagian selulosa yang amorf, dilanjutkan oleh selobiohidrolase yang membebaskan unit selobiosa dari ujung-ujung reduksi rantai selulosa. Kerjasama endoglukanase dan selobiohidrolase menghasilkan selooligosakarida dan akhirnya β -glukosidase

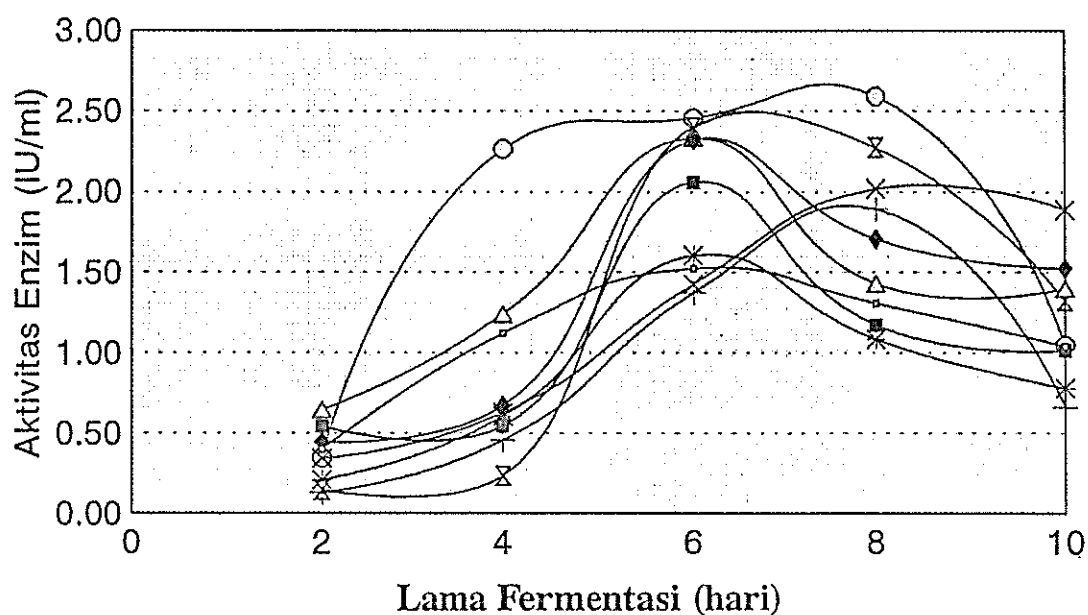
menghidrolisis selooligosakarida dan selobiosa menjadi glukosa. Nilai aktivitas FP-ase dinyatakan dalam IU (International Unit) per ml enzim kasar.

Dari Gambar 9 terlihat kecenderungan nilai tertinggi dari masing-masing perlakuan dicapai setelah fermentasi selama 6 atau 8 hari. Untuk tandan kosong ukuran 10 mesh nilai tertinggi diperoleh dari perlakuan sabut ukuran 30 mesh dengan perbandingan 1 : 2 (tandan kosong berbanding sabut). Nilai aktivitas terendah pada tandan kosong ukuran 10 mesh dan sabut ukuran 10 mesh dengan perbandingan 2:1.

Dengan ukuran tandan kosong yang sama, terlihat bahwa aktivitas FP-ase meningkat dengan semakin kecilnya ukuran partikel substrat. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Pandey (1990) yang meneliti pengaruh ukuran partikel substrat terhadap produksi enzim pada fermentasi substrat padat. Hasil yang diperoleh, substrat dengan ukuran partikel yang lebih kecil menghasilkan aktivitas yang lebih tinggi.

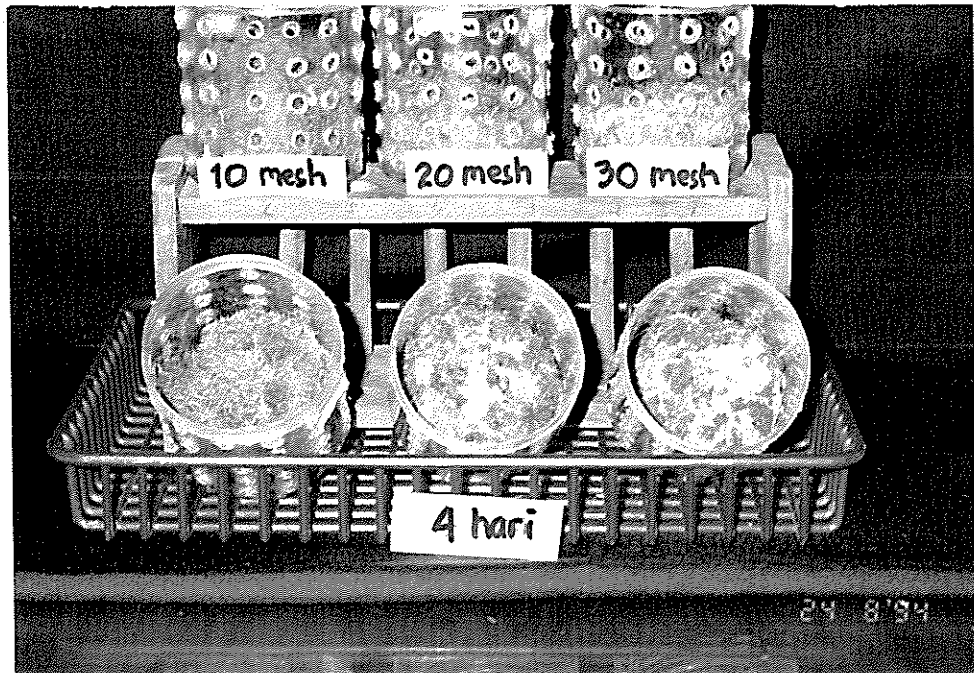
Pada Gambar 10 dengan ukuran tandan kosong yang sama (10 mesh) semakin kecil ukuran sabut memperlihatkan pertumbuhan *Neurospora sitophila* semakin baik. Bila dihubungkan dengan aktivitas FP-ase pada Gambar 9 terlihat hubungan bahwa dengan ukuran tandan kosong yang sama, semakin kecil ukuran sabut maka aktivitas selulase dan pertumbuhan *Neurospora sitophila*

semakin baik. Diduga tandan kosong ukuran 10 mesh menghasilkan volume ruang kosong yang menyediakan cukup O_2 untuk pertumbuhan *Neurospora sitophila*. Gambar 11 menunjukkan aktivitas FP-ase pada tandan kosong ukuran 20 mesh dengan berbagai ukuran sabut dan perbandingan. Setiap perlakuan menunjukkan pola aktivitas FP-ase yang hampir sama. Secara umum pada hari kedua fermentasi, nilai aktivitas FP-ase masih sangat kecil. Hari ke empat aktivitas FP-ase



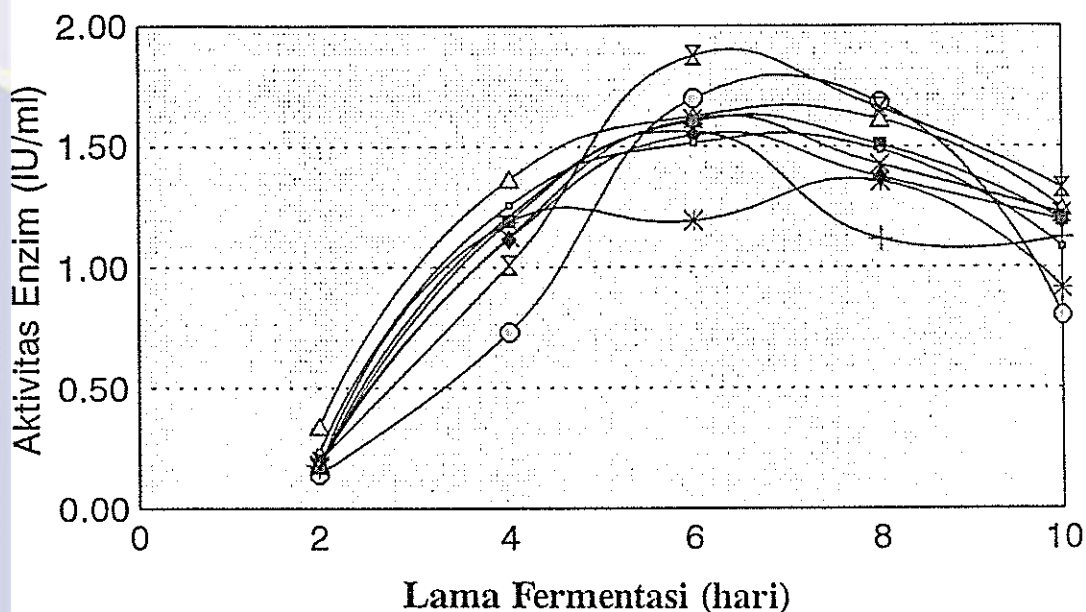
○	2(10) : 1(10)	+	1(10) : 1(10)	*	1(10) : 2(10)
■	2(10) : 1(20)	*	1(10) : 1(20)	◆	1(10) : 2(20)
△	2(10) : 1(30)	⊗	1(10) : 1(30)	○	1(10) : 2(30)

Gambar 9. Aktivitas FP-ase tandan kosong 10 mesh pada berbagai ukuran sabut dan perbandingan



Gambar 10. Pertumbuhan *N. sitophila* pada substrat tandan kosong 10 mesh

naik dan mencapai puncak pada hari ke enam, kemudian terus menurun sampai akhir fermentasi. Pengecualian terjadi pada perlakuan tandan ukuran 20 mesh dengan sabut 10 mesh pada perbandingan 2:1 yang mencapai nilai tertinggi pada hari ke delapan fermentasi, diduga *Neurospora sitophila* membutuhkan waktu yang lebih lama untuk menghidrolisis sabut yang berukuran lebih besar. Nilai tertinggi diperoleh dari perlakuan sabut ukuran 30 mesh dengan perbandingan 1:1.



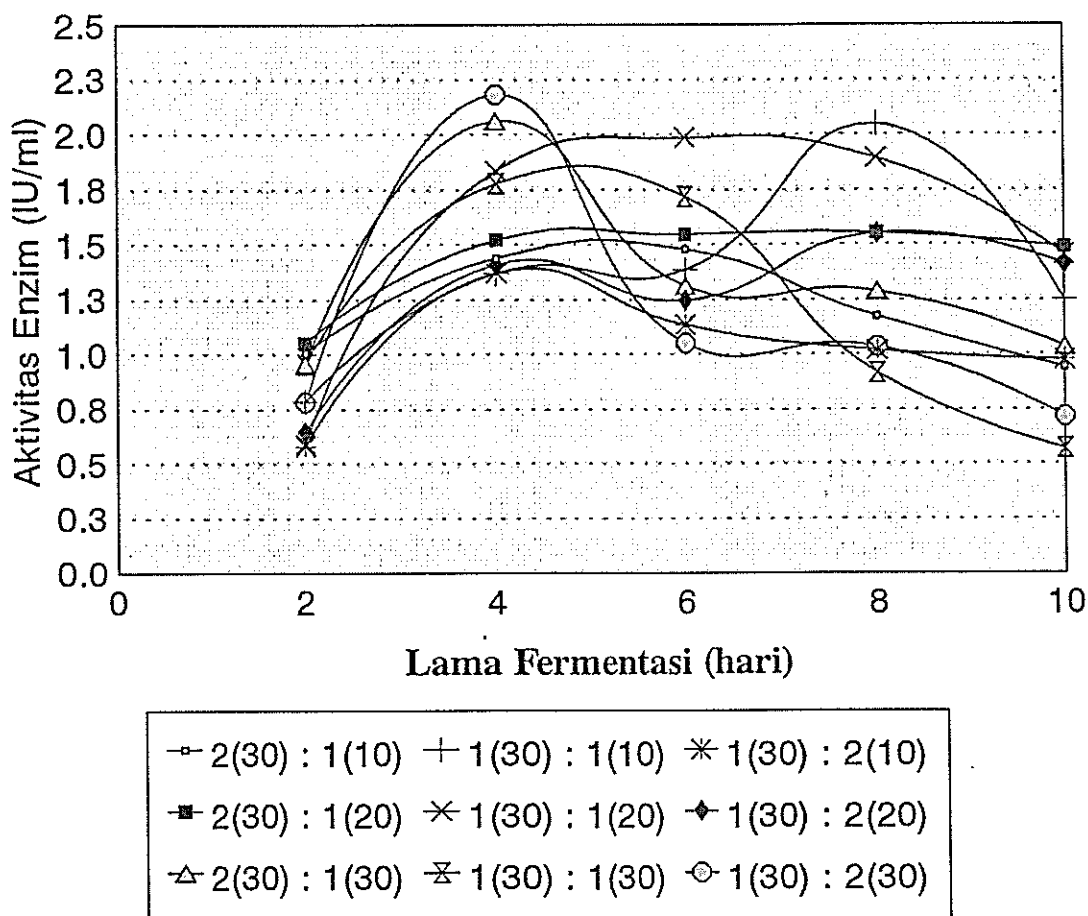
◻ 2(20):1(10)	+ 1(20):1(10)	* 1(20):2(10)
◼ 2(20):1(20)	× 1(20):1(20)	◆ 1(20):2(20)
△ 2(20):1(30)	⊗ 1(20):1(30)	○ 1(20):2(30)

Gambar 11. Aktivitas FP-ase tandan kosong 20 mesh pada berbagai ukuran sabut dan perbandingan

Sama halnya dengan tandan kosong ukuran 10 mesh, pada tandan kosong ukuran 20 mesh semakin kecil ukuran sabut yang digunakan aktivitas selulase semakin tinggi. Walaupun demikian, tandan kosong ukuran 10 mesh memiliki nilai aktivitas FP-ase yang lebih tinggi dari tandan kosong 20 mesh.

Pada tandan kosong ukuran 30 mesh (Gambar 12) dapat dilihat pola yang hampir sama yaitu nilai tertinggi dicapai pada hari ke empat fermentasi, yaitu pada perlakuan tandan kosong ukuran 30 mesh

dengan sabut ukuran 30 mesh pada perbandingan 1:2. Nilai aktivitas FP-ase yang dihasilkan lebih kecil dibandingkan tandan kosong ukuran 20 mesh dan tandan kosong ukuran 10 mesh. Sedangkan nilai aktivitas terkecil adalah pada perlakuan tandan kosong ukuran 30 mesh dengan sabut ukuran 10 mesh pada perbandingan 1:2. Dari ketiga grafik diatas (Gambar 9, 11, dan 12) yaitu perlakuan tandan kosong ukuran 10 mesh, tandan kosong ukuran 20 mesh, tandan kosong ukuran 30 mesh pada berbagai ukuran sabut dan perbandingan.



Gambar 12. Aktivitas FP-ase tandan kosong 30 mesh pada berbagai ukuran sabut dan perbandingan

Sabut ukuran 30 mesh selalu menghasilkan nilai tertinggi, sebaliknya semakin besar ukuran tandan kosong nilai aktivitas semakin tinggi. Dari grafik dihasilkan kecenderungan bahwa semakin besar ukuran tandan kosong dan semakin kecil ukuran sabut yang digunakan maka aktivitas enzim semakin tinggi. Demikian pula lama fermentasi yang dibutuhkan cenderung lebih singkat dengan semakin kecil ukuran tandan kosong.

Melihat kecenderungan diatas, diduga ukuran substrat yang lebih kecil lebih mudah dan lebih cepat dimanfaatkan oleh *Neurospora sitophila* dengan memproduksi enzim untuk pertumbuhannya. Disamping itu, ukuran partikel juga mempengaruhi sifat menyerap bahan terhadap air maupun nutrisi.

Menurut Muniswaran (1993), ukuran yang lebih kecil, luas permukaannya lebih besar namun daya serapnya rendah. Dengan ukuran yang lebih besar, luas permukaan lebih kecil, tetapi daya serapnya lebih baik.

Kombinasi tandan kosong ukuran 10 mesh dan sabut ukuran 30 mesh menghasilkan kondisi optimal untuk pertumbuhan *Neurospora sitophila*, yaitu luas permukaan yang cukup serta tersedianya O_2 yang dibutuhkan selama fermentasi.

Nilai aktivitas FP-ase tertinggi adalah pada perlakuan tandan kosong ukuran 10 mesh dengan sabut



ukuran 30 mesh pada perbandingan 1:2 yaitu 2.591 IU/ml. Bila dibandingkan dengan penelitian terdahulu yaitu Tun-Tedja-Irawadi (1991) menghasilkan aktivitas FP-ase sebesar 2.33 IU/ml pada substrat tandan kosong 20 mesh dan sabut 20 mesh dengan perbandingan 1:1. Nilai aktivitas FP-ase yang diperoleh pada penelitian ini adalah lebih besar.

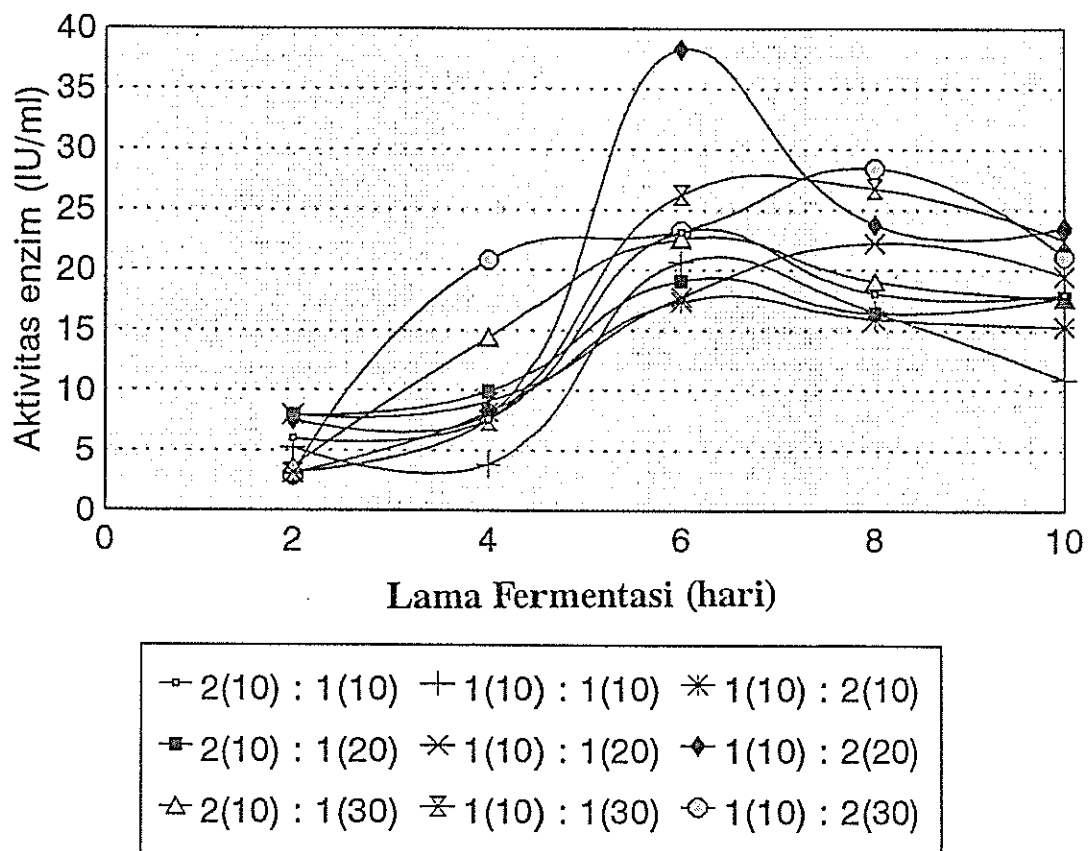
Secara visual, pertumbuhan *Neurospora sitophila* pada substrat dengan ukuran tandan kosong yang sama, semakin kecil ukuran sabut menunjukkan pertumbuhan yang lebih baik. Namun pada substrat dengan tandan kosong ukuran 30 mesh pertumbuhan *Neurospora sitophila* hanya pada permukaan saja, sebaliknya pada tandan kosong 10 mesh dan tandan kosong 20 mesh pertumbuhan *Neurospora sitophila* lebih merata sampai ke dalam substrat.

2. Aktivitas CMC-ase

Pengukuran aktivitas endoglukanase (CMC-ase) dilakukan dengan menggunakan substrat CMC yang merupakan turunan selulosa yang dapat larut. Gambar 13 menyajikan aktivitas CMC-ase dalam bentuk kurva untuk perlakuan tandan kosong ukuran 10 mesh dengan berbagai ukuran sabut dan perbandingan. Pada hari ke dua fermentasi nilai aktivitas CMC-ase masih sangat rendah. Hari ke empat fermentasi mulai

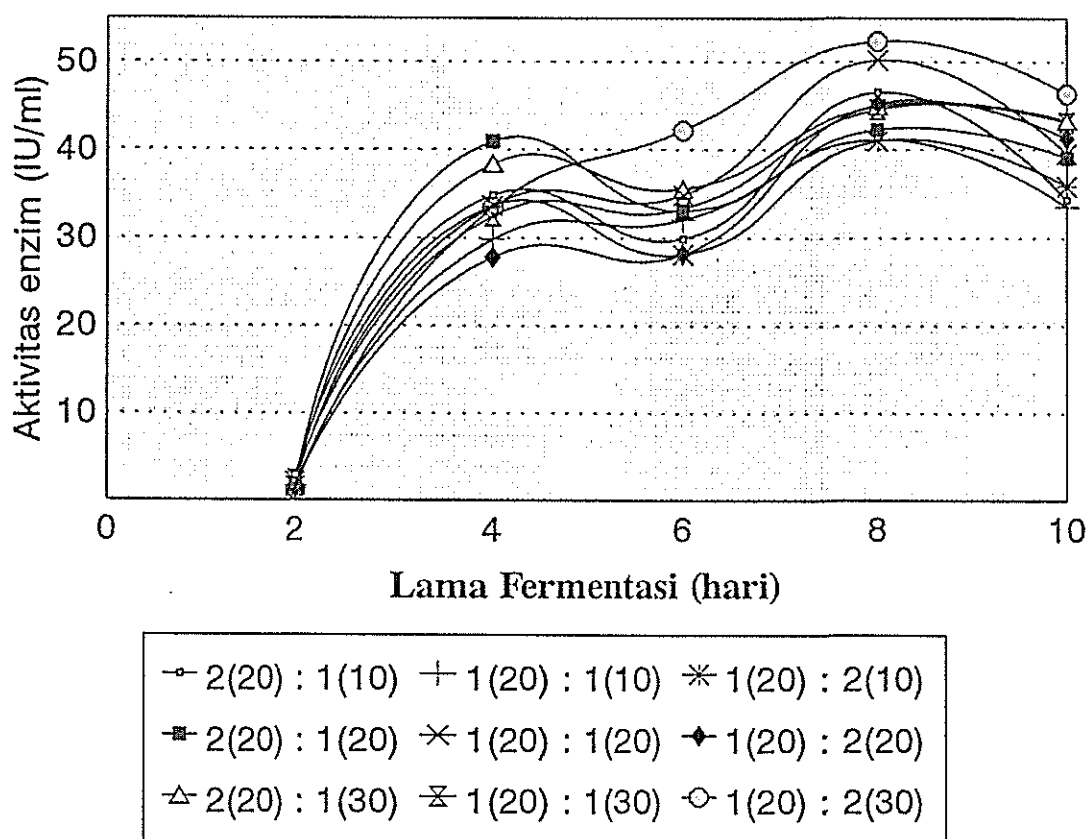
meningkat dan mencapai nilai tertinggi pada hari ke 6 fermentasi. Hari selanjutnya aktivitas CMC-ase turun sampai hari ke sepuluh (hari terakhir fermentasi). Nilai tertinggi diperoleh pada perlakuan tandan kosong 10 mesh dan sabut ukuran 20 mesh dengan perbandingan 1:2.

Gambar 14 memperlihatkan pola yang sangat seragam, yaitu pada perlakuan tandan kosong ukuran 20



Gambar 13. Aktivitas CMC-ase tandan kosong 10 mesh pada berbagai ukuran sabut dan perbandingan

mesh dengan berbagai ukuran sabut dan perbandingan. Pada hari kedua fermentasi terlihat aktivitas CMC-ase masih sangat rendah, kemudian melonjak naik pada hari ke empat fermentasi. Hari ke enam fermentasi aktivitas CMC-ase mulai turun dan selanjutnya naik pada hari ke-8 fermentasi dan turun kembali pada akhir fermentasi. Pada Gambar 15 terlihat hubungan aktivitas CMC-ase dan gula pereduksi

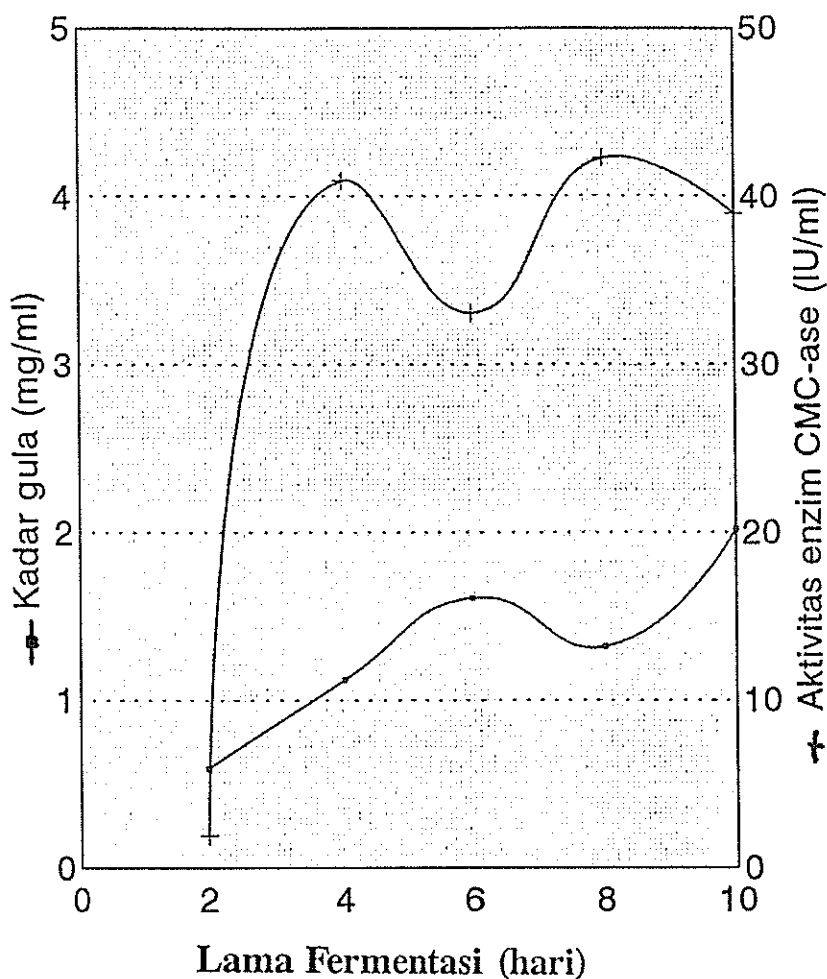


Gambar 14. Aktivitas CMC-ase tandan kosong 20 mesh pada berbagai ukuran sabut dan perbandingan

Pola fermentasi yang mengalami stagnasi ini diduga berhubungan dengan persediaan gula pereduksi pada substrat. Hal ini dapat diterangkan dengan melihat dan kadar gula pereduksi selama fermentasi untuk perlakuan tandan kosong ukuran 20 mesh dan sabut ukuran 20 mesh dengan perbandingan 2:1.

Pada saat gula pereduksi rendah (hari ke-4 dan 8) diperoleh nilai aktivitas CMC-ase yang tinggi. Dan sebaliknya ketika nilai gula pereduksi tinggi (hari ke-6 dan ke-10 fermentasi) aktivitas CMC-ase rendah. Diduga dengan tersedianya gula pereduksi yang cukup banyak pada substrat, maka Selulase tidak aktif dan sebaliknya bila persediaan gula pereduksi telah habis (sedikit), selulase kembali aktif untuk memproduksi gula pereduksi. Mandels dan Weber (1969) dalam Tun-Tedja-Irawadi (1991) menjelaskan bahwa konsentrasi yang tinggi dari selobiosa atau sumber karbon yang dapat cepat dimetabolisme seperti glukosa atau gliserol dapat menghambat pembentukan selulase.

Gambar 16 menunjukkan aktivitas CMC-ase pada perlakuan tandan kosong ukuran 30 mesh dengan berbagai ukuran sabut dan perbandingan. Pola yang disajikan pada Gambar 16 antar perlakuan adalah sangat seragam. Hari kedua fermentasi aktivitas CMC-ase

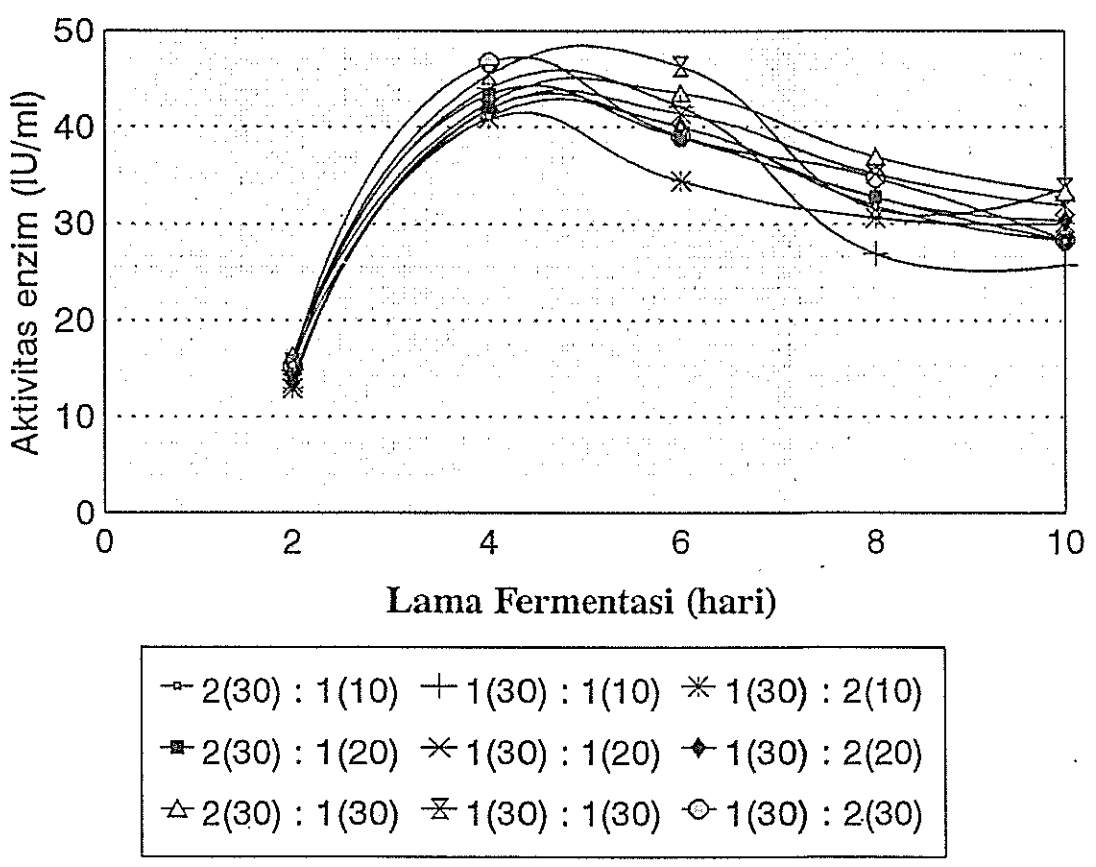


Gambar 15. Hubungan aktivitas CMC-ase dengan gula pereduksi

masih sangat rendah, kemudian melonjak naik pada hari ke 6 fermentasi dan selanjutnya terus turun sampai akhir fermentasi.

Nilai aktivitas tertinggi CMC-ase dari semua perlakuan adalah 52.345 IU/ml. Nilai ini diperoleh dari perlakuan tandan kosong ukuran 20 mesh, sabut ukuran 30 mesh pada perbandingan 1:2.

Berbeda dengan FP-ase yang dengan jelas menunjukkan semakin besar ukuran tandan dan semakin kecil ukuran sabut maka aktivitas selulase semakin tinggi. Nilai tertinggi aktivitas CMC-ase diperoleh pada perlakuan tandan kosong ukuran 20 mesh dengan sabut ukuran 30 mesh pada perbandingan 1 : 2. Hal ini terjadi karena CMC-ase merupakan selulase yang menyerang bagian amorf dari selulosa sehingga aktivitasnya lebih tinggi pada substrat yang berukuran lebih kecil.



Gambar 16. Aktivitas CMC-ase tandan kosong 30 mesh pada berbagai ukuran sabut dan perbandingan

Secara umum aktivitas FP-ase dan CMC-ase menunjukkan pola yang sama yaitu pada awal fermentasi aktivitas selulase masih sangat rendah selanjutnya aktivitas bertambah dengan bertambahnya waktu fermentasi sampai mencapai titik tertinggi dan kemudian terus menurun sampai hari terakhir fermentasi. Pola ini berhubungan dengan pola pertumbuhan kapang seperti yang telah dijelaskan di depan, dimana pada awal fermentasi *N. sitophila* masih mengalami fase adaptasi.

Aktivitas selulase diharapkan tetap konstan setelah mencapai titik tertinggi sampai akhir fermentasi. Mengingat selulase merupakan biokatalisator yang tidak ikut bereaksi. Pola aktivitas yang menurun setelah mencapai titik tertinggi pada penelitian ini diduga diantaranya disebabkan *N. sitophila* telah mengalami fase kematian, penghambatan oleh kandungan gula pereduksi yang tinggi (Gambar 15).

Hasil analisis statistik menunjukkan faktor ukuran tandan kosong dan ukuran sabut berpengaruh terhadap aktivitas CMC-ase dan FP-ase (Lampiran 5 dan 6). Berarti dengan ukuran tandan kosong dan sabut yang berbeda akan diperoleh nilai aktivitas CMC-ase dan FP-ase yang berbeda pula secara nyata.



E. PERBANDINGAN TANDAN KOSONG DAN SABUT KELAPA SAWIT

Perbandingan tandan kosong dan sabut yang tepat sebagai substrat fermentasi akan menghasilkan kondisi yang sesuai bagi *N. sitophila* untuk memproduksi Selulase, mengingat kandungan nutrisi dan sifat bahan yang berbeda.

Taraf perbandingan dipilih secara *trial and error* yaitu 2:1 (Tandan : Sabut), 1:1 dan 1:2. Dengan berdasarkan pada hasil penelitian Tun-Tedja-Irawadi (1991) yaitu dibandingkan substrat yang terdiri atas tandan kosong saja atau sabut saja, campuran tandan kosong dan sabut (1:1) menghasilkan FP-ase dan CMC-ase dengan aktivitas yang lebih tinggi.

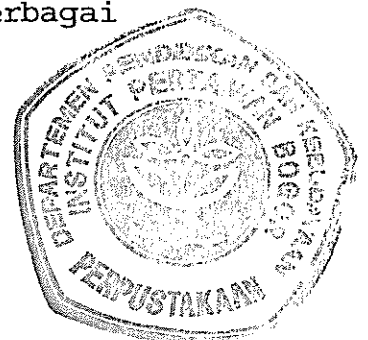
Gambar 9, 11, 12, 13, 14 dan 16 diatas menunjukkan pola yang sama pada berbagai perbandingan, dilihat dari aktivitas FP-ase dan CMC-ase. Nilai aktivitas tertinggi diperoleh pada perbandingan 1:2 baik untuk FP-ase maupun CMC-ase. Tandan dibandingkan sabut lebih banyak mengandung lignin, sehingga komponen karbohidratnya kurang dapat dimanfaatkan oleh *Neurospora sitophila* sebagai sumber karbon. Sabut lebih unggul dan dibutuhkan lebih banyak di dalam substrat karena kandungan ligninnya jauh lebih rendah dari tandan.

Secara visual dapat dilihat pada Gambar 17, dimana perbandingan selain mempengaruhi aktivitas selulase juga

mempengaruhi pertumbuhan *Neurospora sitophila*. Pada perlakuan tandan kosong ukuran 10 mesh dan sabut ukuran 20 mesh pada perbandingan 2:1 (Tandan : sabut), pertumbuhan *N. sitophila* kurang baik dan semakin banyak jumlah sabut di dalam substrat pertumbuhan menjadi semakin baik. Hal ini juga menunjukkan bahwa pertumbuhan *Neurospora sitophila* sebanding dengan aktivitas selulase.



Gambar 17. Pertumbuhan *Neurospora sitophila* pada tandan 10 mesh, sabut 20 mesh dengan berbagai perbandingan



V. KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

Tandan kosong dan sabut kelapa sawit dapat digunakan sebagai substrat pada fermentasi padat untuk memproduksi selulase oleh *Neurospora sitophila*. Pengecilan ukuran substrat mempengaruhi aktivitas selulase. Kombinasi tandan kosong ukuran 10 mesh dan sabut 30 mesh menghasilkan aktivitas FP-ase yang tertinggi. Sedangkan aktivitas CMC-ase tertinggi diperoleh pada kombinasi tandan kosong ukuran 20 mesh dan sabut 30 mesh.

Secara statistik faktor ukuran tandan kosong, ukuran sabut dan lama fermentasi adalah berpengaruh nyata terhadap aktivitas FP-ase dan CMC-ase. Sedangkan perbandingan tandan dan sabut yang digunakan tidak berpengaruh nyata terhadap aktivitas FP-ase dan CMC-ase.

Semakin besar ukuran partikel substrat dibutuhkan hari fermentasi yang lebih lama. Lama fermentasi terbaik untuk memproduksi CMC-ase adalah 6 hari dan 8 hari untuk memproduksi FP-ase. Perlakuan yang menghasilkan aktivitas FP-ase tertinggi adalah tandan kosong ukuran 10 mesh dan sabut ukuran 30 mesh yaitu 2.591 IU/ml. CMC-ase tertinggi diperoleh pada perlakuan tandan kosong ukuran 20 mesh dan sabut 30 mesh. Nilai tertinggi tersebut diperoleh pada perbandingan 1 : 2 (tandan

kosong : sabut), namun sesuai dengan hasil analisa statistik nilai perbandingan yang diperoleh yaitu 1:2 tidak berpengaruh nyata.

B. SARAN

Pada penelitian ini dihasilkan biomassa dari media fermentasi. Perlu dilakukan penelitian guna pemanfaatan biomassa ini sebagai makanan ternak.

Enzim yang dihasilkan memiliki aktivitas yang cukup tinggi. Aplikasi penggunaan selulase ini untuk menghidrolisis limbah-limbah pertanian dapat dilakukan dalam penelitian selanjutnya.

DAFTAR PUSTAKA

AOAC. 1980. Official Method of Analytic of Associaton of Official Analytic Chemist. Association of Official Analytic Chemist, Washington DC.

Achmadi, S. 1989. Kimia Kayu. Diktat PAU Ilmu Hayati. IPB, Bogor.

Alexopoulus, G.J. dan C.W. Mims. 1979. Introduction Mycology. John willey and Sons, New York.

Bilgrami, K.S. dan R.N. Verma. 1978. Physiology of Fungi. Vikas publishing, house PVT LTD, New Delhi.

Banerjee, U.C., Y Chisti dan M. Moo-young. 1994. Protein Enrichment of Corn Stover Using *Neurospora sitophila*. Simp. Bioproducts Processing. University of Waterloo, Canada.

Chahal, D.S. 1985. Solid State Fermentation with *Trichoderma reesei* for Cellulase Production. Appl. Environ. Microbiol. 49(1) : 205-210.

Chang, M. M, T.Y.C. Chon dan G.T. Tsao. 1981. Structure Pretreatment and Hidrolysis Cellulose. Adv. Biochem. Eng., vol 20.

Darnoko. 1991. Potensi Pemanfaatan Limbah Lignoselulosa Kelapa Sawit Melalui Biokonversi. Berita Pen. Perkebunan, Medan.

Enari, T.M. 1983. Microbial Cellulases. Di dalam W.M. Fogarty (Ed.). Microbial Enzymes and Biotechnology. Appl. Science. London : 183 - 223.

Fardiaz, S. 1988. Fisiologi Fermentasi. PAU IPB, Bogor.

Fajarrini, K. 1991. Hidrolisis Enzimatik Tandan Kosong Kelapa Sawit dengan Perlakuan Pendahuluan Perendaman dalam Larutan Besi III Natrium Tartrat. Skripsi. Fateta IPB, Bogor.

Frost, G.M. dan D.A. Moss. 1987. Production of Enzymes by Fermentation. Dalam Biotechnology Vol. 7a. VHC, Germany.

Goering, H.K. dan P.T. Van Soest. 1970. Forage Analysis Agriculture Handbook no.379. Ag Res Service, USDA.

- Gong, S.C. dan G.T. Tsao. 1979. Cellulases and Biosynthesis Regulation. Di dalam D. Perlman (Ed.). Annual Report on Fermentation Processes Vol 3. Academic Press, New York.
- Gumbira-Said, E. 1992. Development of Packed Bed Solid State Cultivation Sistem for The Protein Enrichment of Sago Starch. Queensland, Australia.
- IRRI. 1972. Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice The International Rice. Research Institute Losbanos, Philipphines.
- Judoamidjojo, R. M., E. Gumbira-Said dan L. Hartoto. 1989. Biokonversi. PAU-IPB, Bogor.
- Knapp, J.S dan J. A Howel. 1980. Solid Substrate Fermentation. Di dalam A. Wiseman (Ed.). Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology. John Willey and Sons, New York.
- Liesbetini-Hartoto. 1992. Teknologi Fermentasi. PAU-IPB, Bogor.
- Lonsane, B. K., N.P. Ghildyal, S. Budiartman dan S.V. Ramakrishna. 1985. Engineering Aspects of Solid State Fermentation. J. Enzyme Microb Tech, vol.7.
- Maggy-T. Suhartono. 1989. Enzim dan Bioteknologi. PAU IPB, Bogor.
- Mandels, M dan E. T. Reese. 1957. Induction of Cellulose in *Trichoderma viride* as Influenced by Carbon Sources and Metals. J. Bacteriol. 73:269.
- Miller. G.L. 1959. The Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Anal. Chem.
- Mikosari. 1990. Optimasi Hidrolisis Enzimatik Tandan Kosong Kelapa Sawit dengan menggunakan Asam Sulfat Encer. Skripsi. Fateta IPB, Bogor.
- Muniswaran, P.K.A., P Selvakumar dan N.C.I.N. Charyulu. 1993. Production of Cellulases from Coconut Coir Pith in Solid State Fermentation. J. Chem. Biotechnol.
- Oguntimein, G. O. Vlach dan M. Moo-young. 1991. Production of Cellulolytic Enzymes by *Neurospora sitophila* Grown on Cellulosic Material. Bioresource Technology 39 :277-283. Elsevier Publishers, England.

- Pandey, A. 1991. Effect of Particle Size of Substrate on Enzyme Production in Solid State Fermentation. J. Bioresource Technology. Elsevier Publishers, England.
- Pratiwi, W. 1986. Pembuatan Pulp Kertas dari Tandan Kosong Kelapa Sawit dengan Proses Soda Antrakinon. Fateta-IPB, Bogor.
- Riyadi, R. P. 1995. Kajian Biodegradasi Tandan Kosong Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* JACQ) menggunakan Kultivasi Media Padat. Skripsi. FATETA-IPB, Bogor.
- Smith, J. E. 1990. Prinsip Bioteknologi. PT Gramedia, Jakarta.
- Stanberg, O. 1976. Production of Cellulose by *Trichoderma*. Di dalam E.L. Gaden Jr. (Ed.). Enzymatic Conversion of Cellulosic Materials. Technology and Application.
- Tanaka, M., M Ikesaka dan R. Matsuno. 1988. Effect of Poresize in Substrate and Difusion of Enzyme on Hydrogen of Cellulosic with Cellulases. Biotechnol, Bioeng. 32 : 689-709.
- Tarigan, E. 1989. Pemanfaatan Limbah Kelapa Sawit menjadi Silase. Fateta-IPB, Bogor.
- Tsao, G.T., M.C. Ladisch, T.A. Ladisch, T.A. Hsu, B. Dale dan T. Chou. 1978. Fermentation Substrate from Cellulosic Materials. Di dalam D. Pearlman (Ed.). Production of Fermentation Sugars from cellulosic Materials. Annuals report on fermentation Processes. Vol 2.
- Tun-Tedja-Irawadi. 1990. Selulase. PAU-IPB, Bogor.
- Tun-Tedja-Irawadi. 1991. Produksi Enzim Ekstraselular dari *Neurospora sitophila* pada Substrat Limbah Padat Kelapa Sawit. Disertasi Fakultas Pasca Sarjana IPB, Bogor.

Lampiran 1. Komposisi Nutrisi Substrat

Larutan nutrisi yang digunakan adalah berdasarkan larutan nutrisi standar dalam produksi selulase oleh Mandels dan Reese (1967) disesuaikan dengan komposisi substrat (Tandan kosong dan sabut kelapa sawit) oleh Tun-Tedja-Irawadi (1991).

A. LARUTAN NUTRISI A

1. 136.5 mg $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
2. 122.5 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
3. 175 mg CoCl dalam air suling 100 ml

B. LARUTAN NUTRISI B

1. Larutan A sebanyak 10 ml
2. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sebanyak 12.25 g
3. KH_2PO_4 sebanyak 17.5 g
4. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ sebanyak 2.625 g
5. $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sebanyak 2.625 g
6. Pepton sebanyak 4.375 g

Semua bahan dimasukkan ke dalam labu ukur 250 ml dengan penambahan air destilata. Pada setiap gram substrat ditambahkan 2 ml larutan B.

Lampiran 2. Prosedur Analisis

A. ANALISIS KIMIA SUBSTRAT

1. Analisis Kadar Air (AOAC 1980)

Pinggan aluminium dipanaskan pada suhu 105°C dan kemudian didinginkan dalam desikator sebelum ditimbang. Kemudian 2 gram contoh dimasukkan ke dalam pinggan aluminium yang telah diketahui beratnya dan panaskan dalam oven pada suhu 105°C selama satu jam. Selanjutnya pemanasan diulang sampai mencapai berat yang tetap. Sisa contoh dihitung sebagai berat padatan dan kadar air yang hilang sebagai air.

2. Analisis Kadar Abu (AOAC, 1980)

Cawan porselin terlebih dahulu dipanaskan di dalam tanur, kemudian dinginkan dalam desikator dan ditimbang. Sebanyak 3 - 5 gram contoh ditimbang dan dimasukkan dalam cawan selanjutnya dimasukkan ke dalam tanur bersuhu 550°C sampai bahan menjadi abu dan berwarna agak kelabu. Contoh dimasukkan ke dalam desikator dan setelah dingin ditimbang. Sisa berat contoh dihitung sebagai kadar abu.

3. Analisis Mineral (IRRI, 1972)

Contoh sebanyak 0.5 gram dimasukkan ke dalam labu kjedahl 75 ml, ditambah 5 ml asam campuran (750 ml HNO_3 , $150\text{ ml H}_2\text{SO}_4$ dan 300 ml HClO_4 60-62%) kemudian dibiarkan selama 2 jam. Selanjutnya dipanaskan secara berangsur-angsur sampai larutan bening. Dinginkan lalu diencerkan dengan air bebas ion dalam labu takar 50 ml, kemudian disaring dengan kertas whatman no.1, lalu diukur dengan spektrofotometer.

4. Kadar Serat Kasar (AOAC, 1980)

Contoh didekstruksi di dalam 200 ml H_2SO_4 1.25% selama 30 menit dalam erlenmeyer dengan menggunakan api yang kecil. Panas api diatur sehingga busa tidak terbentuk, kemudian disaring.

Filtrat dibuang dan endapan dicuci dengan air panas 25 ml. Endapan dipindahkan ke dalam erlenmeyer dan didekstruksi di dalam 200 ml NaOH 25%

selama 30 menit, sementara itu dilakukan pengeringan kertas saring ashless dalam oven bersuhu 105°C selama 1 jam kemudian kertas saring ditimbang.

Hasil destruksi dalam keadaan panas disaring dengan kertas saring yang telah dikeringkan dan dibilas dengan air panas dan alkohol 96%, kertas dan ampasnya dipindahkan ke dalam cawan porselen. Kemudian dipanaskan dalam oven bersuhu 105°C dan dikeringkan sampai berat kertas dan isinya konstan, lalu ditimbang.

Cawan diabukan pada suhu 600°C selama 2 jam, didinginkan ke dalam eksikator dan ditimbang. Kadar serat kasar diperoleh dengan rumus :

$$\text{Kadar serat kasar} = \frac{a - b - c}{d} \times 100\%$$

- a = berat cawan dan isi setelah dipanaskan
- b = berat cawan dan isi setelah diabukan
- c = berat kertas saring ditambah faktor koreksi berat abu kertas saring ashless
- d = berat contoh awal

5. Analisis Kadar Selulosa (Goering dan Van Soest, 1970)

Contoh berukuran 20-30 mesh sebanyak 1 gram (S) dianalisis serat deterjen asamnya (ADF =W1). Cawan pengabuan ditempatkan pada talam berisi air setinggi 1 cm (serat jangan sampai basah). Reagen A ditambahkan sebanyak 25 ml. Reagen A ditambahkan sebanyak 25 ml dan dibiarkan selama 90 menit. Kemudian dilakukan penyaringan secara vakum, cawan ditempatkan pada talam yang bersih. Ke dalam cawan ditambahkan reagen B sampai setengahnya, dan setelah 5 menit dilakukan penyaringan sampai serat berwarna putih. Cawan dicuci dengan etanol 80 persen, disaring (diulangi dua kali) dan dikeringkan pada suhu 100°C selama satu hari sampai beratnya konstan (W2). Kemudian dilakukan pengabuan pada suhu 500°C selama 2 jam, didinginkan dan ditimbang (W3).

$$\text{Kadar selulosa} = ((W2 - W3) / S) \times 100 \%$$

6. Penentuan Kadar Hemiselulosa (Goering dan Van Soest, 1970)

1. Pembuatan Pereaksi

a. Pereaksi NDF

Natrium dedosil sulfat (SDS)	30.00 g
EDTA	18.61 g
Natrium borat dekahidrat	6.81 g
Dinatrium hidrogen fosfat	4.56 g
Etilen glikol monoetil eter	10.00 g
Air suling	1000.00 g

EDTA dan natrium borat dekahidrat dimasukkan dalam labu, ditambahkan air secukupnya dan dipanaskan sampai larut. Larutan yang dihasilkan ditambahkan ke SDS dan Etilen glikol monoetil eter.

Dinatrium hidrogen fosfat dimasukkan dalam labu dan dipanaskan sampai larut. Setelah itu dicampurkan dengan larutan diatas dan diatur pH-nya (seharusnya 6.9 -7.1).

b. Pereaksi ADF

Asam sulfat	49.04 g
Cetil trimetilamonium bromid (CTAB)	20.00 g
Air suling	1000.00 ml

Asam sulfat diencerkan dengan air hingga normalitasnya 1 N. Standarisasi dilakukan dengan titrasi. Setelah itu ditambahkan CTAB.

2. Metoda

Kadar hemiselulosa diperoleh dengan menghitung selisih NDF - ADF

1. Serat Deterjen Netral (NDF)

Contoh kering berukuran 20-30 mesh ditimbang sebanyak 0.5-1.0 gram di dalam labu reflux, dan ditambahkan 100 ml reagen NDF, 2 ml dekahidronaptalen dan 0.5 gram natrium sulfit. Kemudian dididihkan selama 5-10 menit. Setelah mendidih direfluks selama 60 menit, dan disaring dengan cawan gooch (yang telah diketahui beratnya) secara vakum. Dengan menggunakan air panas, contoh

vakum. Dengan menggunakan air panas, contoh di dalam labu dicuci. Ke dalam cawan dituangkan air panas dan disaring lagi (ulangi beberapa kali). Terakhir dicuci dengan aseton (2 kali) dan disaring kembali. Cawan dikeringkan pada 100°C selama 1 malam.

$$\text{NDF} = (W_1 - W_0) / S$$

W_1 = Bobot cawan isi
 W_0 = Bobot cawan kosong
 S = Bobot contoh kering

b. Serat Deterjen Asam (ADF)

Contoh kering berukuran 20-30 mesh ditimbang sebanyak 1.0 gram di dalam labu refluks dan ditambahkan 100 ml reagen ADF dan 2 ml dekahidronaptalen. Kemudian dididihkan selama 5-10 menit. Setelah mendidih direfluks selama 60 menit dan disaring dengan cawan gooch (yang telah diketahui beratnya) secara vakum. Contoh di dalam labu dicuci dengan air panas dan disaring kembali. Terakhir dicuci dengan aseton sampai filtrat tidak berwarna. Bila perlu dilakukan pencucian dengan hexan. Cawan dikeringkan pada 100°C selama 1 malam dan ditimbang.

$$\text{ADF} = (W_1 - W_0) (100) / S$$

W_1 = Berat cawan isi
 W_0 = Berat cawan kering
 S = Berat contoh kering

7. Analisis Kadar Lignin Metoda Klason (Tun-Tedja-Irawadi, 1991)

Prosedur analisis sama dengan analisis kadar selulosa dan hemiselulosa. Persen lignin dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ Lignin} = (W_1 - W_2) / S \times 100\%$$

8. Analisis Kadar Lignin (Spektroskopi)

Contoh sebanyak 0.005 g dimasukkan di dalam 5 ml pereaksi asetil bromida 25% (dalam asetat glasial). Dipanaskan dalam penangas air pada suhu 70° selama 30 menit dan diaduk-aduk setiap 5 menit. Lalu didinginkan selama 30 menit dengan es dan kemudian tambahkan 2 ml etanol. Larutan dipindahkan ke labu ukur 25 ml, ditambahkan 10 ml etanol, 0.25 ml hidroksilamin hidroklorida 7.5 M. Semua campuran diaduk dan diencerkan sampai tanda tera. Saring dan baca absorbansi spektrofotometer pada panjang gelombang 280 nm. Persen lignin dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ Lignin} = \frac{\text{AS} - \text{AB}}{\epsilon \cdot W} \times 100\%$$

AS = absorbansi contoh

AB = absorbansi blanko

ϵ = absortivitas/ keterserapan molar

W = berat contoh

9. Analisis Kadar Lemak (AOAC, 1980)

Contoh sebanyak 3 gram dimasukkan ke dalam kertas saring yang dibuat seperti kantong. Bungkus kertas saring kemudian dimasukkan ke dalam tabung soxhlet dan diekstrak dengan petroleum benzena selama 6 jam. Kemudian kertas saring dan batu didihkan dan dikering di dalam oven bersuhu 105°C selama 1 jam. Selanjutnya didinginkan di dalam eksikator dan ditimbang hingga diperoleh berat yang konstan. Kadar lemak dihitung dengan rumus :

$$\text{Kadar lemak} = \frac{c - b}{a} \times 100\%$$

a = berat contoh

b = berat labu dan batu didih

c = berat labu dan batu didih setelah didestruksi

10. Analisis Kadar Protein (AOAC, 1980)

Sebanyak 1 gram contoh didestruksi dengan 5 ml asam sulfat pekat dengan katalisator CuSO_4 dan Na_2SO_4 masing-masing satu gram sampai warnanya menjadi hijau jernih. Destilasi dilakukan setelah ditambahkan 5 ml aquades dan 15 ml NaOH 50%. Sebagai penampung digunakan 25 ml asam sulfat 0.02 N dan 2 atau 3 tetes indikator campuran metil biru dan metil merah. Hasil destilasi dititrasi dengan larutan NaOH 0.02 N. Prosedur blanko sama dengan diatas tanpa menambahkan contoh. Kadar protein dihitung dengan rumus :

$$\text{Kadar protein} = \frac{A \times N \times 14 \times 6.25 \times 100\%}{\text{mg contoh}}$$

A = selisih volume NaOH yang dibutuhkan untuk mentitrasi blanko dan contoh

N = normalitas larutan NaOH

B. ANALISIS AKTIVITAS ENZIM SELULASE

1. Penentuan gula pereduksi metoda DNS (Miller, 1959)

a. Pembuatan Pereaksi DNS

Sebanyak 10.6 gram DNS dan 19.8 gram NaOH dilarutkan ke dalam 1416 ml aquades. Setelah larut sempurna ditambahkan 306 gram Na-K-tartrat (garam Rochelle), 7.6 gram phenol (sebelumnya dicairkan dulu pada suhu 50 °C), dan 8.3 gram Natrium metabisulfit. Titrasi 3 ml larutan ini dengan HCl 0.1 N dengan menggunakan indikator phenolphtalein, biasanya sekitar 5 - 6 ml. Selanjutnya ditambahkan NaOH bila dibutuhkan sejumlah 2 gram untuk setiap ml penggunaan HCl 0.1 N pada titrasi tadi.

b. Standar Glukosa

Larutan standar glukosa dibuat pada selang 0.02 - 0.5 mg glukosa per-ml. Sebanyak 1 atau 2 ml larutan contoh dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 3 ml pereaksi DNS. Tabung ini diletakkan di dalam air mendidih selama 5 menit dan didinginkan pada suhu kamar. Bila diperlukan larutan contoh dapat diencerkan sehingga pembacaan larutan contoh dengan spektrofotometer lebih mudah dilakukan pada panjang gelombang 550 nm, berada diantara 20 persen dan 80 persen transmisi.

Perhitungan dilakukan dengan membuat persamaan regresi dari larutan standar glukosa berdasarkan nilai absorbansinya terhadap konsentrasi glukosa. Selanjutnya dihitung kadar glukosa contoh dengan memasukkan nilai absorbansinya ke persamaan regresi yang didapatkan. Aktivitas enzim selulase dapat dihitung sebagai mg glukosa yang dihasilkan per-ml filtrat enzim.

2. Pengujian Aktivitas Karboksimetil selulase (CMC-ase)

a. Larutan Buffer Sitrat 1 M pH 4.6

Asam sitrat ditimbang sebanyak 210 gram, dilarutkan dalam 750 ml aquades, kemudian ditambahkan NaOH (kira-kira 55 g) hingga pH larutan 4.4 dan berikan pengawet 100 mg merthiolat. Bila larutan ini diencerkan menjadi 0.05 M harus memiliki pH 4.8.

b. Pereaksi DNS (sama seperti pereaksi DNS untuk pengujian glukosa)

c. Karboksimetil selulosa (CMC) 1 persen

Sebanyak 100 g CMC medium, DS 0.5, larutkan dalam 800 ml aquades panas ($80^{\circ}\text{C} - 90^{\circ}\text{C}$) dengan cara menambahkan bubuk kering tersebut sedikit sedikit dengan pengadukan yang kontinu. Selanjutnya 100 ml larutan buffer sitrat 0.05 M pH 4.8 dan 10 ml larutan methiolet 1 persen ditambahkan dan kemudian diencerkan hingga 1000 ml. Simpan dalam lemari es dan bila akan digunakan harus dihangatkan hingga suhu 50°C dan dikocok.

d. Standar glukosa dalam buffer asam sitrat 0.05 M pH 4.8 (sama dengan pada pengujian glukosa)

Sebanyak 0.5 ml larutan enzim dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 0.5 ml larutan CMC 1 persen, divorteks dan kemudian diinkubasi pada suhu 50°C selama 30 menit. Sebanyak 3 ml pereaksi DNS ditambahkan untuk menghentikan reaksi. Tabung ditempatkan di dalam air mendidih selama 5 menit. Larutan-larutan contoh dan standar ditentukan kandungan gula pereduksinya sebagai glukosa dengan mengukur larutan tersebut dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 550 nm. Blanko 0.5 ml buffer dan 3 ml pereaksi DNS digunakan untuk menentukan transmisi 100 persen.

Blanko enzim tanpa substrat dan substrat tanpa enzim dilakukan seperti contoh dan dikoreksi terhadap contoh. Bila nilai glukosa sampai diluar batas absorbansi standar atau melebihi 0.6 mg, maka dilakukan pengenceran contoh enzim dengan menggunakan larutan buffer sitrat 0.05 M pH 4.8 dan diperkirakan larutan enzim yang diperiksa mengandung kurang dari 0.5 mg glukosa.

Perhitungan dilakukan, dimana satu unit enzim selulase sebanding dengan satu mikromol substrat yang dihidrolisis per-menit. Hal ini berdasarkan hidrolisis selulosa yang menghasilkan glukosa. Satu mikromol glukosa sama dengan 0.185 mg. Dengan kondisi pengujian tersebut, maka aktivitas enzim CMC-ase adalah

$$\text{Aktivitas CMC-ase (unit/ml)} = \frac{\text{mg glukosa} \times 0.185}{\text{ml}}$$

3. Pengujian Aktivitas Selulase Lengkap (FP-ase)

Sebanyak 0.5 ml enzim (filtrat enzim) dan 1.0 ml larutan buffer dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 1 potong kertas saring. Selanjutnya diaduk dan diinkubasi selama satu jam pada suhu 50°C. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 3 ml pereaksi DNS, aduk kembali dan kemudian tabung-tabung tersebut dimasukkan ke dalam air mendidih selama 5 menit.

Kandungan gula pereduksi ditentukan dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 550 nm. Bila diperluakan pengenceran contoh dapat dilakukan dengan menambahkan larutan buffer sitrat 0.05 M pada pH 4.8.

Perhitungan dilakukan, dimana dalam 60 menit pengujian contoh makan satu unit enzim menghasilkan 0.18 x 60 = 10.80 mg glukosa. Aktivitas enzim selulase diperoleh dengan rumus :

$$\text{Aktivitas FP-ase (unit/ml)} = \frac{\text{mg glukosa} \times 0.0925}{\text{ml}}$$



Lampiran 3. Data hasil analisa aktivitas enzim FP-ase (IU/ml)

Hari	Jumlah	Reperbandingan	Ulangan	Tandan 10 mesh			Tandan 20 mesh			Tandan 30 mesh		
				Sabut 10	Sabut 20	sabut 30	Sabut 10	Sabut 20	Sabut 30	Sabut 10	Sabut 20	Sabut 30
2	2(T) : 1(S)		1	0.355	0.837	0.852	0.250	0.184	0.233	0.972	1.082	0.885
			2	0.439	0.543	0.438	0.225	0.160	0.451	1.041	1.022	1.025
	1(T) : 1(S)		1	0.123	0.254	0.172	0.170	0.156	0.176	0.668	0.715	0.734
			2	0.134	0.428	0.116	0.185	0.206	0.220	0.902	0.469	1.177
	1(T) : 2(S)		1	0.247	0.217	0.384	0.149	0.237	0.136	0.321	0.343	0.959
			2	0.168	0.672	0.310	0.192	0.159	0.152	0.842	0.949	0.604
2(T) : 1(S)		1	1.212	0.546	1.478	1.246	1.223	1.292	1.370	1.522	2.079	
		2	1.034	0.415	1.003	1.266	1.158	1.436	1.507	1.520	2.041	
4	1(T) : 1(S)		1	0.528	0.436	0.195	1.219	1.293	1.121	1.371	1.697	1.919
			2	0.382	0.818	0.271	1.203	0.959	0.898	1.738	1.973	1.634
	1(T) : 2(S)		1	0.141	0.527	2.266	1.443	1.087	0.697	1.764	1.711	2.285
			2	1.062	0.815	2.259	1.187	1.146	0.766	1.926	1.410	2.078
	2(T) : 1(S)		1	1.739	2.079	2.052	1.465	1.733	1.715	1.645	1.546	1.239
			2	1.309	2.037	2.609	1.559	1.475	1.530	1.310	0.801	1.384
1(T) : 1(S)		1	0.876	1.370	2.823	1.625	1.724	1.879	1.325	1.179	1.938	
		2	1.869	1.483	1.972	1.493	1.500	1.872	0.791	0.790	1.498	
1(T) : 2(S)		1	0.800	2.240	1.274	1.162	1.654	1.962	0.901	1.247	1.034	
		2	2.407	2.395	2.456	1.158	1.435	1.431	1.135	1.098	1.069	
2(T) : 1(S)		1	1.161	1.838	1.521	1.406	1.544	1.422	1.348	1.658	1.288	
		2	1.455	0.509	1.337	1.562	1.467	1.799	0.996	1.449	1.461	
1(T) : 1(S)		1	1.106	2.066	1.766	1.045	1.546	1.381	1.838	2.208	0.981	
		2	2.677	2.016	2.776	1.188	1.301	1.935	2.253	1.577	0.851	
1(T) : 2(S)		1	1.133	1.426	2.741	1.268	1.308	1.683	1.565	1.537	1.993	
		2	1.036	1.986	2.440	1.439	1.433	1.678	1.019	1.566	1.036	
2(T) : 1(S)		1	0.648	1.123	1.871	0.843	1.084	0.858	1.281	1.741	1.764	
		2	1.436	0.907	0.927	1.326	1.310	1.632	0.601	1.235	1.036	
1(T) : 1(S)		1	0.579	1.302	1.354	0.979	0.761	0.958	1.075	0.974	0.519	
		2	0.749	2.474	1.293	1.271	1.683	1.697	1.421	1.936	0.873	
1(T) : 2(S)		1	0.201	1.379	0.823	0.715	1.134	0.483	0.433	1.411	2.077	
		2	1.361	1.668	1.272	1.115	1.252	1.120	1.518	1.671	0.716	

Lampiran 4. Data hasil analisa aktivitas enzim CMC-ase

Hari Inkubasi	Perbandingan Ujangan	Tandan 10 mesh			Tandan 20 mesh			Tandan 30 mesh			
		Sabuf 10	Sabuf 20	Sabuf 30	Sabuf 10	Sabuf 20	Sabuf 30	Sabuf 10	Sabuf 20	Sabuf 30	
2	2(T) : 1(S)	1	8.812	5.706	2.686	2.330	0.941	0.796	14.760	15.230	15.789
		2	6.026	10.269	4.671	3.382	2.848	2.224	15.978	16.414	16.932
	1(T) : 1(S)	1	5.238	10.210	3.467	1.608	2.195	2.753	14.203	15.232	14.928
		2	8.634	5.714	2.905	1.801	1.935	1.974	15.355	11.738	16.258
	1(T) : 2(S)	1	2.002	11.437	2.560	0.819	0.775	1.702	9.793	11.138	13.524
		2	4.216	3.628	3.327	2.382	2.063	0.746	16.130	15.923	16.753
4	2(T) : 1(S)	1	3.116	12.267	11.907	33.520	40.936	40.138	41.094	43.378	42.595
		2	7.591	7.540	16.912	36.121	55.505	36.587	45.582	47.906	49.608
	1(T) : 1(S)	1	3.844	6.066	8.170	29.821	40.865	35.071	44.091	45.427	46.793
		2	3.629	12.106	8.862	37.754	33.641	29.836	45.123	41.876	44.155
	1(T) : 2(S)	1	12.047	13.468	23.817	60.169	32.604	30.740	34.142	37.307	43.921
		2	4.166	2.581	17.838	33.623	22.941	36.081	47.625	46.511	49.575
6	2(T) : 1(S)	1	23.138	20.233	24.286	29.848	33.062	38.461	40.058	38.773	43.505
		2	14.217	17.972	20.875	21.372	27.369	32.590	38.852	39.027	43.541
	1(T) : 1(S)	1	14.868	17.168	33.200	32.038	34.833	37.114	42.111	45.643	47.207
		2	20.654	18.340	19.215	32.016	33.317	29.507	36.496	37.136	45.435
	1(T) : 2(S)	1	9.822	32.633	25.119	28.097	30.994	49.127	37.511	40.628	39.082
		2	17.386	43.878	21.386	22.861	25.224	35.181	31.335	39.443	20.874
8	2(T) : 1(S)	1	18.051	14.599	19.445	55.611	53.961	50.274	34.586	32.751	36.790
		2	17.502	18.230	18.684	37.450	40.748	39.581	29.140	26.824	27.005
	1(T) : 1(S)	1	17.360	19.176	25.293	45.143	58.123	50.390	35.796	36.136	31.935
		2	15.672	22.228	28.169	37.484	42.281	38.740	17.981	34.106	31.183
	1(T) : 2(S)	1	15.035	23.755	29.459	43.827	46.502	59.825	29.028	33.722	35.449
		2	16.153	19.836	27.300	38.121	43.886	44.864	32.199	31.579	24.064
10	2(T) : 1(S)	1	19.388	17.782	26.936	34.327	39.003	43.197	31.593	27.389	33.834
		2	18.806	24.708	8.470	39.016	41.220	43.418	24.950	29.250	32.742
	1(T) : 1(S)	1	9.864	27.301	13.533	33.493	39.543	40.895	32.704	32.381	34.222
		2	12.018	19.502	31.453	36.094	43.418	45.284	18.857	31.438	33.195
	1(T) : 2(S)	1	15.327	27.546	23.410	35.854	41.279	47.324	30.255	30.368	28.381
		2	19.952	23.553	19.042	41.214	41.321	45.371	29.889	33.925	32.570

Lampiran 5a. Hasil Uji Kenormalan Data Aktivitas Enzim FP-ase

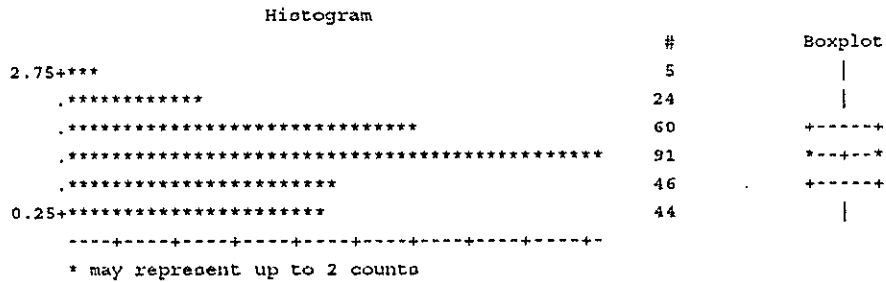
UNIVARIATE PROCEDURE

Variable=Y (Aktivitas enzim FP-ase)

		Moments	
N	270	Sum Wgts	270
Mean	1.233281	Sum	332.986
Std Dev	0.624256	Variance	0.389696
Skewness	0.05165	Kurtosis	-0.47351
USS	515.4937	CSS	104.8282
CV	50.61751	Std Mean	0.0037991
T:Mean=0	32.46244	Prob> T	0.0001
Sgn Rank	18292.5	Prob> S	0.0001
Num ^ = 0	270		
W:Normal	0.958422	Prob<W	0.0001

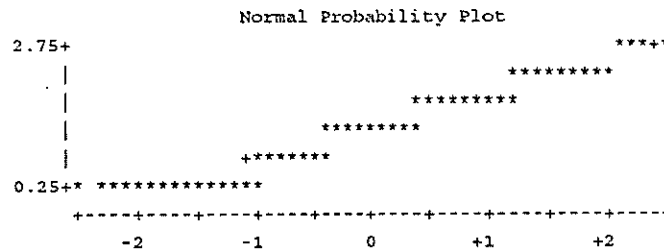
UNIVARIATE PROCEDURE

Variable=Y



UNIVARIATE PROCEDURE

Variable=Y



Keterangan :

- Data menyebar normal dilihat secara kualitatif yaitu :
 - Nilai kurtosis mendekati nol
 - Kurva normal probability membentuk pola linier

Lampiran 5b. Analisis Ragam Aktivitas Enzim FP-ase

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	137	90.51015592	0.66065807	6.09	0.0001**
Error	132	14.31806669	0.10847020		
Corrected Total	269	104.82822261			
	R-Square	C.V.	Root MSE		Y Mean
	0.863414	26.70503	0.329348		1.23328148

Keterangan :

** = Berbeda nyata pada taraf 5 persen dan 1 persen

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	2	3.26454712	1.63227356	15.05	0.0001**
T*U	3	1.21689131	0.40563044	3.74	0.0128*
S	2	4.55577614	2.27788807	21.00	0.0001**
H	4	45.54939398	11.38734849	104.98	0.0001**
P	2	0.28468876	0.14234438	1.31	0.2727
S*H	8	2.05174082	0.25646760	2.36	0.0207*
S*P	4	0.38364610	0.09591153	0.88	0.4754
H*P	8	2.11501376	0.26437672	2.44	0.0172*
S*H*P	16	3.91059938	0.24441246	2.25	0.0063**
T*S*H*P	88	27.17785855	0.30883930	2.85	0.0001**

Keterangan :

** = Berbeda nyata pada taraf 5 persen dan 1 persen

* = Berbeda nyata pada taraf 5 persen

Lampiran 5c. Uji Lanjut DUNCAN Aktivitas enzim FP-ASE

Alpha= 0.05 df= 135 MSE= 0.115074

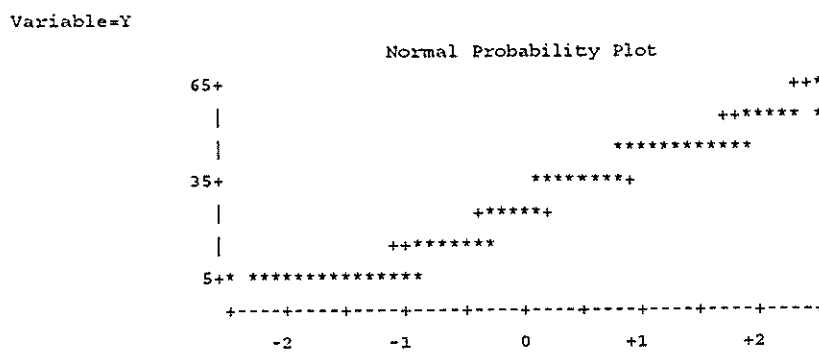
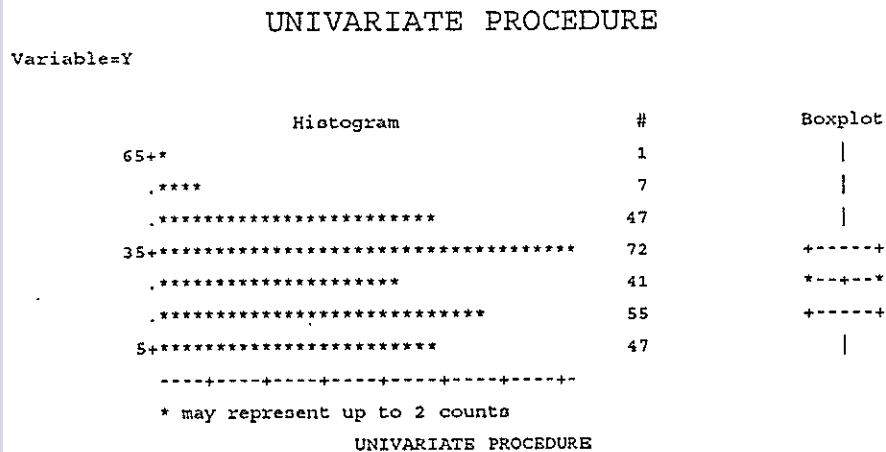
Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	I	Perlakuan		
				Perbandingan (tandan:sabut)	Tandan (mesh)	Sabut (mesh)
A	2.591	2	42	1 : 2	10	30
B A	2.398	2	38	1 : 1	10	30
B D A C	2.330	2	37	2 : 1	10	30
B D A C	2.318	2	24	1 : 2	10	20
E B D A C	2.271	2	41	1 : 1	10	30

Lampiran 6a. Uji Kenormalan Data Aktivitas enzim CMC-ASE.

UNIVARIATE PROCEDURE
Variable=Y (Aktivitas enzim FP-ase)

		Moments	
N	270	Sum Wgts	270
Mean	26.43119	Sum	7136.42
Std Dev	14.67687	Variance	215.4105
Skewness	-0.10423	Kurtosis	-0.9478
USS	246569.5	CSS	57945.44
CV	55.52862	Std Mean	0.893206
T:Mean=0	29.59137	Prob> T	0.0001
Sgn Rank	18292.5	Prob> S	0.0001
Num ^= 0	270		
W:Normal	0.942085	Prob<W	0.0001



Keterangan :

- Data menyebar normal dilihat secara kualitatif, yaitu :
 - Nilai kurtosis mendekati nol
 - Kurva normal probability membentuk pola linier

Lampiran 6b. Analisa Ragam Aktivitas Enzim CMC-ase

Dependent Variable: Aktivitas enzim CMC-ase

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	137	54948.46041	401.08365	17.67	0.0001**
Error	132	2996.97626	22.70437		
Corrected Total	269	57945.43667			
	R-Square	C.V.	Root MSE	Y Mean	
	0.948279	18.02761	4.764910	26.4311852	

Keterangan :

** = Berbeda nyata pada taraf 5 persen dan 1 persen

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
T	2	15718.94876	7859.47438	346.17	0.0001**
T*U	3	278.80538	92.93513	4.09	0.0082**
S	2	730.09729	365.04864	16.08	0.0001**
H	4	24596.95516	6149.23879	270.84	0.0001**
P	2	14.01622	7.00811	0.31	0.7350
S*H	8	330.31703	41.28963	1.82	0.0789
S*P	4	37.19904	9.29976	0.41	0.8015
H*P	8	185.60336	23.20042	1.02	0.4228
S*H*P	16	740.43377	46.27711	2.04	0.0149*
T*S*H*P	88	12316.08439	139.95550	6.16	0.0001**

Keterangan :

** = Berbeda nyata pada taraf 1 persen dan 5 persen

* = Berbeda nyata pada taraf 5 persen

Lampiran 6c. Hasil Uji Lanjut DUNCAN Aktivitas Enzim CMC-ase

Alpha= 0.05 df= 135 MSE= 24.26505

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	I	Perlakuan		
				Perbandingan (Tandan:Sabut)	Tandan (mesh)	Sabut Hari (mesh)
A	52.345	2	87	1 : 2	20	30 8
B	50.202	2	71	2 : 1	20	20 4
B	48.221	2	64	1 : 1	20	20 6
B	47.355	2	70	2 : 1	20	20 6
E	46.896	2	51	1 : 2	20	20 6