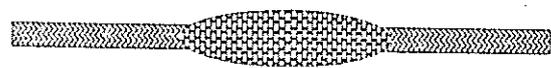


بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

untuk
Ibunda Tercinta
dan
Ayahanda Tercinta



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



♥ Ananda Henny

Halaman ini adalah hak cipta milik IPB University dan tidak boleh disebarluaskan atau diperjualbelikan kembali. Untuk informasi lebih lanjut, silakan hubungi bagian hukum IPB University.

**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.

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...
1. Diambil sebagai...
2. Diperoleh...
3. Diperoleh...
4. Diperoleh...
5. Diperoleh...
6. Diperoleh...
7. Diperoleh...
8. Diperoleh...
9. Diperoleh...
10. Diperoleh...

KATA PENGANTAR

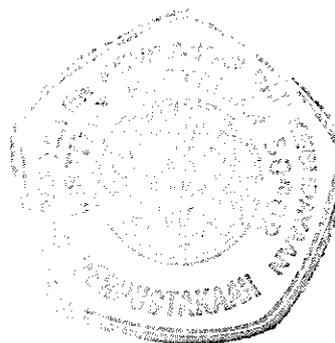
Alhamdulillah, hanya dengan rahmat dan karunia Allah SWT penulis dapat menyusun skripsi dengan judul Pengaruh Komposisi dan Ukuran Partikel Substrat (Tandan Kosong dan Sabut Kelapa Sawit) terhadap Produksi Selulase oleh *Neurospora sitophila*.

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 |

Has Cipta Plintar (Unsur) dan
 1. Diambil sebagai bagian dari...
 4. Penelitian yang...
 5. Penelitian yang...
 6. Penelitian yang...

| | |
|---|----|
| 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 |

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 |

Has Cipta, Penerbitan, dan Pengedaran
1. Diizinkan mengutip sebagian atau seluruh karya-karya ini dengan catatan sumber dan diperbolehkan untuk:
a. Penelitian ilmiah untuk kepentingan pendidikan, penelitian, pertukaran karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan buku atau tulisan untuk masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang memperjualbelikan dan menyalin sebagian atau seluruh karya-karya ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

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 Pendaftar: Universitas Indonesia
1. Dilindungi sebagai karya intelektual yang haknya harus dipertahankan dan dipercedakan kembali
2. Diperbolehkan untuk melakukan penelitian, pendidikan, pertukaran karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan buku atau tulisan untuk masalah
3. Diperbolehkan untuk mengutip dan mempergunakan sebagian atau seluruh karya tulis ini dengan catatan harus tercantum nama IPB University
4. Diperbolehkan untuk mengutip dan mempergunakan sebagian atau seluruh karya tulis ini dengan catatan harus tercantum nama IPB University

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*.

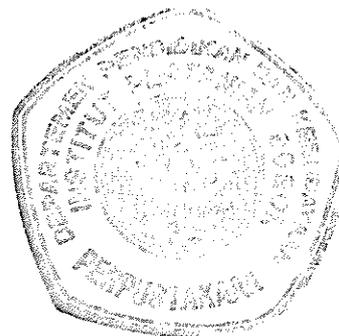
Produksi selulase pada tandan kosong dan sabut kelapa sawit diantaranya ditentukan oleh komposisi nutrisi substrat dan ukuran partikel substrat. Partikel yang berukuran lebih kecil mempunyai luas permukaan yang

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 (FP-ase) 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

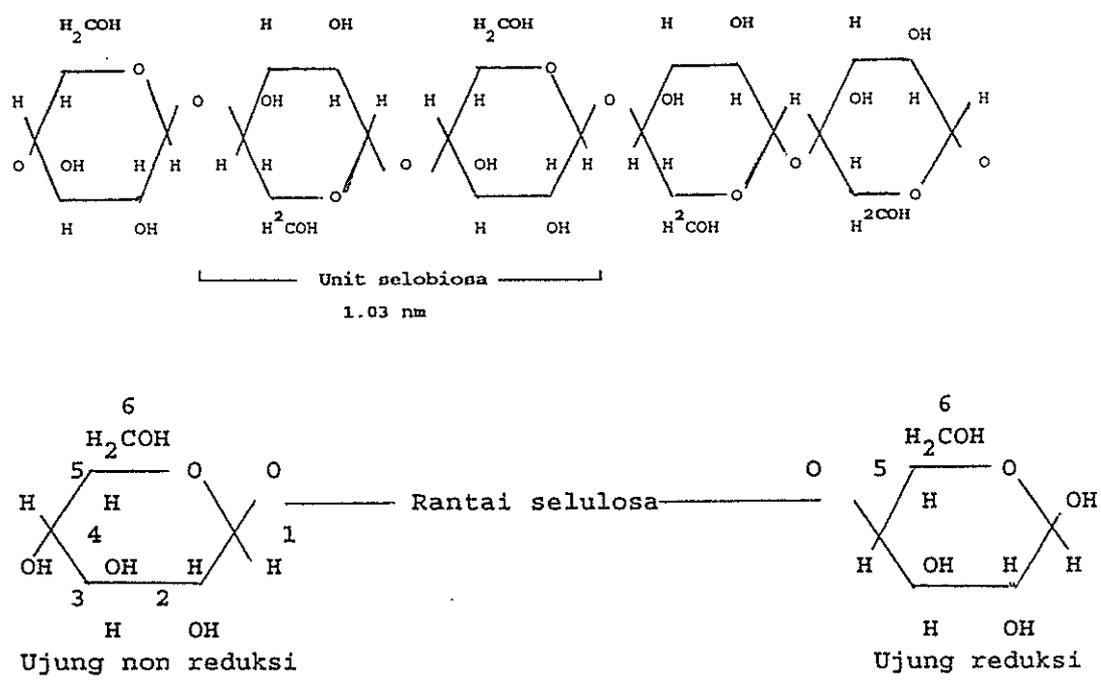
B. SELULOSA

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 struktur dan sifat-sifatnya
 2. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 3. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 4. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 5. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 6. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 7. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 8. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 9. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 10. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 11. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 12. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 13. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 14. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 15. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 16. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 17. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 18. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 19. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 20. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 21. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 22. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 23. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 24. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 25. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 26. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 27. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 28. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 29. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 30. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 31. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 32. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 33. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 34. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 35. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 36. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 37. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 38. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 39. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 40. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 41. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 42. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 43. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 44. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 45. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 46. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 47. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 48. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 49. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 50. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 51. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 52. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 53. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 54. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 55. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 56. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 57. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 58. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 59. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 60. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 61. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 62. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 63. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 64. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 65. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 66. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 67. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 68. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 69. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 70. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 71. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 72. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 73. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 74. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 75. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 76. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 77. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 78. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 79. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 80. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 81. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 82. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 83. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 84. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 85. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 86. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 87. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 88. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 89. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 90. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 91. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 92. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 93. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 94. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 95. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 96. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 97. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 98. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 99. Diteliti mengenai sifat-sifatnya
 100. Diteliti mengenai sifat-sifatnya

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*, Klas *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



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 :

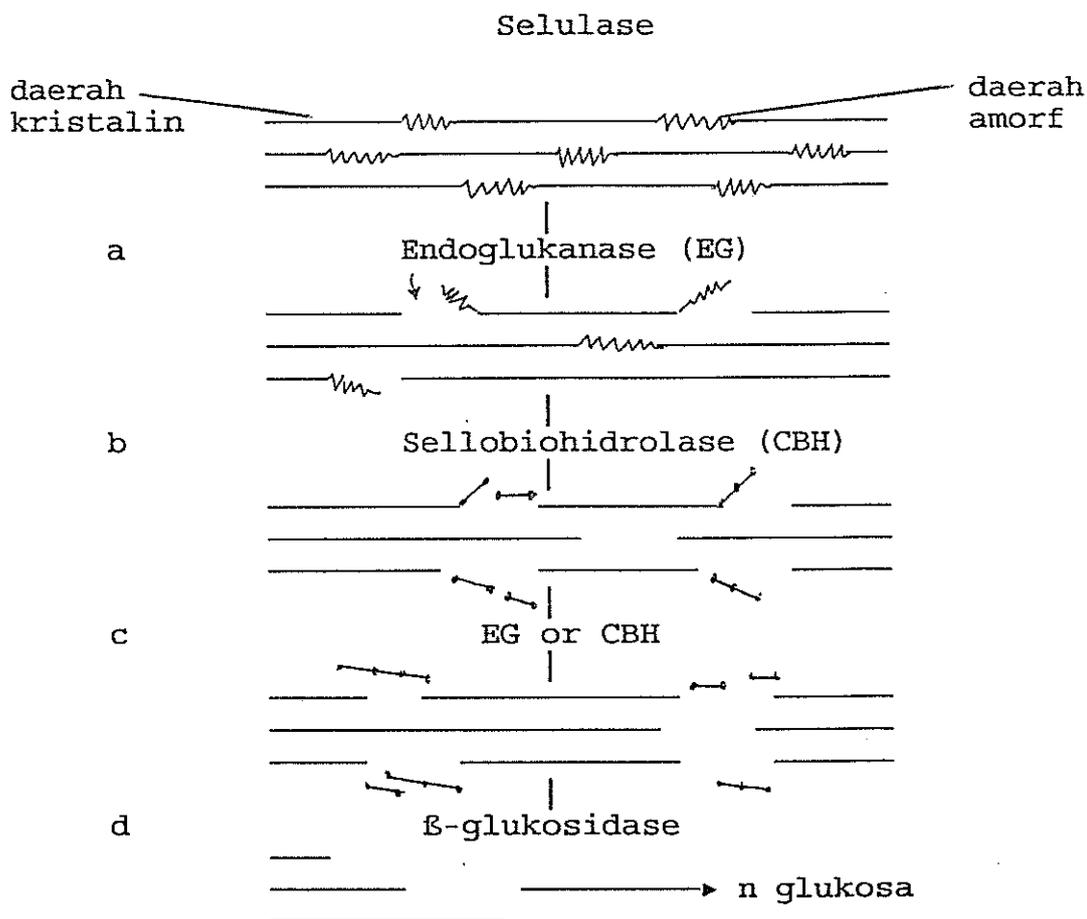
- a. Endoglukanase (C_x) menyerang bagian yang amorf dari serat selulosa sehingga membuka jalan bagi enzim selobiohidrolase (C_1).
- b. Selobiohidrolase membebaskan unit selobiosa dari ujung-ujung non reduksi rantai selulosa.

- 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.





Sellooligosakarida dan sellobiosa

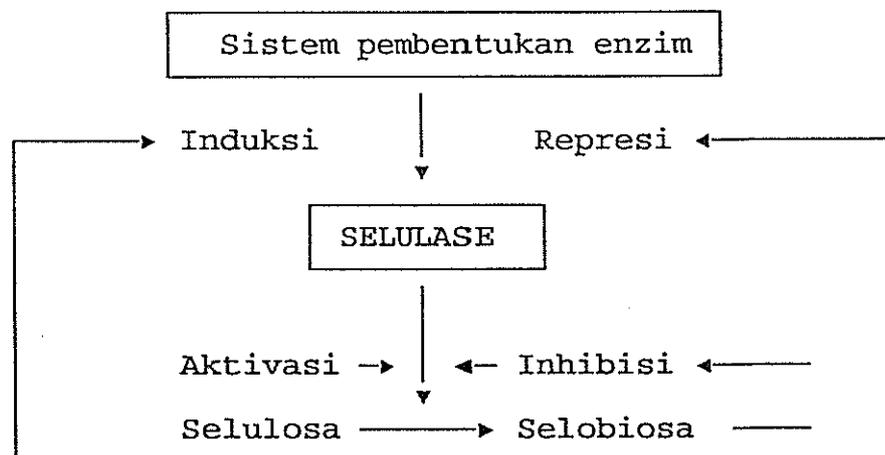
Keterangan :

- = sellobiosa
- = 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 | Selo-biosa |
| 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 kekenyalan CMC selama hidrolisis (Canevascini dan Gattlen, 1976 dalam Tun-Tedja-Irawadi, 1990).

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

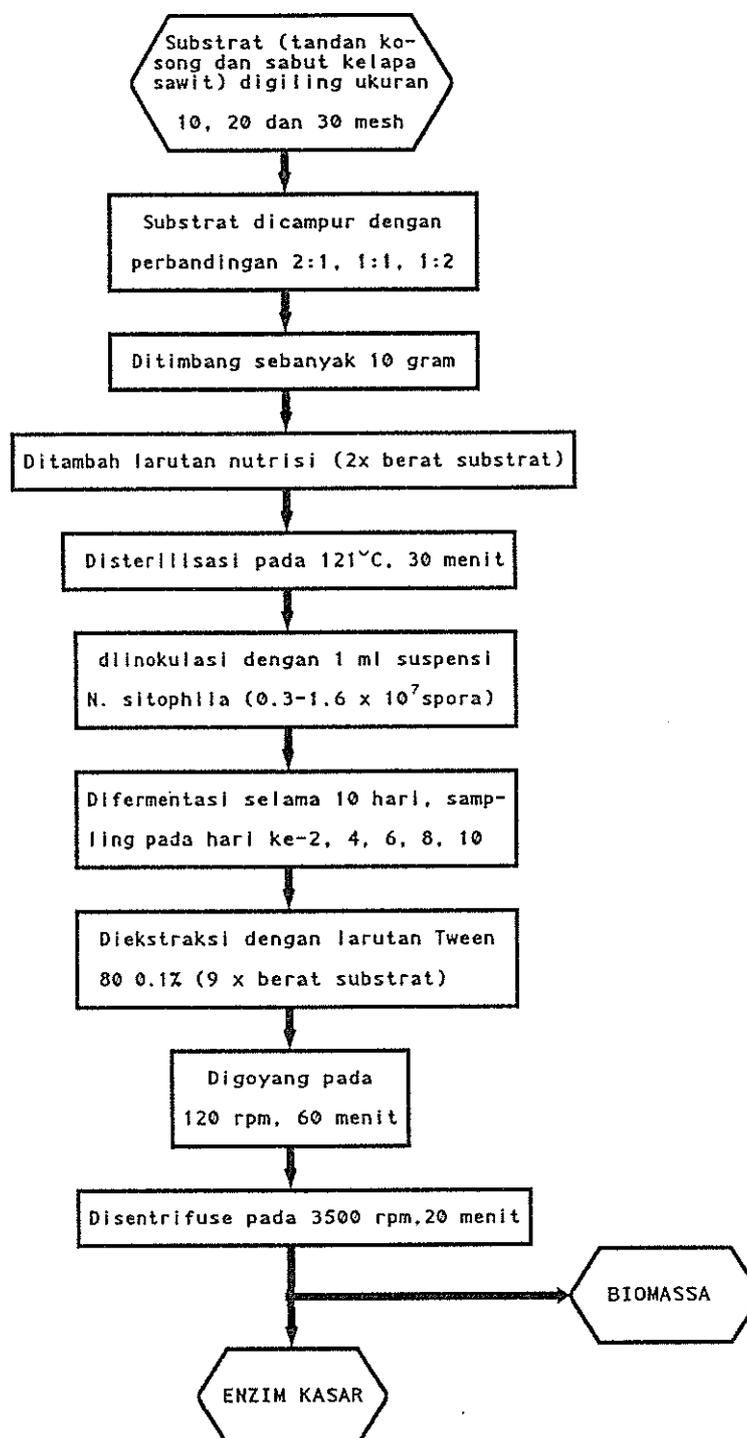
Analisis komposisi substrat dilakukan dengan menggunakan substrat yang berukuran 20 mesh. Analisis yang dilakukan adalah analisis kadar air, analisis kadar protein, analisis lemak, serat kasar, kadar abu, lignin, selulosa, hemiselulosa dan mineral (Lampiran 2).

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^oC 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.

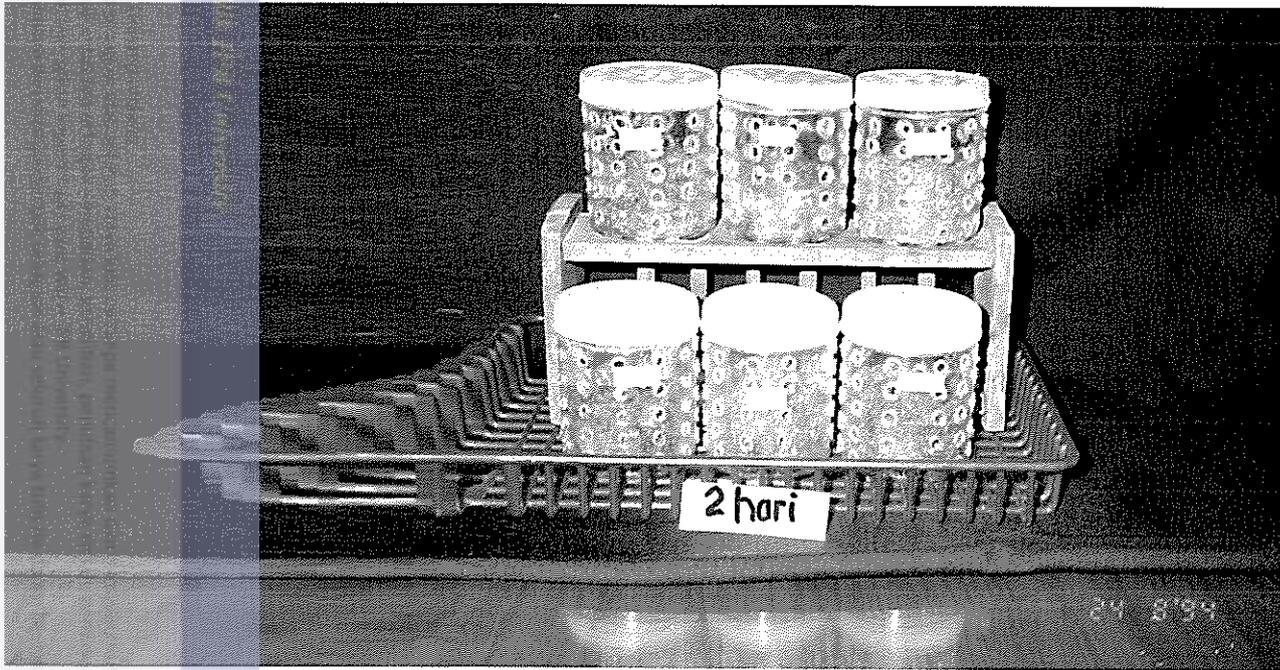
C. KONDISI FERMENTASI

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.

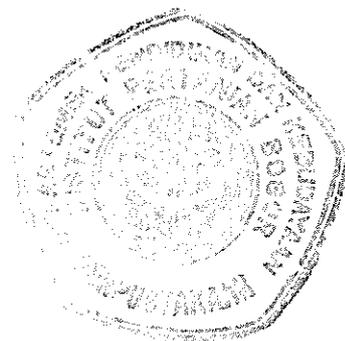
Sistem fermentasi yang digunakan merupakan modifikasi dari sistem *Multiple Mini Packed Bed*. Fermentasi dilakukan dengan memasukan substrat ke dalam tabung plastik yang telah dilubangi untuk memperbaiki aerasi. Setiap tabung terdiri dari satu perlakuan untuk sekali pengambilan contoh, dengan demikian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

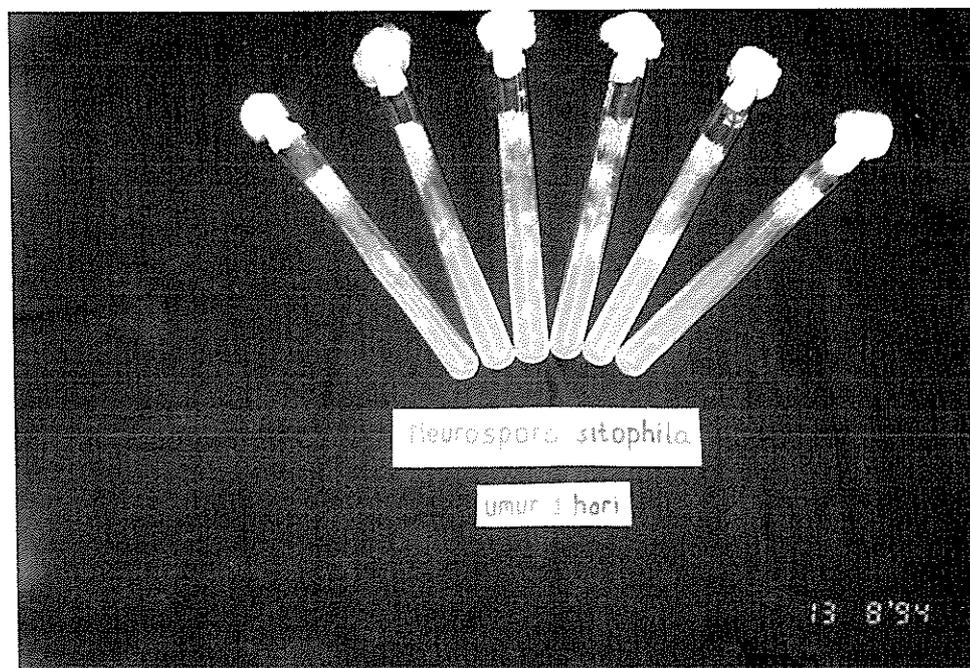
Neurospora sitophila merupakan salah satu jenis kapang yang dapat menghasilkan selulase. Kapang ini telah dikenal baik di Indonesia sebagai kapang oncom merah.

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

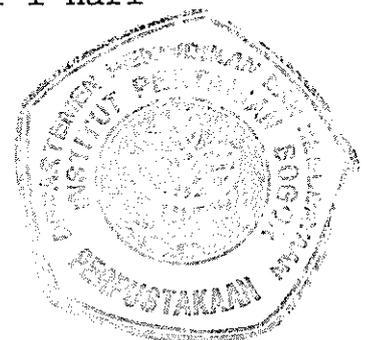


Aspergillus niger dan *Trichoderma viride* telah dikenal sebagai penghasil selulase yang baik.

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,

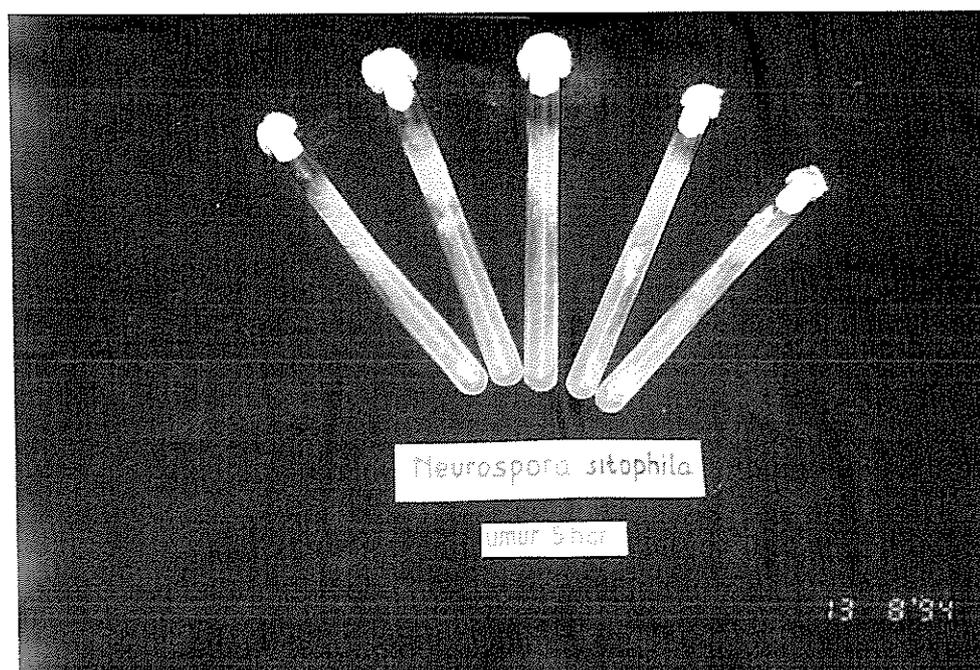


Gambar 7. *Neurospora sitophila* berumur 1 hari pada media agar miring



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

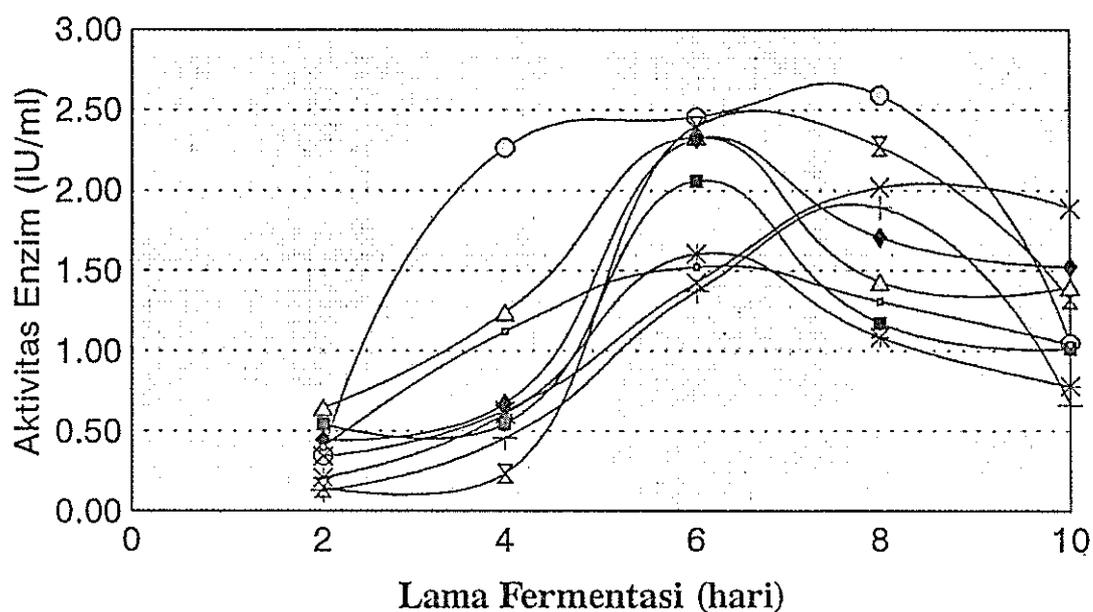
menghidrolisis selooligosakarida dan selobiosa menjadi glukosa. Nilai aktivitas FP-ase dinyatakan dalam IU (International Unit) per ml enzim kasar.

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.

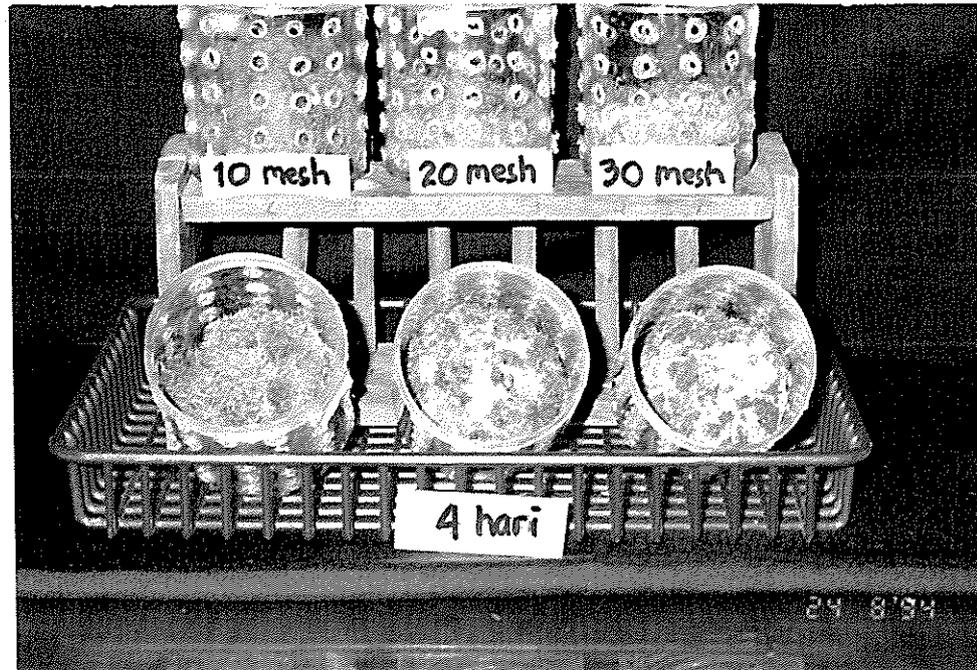
Pada Gambar 10 dengan ukuran tandan kosong yang sama (10 mesh) semakin kecil ukuran sabut memperlihatkan pertumbuhan *Neurospora sitophila* semakin baik. Bila dihubungkan dengan aktivitas FP-ase pada Gambar 9 terlihat hubungan bahwa dengan ukuran tandan kosong yang sama, semakin kecil ukuran sabut maka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



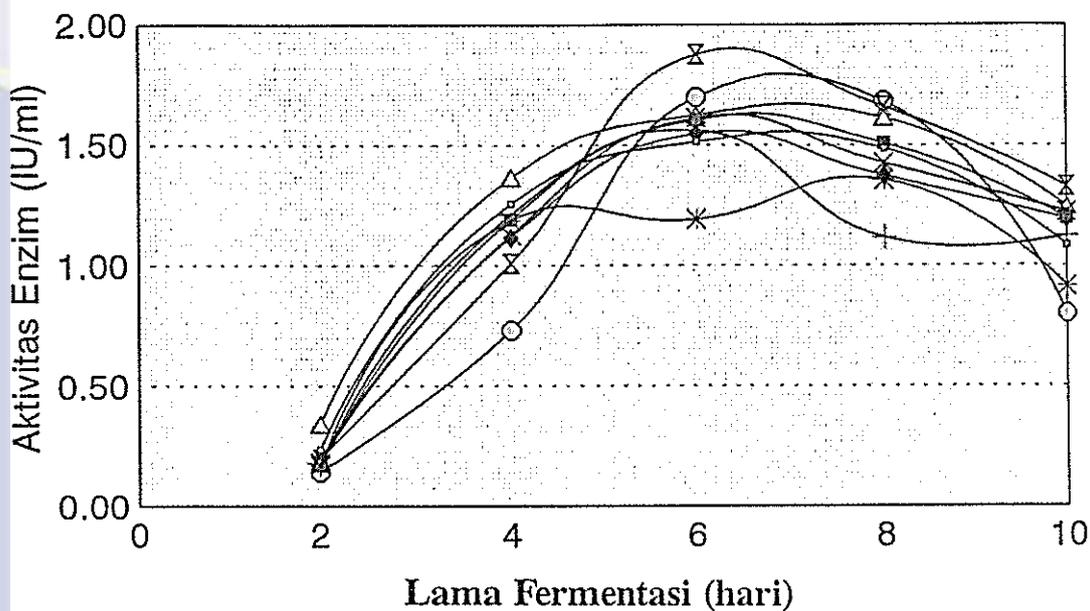
| | | | | | |
|---|---------------|---|---------------|---|---------------|
| ○ | 2(10) : 1(10) | + | 1(10) : 1(10) | * | 1(10) : 2(10) |
| ■ | 2(10) : 1(20) | * | 1(10) : 1(20) | ◆ | 1(10) : 2(20) |
| △ | 2(10) : 1(30) | ⊗ | 1(10) : 1(30) | ○ | 1(10) : 2(30) |

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.



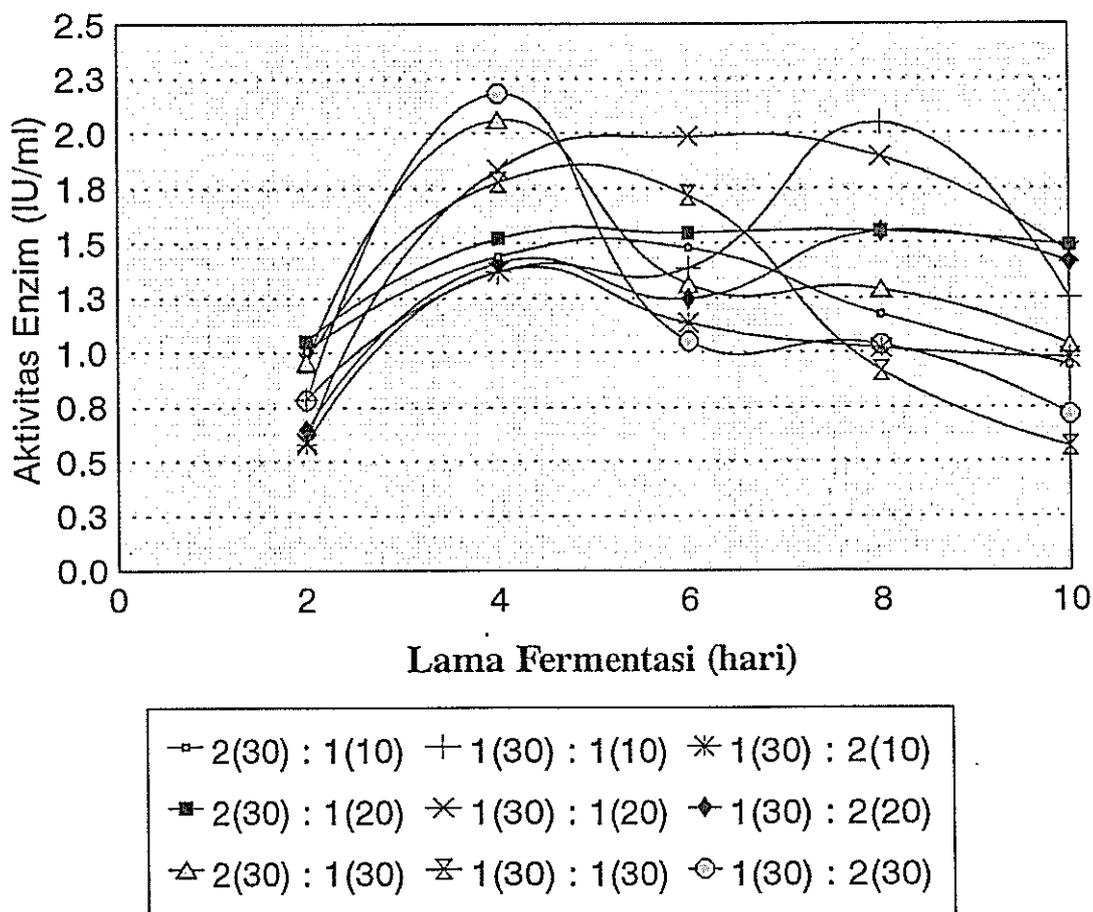
| | | |
|---------------|---------------|---------------|
| ◻ 2(20):1(10) | + 1(20):1(10) | * 1(20):2(10) |
| ◼ 2(20):1(20) | × 1(20):1(20) | ◆ 1(20):2(20) |
| △ 2(20):1(30) | ⊗ 1(20):1(30) | ○ 1(20):2(30) |

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

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.

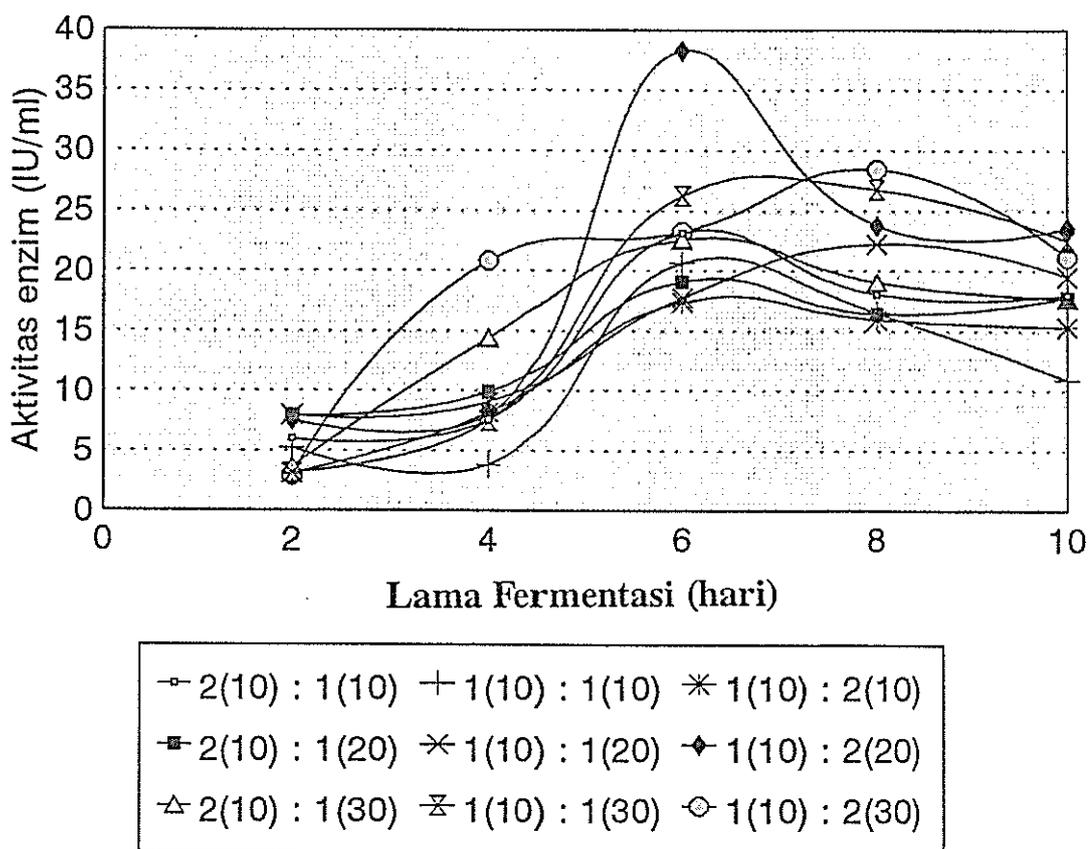
Secara visual, pertumbuhan *Neurospora sitophila* pada substrat dengan ukuran tandan kosong yang sama, semakin kecil ukuran sabut menunjukkan pertumbuhan yang lebih baik. Namun pada substrat dengan tandan kosong ukuran 30 mesh pertumbuhan *Neurospora sitophila* hanya pada permukaan saja, sebaliknya pada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

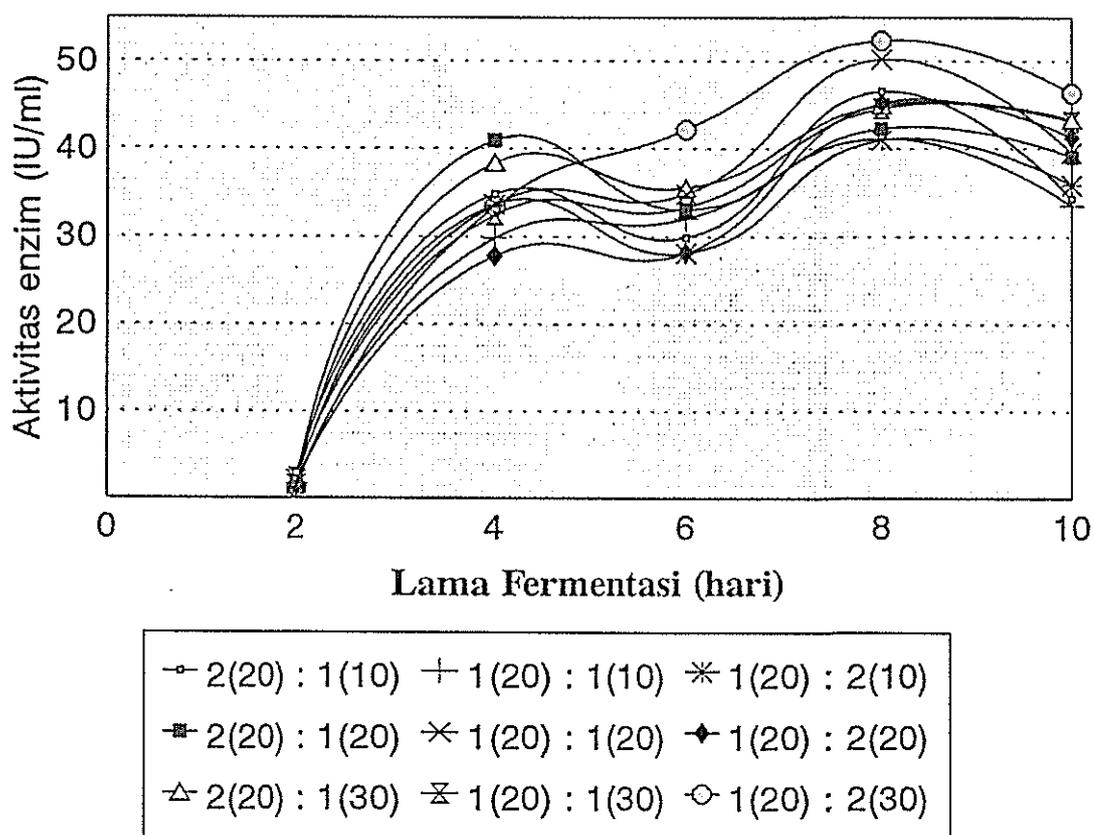
meningkat dan mencapai nilai tertinggi pada hari ke 6 fermentasi. Hari selanjutnya aktivitas CMC-ase turun sampai hari ke sepuluh (hari terakhir fermentasi). Nilai tertinggi diperoleh pada perlakuan tandan kosong 10 mesh dan sabut ukuran 20 mesh dengan perbandingan 1:2.

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



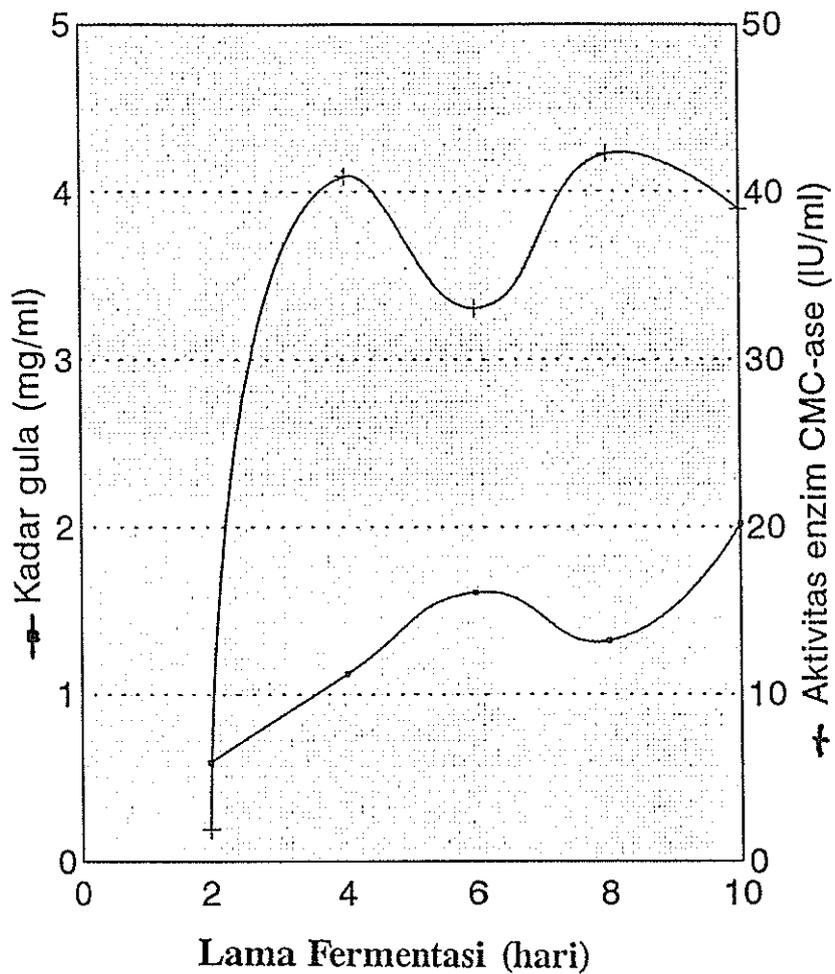
Gambar 14. Aktivitas CMC-ase tandan kosong 20 mesh pada berbagai ukuran sabut dan perbandingan

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



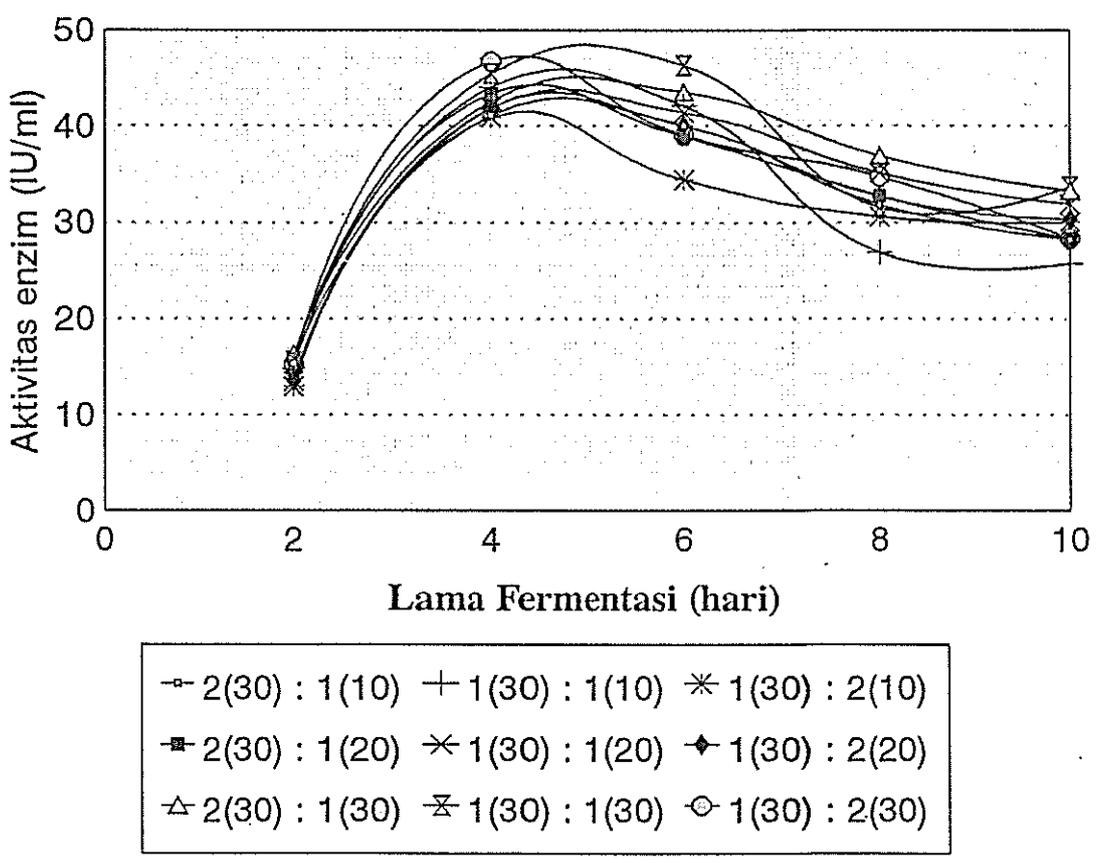


Gambar 15. Hubungan aktivitas CMC-ase dengan gula pereduksi

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

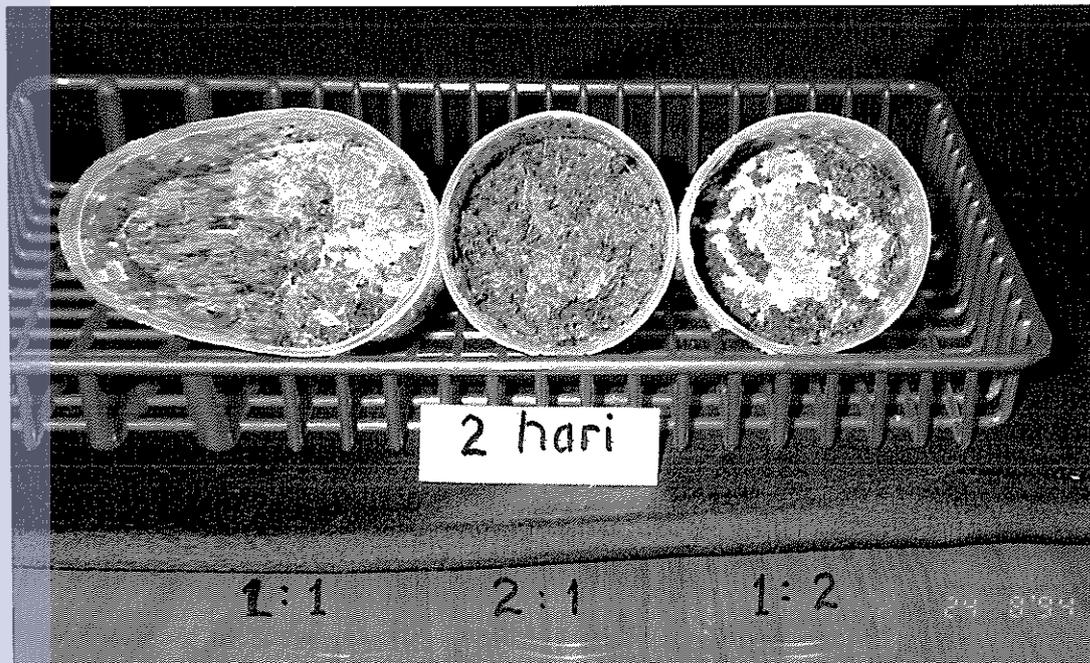
Perbandingan tandan kosong dan sabut yang tepat sebagai substrat fermentasi akan menghasilkan kondisi yang sesuai bagi *N. sitophila* untuk memproduksi Selulase, mengingat kandungan nutrisi dan sifat bahan yang berbeda.

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.

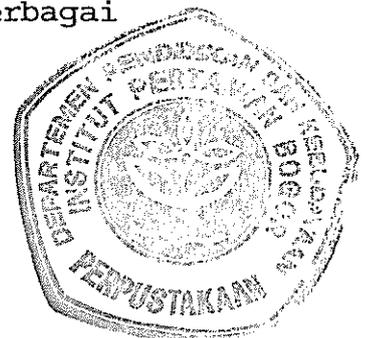
Gambar 9, 11, 12, 13, 14 dan 16 diatas menunjukkan pola yang sama pada berbagai perbandingan, dilihat dari aktivitas FP-ase dan CMC-ase. Nilai aktivitas tertinggi diperoleh pada perbandingan 1:2 baik untuk FP-ase maupun CMC-ase. Tandan dibandingkan sabut lebih banyak mengandung lignin, sehingga komponen 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.

Alexopoulos, 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, Philipines.
- 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

Hal Cipta (Hak Cipta) Unsur-unsur:

1. Diambil sebagai bagian atau seluruh karya seni, sastra, atau ilmu pengetahuan dan kebudayaan, seperti: a. Pergerakan tubuh atau kesungguhan seni/drama, seni/sastra, pertunjukan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan buku atau tulisan atau masalah b. Pengalihan atau ekspresi/keperluan yang wajar (IPB University)
2. Dianggap menggunakan dan memperbanyak dengan atau melalui karya tulis, dan dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

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 diperlukan 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 | Perbandingan | 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 | | | |
|---------------|----------------------|----------------|----------|----------|----------------|----------|----------|----------------|----------|----------|--------|
| | | Sabut 10 | Sabut 20 | sabut 30 | Sabut 10 | Sabut 20 | Sabut 30 | Sabut 10 | Sabut 20 | Sabut 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 | 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 | 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 | 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 | 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 | 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 | 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 | 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 | 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 | 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 | 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 | 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 | 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 | 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 | 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 | 45,371 | 29,889 | 33,925 | 32,570 |

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

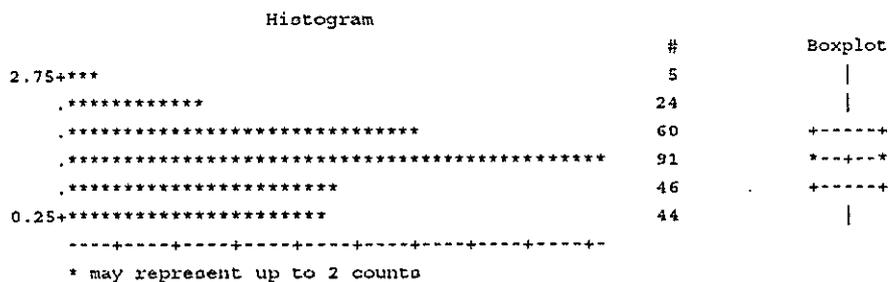
UNIVARIATE PROCEDURE

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 | 0.037991 |
| 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 |

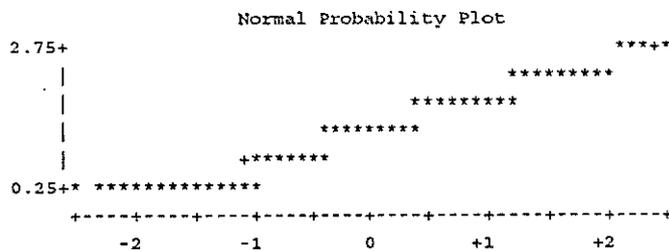
UNIVARIATE PROCEDURE

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

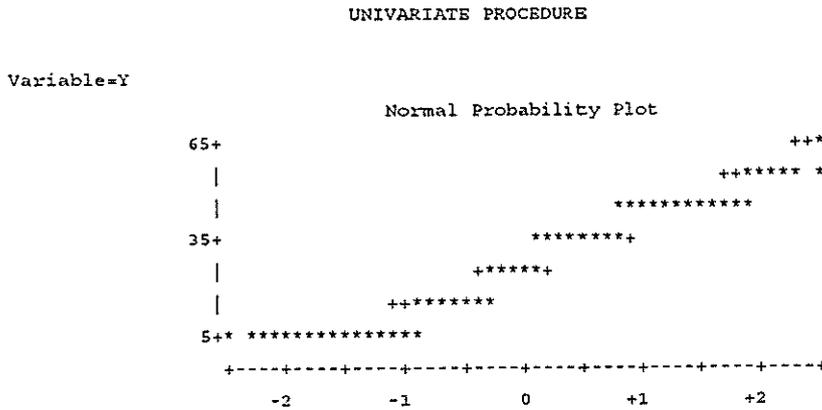
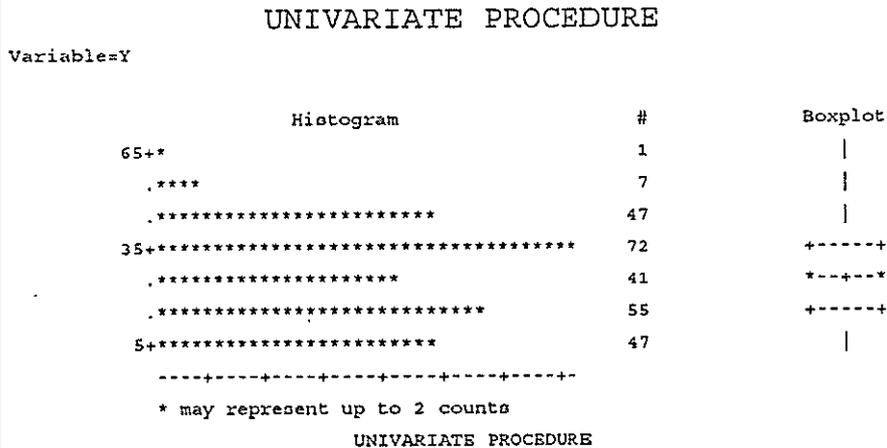
Means with the same letter are not significantly different.

| 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 |