

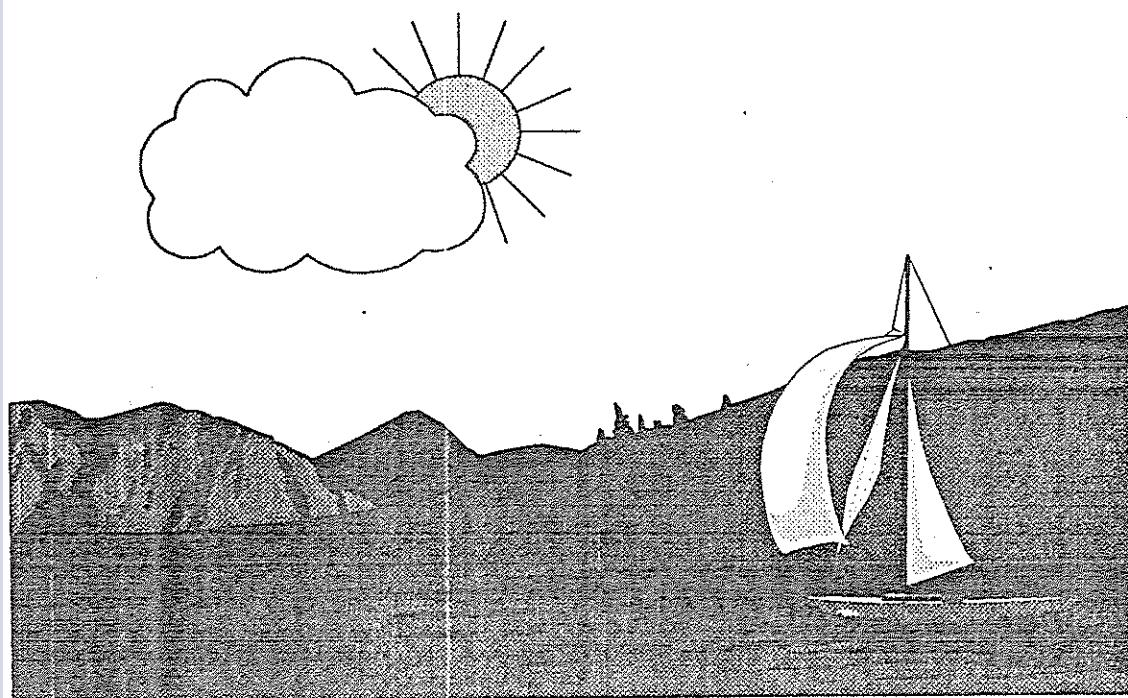
Karya kecil ini  
Kupersembahkan buat orang-orang tercinta :

Ibunda Nurdjanah Ali Batis,  
Ayahanda Slamet Riyadi,  
Ayunda Lilik Riyadi dan Yuni Riyadi,  
Adinda Rafida Riyadi, Iwan Handaru Riyadi dan Gama Riyadi,  
Serta F. Tauhid di Surabaya.



" Demi masa (Waktu), sesungguhnya manusia itu dalam kerugian, kecuali orang - orang yang beriman dan beramal shaleh dan berwasiat (nasihat - menasikati) dengan kebenaran dan berwasiat dengan kesabaran " (QS : Al - Ashr : 1 - 3)."

" Dia (Allah) memperjalankan kamu di darat dan di laut, sehingga ketika kamu dalam kapal dan kapal itu berlayar dengan angin yang baik, sedang mereka bergembira, tiba - tiba bertiplan angin taufan dan datanglah ombak dari tiap - tiap penjuru, sehingga mereka menduga bahwa mereka akan ditimpah bahaya (ketika itu) mereka memohon kepada Allah, serta mengikhlaskan agama kepada - Nya : Demi jika engkau lepaskan kami dari bahaya ini, niscaya kami berterima kasih " ( QS : Yunus, 22).



F/TIN  
1995  
0055

KAJIAN BIODEGRADASI  
TANDAN KOSONG KELAPA SAWIT (*Elaeis guineensis* JACQ)  
MENGGUNAKAN KULTIVASI MEDIA PADAT (KMP)

@Hick epita mitik IPB University

Oleh  
ROCHMAT PUDJIONO RIYADI  
F 27. 1228



1994

FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN  
INSTITUT PERTANIAN BOGOR  
BOGOR

IPB University



Rochmat Pudjiono Riyadi. F 27.1228. Kajian Biodegradasi Tandan Kosong Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* JACQ) Menggunakan Kultivasi Media Padat (KMP). Dibawah bimbingan E. Gumbira-Sa'id.

## RINGKASAN

Pengembangan agroindustri kelapa sawit di Indonesia, membawa implikasi pada peningkatan produksi minyak kelapa sawit yang dihasilkan. Di lain pihak limbah pengolahan minyak kelapa sawit juga mengalami peningkatan. Pengolahan dan penanganan limbah pengolahan minyak kelapa sawit seyogyanya memperoleh perhatian serius. Limbah padat berupa tandan kosong kelapa sawit (TKKS) merupakan limbah terbesar pada pengolahan minyak kelapa sawit. Menurut Loebis (1992) sekitar 35 - 38 persen dari total bahan baku tandan buah sawit segar adalah limbah tandan kosong kelapa sawit. Limbah tersebut belum dapat dimanfaatkan secara optimal dan sering menimbulkan masalah, oleh karena itu perlu diupayakan proses biokonversi TKKS menjadi berbagai produk yang bermanfaat.

TKKS merupakan salah satu bahan lignoselulosa. Komponen utama bahan lignoselulosa adalah selulosa, lignin dan hemiselulosa dengan perbandingan komposisi 4 : 3 : 3. Salah satu teknik biokonversi bahan lignoselulosa adalah kultivasi media padat atau KMP (*Solid Substrat Cultivation*). Biodegradasi TKKS menggunakan kapang perlu dilaksanakan guna mempercepat proses biokonversi. Hal penting yang perlu dilakukan dalam biodegradasi adalah perlakuan pendahuluan TKKS berupa pengecilan ukuran dan delignifikasi.

Pada penelitian ini, substrat TKKS digiling dengan ukuran 20, 40 dan 60 mesh, sedangkan delignifikasi dilakukan dengan menggunakan NaOH 0.15kg/kg bahan (Mooyoung *et al.*, 1994). Peningkatan kandungan selulosa hasil delignifikasi untuk substrat 20, 40 dan 60 mesh berturut-turut adalah 63.13, 52.16 dan 57.11 persen, sedangkan untuk substrat yang tidak didelignifikasi kandungan rata-rata selulosa, lignin dan hemiselulosa adalah 42.24, 28.24 dan 22.39 persen (Gumbira-sa'id *et al.*, 1994).

Kapang mempunyai kemampuan untuk mendegradasi bahan lignoselulosa. Hal ini dikarenakan kapang menghasilkan beberapa jenis enzim, yang cukup potensial. Beberapa jenis kapang yang dapat tumbuh baik pada bahan lignoselulosa adalah *Trichoderma viride*, *Neurospora sitophila* dan *white rot fungi Phanerochaete crysosporium*.

Kapang *Trichoderma viride* tumbuh sangat baik pada TKKS yang didelignifikasi, tetapi tumbuh kurang baik pada TKKS tanpa delignifikasi. Aktifitas enzim endoglukanase tertinggi adalah 9.16 IU/ml pada substrat tanpa delignifikasi dengan ukuran 60 mesh dan dicapai pada hari ke 5, aktifitas enzim  $\beta$ -glukosidase tertinggi dicapai pada jam ke 66 yaitu 6.07 IU/ml pada substrat 40 mesh dengan perlakuan delignifikasi. Aktifitas enzim FP-ase tertinggi dicapai pada jam ke 54 yaitu 3.26 IU/ml, pada substrat 20 mesh dengan delignifikasi.

Kandungan gula pereduksi selama KMP pada substrat yang didelignifikasi mengalami kenaikan dengan nilai tertinggi 16.17 mg/ml, sedangkan pada substrat tanpa delignifikasi mengalami penurunan sampai hari ke-4 untuk selanjutnya sedikit mengalami kenaikan. Kandungan protein terlarut dalam enzim pada substrat TKKS yang didelignifikasi mengalami kenaikan sampai cenderung konstan dengan nilai tertinggi 30.59 mg/ml. Kandungan protein terlarut dalam enzim pada substrat ukuran 60 mesh adalah yang terbaik (30.59 mg/ml) diperoleh pada jam ke-84.





Persentase sisa selulosa sebagai hasil konversi oleh *Trichoderma viride* pada jam ke-60 rata-rata 41.7 persen dan pada jam ke-96 adalah 48.9 persen. Demikian juga dengan kandungan hemiselulosa dan lignin yang masing-masing mengalami penurunan dari bobot awal yang bervariasi. Penurunan kandungan selulosa, lignin dan hemiselulosa pada TKKS tanpa delignifikasi lebih kecil dibandingkan dengan TKKS dengan delignifikasi. Kandungan selulosa menurun 13.78 - 17.90 persen, hemiselulosa, 17.46 - 44.93 persen dan lignin 30.42 - 38.92 persen. Kandungan hemiselulosa merupakan komponen yang paling tinggi mengalami degradasi.

Pada KMP menggunakan *Neurospora sitophila*, aktifitas enzim endoglukanase tertinggi diperoleh pada KMP tanpa aerasi pada substrat 40 mesh dan dicapai pada jam ke-96 yaitu 3.32 IU/ml. Aktifitas enzim  $\beta$ -glukosidase tertinggi dicapai pada jam ke-60 yaitu 2.68 IU/ml pada substrat 40 mesh dengan aerasi, sedangkan aktifitas enzim FP-ase tertinggi adalah 2.38 IU/ml diperoleh pada substrat 20 mesh tanpa aerasi pada jam ke-60.

Kandungan gula pereduksi tertinggi adalah 11.57 mg/ml pada substrat tanpa aerasi dengan ukuran 40 mesh, sedangkan kandungan protein terlarut dalam enzim tertinggi adalah 21.64 mg/ml pada substrat 40 mesh tanpa aerasi. Efektifitas biodegradasi pada substrat 20 mesh pada jam ke 60, dinyatakan oleh jumlah selulosa terkonversi yaitu 28.63 persen untuk KMP dengan aerasi dan 31.11 persen untuk KMP tanpa aerasi. Namun demikian, pada substrat 40 mesh pada jam ke-72 selulosa terkonversi adalah 26.06 persen pada KMP dengan aerasi dan 34.76 persen pada KMP tanpa aerasi.

Pada proses KMP menggunakan *Phanerochaete crysosporium*, kondisi produksi enzim lebih bervariasi. Aktifitas enzim endoglukanase tertinggi (13.61 IU/ml) dicapai pada hari ke-3 pada substrat 60 mesh, pada KMP dalam inkubator. Aktifitas enzim  $\beta$ -glukosidase tertinggi adalah 7.56 IU/ml pada substrat 60 mesh pada KMP dalam erlenmeyer, yang dicapai pada hari ke-17. Namun demikian aktifitas enzim FP-ase tertinggi dicapai pada hari ke-11 yaitu 2.4 IU/ml.

Kandungan selulosa terdegradasi oleh *Phanerochaete crysosporium*, pada hari ke-5 adalah 12.95 - 26.02 persen untuk KMP dalam inkubator dan 44.82 - 48.75 persen pada erlenmeyer yang dicapai pada hari ke-8. Namun demikian Penurunan kandungan lignin sangat tinggi, yaitu sekitar 50 - 78 persen dari kandungan lignin awal. Penurunan kandungan lignin tertinggi diperoleh pada KMP dalam erlenmeyer dengan ukuran substrat 60 mesh pada hari ke-17 yaitu sekitar 78 persen.

Secara keseluruhan ukuran partikel substrat 60 mesh, untuk KMP menggunakan *Trichoderma viride* dan *Phanerochaete crysosporium* dalam hal kandungan protein terlarut, kandungan selulosa terkonversi maupun lignin terdegradasi, adalah yang paling baik. Sedangkan untuk KMP menggunakan *Neurospora sitophila* yang terbaik adalah pada substrat 40 mesh.



**KAJIAN BIODEGRADASI  
TANDAN KOSONG KELAPA SAWIT (*Elaeis guineensis* JACQ)  
MENGGUNAKAN KULTIVASI MEDIA PADAT (KMP)**

**SKRIPSI**

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

Oleh  
**ROCHMAT PUDJIONO RIYADI**  
**F 27.1228**

1994  
**FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN**  
**INSTITUT PERTANIAN BOGOR**  
**BOGOR**

**INSTITUT PERTANIAN BOGOR**  
**FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN**

---

**KAJIAN BIODEGRADASI**

**TANDAN KOSONG KELAPA SAWIT (*Elaeis guineensis* JACQ.)**

**MENGGUNAKAN KULTIVASI MEDIA PADAT (KMP)**

SKRIPSY

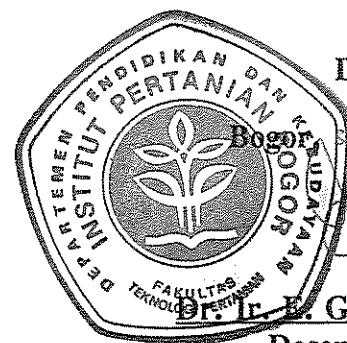
Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
**SARJANA TEKNOLOGI PERTANIAN**  
pada jurusan **TEKNOLOGI INDUSTRI PERTANIAN**,  
Fakultas Teknologi Pertanian  
Institut Pertanian Bogor

Oleh  
**ROCHMAT PUDJIONO RIYADI**  
F 27-1228

Dilahirkan Pada Tanggal 3 Maret 1972

di Malang, Jawa Timur

Tanggal Lulus : 29 Desember 1994



Disetujui

Desember 1994

## Dosen Pembimbing



## KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Wr. Wb.

Alhamdulillah hirobbil alamin, puji dan syukur penulis panjatkan ke-hadirat Allah SWT, atas segala rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penelitian dan penyusunan skripsi ini dapat diselesaikan sesuai dengan waktunya. Karya ini merupakan tugas akhir sebagai syarat memperoleh gelar Sarjana Teknologi Pertanian pada jurusan Teknologi Industri Pertanian. Penulis menghaturkan terima kasih kepada :

1. Ibunda Nurdjanah Ali Batis dan Ayahanda Slamet Riyadi, yang dengan penuh kasih sayang dan kesabaran memberikan segalanya untuk kelancaran studi penulis, baik moril dan material,
2. Dr. Ir. Endang Gumbira-Sa'id, MAdEv., selaku dosen pembimbing yang telah banyak memberikan arahan dan mencurahkan perhatian sepenuhnya hingga selesaiannya masa studi penulis,
3. Ir. Agus Herindayanto, Msc. dan Ir. Mulyorini Rahayuningsih, MS., yang telah berkenan menguji penulis dan meluangkan waktu untuk memberikan arahan dan saran guna perbaikan skripsi ini,
4. Ayunda Lilik Riyadi dan Yuni Riyadi, yang selalu memberikan nasehat dan semangat, hingga penulis menyelesaikan pendidikan,
5. Adinda Rafida Riyadi, Iwan Handaru Riyadi dan Gama Riyadi, yang selalu dengan sabar menerima nasehat dan memberikan dorongan semangat pada penulis sehingga dapat menyelesaikan studi,



5. Suprasono, Dwiyulianto dan rekan-rekan di Wisma Gajah, Rekan sebimbingan Dona Damayanti, Indah Wijayanti, Agus Ratmono, Agus Purwanto dan Agus Pamungkas, Asep Priyadi, Nuzwardi, Bapak Edi Sumantri dan rekan-rekan lain di laboratorium Bioindustri, serta rekan-rekan lain yang telah membantu studi penulis,
6. Teristimewa buat Farida Tauhid di FKG Unair, yang telah memberikan kepercayaan dan mendorong semangat sehingga penulis dapat menyelesaikan studi.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu kritik dan saran sangat penulis harapkan untuk perbaikan di masa-masa mendatang. Semoga karya ini bermanfaat bagi yang membacanya.

Wassalamu'alaikum Wr. Wb.

Bogor, Desember 1994

Penulis



## DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR .....	i
DAFTAR TABEL .....	iv
DAFTAR GAMBAR .....	v
DAFTAR LAMPIRAN .....	vii
I. PENDAHULUAN .....	1
A. LATAR BELAKANG .....	1
B. TUJUAN PENELITIAN .....	3
II. TINJAUAN PUSTAKA .....	5
A. BAHAN LIGNOSELULOSA .....	5
1. Selulosa .....	5
2. Hemiselulosa .....	7
3. Lignin .....	9
B. TANDAN KOSONG KELAPA SAWIT .....	12
C. KULTIVASI MEDIA PADAT (KMP) .....	13
D. RANCANG BANGUN SISTEM KULTIVASI MEDIA PADAT .....	16
E. MEKANISME HIDROLISIS BAHAN LIGNOSELULOSA .....	18
F. MIKROORGANISME PENDEGRADASI LIGNOSELULOSA .....	19
1. <i>Neurospora sitophila</i> .....	21
2. <i>Trichoderma viride</i> .....	23
3. <i>Phanerochaete crysosporum</i> .....	24
D. AKTIFITAS ENZIM PENDEGRADASI LIGNOSELULOSA .....	26
III. METODOLOGI PENELITIAN .....	29
A. BAHAN DAN ALAT .....	29
C. METODA PENELITIAN .....	30
1. Penyiapan Bahan .....	30
2. Penyiapan Bioreaktor dan Inkubator .....	30
3. Penyiapan Kultur .....	31
4. Penyiapan Medium .....	32
5. Proses Kultivasi Media Padat .....	32
6. Analisis Sampel .....	33
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN .....	35
A. DELIGNIFIKASI TKKS .....	35
B. KMP MENGGUNAKAN KAPANG <i>T. viride</i> .....	38



1. Substrat TKKS Didelignifikasi . . . . .	38
2. Substrat TKKS Tanpa Delignifikasi . . . . .	43
C. KMP MENGGUNAKAN KAPANG <i>N. sitophila</i> . . . . .	49
1. Sistem di Aerasi . . . . .	49
2. Sistem tanpa Aerasi . . . . .	52
D. KMP MENGGUNAKAN <i>P. crysosporium</i> . . . . .	58
1. KMP Dalam Inkubator . . . . .	58
2. KMP Dalam Erlenmeyer . . . . .	64
E. PENGARUH KMP PADA SUBSTRAT TKKS . . . . .	69
1. KMP Dengan <i>T. viride</i> . . . . .	69
2. KMP Dengan <i>N. sitophila</i> . . . . .	72
3. KMP Dengan <i>P. crysosporium</i> . . . . .	75
V. KESIMPULAN DAN SARAN . . . . .	78
A. KESIMPULAN . . . . .	78
B. SARAN . . . . .	80
DAFTAR PUSTAKA . . . . .	81
LAMPIRAN . . . . .	86

**DAFTAR TABEL**

Tabel 1. Komposisi tandan kosong kelapa sawit . . . . .	13
Tabel 2. Substrat untuk penentuan aktifitas enzim selulase . . . . .	28
Tabel 3. Komposisi TKKS yang digunakan . . . . .	35
Tabel 4. Hasil analisis komponen TKKS setelah proses delignifikasi . . . . .	36



DAFTAR GAMBAR	
Gambar 1.	Struktur sel kayu . . . . . 7
Gambar 2.	Satuan-satuan penyusun lignin . . . . . 10
Gambar 3.	Macam-macam ikatan yang terjadi antara lignin dengan polisakarida . . . . . 11
Gambar 4.	Model hipotesa hidrolisis enzimatik selulosa (Konsep C1/CX) . . 18
Gambar 5.	Mekanisme hidrolisis selulosa oleh enzim celulase . . . . . 20
Gambar 6.	Penampakan <i>Neurospora sitophila</i> . . . . . 22
Gambar 7.	Penampakan <i>Trichoderma viride</i> . . . . . 23
Gambar 8.	Profil bioreaktor multipel mini model kultur nampan . . . . . 31
Gambar 9.	Diagram alir proses KMP . . . . . 34
Gambar 10.	Pola perubahan nilai pH, kandungan gula pereduksi dan protein terlarut selama KMP dengan <i>T. viride</i> pada TKKS didelignifikasi . . . . . 39
Gambar 11.	Pola perubahan nilai pH dan aktifitas enzim selama KMP dengan <i>T. viride</i> pada TKKS didelignifikasi . . . . . 42
Gambar 12.	Pola perubahan nilai pH, kandungan gula pereduksi dan protein terlarut selama KMP dengan <i>T. viride</i> pada TKKS tanpa delignifikasi . . . . . 45
Gambar 13.	Pola perubahan nilai pH dan aktifitas enzim selama KMP dengan <i>T. viride</i> pada TKKS tanpa delignifikasi . . . . . 48
Gambar 14.	Pola perubahan nilai pH, kandungan gula pereduksi dan protein terlarut selama KMP dengan <i>N. sitophila</i> pada sistem diaerasi . . 51
Gambar 15.	Pola perubahan nilai pH dan aktifitas enzim selama KMP dengan <i>N. sitophila</i> pada sistem diaerasi . . . . . 53
Gambar 16.	Pola perubahan nilai pH, kandungan gula pereduksi dan protein terlarut selama KMP dengan <i>N. sitophila</i> pada sistem tanpa aerasi . . . . . 55





Gambar 17.	Pola perubahan nilai pH dan aktifitas enzim selama KMP dengan <i>N. sitophila</i> dengan aerasi pada sistem tanpa aerasi . . . . .	57
Gambar 18.	Pola perubahan nilai pH, kandungan gula pereduksi dan protein terlarut selama KMP dengan <i>P. crysosporium</i> dalam inkubator . .	60
Gambar 19.	Pola perubahan nilai pH dan aktifitas enzim selama KMP dengan <i>P. crysosporium</i> dalam inkubator . . . . .	63
Gambar 20.	Pola perubahan nilai pH, kandungan gula pereduksi dan protein terlarut selama KMP dengan <i>P. crysosporium</i> dalam erlenmeyer .	66
Gambar 21.	Pola perubahan nilai pH dan aktifitas enzim selama KMP dengan <i>P. crysosporium</i> dalam erlenmeyer . . . . .	68
Gambar 22.	Penurunan kandungan selulosa, lignin dan hemiselulosa selama KMP dengan <i>T. viride</i> pada TKKS didelignifikasi . . . . .	71
Gambar 23.	Penurunan Kandungan selulosa, lignin dan hemiselulosa selama KMP dengan <i>T. viride</i> pada TKKS tanpa delignifikasi . . . . .	73
Gambar 24.	Penurunan kandungan selulosa, lignin dan hemiselulosa selama KMP dengan <i>N. sitophila</i> . . . . .	74
Gambar 25.	Penurunan kandungan selulosa, lignin dan hemiselulosa selama KMP dengan <i>P. crysosporium</i> dalam erlenmeyer . . . . .	76
Gambar 26.	Penurunan kandungan selulosa, lignin dan hemiselulosa selama KMP dengan <i>P. crysosporium</i> dalam inkubator . . . . .	77



Lampiran 1.	Rekapitulasi data hasil penelitian . . . . .	86
Lampiran 2.	Gambar penampakan KMP dengan <i>Trichoderma viride</i> . . . . .	96
Lampiran 3.	Gambar penampakan KMP dengan <i>Neurospora sitophila</i> . . . . .	97
Lampiran 4.	Gambar penampakan KMP dengan <i>Phanerochaete crysosporium</i> .	98
Lampiran 5.	Prosedur analisis sampel . . . . .	99



## I. PENDAHULUAN

### A. LATAR BELAKANG

Pembangunan jangka panjang tahap II menempatkan subsektor agroindustri menjadi prioritas utama. Beberapa komoditi pertanian menjadi primadona dan potensial dikembangkan untuk memenuhi kebutuhan bahan baku industri. Salah satu diantara komoditi-komoditi pertanian tersebut adalah kelapa sawit (*Elaeis guineensis* JACQ).

Indonesia merupakan penghasil kelapa sawit terbesar nomor dua di dunia setelah Malaysia. Pada tahun 1982, luas areal kebun kelapa sawit mencapai 329 901 hektar. Setelah kurun waktu sepuluh tahun meningkat sebesar 450 persen menjadi 1 460 763 hektar, dengan produksi buah kelapa sawit sebanyak 3 162 228 ton (Ditjen Perkebunan, 1992).

Komoditi kelapa sawit diolah menjadi produk minyak kelapa sawit kasar (CPO) dan minyak inti sawit (PKO). Meningkatnya hasil produksi kelapa sawit, semakin meningkatkan produksi minyak yang dihasilkan sehingga memerlukan pendirian industri pengolahan kelapa sawit yang baru. Industri pengolahan kelapa sawit menghasilkan limbah cair dan limbah padat terutama dalam bentuk ampas dan tandan kosong kelapa sawit. Limbah terbesar adalah tandan kosong kelapa sawit (TKKS) yang mencapai 35 - 38 persen dari total bahan baku (Loebis, 1992). Limbah tersebut belum dimanfaatkan secara optimal, dan sering menimbulkan masalah, diantaranya sifatnya kamba sehingga memerlukan tempat yang luas dan memerlukan biaya tambahan untuk menanganinya. Oleh

karena, itu perlu diupayakan pemanfaatan TKKS menjadi berbagai produk yang berguna.

Pemanfaatan limbah lignoselulosa diantaranya adalah dengan biokonversi menjadi berbagai produk berguna, seperti untuk pelarut organik, untuk produksi pakan ternak, produksi enzim, maupun melalui penanganan konvensional seperti untuk papan partikel, pulp dan genting. Produksi Aseton, Butanol dan Etanol (ABE) dan beberapa enzim merupakan salah satu usaha yang penting dilakukan. Hal utama yang harus dilakukan untuk biokonversi TKKS menjadi ABE adalah proses hidrolisis menjadi gula sederhana (Gumbira-Sa'id *et al.*, 1994). Proses hidrolisis yang biasa dilakukan adalah secara kimia, dan dengan enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme. Proses hidrolisis dengan enzim secara langsung, yaitu dengan menumbuhkan mikroorganisme secara langsung untuk menghasilkan gula, guna proses biokonversi lebih lanjut, perlu diupayakan. Hal ini dilakukan dengan tujuan memperbaiki proses biokonversi bahan lignoselulosa tersebut melalui biodegradasi dengan Kultivasi Media Padat (KMP).

Kultivasi media padat mempunyai potensi yang lebih besar, mengingat sistemnya yang sederhana dan resiko kontaminasi mikroorganisme lain relatif rendah. Di negara-negara berkembang, pengayaan terhadap bahan berpati dan lignoselulosa menjadi produk pakan sangat penting dan berprospek cerah. Hal ini dikarenakan dengan sistem KMP, proses dapat langsung diterapkan di pedesaan tanpa suatu teknologi yang rumit (Gumbira Sa'id, 1992).

Mengingat berbagai hal diatas, maka Indonesia mempunyai potensi dalam pengembangan sistem KMP, untuk memproduksi pakan dan produk-produk lain yang berguna. Oleh karena itu, perlu dilakukan beberapa kajian untuk

memperoleh informasi kondisi KMP yang tepat dan optimal. Proses biodegradasi melibatkan kerja beberapa jenis enzim, diantaranya adalah enzim selulase, enzim xilanase dan enzim ligninase beserta turunannya. Enzim merupakan biokatalisator yang kerjanya sangat spesifik. Enzim mikrobial terbagi menjadi dua yaitu enzim ekstraselular dan intraselular. Enzim ekstraselular diperlukan bagi industri karena kespesifikannya. Sebagai contoh enzim ekstraselular adalah enzim lipase, selulase, amilase, xilanase dan lain-lain. Enzim endoglukanase dan  $\beta$ -glukosidase adalah contoh enzim ekstraselular yang termasuk golongan enzim selulase. Kedua enzim tersebut bersama-sama dengan enzim selobiohidrolase sangat berguna untuk menghidrolisa selulosa yang tidak larut menjadi glukosa. Kegunaan lain dari enzim tersebut adalah pada industri tekstil, industri minuman ringan, sari buah dan sebagainya. Aktifitas gabungan ketiga jenis enzim di atas sangat menentukan untuk mengetahui jumlah glukosa yang dihasilkan selama proses hidrolisis. Mengingat ketersediaan bahan lignoselulosa dan fungsi spesifik dari enzim tersebut di atas, maka studi mengenai enzim selulase dan turunannya selayaknya dilakukan dengan intensif.

## B. TUJUAN PENELITIAN

1. Mengetahui pengaruh ukuran partikel substrat awal TKKS terhadap parameter biodegradasi yang dianalisa,
2. Mempelajari biodegradasi kandungan selulosa dan lignin, serta peningkatan gula pereduksi dan protein terlarut yang dihasilkan setelah proses KMP.

3. Mengetahui tingkat aktifitas enzim kasar dari mikroorganisme yang digunakan.
4. Mengetahui potensi mikroorganisme yang digunakan untuk proses kultivasi media padat dengan substrat bahan lignoselulosa.





## II. TINJAUAN PUSTAKA

### A. BAHAN LIGNOSELULOSA

Bahan selulosa pada kenyataannya tidak pernah dijumpai dalam keadaan murni. Umumnya selulosa berikatan dengan bahan lain yaitu hemiselulosa dan lignin menjadi bentuk lignoselulosa. Perbandingan ketiga komponen dalam lignoselulosa (selulosa, hemiselulosa dan lignin), menurut Fengel dan Wegener (1984) adalah 4 : 3 : 3, dimana nilai bilangan tersebut tergantung pada jenis tanaman.

#### 1. Selulosa

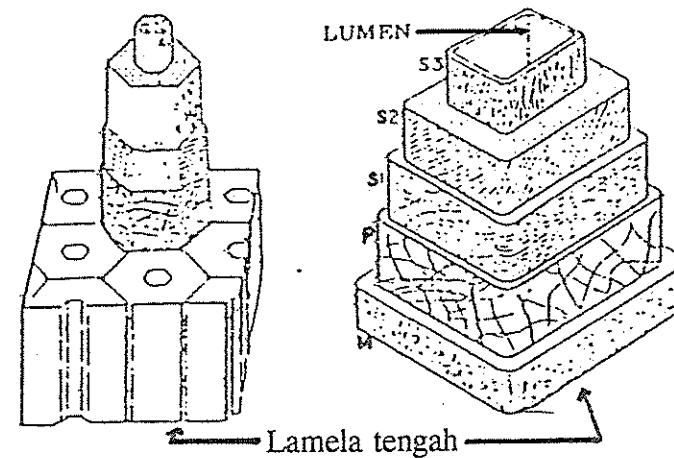
Selulosa merupakan polimer glukosa dengan ikatan  $\beta$ -1,4-glikosidik. Ikatan tersebut sangat kuat dan dapat membentuk kristal mikrofibril yang secara bersama-sama membentuk selulosa tidak larut. Secara umum rumus empirik selulosa dapat ditulis sebagai  $(C_6H_{10}O_5)_n$  dengan n menyatakan derajat polimerisasi yang berkisar antara 15 - 14 000. Rantai selulosa terdiri dari satuan-satuan gula (glukosa) anhidrida yang saling berkaitan melalui atom C pertama dan keempat (Cowling, 1975).

Rantai polimer linier dari selulosa mempunyai struktur yang beragam. Dua unit glukosa yang berdekatan akan berikatan dengan cara melepaskan satu molekul air, yang terbentuk dari gugus-gugus hidroksil pada atom karbon ke satu dan keempat. Posisi  $\beta$  dari grup -OH pada C1 akan berhubungan dengan unit glukosa lain pada C1 - C4 dari cincin piranosida membentuk unit selobiosa.

Menurut Judoamidjojo *et al.* (1989), secara alamiah molekul selulosa tersusun dalam fibril yang terdiri dari beberapa molekul selulosa paralel yang dihubungkan dengan ikatan hidrogen. Pada kayu, fibril-fibril membentuk struktur kristal yang dibungkus oleh lignin. Lignin berperan sebagai pelindung selulosa dari serangan enzim pemecah selulosa.

Terdapat dua macam ikatan hidrogen yang terdapat pada struktur selulosa yaitu ikatan hidrogen intramolekular dan ikatan hidrogen intermolekular. Ikatan hidrogen yang dibentuk dari O(6) pada satu residu glukosa dengan O(2)H pada glukosa disebelahnya dan juga dari O(3)H dengan oksigen O(5') H cincin, merupakan ikatan hidrogen intramolekul. Ikatan hidrogen intermolekul terjadi akibat ikatan dari O(3'') pada satu rantai dengan O(6) pada rantai disampingnya (Ahmadi, 1989). Ikatan hidrogen intramolekuler mempertahankan kekakuan rantai selulosa yang saling berikatan membentuk suatu mikrofibril. Pada proses hidrolisis, maka yang paling mudah terhidrolisa adalah bagian amorf, dimana pada selulosa sekitar 15 persen adalah bagian amorf (Enari, 1983).

Selulosa banyak terdapat dalam sel dinding tanaman. Menurut Tsao *et al.* (1978), susunan dinding sel terdiri atas lamela tengah, dinding primer dan dinding sekunder. Dinding sekunder terbentuk selama proses pendewasaan sel dan terdiri atas dinding sekunder utama, lamela transisi dan dinding sekunder bagian dalam. Gambar 1 menunjukkan struktur sel kayu.



Gambar 1. Struktur sel kayu (Tsao *et al.*, 1978).

Keterangan :  
 M = lamela tengah  
 P = dinding primer  
 S1 = lamela transisi  
 S2 = dinding sekunder utama  
 S3 = dinding sekunder bagian dalam.

Kumpulan fibril disebut mikrofibril sedangkan kumpulan dari mikrofibril membentuk makrofibril. Bagian mikrofibril yang banyak ikatan hidrogen bersifat sangat kuat, tidak dapat ditembus air dan disebut bagian yang berkristal dari selulosa. Bagian mikrofibril yang sedikit atau sama sekali tidak mengandung ikatan hidrogen disebut bagian amorf (Tsao *et al.*, 1978).

## 2. Hemiselulosa

Hemiselulosa adalah polisakarida yang berikatan dengan selulosa pada bagian tanaman yang telah mengalami delignifikasi. Hemiselulosa

terutama terdapat pada bagian lamela tengah dari dinding sel (Gong *et al.*, 1981). Molekul hemiselulosa lebih mudah menyerap air, bersifat plastis dan mempunyai permukaan kontrol antar molekul yang lebih luas dibandingkan dengan selulosa.

Hemiselulosa merupakan heteropolimer bercabang dari glukosa, xylosa, galaktosa, manosa, arabinosa dan asam-asam urat dari glukosa dan galaktosa yang saling berikatan secara 1-3, 1-4, dan 1-6 glikosidik, dengan derajat polimerisasi mencapai 200 (Cowling di dalam Gaden *et al.*, 1976). Menurut Fengel dan Wegener (1984), rantai utama hemiselulosa dapat hanya terdiri satu macam monomer (homopolimer), misalnya xilan, dan dapat juga dua atau tiga monomer misalnya glukomanan.

Hemiselulosa yang terdapat pada limbah hasil pertanian, umumnya mengandung hetero-1-4- $\beta$ -D-xilan (arabino-4-O-metilglukoronoxilan dan 4-O-metilglukoronoxilan) dan hetero-1-4- $\beta$ -D-manan (galaktoglukamanan dan glukomanan). Hetero xilan terutama merupakan komponen hemiselulosa yang berasal dari *gramineae* (rumput-rumputan dan biji-bijian) dan *Angiospermae* (kayu keras), sedangkan  $\beta$ -manan terutama terdapat pada *Gymnospermae* (kayu lunak). Unit xilosa dan asetyl lebih banyak terdapat pada hemiselulosa dari kayu keras sedangkan unit manosa dan galaktosa banyak ditemui pada kayu lunak (Fengel dan Wegener, 1984).

### 3. Lignin

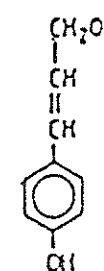
Lignin merupakan polimer aromatik kompleks yang terbentuk melalui polimerisasi tiga dimensi dari sinamil alkohol (turunan fenilpropana) dan mempunyai bobot molekul hingga 11 000 (Haigler di dalam Zeronian, 1985). Nama lain dari lignin menurut Tsao *et al.* (1978), adalah senyawa polifenol, yaitu polimerisasi dari koniferil alkohol, sinamil alkohol dan para-kumaril alkohol.

Serat lignin banyak terdapat pada lamela tengah dan makin berkurang pada dinding sel bagian dalam. Lignin bersifat hidrofobik dan keberadaanya pada serat mengakibatkan sifat kaku dan ketahanan tarik serat rendah.

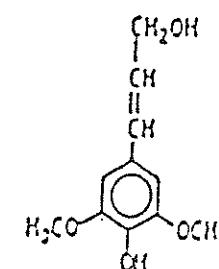
Pada bahan lignoselulosa, fermentabilitas dinding sel dibatasi oleh efek kimia dan efek fisik (Judoamidjojo *et al.*, 1989). Efek kimia yaitu adanya hubungan lignin dengan karbohidrat dan asetilasi hemiselulosa. Secara fisik lignin membungkus mikrofibril dari selulosa dalam suatu matriks hidrofobik dan terikat secara kovalen, baik dengan selulosa maupun dengan hemiselulosa.

Menurut Saarkanen dan Ludwig (1971) di dalam Fengel dan Wegener (1984), satuan penyusun lignin adalah fenil propana yang tersubstitusi pada dua atau tiga posisi dalam cincin benzennya. Bila rantai fenol aromatik tersebut disubstitusi oleh satu gugus metoksil, maka disebut satuan guaiasil dan apabila oleh dua gugus metoksil maka disebut siringil. Secara umum rumus kimia satuan penyusun lignin disajikan pada Gambar 2.

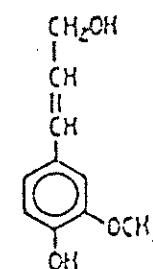
Pada kenyataanya di alam lignin selalu dalam bentuk kompleks dan berikatan diantara polisakarida-polisakarida dinding sel. Karbohidrat merupakan awal atau prekursor terbentuknya lignin diantara dinding sel tanaman.



### para-kumaril alkohol



sinamil alkoho



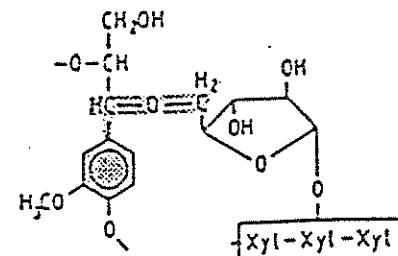
koniferil alkohol

Gambar 2. Satuan-satuan penyusun lignin (Fengel dan Wegener, 1984).

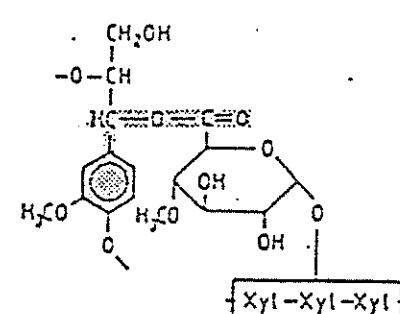
Ketiga komponen utama penyusun lignoselulosa tersebut di atas tidak dapat secara sempurna terpisahkan dengan teknik tertentu. Pada selulosa yang telah dimurnikan selalu ditemui lignin, begitu juga sebaliknya. Menurut Tanaka *et al.*, (1979) di dalam Fengel dan Wegener (1984) diketahui bahwa dari berbagai percobaan, ternyata ikatan antara lignin dan polisakarida lebih dipengaruhi oleh ikatan kimia dari pada

asosiasi seperti ikatan hidrogen, gaya vanderwalls dan khemosorpsi.

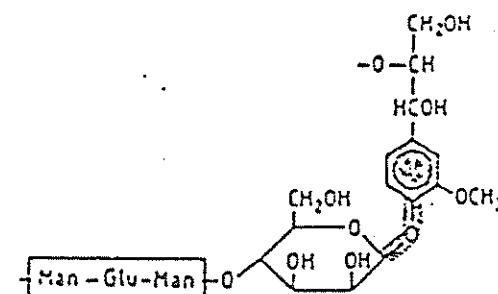
Gambar 3 merupakan contoh macam ikatan yang terjadi antara lignin dan polisakarida.



ikatan eter benzi



ikatan ester benzi



ikatan glikosidik fenil

Gambar 3. Macam ikatan yang terjadi antara lignin dengan polisakharida (Fengel dan Wegener, 1984).

Adanya lignin pada struktur kristal selulosa jaringan tanaman, membatasi hidrolisis selulosa oleh enzim ataupun secara asam. Perlakuan fisik seperti pengecilan ukuran atau perlakuan kimiawi seperti penggunaan asam dan basa, merupakan perlakuan pendahuluan yang



biasa dilakukan dalam proses delignifikasi limbah pertanian sebelum memasuki proses hidrolisis bahan lignoselulosa (Gumbira-Sa'id *et al.*, 1994).

## B. TANDAN KOSONG KELAPA SAWIT

Tandan kosong kelapa sawit, diperoleh dari tanaman kelapa sawit (*Elaeis guineensis JACQ*) yang termasuk famili *Palmae*, subklas *Monocotyledonae*, klas *Angiospermae*, subdivisi *Pteropsida* dan divisi *Tracheophyta* (Naibaho, 1992). Pemanenan kelapa sawit biasanya dilakukan pada umur tiga sampai empat tahun setelah masa tanam. Setiap hektar ditanami sekitar 144 pohon dan setiap pohon menghasilkan sampai enam tandan buah. Bobot setiap tandan berkisar 5 - 30 kg (Aritonang, 1986). Menurut Naibaho (1992), setiap tandan mengandung kelapa sawit sekitar 62 - 70 persen buah. Sisanya 30 - 38 persen adalah tandan kosong yang merupakan limbah yang belum dimanfaatkan secara optimal.

Komposisi terbesar di dalam tandan kosong kelapa sawit adalah serat yang terdiri atas selulosa, hemiselulosa dan lignin. Selulosa merupakan polimer karbohidrat yang terdapat pada dinding pertama dan kedua sel tanaman. Selulosa juga merupakan komponen utama bahan lignoselulosa, selain lignin dan hemiselulosa. Komposisi TKKS hasil penelitian Pratiwi *et al.* (1988) dan Azemi *et al.* (1994), disajikan pada Tabel 1.



Tabel 1. Komposisi tandan kosong kelapa sawit

Komponen	Komposisi (%)	
	A	B
Selulosa	36.8	40.0
Hemiselulosa	27.0	24.0
Lignin	15.7	21.0
Kadar abu dan lain-lainnya	6.0	15.0

A = Pratiwi *et al.* (1988)

B = Azemi *et al.* (1994)

### C. KULTIVASI MEDIA PADAT (KMP)

Kultivasi media padat (KMP) merupakan sistem kultivasi dengan menumbuhkan mikroorganisme pada substrat padat secara terkontrol dengan tujuan untuk kemaslahatan manusia (Gumbira-Sa'id, 1992a). Istilah ini pada dasarnya menggantikan istilah fermentasi media padat yang secara ilmiah merupakan istilah yang salah kaprah. Fermentasi merupakan istilah baku dalam fisiologi mikroorganisme secara anaerobik sedangkan kultivasi media padat pada umumnya dilakukan pada keadaan aerobik.

KMP dapat didefinisikan sebagai sebuah sistem dengan partikel matrik padat, fasra cairan yang terikat dengannya dan gas-gas yang terperangkap di dalam partikel. Besaran fisika dari sistem tersebut seperti potensial air, kapasitas penahan air yang dapat digunakan sebagai indeks dari aerasi dan densitas kamba, menolong untuk mendefinisikan tipe dari kultivasi tersebut (Gumbira-Sa'id, 1992b).

Pada dasarnya aplikasi proses KMP telah dipergunakan selama beberapa abad, terutama untuk makanan dan minuman, lama sebelum pengeta-



huan mikrobiologi dan biokimia dimengerti. Pada saat ini tiga tipe proses yang telah dikembangkan digunakan pada penerapan yang berbeda seperti (1) fermentasi makanan oriental (2) pematangan keju dan (3) pengomposan (Gumbira-Sa'id, 1992b).

Pada saat ini KMP digunakan untuk memproduksi beberapa enzim, makanan fermentasi dan mikotoksin. Dibandingkan dengan kultivasi media cair konvensional, beberapa peneliti mengungkapkan keuntungan dari proses tersebut dan juga kekurangannya. Berdasarkan beberapa penelitian yang dikembangkan oleh Gumbira-sa'id (1992b), keuntungan KMP adalah sebagai berikut :

1. KMP menggunakan relatif sedikit air, bakteria yang dikenal membutuhkan konsentrasi air yang tinggi tidak dapat bertahan, sehingga banyak sekali mengurangi permasalahan kontaminasi oleh bakteria,
2. Ukuran bioreaktor relatif lebih kecil dibandingkan hasil produk, terutama jika kondisi substrat lebih pekat,
3. Komposisi medium relatif sederhana dibandingkan dengan medium sintetik,
4. Kondisi untuk pertumbuhan kapang sama dengan keadaan di alam bebas dan kebanyakan proses tidak membutuhkan sterilisasi,
5. Produktivitas lebih tinggi dibandingkan dengan media cair,
6. Pemisahan produk dapat lebih mudah, secara umum tidak membutuhkan penyaringan karena produk terkonsentrasi dalam substrat dan dapat dipergunakan secara langsung. Apabila dibutuhkan untuk mengekstrak produk, pelarut yang dibutuhkan lebih sedikit dibandingkan dengan

media cair. Produk dapat langsung diberikan sebagai makanan ternak dengan keberadaan substrat sisa atau produk organik,

7. Aerasi dilakukan melalui rongga diantara partikel substrat dan melalui pencampuran,
8. Tidak menghasilkan limbah cair yang banyak dan limbah yang dihasilkan hanya mempunyai sedikit COD dan BOD,
9. Peralatan yang digunakan tidak lebih rumit dari metoda konvensional,

Namun demikian terdapat beberapa kelemahan KMP (Gumbira-Sa'id, 1992b) yang antara lain adalah :

1. Mikroorganisme yang dapat digunakan sedikit, khususnya hanya yang dapat tumbuh pada kelembaban yang rendah. Mikroorganisme tersebut antara lain kapang, beberapa khamir dan *Streptomyces*,
2. Memerlukan banyak spora untuk inokulasi. Hal ini membutuhkan banyak air dan dapat menyebabkan kontaminasi dan produksi mikotoksin,
3. Permasalahan penggandaan skala terjadi akibat kesulitan pengukuran panas dan transfer massa serta proses kontrol,
4. Kontrol proses berkenaan dengan pH, kelembaban, aktivitas air, pasokan oksigen, kadar CO<sub>2</sub> dan sebagainya lebih sulit. Variabel-varibel proses sulit diukur.



#### D. RANCANG BANGUN SISTEM KULTIVASI MEDIA PADAT

Kesulitan dalam melakukan pengukuran variabel-variabel kunci dalam proses percobaan KMP menghambat perkembangan KMP dibandingkan dengan perkembangan yang terjadi pada kultivasi kultur terendam. Keberadaan padatan yang dapat mencapai 60 persen dari campuran substrat serta keragaman media menghambat penentuan kadar biomassa, konsentrasi nutrien dan bahkan nilai-nilai pH, RH, dan suhu yang tepat (Moo-Young *et al.*, 1983 *di dalam* Gumbira-Sa'id, 1992).

Rancang bangun bioreaktor kultivasi media padat seyogyanya memenuhi ciri-ciri sebagai berikut : (1) Kapasitas bioreaktor harus memungkinkan studi variabel-variabel yang tidak dapat dilaksanakan pada skala kecil (laju 2aerasi, pengaruh ketebalan lapisan substrat, atau banyaknya muatan substrat, pengumpulan panas dan lain-lain), (2) Alat-alat untuk pemantauan dan pengontrolan parameter-parameter pH, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, RH dan a<sub>w</sub> harus diadaptasikan dengan baik (Gumbira-Sa'id, 1992). Untuk KMP pada skala pilot plan, Durand *et al.* (1988) menekankan bahwa rancang bangun harus dapat digunakan untuk penggandaan skala sampai satu ton dan penanganan bahan harus bersifat sederhana.

Berbagai jenis bioreaktor pengayaan protein bahan-bahan berpati yang digunakan pada umumnya adalah dari jenis bioreaktor baki yaitu kultur dalam nampakan dan bioreaktor kolom. Trevelyan (1974) di dalam Gumbira-Sa'id (1992a) menggunakan desikator sebesar 6.2 liter sebagai suatu bioreaktor sederhana dimana lubang pengeluaran bioreaktor ditutup dengan kapas, sehingga udara dapat berdifusi ke dalam bioreaktor. Raimbault *et al.* (1980)



juga merancang bangun suatu bioreaktor yang merupakan suatu modifikasi dari blender pembuat roti komersial dengan kapasitas 10 kg.

Aerasi dilaksanakan dengan melalukan udara lembab melalui dasar bejana. Suatu sistem pengontrol sederhana menggunakan sensor-sensor sederhana dilengkapi untuk mempertahankan kondisi yang cocok untuk pH, kadar air dan suhu. Sistem kontrol tersebut diaktivasi dengan sensor suhu dimana sensor tersebut dapat mencapai suhu yang telah ditentukan sebelumnya. Bioreaktor dapat memproduksi sejumlah produk pakan yang cukup untuk percobaan pengumpunan pada ternak-ternak monogastrik.

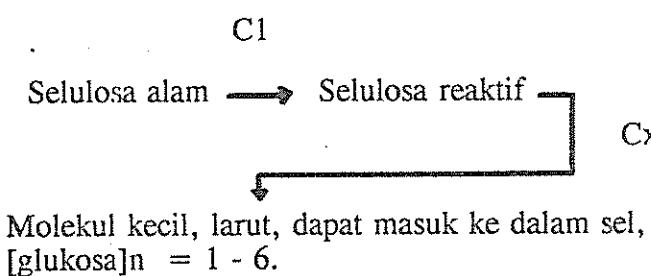
Bioreaktor tipe baki atau Kultur dalam nampan memiliki beberapa keuntungan antara lain (1) bioreaktor memungkinkan studi variasi kedalaman unggul tanpa mengubah alir gas, (2) bioreaktor memungkinkan pengukuran suhu dan komposisi gas pada kedalaman yang berbeda dengan gangguan sekecil mungkin pada kultur, dan (3) bioreaktor memungkinkan pengukuran konsentrasi dan gradien suhu pada arah aksial searah dengan arah alir gas (Gumbira-Sa'id, 1992b).

Daubrese *et al.* (1987) di dalam Gumbira-Sa'id (1992b), menyatakan bahwa suatu bioreaktor skala pedesaan dapat menggunakan suatu bejana sebesar 200 liter dengan beberapa lubang pembukaan di sisinya dan sebuah tutup untuk ventilasi. Bioreaktor tersebut untuk menangani baki setebal lima sentimeter dimana 6 - 9 baki dapat disimpan sekaligus. Ventilasi dilengkapi dengan perforasi pada dinding bioreaktor, sedangkan kelembaban bioreaktor dipertahankan dengan menambahkan air pada dasar bioreaktor. Bioreaktor baki memungkinkan studi KMP dengan muatan banyak.



## E. MEKANISME HIDROLISIS BAHAN LIGNOSELULOSA

Menurut Reese *et al.*, (1950) di dalam Enari (1983), terdapat dua tahapan kerja enzim selulase dalam menghidrolisa selulosa. Tahap pertama adalah tahap aktifasi untuk enzim non hidrolisis (C1) dan tahap kedua adalah tahap hidrolisis dari selulosa yang telah diaktifasi oleh enzim hidrolisis (Cx). Secara umum model hipotesis hidrolisis tersebut adalah sebagai berikut :



Gambar 4. Model hipotesa hidrolisis enzimatik (konsep C1/Cx) (Reese *et al.*, 1950 di dalam Enari, 1983).

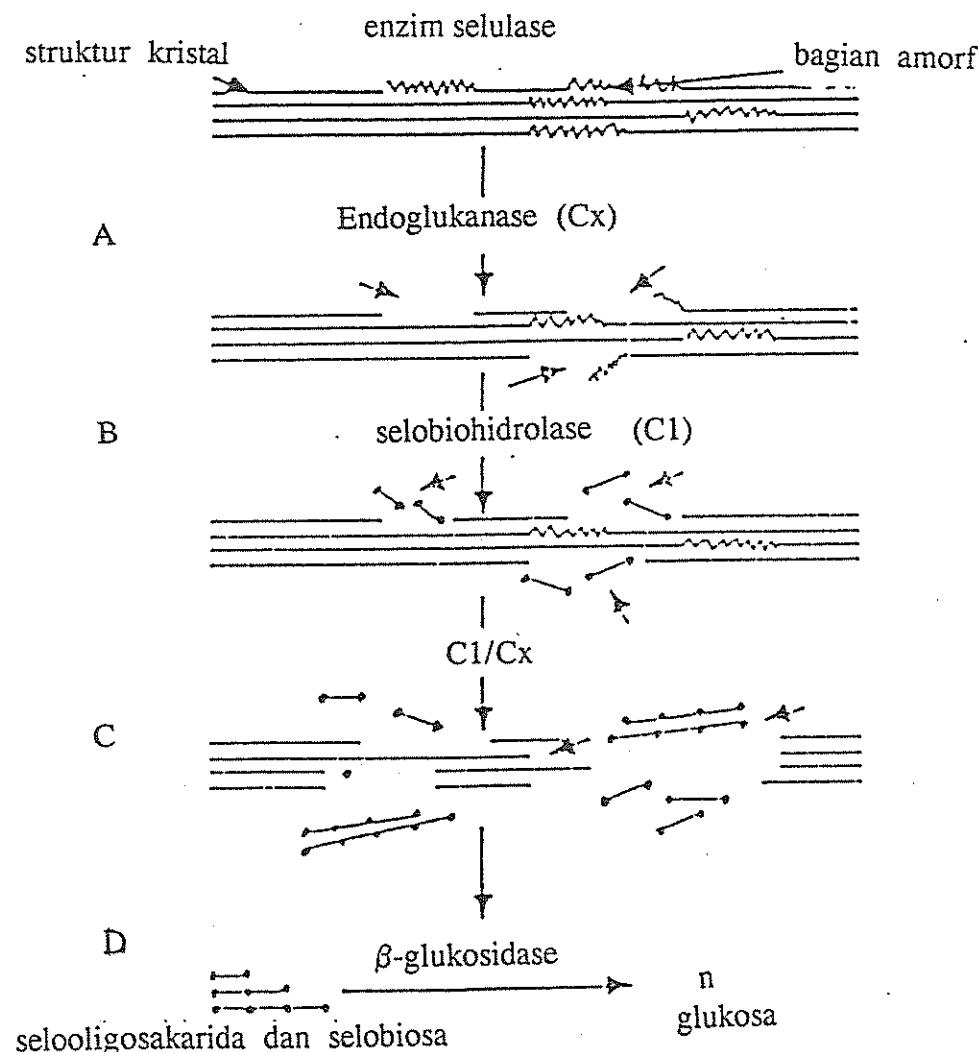
Berdasarkan hal diatas, maka mikroorganisme yang mampu tumbuh pada selulosa kristal akan membentuk enzim C1, sedangkan yang hanya mampu mendegradasi selulosa yang tersubstitusi, misalnya karboksimetyl selulase akan kekurangan enzim tersebut dan hanya memproduksi enzim Cx. Pada proses hidrolisis enzimatik selulosa oleh enzim selulase, sebenarnya terdapat tiga macam enzim yang terlibat. Ketiga enzim tersebut adalah selobiohidrolase, endoglukanase dan  $\beta$ -glukosidase. Setiap enzim selulosa dari mikroorganisme yang berbeda, hampir pasti mengandung ketiga jenis enzim tersebut. Enzim yang dihasilkan oleh setiap kapang mempunyai kemampuan yang berbeda dalam mendegradasi substrat.

Pada substrat yang teratur sinergisme antara selobiohidrolase dan endoglukanase sangat tinggi, tetapi sebaliknya pada substrat amorf, pada substrat yang telah dikembangkan dengan asam, serta tidak ada pada substrat yang telah disubstitusi dan larut seperti CMC. Menurut Enari (1983), mekanisme hidrolisis selulosa secara lebih jelas terlihat pada Gambar 5, dimana endoglukanase merupakan penentu kecepatan aktifitas enzim secara keseluruhan.

Enzim endoglukanase (Cx) menyerang bagian amorf dari serat selulosa sehingga membuka jalan bagi enzim selobiohidrolase (C1). Selobiohidrolase membebaskan unit selobiosa dari ujung-ujung non-reduksi rantai selulosa. Kerja sama kedua enzim dikarenakan substrat dari selobiohidrolase terbentuk akibat kerja enzim endoglukanase. Enzim  $\beta$ -glukosidase menghidrolisis selooligosakarida dan selobiase menjadi glukosa.

## F. MIKROORGANISME PENDEGRADASI LIGNOSELULOSA

Sejumlah mikroorganisme dapat tumbuh pada bahan-bahan lignoselulosa. Mikroorganisme menghasilkan beberapa jenis enzim, dan dengan enzim tersebut, mikroorganisme dapat menghidrolisa bahan lignoselulosa untuk media pertumbuhannya. Sejumlah kapang seperti *Trichoderma viride*, *Neurospora sitophila*, *Penicillium funiculosum* dan *Chrysosporium lignorum* dapat menghasilkan enzim selulase yang dapat menghidrolisa bahan-bahan lignoselulosa dan meningkatkan kandungan protein bahan tersebut (Frazier, 1967 ; Fardiaz, 1989).



- Endoglukanase (Cx) menyerang bagian amorf dari selulosa sehingga membuka jalan bagi enzim selobiohidrolase (C1).
- Selobiohidrolase membebaskan unit cellobiosa dari ujung-ujung non-reduksi rantai selulosa.
- Kerjasama diantara kedua enzim disebabkan karena substrat baru dari selobiohidrolase terbentuk akibat kerja enzim endoglukanase.
- $\beta$ -glukosidase menghidrolisis celooligosakarida dan cellobiosa menjadi glukosa.

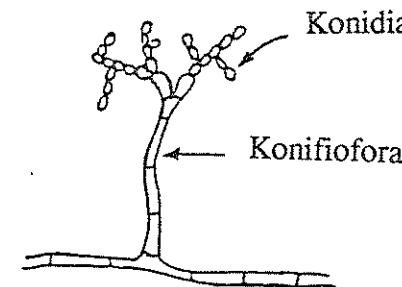
Gambar 5. Mekanisme hidrolisis selulosa dengan enzim selulase (Enari, 1983).



Mikroorganisme yang termasuk *White rot fungi* seperti *Phanerochaeta crysosporium* dan *Pleurotus sajor-caju* mempunyai kemampuan yang tinggi untuk mendegradasi lignin sehingga dapat meningkatkan kandungan protein bahan lignoselulosa. *Pleurotus sajor-caju* mempunyai kemampuan meningkatkan kandungan protein bahan lignoselulosa sebesar 41.7 persen dari kandungan awal (Dinesh *et al.*, 1994). Beberapa jenis mikroorganisme lain yang potensial untuk proses degradasi bahan lignoselulosa antara lain *Fusarium* sp, *Polyporus* sp, *Mycothecium*, *Eupenicillium* sp dan lain-lain.

### 1. *Neurospora sitophila*

*Neurospora sitophila* merupakan mikroorganisme yang dikenal sebagai kapang roti merah. Hal ini dikarenakan kapang tersebut sering menyebabkan kerusakan pada roti. Miselia *Neurospora sitophila* berbentuk septat dan mempunyai jaringan pernafasan yang bebas sepanjang tepi miseliannya (Frazier, 1967). Pertumbuhan kapang berlangsung lambat pada 12 jam pertama, kemudian diikuti dengan pertumbuhan miselia yang lebih cepat dan perkembangan cita rasa pada oncom merah. Spora kuning oranye berkembang antara 24 - 48 jam (Van Veen *et al.*, 1968). Gambar 6 memperlihatkan penampakan *Neurospora sitophila*.



Gambar 6. Penampakan *Neurospora sitophila*

*N. Sitophila* merupakan kapang yang termasuk dalam sub divisi *Eumycophyta*, klas *Ascomycetes*, ordo *Sphriales* dan famili *Sordariaceae*. Kapang tersebut mudah menyebar dan berkembang biak secara cepat terutama dengan cara aseksual biasanya ditemukan pada tingkat konidia. Spora seksualnya jarang ditemui karena hanya dibuat dalam jumlah sedikit (Alexopoulos dan Mims, 1979).

Kapang *N. Sitophila* dikenal sebagai kapang oncom merah, karena kultur kapang yang diturunkan dari oncom merah menunjukkan ciri-ciri sebagai *N. Sitophila* (Dwijoseputro, 1961). Jika ditumbuhkan pada oncom merah atau ampas tahu, kapang tersebut dapat menurunkan kadar total *dietary fiber* sebesar 26.16 persen dan hemiselulosa sebesar 93.01 persen. Bila ditumbuhkan pada selulosa maka akan dihasilkan enzim  $\beta$ -glukosidase.

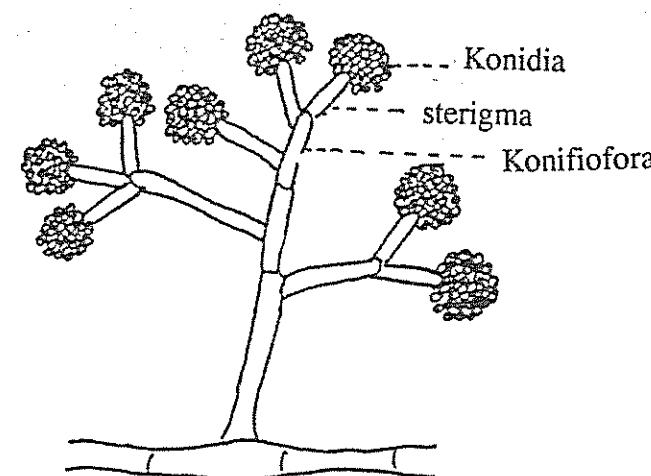
Komposisi kimia medium untuk pertumbuhan dalam kultur minimum adalah sukrosa sebagai sumber karbon dan  $\text{KNO}_3$  sebagai sumber nitrogen. Garam anorganik dan biotin termasuk elemen yang



sangat sedikit diperlukan. Alexopoulos dan Mims (1979) menjelaskan bahwa medium tersebut berguna merangsang reproduksi seksual. Nilai pH pertumbuhan awal medium adalah 4.5 menyebabkan kapang tumbuh dengan baik. Demikian juga jika ditambahkan tapioka sebanyak satu persen ke dalam medium pertumbuhannya.

## 2. *Trichoderma viride*

Kapang *Trichoderma viride* mempunyai ciri-ciri umum miselia berseptat, bercabang banyak, konidiospora berseptat dan cabang yang paling ujung berfungsi sebagai sterigma. Konidia berwarna hijau cerah bergerombol menjadi satu membentuk bola dan berkas-berkas hifa yang berwarna putih terlihat menonjol jelas diantara konidiospora (Frazier dan Westhoff, 1983). Gambar 7 memperlihatkan penampakan *Trichoderma viride*.



Gambar 7. Penampakan *Trichoderma viride*



*T. viride* merupakan species yang paling banyak dijumpai diantara genusnya. Genus *Trichoderma* termasuk dalam famili *Moniiliaceae*, ordo *moniliales* dan klas *fungi imperfecti* (Pelczar dan Reid, 1974). Isolasi *T. viride* dapat diperoleh dari tanah yang sedang aktif dalam proses dekomposisi selulosa. Selain menghasilkan enzim selulosa yang sangat efisien, *T. viride* juga menghasilkan antibiotik yang cukup efektif (Pelczar dan Reid, 1974). Keaktifan sifat selulitik dari mikroorganisme penghasil selulosa selalu diukur berdasarkan perbedaan tingkat keaktifan enzim selulase yang dihasilkan oleh mikroorganisme tersebut, dengan enzim yang digunakan.

Beberapa mineral dibutuhkan untuk pertumbuhan kapang diantaranya adalah Mg, Ca, Fe dan Zn. Mineral Fe dan Mn dapat berfungsi sebagai penginduksi dan penambahan kombinasi mineral Fe, Mn dengan Zn atau Co akan meningkatkan aktifitas enzim selulase yang dihasilkan sehingga proses hidrolisa bahan lignoselulsa dapat lebih efisien (Fukuda *et al.*, 1987).

### 3. *Phanerochaete crysosporium*

*White rot fungi* telah diketahui mempunyai kemampuan untuk mendegradasi lignin. *Phanerochaete crysosporium* merupakan salah satu jenis jamur putih atau *white rot fungi* yang mampu untuk mendegradasi lignin, berseptat dan pertumbuhan miselia adalah multinukleat. Untuk menumbuhkannya, biasanya digunakan spora aseksual, tetapi



dapat juga menggunakan siklus seksualnya untuk memproduksi basidiospora (Burdsall dan Eslyn, 1974).

*P. cryosporium* merupakan yang paling potensial diantara semua jenis *white rot fungi*, termasuk dalam kelas *Basidiomycetes*. Jamur ini menghasilkan beberapa jenis enzim bila ditumbuhkan pada bahan lignoselulosa. Enzim ligninase, selulase, xilanase dan beberapa enzim turunannya merupakan enzim terbesar yang dihasilkan.

Beberapa peneliti memberi nama berbeda untuk *P. crysosporium* yaitu, *Crysosporium pruinossum*, *Sporotrichum pulvereulentum*, *S. pruinossum*, *C. lignorum* dan sebagainya. Kebanyakan tumbuh pada kayu daun lebar dan banyak terdapat dan dikembangkan di negara-negara Skandinavia dan Asia Tengah serta Eropa Timur (Burd-sall dan Eslyn, 1974).

*P. crysosporium* potensial untuk mendegradasi lignin dan selulosa karena beberapa hal yaitu memproduksi banyak spora aseksual sehingga memudahkan pertumbuhannya, bersifat termotoleran yaitu dapat tumbuh pada kisaran suhu 25 - 50°C. Suhu optimal adalah 39 - 45°C. Selain hal tersebut, *P. crysosporium* juga mampu bertahan pada media campuran dan tidak mudah untuk terkontaminasi serta bersifat kompetitif dengan mikroorganisme lain (Erikson dan Pettersson, 1972).



## G. AKTIFITAS ENZIM PENDEGRADASI LIGNOSELULOSA

Enzim pendegradasi bahan lignoselulosa dikelompokkan menjadi tiga golongan yaitu enzim pendegradasi selulosa, pendegradasi lignin dan pendegradasi hemiselulosa. Pada umumnya ketiga jenis enzim di atas dapat dihasilkan secara bersamaan atau bertahap dari suatu sistem produksi enzim lignoselulase.

Menurut Enari (1983), semua enzim selulolitik dapat memutuskan ikatan  $\beta$ -1,4 glikosida. Perbedaan dari setiap enzim terletak pada kespesifikasi struktur di sekeliling substrat. Perbedaan antara endoglukanase dan selobiohidrolase bersifat relatif karena keduanya mampu memutuskan ikatan  $\beta$ -1,4 glikosida dari selulosa amorf.

Pengujian aktifitas enzim di atas akan sulit dilakukan bila substrat yang digunakan alami. Hal ini dikarenakan metoda kerja enzim yang sinergistik. Untuk mengetahui aktifitas enzim secara spesifik, beberapa cara digunakan seperti terdapat pada Tabel 2.

Secara umum, empat macam pengujian aktifitas enzim selulosa selalu digunakan yaitu aktifitas total, endoglukanase, selobiohidrolase dan  $\beta$ -glukosidase. Pengukuran aktifitas total selulase adalah untuk mengetahui aktifitas gabungan enzim yang menghidrolisia bahan selulosa dan menghasilkan glukosa sebagai produk akhir. Aktifitas ini menggambarkan pengaruh kerja sinergisme antar beberapa enzim dan menujukkan mutu kualitatif enzim tersebut (Enari, 1983 ; Tsao *et al.*, 1978).

Pengukuran aktifitas endoglukanase adalah untuk mengetahui aktifitas enzim pertama yang menjadikan selulosa menjadi reaktif. Substrat yang



umum digunakan adalah karboksimetil-selulase (CMC). Waktu hidrolisis menentukan tingkat aktifitas yang dihasilkan, dan hal tersebut dipengaruhi oleh konsentrasi enzim, serta derajat substitusi CMC, disamping juga kepekaan pereaksi penentu gula pereduksi (Lindner *et al.*, 1983).

Aktifitas selobiohidrolase diukur dengan substrat selulosa mikrokristalin. Pengukuran ini untuk mengetahui tingkat aktifitas enzim yang akan membuka ujung rantai baru substrat selulosa dan menghasilkan substrat baru yang akan dihidrolisis oleh enzim endoglukanase. Enzim tersebut berpengaruh juga terhadap enzim  $\beta$ -glukosidase untuk menghidrolisis selulosa reaktif menjadi glukosa. Karena pengaruh endoglukanase dan  $\beta$ -glukosidase ini, maka pengujian aktifitas enzim selobiohidrolase yang sebenarnya, dari filtrat enzim sulit untuk diperoleh. Dan pada kebanyakan penelitian enzim lignoselulase, pengujian enzim selobiohidrolase jarang dilakukan (Enari, 1983).

Penentu utama keberhasilan hidrolisis selulosa adalah enzim  $\beta$ -glukosidase. Hal ini dikarenakan enzim ini merupakan penentu aktifitas enzim lainnya dan merupakan inhibitor bagi enzim lain. Enzim  $\beta$ -glukosidase menghidrolisa selobiosa dan selooligosakharida menjadi glukosa. Substrat untuk pengujian yang umum digunakan adalah salisin (saligenin- $\beta$ -D-glukanopiranosida) dan p-nitrofenil- $\beta$ -D-glikosida (Breuil *et al.*, 1986).



Tabel 2. Cara penentuan aktifitas kelompok enzim selulase (Enari, 1983).

Aktifitas Enzim	Substrat	Produk terukur
Total selulase	selulosa kristal - kapas - avicel - kertas saring	- gula pereduksi - glukosa
Aksi sinergistik dari selobiohidrolase dan endoglukanase	- kapas - avicel - hidrocelulosa - dyed avicel - dyed kertas saring	- gula pereduksi - penurunan bobot - penurunan OD
Endoglukanase	CMC dan HEC	- warna dari oligo sakarida terlarut
Selobiohidrolase	- kapas - avicel - selulosa amorf	- gula pereduksi - penurunan viskositas
$\beta$ -glukosidase	- selobiosa  - p-nitrofenil $\beta$ -D-glukosa - salisin	- gula pereduksi - glukosa  - p-nitrofenil - saligenin



### III. METODOLOGI PENELITIAN

#### A. BAHAN DAN ALAT

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah limbah tandan kosong kelapa sawit yang diperoleh dari pabrik pengolahan kelapa sawit (PKS) Kertajaya PTP XI, Malingping kabupaten Lebak, daerah Banten selatan. Kultur mikroorganisme yang digunakan adalah kapang *Trichoderma viride*, diperoleh dari laboratorium mikrobiologi pangan (TPG), yang diisolasi dari tanah dan *Neurospora sitophila* yang diisolasi sendiri dari tandan kosong kelapa sawit terdekomposisi. *White rot fungi* jenis *Phanerochaete crysosporium*, diperoleh dari Pusat Antar Universitas Bioteknologi ITB, Bandung.

Bahan-bahan kimia yang digunakan diantaranya adalah medium pertumbuhan *potato dextrose agar* (PDA), *yeast extract* (diffco),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , Urea,  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaOH}$ , pepton dan bahan-bahan kimia untuk analisis sampel.

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bioreaktor multipel mini dari tabung yang ditempatkan dalam inkubator model nampan atau baki berbentuk paket mini berganda, thermometer, pipa-pipa, aerator, alat-alat gelas (seperti erlenmeyer dan gelas piala), homogenizer, timbangan, inkubator, penggiling dan sebagainya.

## B. METODA PENELITIAN

Metoda dan rencana kerja penelitian dibagi menjadi beberapa tahapan yaitu penyiapan bahan, penyiapan bioreaktor dan inkubator, perbanyakan kultur, penyiapan medium, proses kultivasi dan analisis sampel. Sampel diambil setiap 6, 12 dan 24 jam selama proses kultivasi 96 - 144 jam untuk kapang dan 192 jam untuk *white rot fungi*. Analisis sampel yang dilakukan meliputi pH, kandungan protein terlarut, kandungan selulosa dan lignin, kandungan hemiselulosa, aktifitas enzim kasar, dan kandungan gula pereduksi.

## 1. Penyiapan Bahan

TKKS digiling dengan ukuran 20, 40, dan 60 mesh dan dilanjutkan dengan pengayakan. Untuk perlakuan KMP dengan delignifikasi bahan, maka proses delignifikasi dilakukan dengan NaOH dengan konentrasi 0.15 kg NaOH/Kg bahan. Delignifikasi dilakukan dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 30 menit. Bahan dicuci dan dikeringkan kemudian digunakan sebagai sumber karbon untuk kultivasi.

## 2. Penyiapan Bioreaktor dan Inkubator

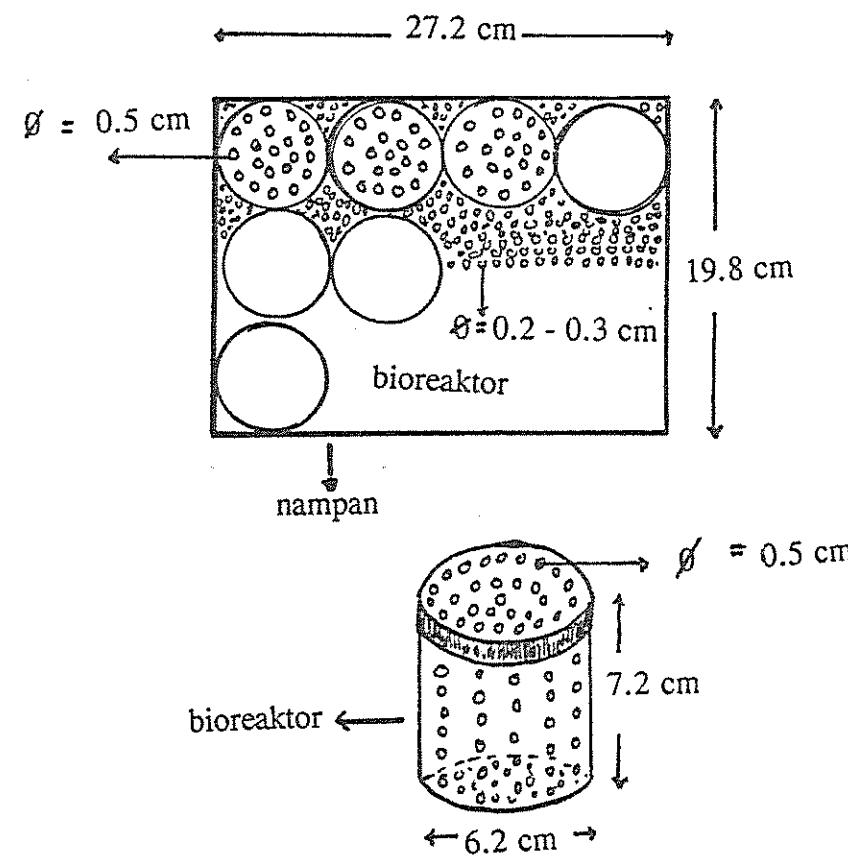
Bioreaktor disiapkan dan ditempatkan dalam inkubator model kultur dalam nampan. Bioreaktor dibuat dari modifikasi tabung plastik mika dengan diameter 6.2 cm dengan tinggi 9.2 cm, dengan diberi lubang disekelilingnya untuk keperluan aerasi dengan diameter 0.5 cm. Pada inkubator, tedapat beberapa baki dan bioreaktor dari tabung tersebut ditempatkan diatas baki atau nampan yang telah dilubangi dengan



diameter lubang kurang lebih 0.2 - 0.3 cm. Sistem aerasi dibuat kontinyu dengan menggunakan dua aerator. Gambar ringkas bioreaktor dan profil inkubator dapat dilihat pada Gambar 8.

### 3. Penyiapan Kultur

Kultur mikroorganisme diperbanyak dengan media PDA pada beberapa tabung reaksi untuk stok cadangan. Mikroorganisme disegarkan kembali dan digunakan untuk KMP setelah umur 5 -6 hari.



Gambar 8. Profil bioreaktor mini berganda model kultur dalam nampan.



#### 4. Penyiapan Medium

Medium fermentasi adalah serbuk TKKS dan bahan-bahan kimia lainnya yang sesuai dengan mikrorganisme yang digunakan. Medium disterilkan dengan autoklaf pada 121 °C selama 15 menit. Setelah didinginkan, medium tersebut telah siap untuk diinokulasi.

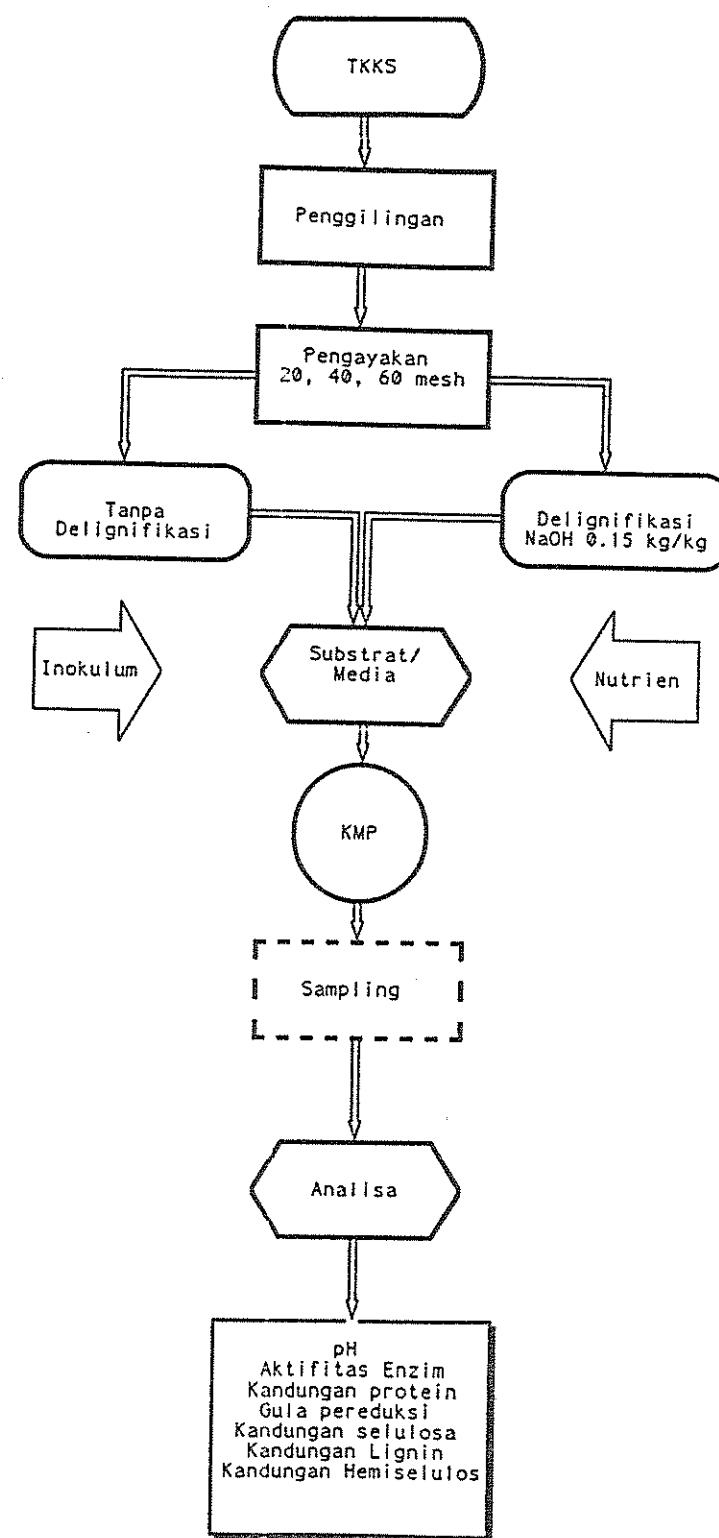
#### 5. Proses Kultivasi

Pada proses kultivasi, masing-masing bioreaktor diisi sebanyak 8 - 10 gram substrat dan larutan nutrien sehingga kandungan air (w/v) mencapai 65 - 70 persen, dicampurkan secara merata. Media yang telah disterilkan diinokulasi dengan 2 mililiter inokulum cair (inokulum mengandung sekitar  $2.6 \times 10^5$  -  $3.4 \times 10^6$  spora). Kultivasi dilakukan dalam bioreaktor mini berganda pada inkubator model kultur dalam nampan selama 96 - 144 jam jika menggunakan kapang, dan 192 jam jika menggunakan *white rot fungi*. Setiap 6 - 12 dan 24 jam dilakukan pengambilan sampel. Kondisi kultivasi untuk kapang adalah suhu  $30 \pm 2$  °C dengan pH awal 5.0. Pengontrolan suhu dilakukan dengan menggunakan dua buah lampu berkekuatan 5 watt. Kandungan air substrat (w/v) 65 - 70 persen dengan RH sekitar 88 - 92 persen. Kondisi kultivasi untuk *P. crysosporium* dalam inkubator adalah suhu  $33 \pm 3$  °C. Pengontrolan suhu dilakukan dengan menggunakan dua buah lampu berkekuatan 25 watt. Sedangkan pada KMP dalam erlenmeyer, suhu yang digunakan adalah suhu kamar.



## 6. Analisis Sampel

Analisis sampel meliputi pH selama kultivasi, kandungan protein terlarut, kandungan selulosa, kandungan lignin dan kandungan hemiselulosa, kandungan gula pereduksi dan aktifitas enzim kasar yang dihasilkan. Prosedur analisis dapat dilihat pada Lampiran 5. Secara umum diagram alir proses kultivasi media padat dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 9. Diagram alir proses kultivasi media padat pada penelitian ini.



#### IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

Substrat Tandan kosong kelapa sawit yang digunakan pada penelitian ini, mengalami perlakuan pengecilan ukuran dengan penggilingan. Serbuk hasil penggilingan selanjutnya mengalami pengayakan dengan ukuran 20, 40 dan 60 mesh. Hasil analisis proksimat TKKS secara umum, berdasarkan penelitian terdahulu disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Komposisi Tandan Kosong Kelapa Sawit Sebagai Substrat untuk Proses KMP<sup>\*</sup>.

Komponen Utama	% Bahan Kering
Lignin	28.24
Selulosa	42.24
Hemiselulosa	22.39
Abu	6.90

Wibowo (1994).

Berdasarkan data diatas, terlihat bahwa komponen tertinggi TKKS adalah selulosa (42.24 persen). Hasil analisa tersebut berbeda dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Pratiwi *et al.* (1988) dan penelitian lebih baru yang dilakukan oleh Azemi *et al.* (1994). Adanya perbedaan di atas diduga karena disebabkan oleh karakteristik TKKS yang dianalisa berbeda. Menurut Naibaho (1992), karakteristik TKKS ditentukan atas dasar umur pohon sawit, umur panen, mutu buah atau tandan yang dipanen, varietas kelapa sawit dan kondisi lingkungan dimana kelapa sawit tersebut tumbuh.



## A. DELIGNIFIKASI TKKS

Proses delignifikasi dilakukan menggunakan metode Moo-Young *et al.* (1994). Delignifikasi dilakukan dengan cara basa dimana konsentrasi NaOH yang digunakan adalah 0.15 kg/kg substrat dalam volume satu liter. Tujuan delignifikasi adalah untuk menghilangkan atau mengurangi kandungan lignin serta membuka jalan bagi ikatan selulosa kristal, sehingga diharapkan mikroorganisme akan dapat lebih mudah menggunakan substrat. Delignifikasi dengan NaOH menyebabkan ikatan yang terbentuk antara lignin dengan polisakarida terbuka, sehingga pemanfaatan selulosa untuk kapang menjadi lebih mudah. Kandungan selulosa yang tinggi akan mempercepat mikroorganisme mengeluarkan enzim selulase untuk keperluan pertumbuhannya. Hasil analisis komponen terbesar TKKS setelah delignifikasi disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil analisis komponen terbesar TKKS setelah delignifikasi.\*

Komponen Terbesar TKKS	% Bahan Kering		
	A	B	C
Selulosa	63.13	52.16	57.11
Lignin	12.57	9.63	13.65
Hemiselulosa	20.71	15.96	13.93

\* Keterangan : A = ukuran partikel substrat 20 mesh, B = 40 mesh, C = 60 mesh

Dari data di atas, terlihat bahwa terjadi variasi kandungan komponen TKKS setelah mengalami delignifikasi. Kandungan selulosa tertinggi

diperoleh pada ukuran substrat 20 mesh dan hal ini dimungkinkan karena pada ukuran tersebut selulosa masih berukuran lebih besar dibandingkan dengan yang lain sehingga pada saat akhir pencucian setelah delignifikasi hanya lignin yang tercuci.

Dari proses tersebut diketahui bahwa faktor ukuran partikel untuk proses delignifikasi juga berpengaruh terhadap hasil delignifikasi yang diperoleh. Diantara ketiga komponen lignoselulosa, hemiselulosa merupakan bagian yang paling mudah larut. Dari struktur mikrofibril selulosa yang diajukan oleh Cowling dan Kirk (1976), diketahui bahwa molekul hemiselulosa terdapat di bagian luar dari bagian mikrofibril selulosa, sehingga hemiselulosa merupakan sumber karbon yang lebih dulu digunakan oleh kapang. Chahal (1985) menyatakan bahwa hemiselulosa digunakan lebih awal sebagai sumber karbon dibandingkan dengan selulosa pada produksi enzim selulase dengan kapang *T. reesei*.

Komposisi serbuk TKKS hasil delignifikasi tersebut di atas dijadikan sebagai acuan untuk menentukan penurunan lignin, selulosa dan hemiselulosa selama kultivasi. Waktu pengambilan sampel dilakukan pada saat dimana aktifitas enzim rata-rata dan kandungan gula pereduksi mencapai nilai tertinggi.

Proses sterilisasi yang diterapkan terhadap substrat, diduga akan dapat merubah sifat lignin dan menurunkan derajat kristalisasi selulosa, sehingga substrat lebih mudah dimanfaatkan oleh kapang. Menurut Fan dan Lee (1983), pemanasan bahan lignoselulosa dengan menggunakan uap selain dapat meningkatkan luas permukaan dan ukuran pori-pori substrat, juga dapat

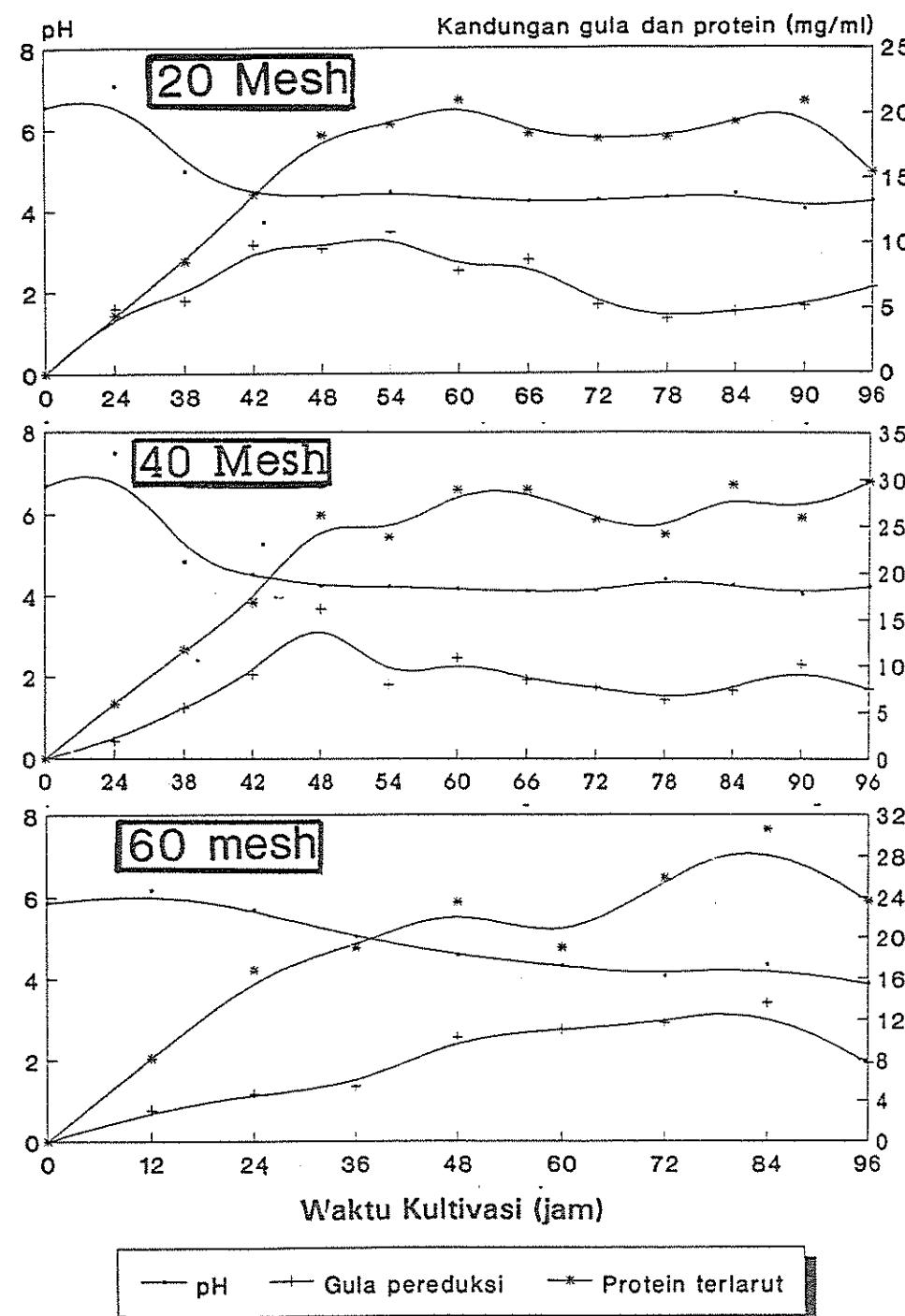
menyebabkan terjadinya degradasi sebagian dari selulosa dan depolimerisasi hemiselulosa yang semuanya akan berpengaruh positif terhadap hasil biodegradasi dari aktifitas enzim yang dihasilkan.

## B. KMP MENGGUNAKAN KAPANG *Trichoderma Viride*

### 1. Substrat TKKS Didelignifikasi

#### a. Kandungan Gula Pereduksi dan Protein Terlarut

Pola perubahan nilai pH, kandungan gula pereduksi dan protein terlarut dalam enzim selama kultivasi menggunakan *T. viride*, dengan substrat TKKS didelignifikasi disajikan pada Gambar 10. Penurunan nilai pH selama kultivasi, terjadi karena kapang *T. viride* menghasilkan asam selama proses. Nilai pH terendah dicapai pada jam ke 90 - 96 pada KMP dengan substrat TKKS 60 mesh yaitu mencapai pH 4.04. Nilai pH awal yaitu pH nutrien pada saat sebelum pencampuran dengan substrat TKKS ditetapkan 5.0. Tetapi telah setelah pencampuran pH berubah menjadi 6.4, terjadi perubahan pH dari 5.0 yaitu pH nutrien menjadi sekitar 6.4. Hal tersebut disebabkan karena TKKS mempunyai sifat basa, karena menurut Naibaho (1992) dilaporkan bahwa kandungan kalium pada TKKS sangat tinggi.



Gambar 10. Pola perubahan nilai pH, kandungan gula pereduksi dan protein terlarut selama KMP menggunakan *T. viride* dengan substrat didelignifikasi.

Selama kultivasi terjadi peningkatan akumulasi kandungan gula pereduksi dan protein terlarut dalam enzim. Kandungan gula tertinggi (16.17 mg/ml) diperoleh pada jam ke 48 pada substrat 40 mesh, sedangkan kandungan protein terlarut dalam enzim tertinggi (30.59 mg/ml) diperoleh pada jam ke 84 pada substrat 60 mesh.

Pada substrat 20 dan 40 mesh, kandungan gula pereduksi menurun dari jam ke 60 sampai mendekati konstan. Hal ini diduga gula-gula yang terbentuk selama KMP, digunakan kembali untuk proses pertumbuhan kapang pada saat gula tidak terbentuk lagi, karena aktifitas katalitik enzim yang dihasilkan mulai menurun. Gula terbentuk karena terjadi proses hidrolisa selulosa menjadi glukosa oleh enzim selulase.

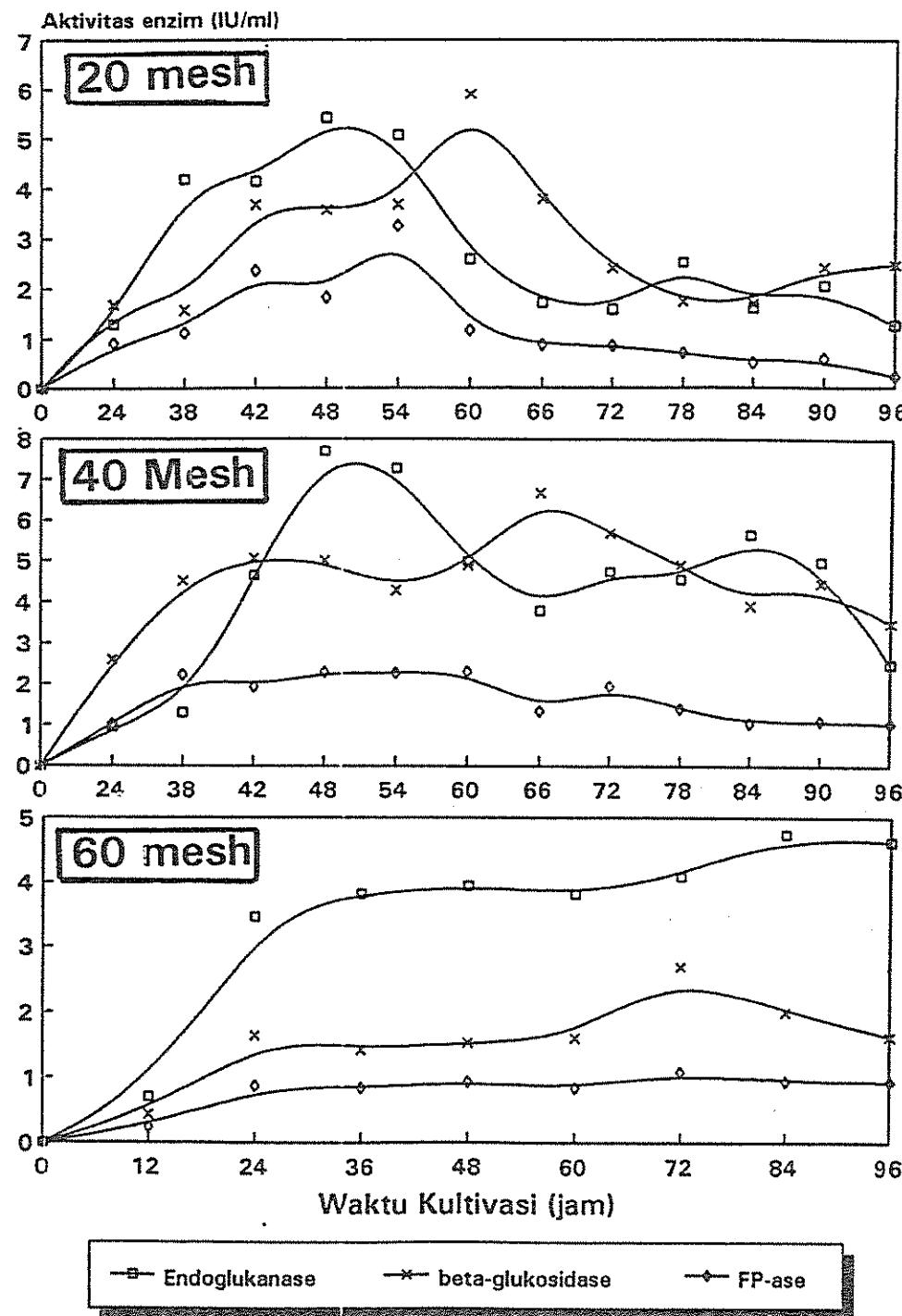
Pada substrat TKKS ukuran 60 mesh, peningkatan kandungan gula pereduksi terjadi sampai jam ke-84 dan setelah itu menurun. Faktor ukuran partikel, dimana partikel substrat lebih kecil, maka enzim lebih mudah untuk melakukan hidrolisa secara lebih stabil (Tanaka *et. al.*, 1988). Produksi gula selama reaksi hidrolisis bersifat tidak linier, karena sebagian besar substrat dihidrolisa pada awal kultivasi. Peningkatan kandungan protein terlarut dalam enzim terjadi sampai jam ke-48 (26.2 mg/ml) dan setelah itu cenderung konstan. Hal ini diduga protein terlarut dalam enzim telah mencapai fase konstan.



### b. Aktifitas Enzim

Pada pengukuran aktifitas kelompok enzim selulase, kecenderungan peningkatan aktifitas enzim disajikan pada Gambar 11. Aktifitas enzim endoglukanase menunjukkan yang tertinggi dibandingkan dengan enzim  $\beta$ -glukosidase dan total selulase. Hal ini dikarenakan enzim endoglukanase merupakan enzim pertama yang dihasilkan pada jalur metabolisme dan biosintesa enzim selulase. Selain itu tingginya nilai aktifitas enzim endoglukanase juga disebabkan substrat untuk pengujian aktifitas enzim tersebut merupakan substrat selulosa yang dapat larut dengan ukuran partikel serbuk yaitu karboksimetil selulase, sehingga lebih mudah dihidrolisa menjadi glukosa. Kepekaan suatu pengujian enzim ditentukan oleh kelinieran hubungan antara waktu inkubasi dengan produk yang dihasilkan dari reaksi antara enzim dengan substrat. Dengan demikian sebaiknya waktu inkubasi yang digunakan bagi suatu pengukuran aktifitas enzim, adalah waktu inkubasi yang terdapat pada daerah yang memberikan hubungan linier antara waktu inkubasi dengan pereduksi yang dihasilkan (Irawadi, 1991)

Aktifitas endoglukanase tertinggi (7.7 IU/ml), diperoleh pada jam ke-48 pada kultivasi menggunakan substrat 40 mesh. Aktifitas enzim  $\beta$ -glukosidase tertinggi (6.07 IU/ml) diperoleh pada kultivasi menggunakan substrat 20 mesh yang dicapai pada jam ke-60. Aktifitas FP-Ase tertinggi terjadi pada jam ke-54 yaitu pada kultivasi menggunakan substrat 20 mesh dengan nilai 3.26 IU/ml.



Gambar 11. Pola perubahan nilai aktifitas enzim selama KMP menggunakan *T. viride* dengan substrat didelignifikasi.

Secara umum kecenderungan peningkatan aktifitas enzim meningkat sampai jam ke-60 untuk substrat 20 dan 40 mesh, dan selanjutnya mengalami penurunan setelah waktu tersebut. Sedangkan pada substrat 60 mesh peningkatan aktifitas enzim hanya terjadi sampai jam ke-36 dan selanjutnya cenderung konstan. Terjadinya penurunan aktifitas enzim secara mendadak, adalah dimungkinkan karena kondisi kultivasi pada saat tersebut kurang stabil. Beberapa faktor yang mempengaruhi kestabilan proses KMP untuk produksi enzim menurut Chahal *et. al.* (1989) adalah variasi suhu dan RH. Dari ketiga gambar di atas, dapat dilihat bahwa kultivasi dengan substrat 60 mesh adalah yang paling stabil meskipun aktifitas enzim yang dihasilkan tidak lebih baik dari yang lain. Jalur biosintesis enzim tidak selalu berbanding lurus dengan pertumbuhan biomassa. Hal ini dikarenakan enzim adalah metabolit sekunder yaitu metabolit yang tidak diperlukan untuk pertumbuhan mikroorganisme. Pertumbuhan biomassa yang tinggi tidak selalu diikuti oleh pembentukan enzim dengan aktifitas tinggi pula, karena aktifitas enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya adalah kondisi KMP, suhu dan pH substrat.

## 2. Substrat TKKS Tanpa Delignifikasi

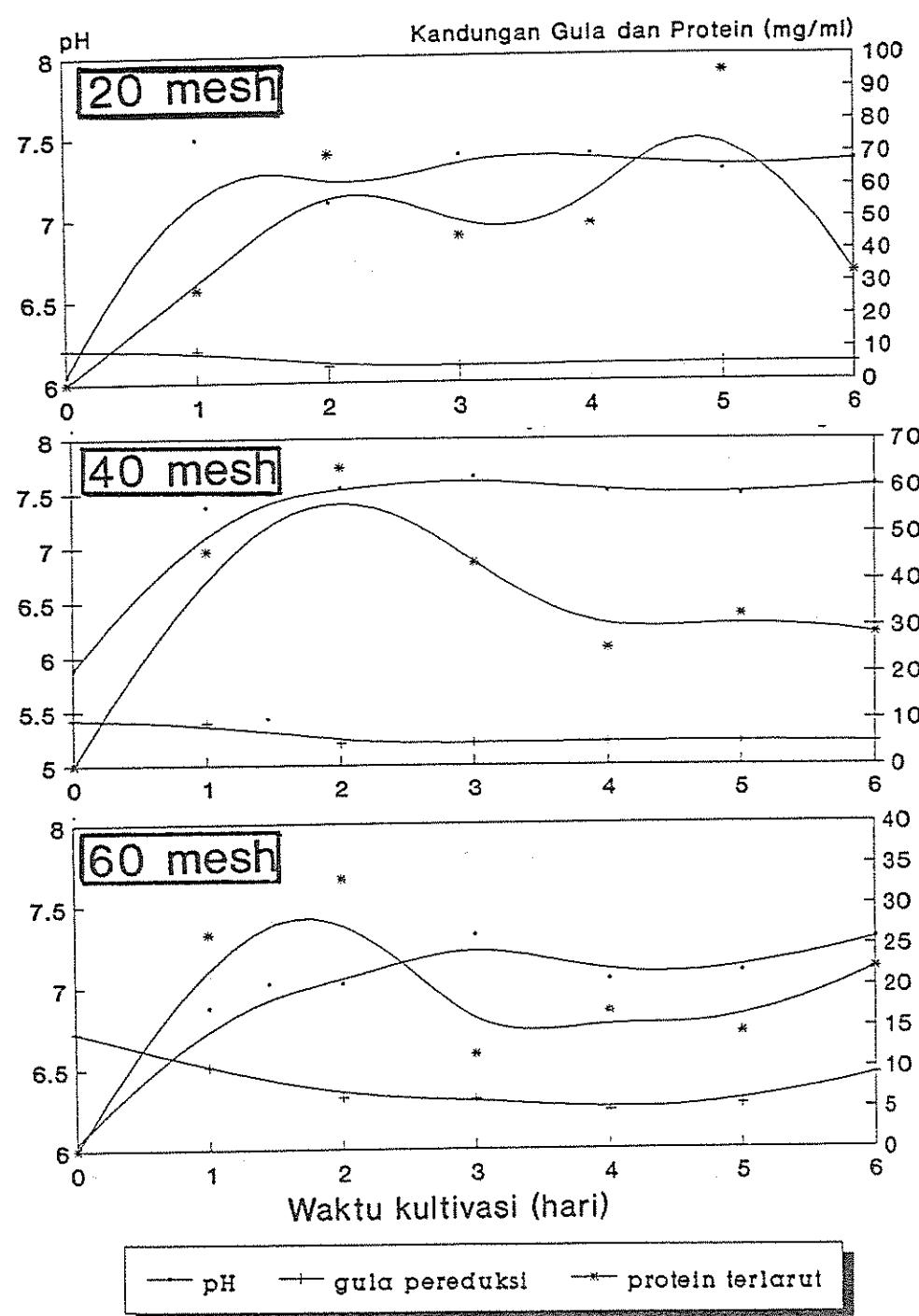
### a. Kandungan Gula Pereduksi dan Protein Terlarut

Pola perubahan nilai pH, kandungan gula pereduksi dan protein terlarut dalam enzim selama kultivasi menggunakan *T. viride*

dengan substrat TKKS tanpa delignifikasi disajikan pada Gambar 12. Dari gambar tersebut terlihat, bahwa kencenderungan nilai pH, secara umum mengalami peningkatan. Peningkatan pH terjadi dikarenakan telah terurainya lignin sebagai akibat dari pengecilan ukuran dan selama kultivasi. Lignin yang merupakan polifenol dengan tiga jenis turunan fenol yaitu sinamil alkohol, para-kumaril alkohol dan koniferil alkohol, akan terurai dan menyebabkan substrat bersifat basa. Sementara itu jumlah asam yang dihasilkan selama kultivasi tidak sebanding dengan jumlah turunan fenol yang dilepaskan, karena selulosa yang berhasil menjadi substrat untuk pertumbuhan hanyalah selulosa amorf yang sedikit jumlahnya. Akibatnya pertumbuhan menjadi tidak sebaik pada substrat yang didelignifikasi. Nilai pH mengalami peningkatan setelah hari ke-2 dan selanjutnya cenderung konstan. Peningkatan pH tersebut menyebabkan pertumbuhan kapang terganggu, karena kapang *T. viride* tumbuh optimal pada pH 5.0 (Chahal *et.al.*, 1985).

Peningkatan kandungan protein terlarut dalam enzim terjadi setelah hari ke-0 sampai hari ke-2 dan setelah itu menurun, kecuali untuk substrat 20 mesh. Kandungan protein tertinggi dicapai pada hari ke-5 (94.95 mg/ml) pada substrat 20 mesh. Pada ukuran partikel substrat yang lebih kecil, kandungan protein terlarut dalam enzim lebih sedikit. Hal tersebut diduga pertumbuhan biomassa yang lebih baik pada ukuran partikel yang lebih kecil sehingga sedikit larut dalam enzim.





Gambar 12. Pola perubahan nilai pH, kandungan gula pereduksi dan protein terlarut selama KMP menggunakan *T. viride* dengan substrat tidak didelignifikasi.

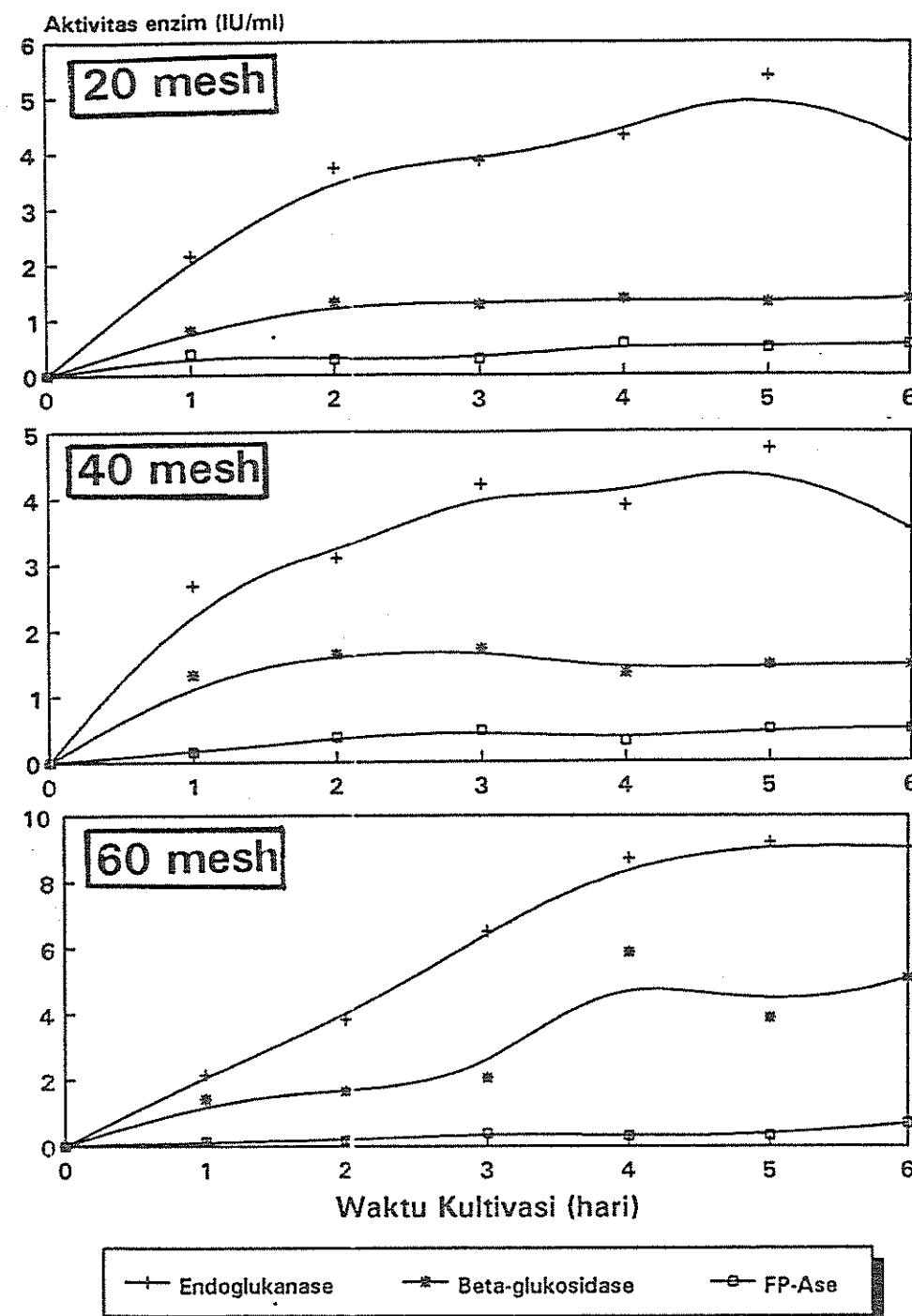
Kandungan gula pereduksi mengalami penurunan sampai hari ketiga dan setelahnya mulai mengalami peningkatan. Kandungan gula pereduksi mengalami penurunan terlebih dulu, dikarenakan pada awal kultivasi, di dalam substrat telah terdapat kandungan gula pereduksi ( $9.77 - 14.49 \text{ mg/ml}$ ), hasil proses pengecilan ukuran dimana selulosa terpotong menjadi bagian yang lebih kecil yaitu glukosa sedangkan hemiselulosa menjadi xilosa. Terjadinya kenaikan kandungan gula pada hari ketiga menunjukkan bahwa proses hidrolisis selulosa menjadi glukosa pada proses KMP telah terjadi.

### b. Aktifitas Enzim

Pola perubahan aktifitas enzim, selama KMP dapat dilihat pada Gambar 13. Aktifitas enzim tertinggi, baik untuk enzim Endoglukanase ( $9.17 \text{ IU/ml}$ ),  $\beta$ -glukosidase ( $5.88 \text{ IU/ml}$ ) maupun FP-ase ( $0.69 \text{ IU/ml}$ ), terjadi pada KMP dengan substrat 60 mesh yang masing-masing dicapai pada hari ke-5 dan ke-6. Kecenderungan aktifitas enzim mulai naik dari hari ke-0 sampai hari ke 3 dan setelahnya cenderung konstan. Dibandingkan dengan aktifitas enzim dengan substrat TKKS didelignifikasi, maka pada substrat 20 dan 40 mesh, aktifitas enzim endoglukanase dan  $\beta$ -glukosidase lebih baik dibandingkan pada substrat tanpa delignifikasi. Hal ini diduga karena pengaruh pH substrat pada KMP yang tidak didelignifikasi, menyebabkan aktifitas enzim yang dihasilkan rendah. Namun hal sebaliknya terjadi pada susbtrat 60 mesh, ukuran partikel substrat

menyebabkan permukaan lebih luas sehingga pertumbuhan *T. viride* lebih baik dan nilai perubahan pH tidak terlalu tinggi peningkatannya. Hal tersebut menyebabkan nilai pH tidak terlalu berpengaruh terhadap aktifitas enzim yang dihasilkan. Secara umum, aktifitas enzim lebih baik pada KMP dengan substrat didelignifikasi.

Beberapa faktor berpengaruh nyata terhadap aktifitas enzim, selain suhu dan komposisi nutrien, menurut Chahal *et al.* (1984) adanya induser untuk merangsang terbentuknya enzim juga berpengaruh. Selulosa merupakan salah satu induser untuk biosintesis enzim selulase. Terdapatnya kandungan selulosa yang tinggi mendorong enzim selulase dengan cepat diselesaikan keluar sel. Sebaliknya, pada substrat yang tidak didelignifikasi, adanya polifenol merupakan inhibitor untuk pertumbuhan karena menyebabkan pH substrat naik. Hal ini berpengaruh pula terhadap kerja enzim yang telah terbentuk. Dari gambar diatas terlihat bahwa enzim hanya sedikit berkerja, karena akumulasi kandungan gula pereduksi yang dihasilkan juga sedikit. Keadaan tersebut berbeda dibandingkan pada KMP dengan substrat yang didelignifikasi.



Gambar 13. Pola perubahan nilai aktifitas enzim selama KMP menggunakan *Trichoderma viride* dengan substrat tidak didelignifikasi.



## C. KMP MENGGUNAKAN *Neurospora sitophila*

### 1. Sistem dengan Aerasi

Sistem aerasi yang diterapkan pada proses KMP dengan *Neurospora sitophila* adalah sistem aerasi secara kontinyu tanpa pengaturan jumlah masuknya udara ke dalam partikel substrat. Substrat yang digunakan adalah TKKS yang telah didelignifikasi. Hal ini dilakukan karena untuk menghasilkan biomasa dari bahan lignoselulosik dengan *N. sitophila*, menurut Moo-Young *et al.* (1994) hasil terbaik adalah dengan proses awal substrat didelignifikasi. Namun demikian menurut Irawadi (1991) untuk produksi enzim selulase, TKKS yang didelignifikasi lebih buruk dibandingkan pada TKKS yang tidak didelignifikasi. Pada penelitian ini substrat TKKS ukuran 20 dan 40 mesh dilakukan delignifikasi. Substrat 60 mesh tidak dilakukan karena berdasarkan penelitian terdahulu tidak menghasilkan perbedaan yang berarti.

#### a. Kandungan Gula Pereduksi dan Protein Terlarut

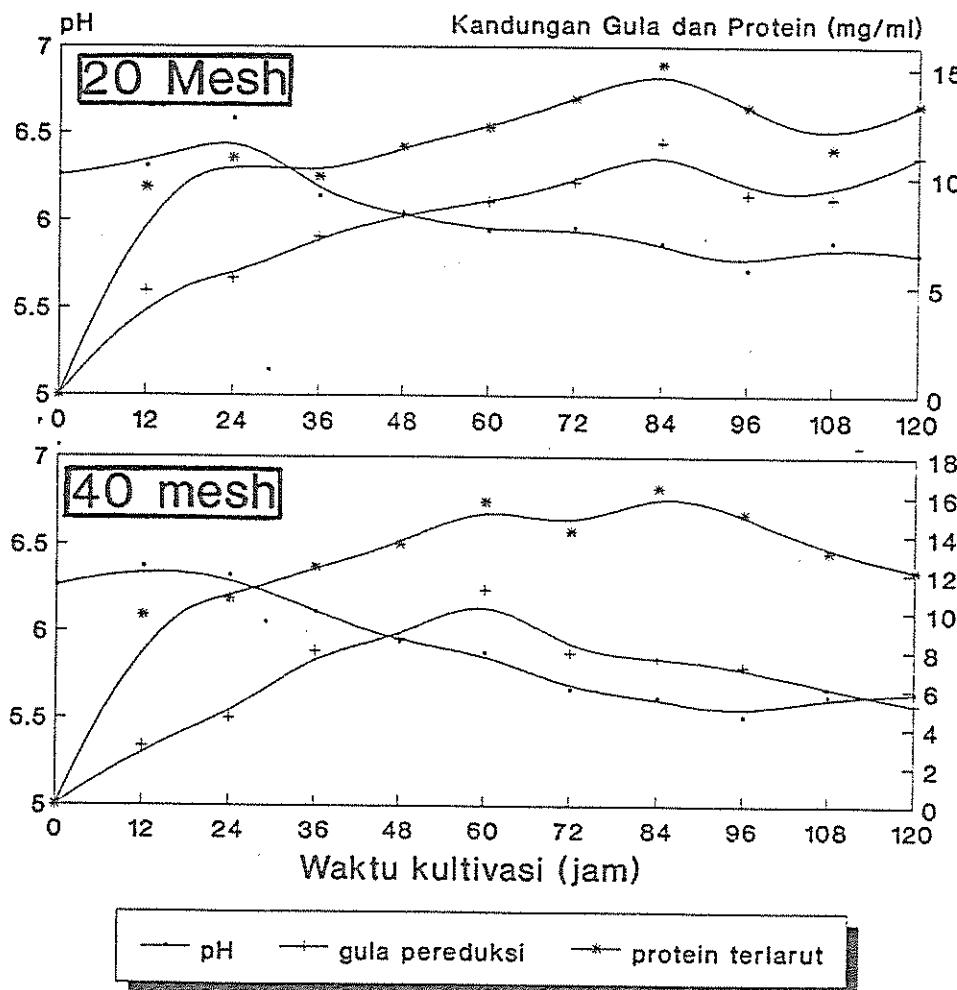
Penurunan nilai pH selama KMP terjadi setelah 24 jam, meskipun sebelumnya terjadi kenaikan pH setelah jam ke 0 dari 6.26 menjadi 6.58. Nilai pH terendah 5.6 dari pH awal, menunjukkan bahwa selama KMP asam diproduksi dalam jumlah sedikit. Gambar 14 menyajikan pola perubahan nilai pH, kandungan gula pereduksi dan protein terlarut selama KMP dengan *N. sitophila*.



Sejalan dengan penurunan nilai pH, peningkatan kandungan protein dengan pesat terjadi setelah jam ke-0 sampai jam ke-36 dan selanjutnya mulai menurun mendekati konstan. Pada keadaan ini, diduga pertumbuhan *N. sitophila* sudah mencapai tahap stasioner.

Sementara itu terjadi peningkatan kandungan gula pereduksi sebagai hasil konversi selulosa dan hemiselulosa, sampai jam ke 24 untuk substrat 20 mesh dan setelah itu mendekati konstan. Untuk substrat 60 mesh kandungan gula meningkat sampai jam ke 60 dan setelah itu mengalami penurunan. Terjadinya penurunan kandungan gula tersebut dikarenakan kandungan gula yang terbentuk digunakan kembali oleh kapang untuk pertumbuhannya. Namun demikian keadaan tersebut tidak terjadi pada substrat 20 mesh, hal ini diduga karena kondisi KMP pada substrat 20 mesh relatif stabil. Kandungan gula pereduksi tertinggi diperoleh pada jam ke 84 (11.57 mg/ml) untuk KMP 20 mesh, sedangkan pada KMP 40 mesh dicapai pada jam ke 60 (11.12 mg/ml).

Kandungan protein terlarut dalam enzim tertinggi diperoleh pada jam ke-84 untuk kedua jenis substrat dengan jumlah 15.18 mg/ml untuk substrat 20 mesh, sedangkan untuk substrat 40 mesh adalah 16.41 mg/ml. Dari grafik terlihat bahwa angka kandungan protein terlarut dan gula pereduksi pada dua jenis ukuran partikel substrat, tidak berbeda jauh. Namun demikian jika dibandingkan dengan KMP menggunakan *T. viride*, angka tersebut lebih rendah.



Gambar 14. Pola perubahan nilai pH, kandungan gula pereduksi dan protein terlarut selama KMP menggunakan *N. sitophila* dengan sistem di aerasi.



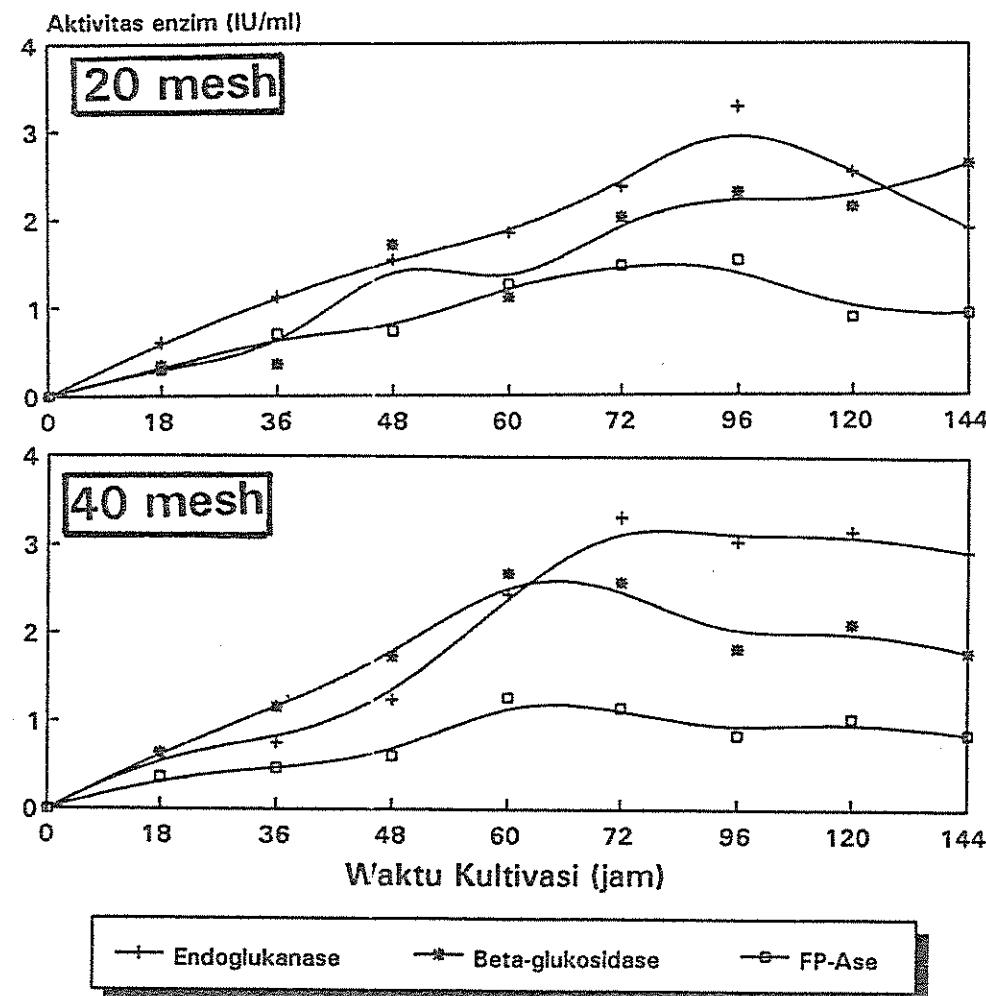
### b. Aktifitas Enzim

Rata-rata keseluruhan aktifitas enzim tertinggi dicapai setelah jam ke-72 untuk substrat 20 mesh. Aktifitas enzim endoglukanase tertinggi dicapai pada jam ke 96 yaitu 3.3 IU/ml, enzim  $\beta$ -glukosidase 2.25 IU/ml dan FP-ase 1.5 IU/ml. Untuk substrat 40 mesh aktifitas enzim tertinggi diperoleh setelah jam ke 60 dengan aktifitas endoglukanase adalah 3.5 IU/ml,  $\beta$ -glukosidase 2.7 IU/ml dan FP-ase adalah 1.3 IU/ml.

Perbedaan nilai aktifitas enzim tertinggi diatas, diduga dikarenakan perbedaan kondisi partikel substrat. Pada substrat 20 mesh, ukuran partikel lebih besar sehingga permukaan lebih sedikit, oleh karena itu memerlukan waktu yang lama untuk pertumbuhan kapang, sedangkan untuk substrat 40 mesh, permukaan partikel menjadi lebih luas, sehingga kapang dapat tumbuh lebih merata. Pada Gambar 15 disajikan pola perubahan aktifitas enzim selama KMP menggunakan *N. sitophila* dengan sistem di aerasi.

## 2. Sistem Tanpa Aerasi

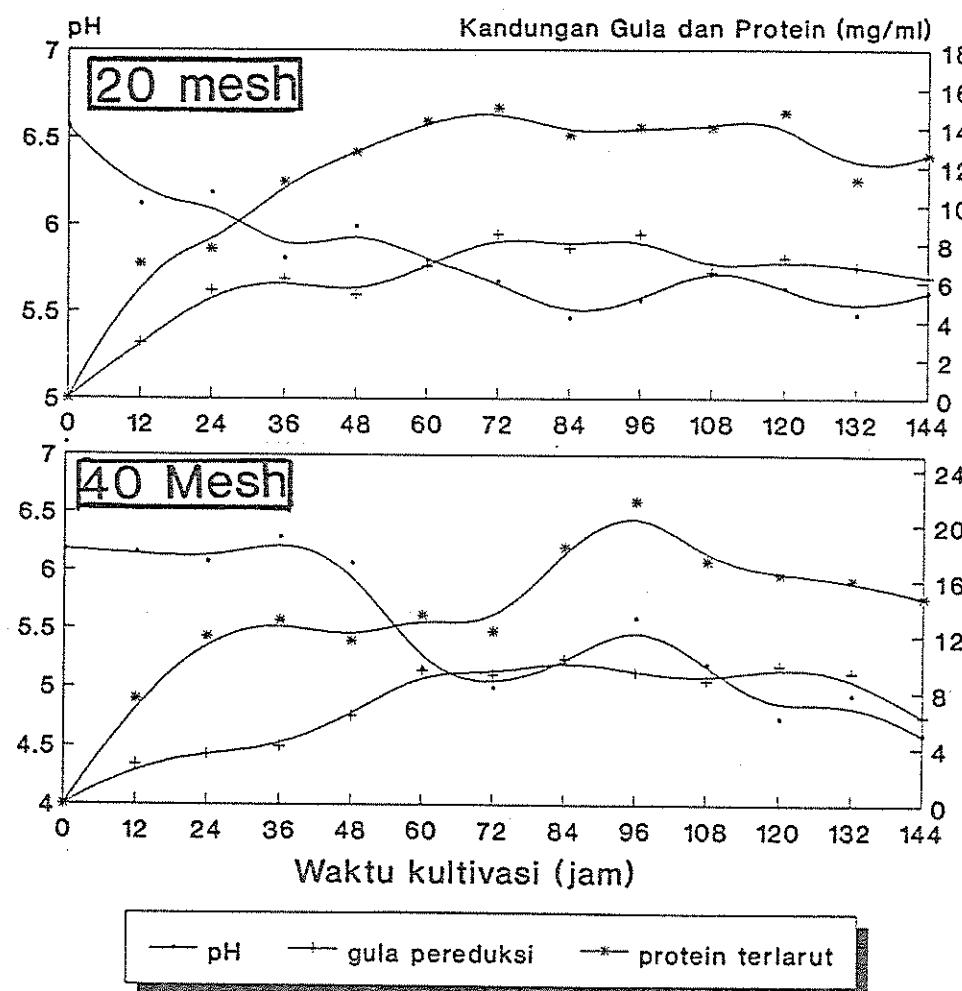
Penggunaan sistem tanpa aerasi, pada perlakuan ini adalah kondisi aerasi yang tidak diberikan lagi pada substrat selama KMP, setelah proses inokulasi. Udara untuk pertumbuhan hanyalah udara yang ada di dalam bioreaktor sebelum bioreaktor ditutup rapat setelah inokulasi.



Gambar 15. Pola perubahan aktifitas selama KMP menggunakan *N. sitophila* dengan sistem di aerasi.

### a. Kandungan Gula Pereduksi dan Protein Terlarut

Nilai pH mengalami penurunan yang bervariasi. Hal ini dimungkinkan karena kondisi masing-masing bioreaktor relatif tidak sama. Kandungan gula pereduksi tertinggi 8.52 mg/ml dicapai pada jam ke 72 untuk substrat 20 mesh, untuk substrat 40 mesh (10.93 mg/ml) diperoleh pada jam ke 84. Kandungan protein terlarut meningkat sampai jam ke 60 pada substrat 20 mesh sebelum konstan. Pada substrat ukuran 40 mesh mengalami fluktuasi peningkatan kandungan protein terlarut. Perbedaan tersebut diduga karena pertumbuhan yang tidak sama, dengan adanya oksigen yang terbatas, sementara oksigen yang masuk pada awal inokulasi jumlahnya juga tidak sama. Dibandingkan dengan KMP dengan sistem di aerasi, kandungan gula pereduksi lebih kecil diperoleh, sedangkan kandungan protein terlarut tidak jauh berbeda. Gambar 16 menunjukkan pola perubahan nilai pH, kandungan gula pereduksi dan protein terlarut selama kultivasi.



Gambar 16. Pola perubahan nilai pH, kandungan gula pereduksi dan protein terlarut selama KMP menggunakan *N. sitophila* pada sistem tidak diaerasi.



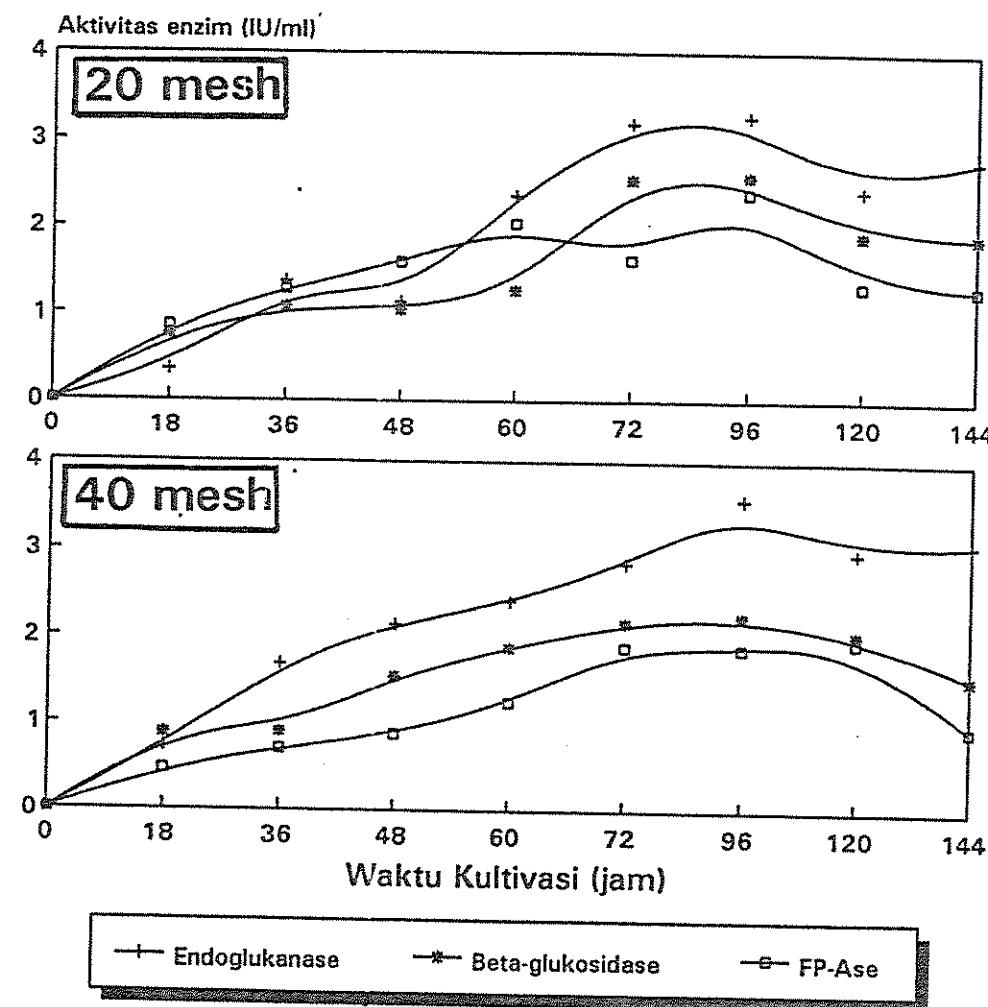
### b. Aktifitas Enzim

Aktifitas enzim tertinggi lebih cepat dicapai pada substrat 40 mesh. Hal ini dikarenakan pada KMP dengan substrat 40 mesh partikel substrat lebih kecil dan permukaan substrat lebih luas, sehingga kapang dapat tumbuh lebih merata. Enzim lebih mudah bekerja pada substrat yang permukaannya luas. Fluktuasi nilai aktifitas enzim diduga karena kondisi aerasi yang terbatas menyebabkan pertumbuhan kapang tidak stabil. Gambar 17 menunjukkan pola perubahan nilai pH dan aktifitas enzim selama KMP dengan sistem tidak di aerasi.

Pada pengujian aktifitas enzim endoglukanase, kelinieran hubungan antara waktu inkubasi dengan gula pereduksi yang dihasilkan, selain ditentukan oleh konsentrasi enzim yang digunakan, juga dipengaruhi oleh derajad substitusi CMC. Menurut Lidnert (1983) dan berdasarkan penelitian Poulsen bersama Petterson (1985) diperoleh data bahwa besarnya derajat substitusi CMC akan mempengaruhi kemampuan enzim menghidrolisanya. Semakin tinggi derajat substitusi CMC, maka semakin rendah kemampuan enzim menghidrolisanya. Hal tersebut dikarenakan rantai selulosa yang tersubstitusi oleh gugus karboksimetil tidak dapat dihidrolisa oleh enzim endoselulase. Kenaikan derajat substitusi sebesar 0.4 -0.7 dapat menurunkan kandungan gula yang dihasilkan sebanyak 70 persen.



Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa aktivitas enzim pada KMP menggunakan *N. sitophila* pada sistem tanpa aerasi dapat meningkat seiring waktu kultivasi. Aktivitas Endoglukanase dan Beta-glukosidase pada KMP menggunakan *N. sitophila* pada sistem tanpa aerasi mencapai puncaknya pada hari ke-96. Sedangkan FP-Ase mencapai puncaknya pada hari ke-72. Peningkatan aktivitas enzim ini berhubungan dengan peningkatan jumlah spora *N. sitophila* selama kultivasi.



Gambar 17. Pola perubahan nilai aktifitas enzim selama KMP menggunakan *N. sitophila* dengan sistem tidak di aerasi.



## D. KMP MENGGUNAKAN *Phanerochaete crysosporium*

*Phanerochaete crysosporium* merupakan *white rot fungi* yang paling potensial untuk biodegradasi bahan lignoselulosa. Hal ini dikarenakan kapang tersebut mampu menghasilkan enzim lignoselulase secara lengkap (Erikcson dan Petterson, 1972), tidak seperti kapang *T. viride* maupun *N. sitophila*. Selain menghasilkan enzim selulase, *P. crysosporium* juga menghasilkan kelompok enzim ligninase dan hemiselulase. Oleh karena itu perlakuan substrat pada KMP ini tidak dilakukan delignifikasi.

Pada KMP menggunakan *P. crysosporium*, perlakuan utama adalah menggunakan inkubator dengan bioreaktor mini berganda model kultur dalam nampan, sama seperti KMP yang dilakukan dengan menggunakan *N. sitophila* maupun *T. viride*. Sebagai pembanding adalah perlakuan menggunakan erlenmeyer.

### 1. KMP pada Inkubator

#### a. Kandungan Gula Pereduksi dan Protein Terlarut

Pada Gambar 18 disajikan grafik pola perubahan nilai pH, kandungan gula pereduksi dan kandungan protein terlarut dalam enzim selama kultivasi dengan *P. crysosporium* dalam inkubator. Peningkatan nilai pH pada berbagai ukuran partikel sejalan dengan pertumbuhan kapang. Sampai pada hari ke dua, nilai pH konstan dan mulai naik pada hari ke-3. Hal tersebut diduga dikarenakan pertumbuhan *P. crysosporium* mulai terlihat pada hari ke-3.

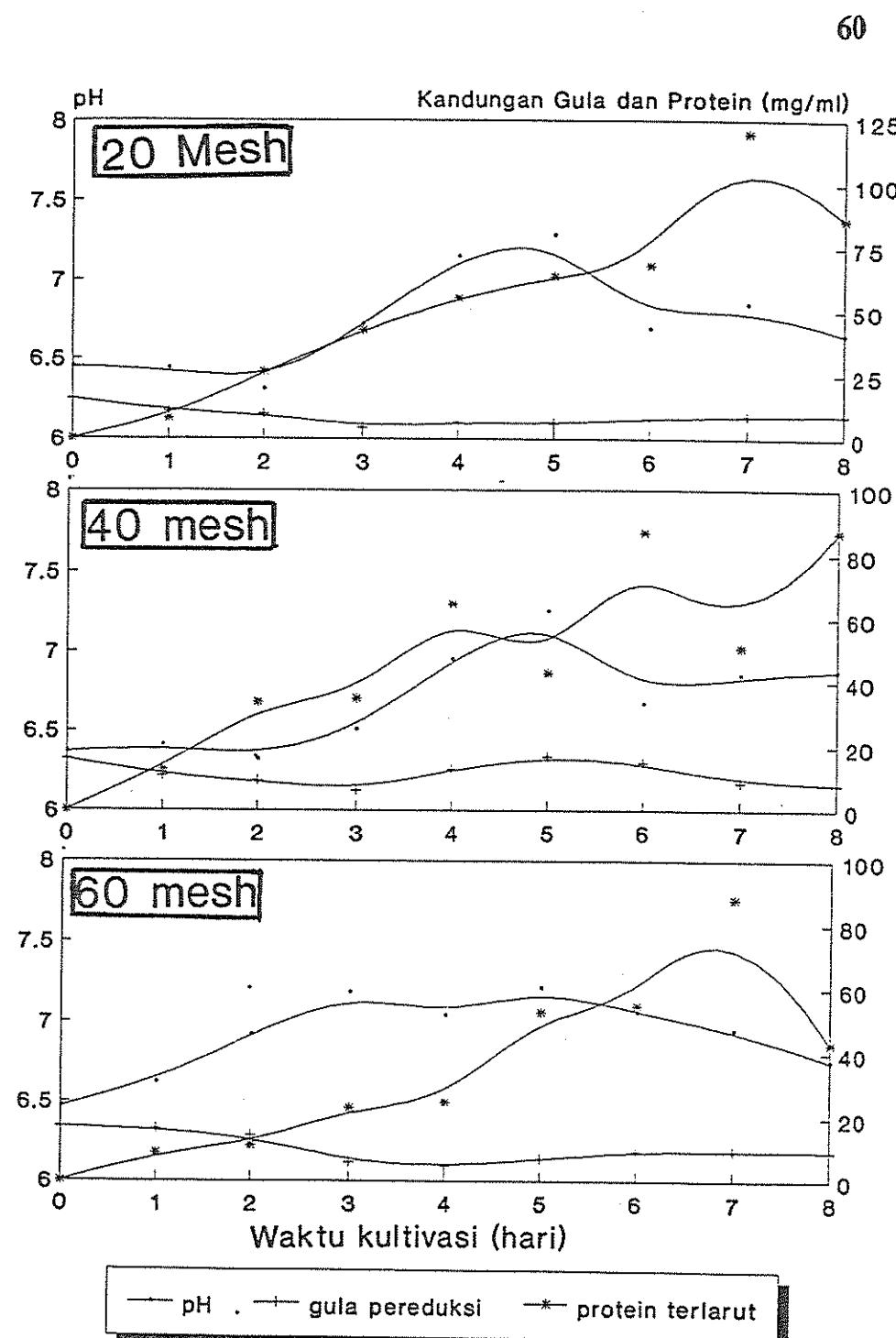
Meningkatnya nilai pH substrat dikarenakan adanya senyawa turunan lignin yang dihasilkan sebagai akibat adanya degradasi oleh enzim ligninase. Senyawa-senyawa tersebut bersifat basa, dan menyebabkan kenaikan pH.

Pada penelitian ini tidak dilakukan pengujian terhadap aktifitas enzim ligninase, namun demikian menurut Erickson dan Petterson (1972) enzim ligninase akan terbentuk pertama pada substrat yang banyak mengandung lignin, karena lignin tersebut bersifat sebagai induser produksi enzim ligninase. Adanya enzim ligninase menyebabkan lignin yang terkandung dalam substrat menghidrolisa lignin menjadi senyawa turunan fenol yang menyebabkan pH substrat mengalami peningkatan.

Peningkatan nilai pH menghambat pertumbuhan kapang. Karena itu kapang tidak mampu bertahan lama setelah hari ke-6. Dari Gambar 18 terlihat bahwa setelah hari ke-3 kandungan gula pereduksi mulai mengalami kenaikan sedikit. Hal ini diduga pada hari ke-3 telah terbentuk gula baru sebagai hasil hidrolisis oleh enzim selulase dan xilanase yang telah hasilkan pada proses KMP tersebut.

Dari ketiga ukuran partikel substrat, kecenderungan kandungan gula pereduksi hampir sama. Perbedaan angka disebabkan oleh perbedaan ukuran partikel substrat, dimana dengan ukuran partikel yang lebih kecil kandungan gula cenderung lebih banyak, sebagai akibat pengecilan ukuran.





Gambar 18. Pola perubahan nilai pH, kandungan gula pereduksi dan protein selama KMP dengan *P. cryosporum* pada inkubator.





Peningkatan kandungan protein terlarut dalam enzim cenderung lebih tinggi dibandingkan dengan KMP menggunakan *T. viride* maupun menggunakan *N. sitophila*. Hal tersebut diduga dikarenakan turunan senyawa fenol yang terbentuk, dan bereaksi dengan reaksi Lowry yang digunakan pada analisis kandungan protein terlarut dalam enzim.

### b. Aktifitas Enzim

Aktifitas enzim yang dihasilkan pada KMP menggunakan *P. crisosporium*, dapat dilihat pada Gambar 19. Aktifitas enzim mengalami fluktuasi peningkatan dan mengalami penurunan pesat setelah hari ke-6. Hal ini terjadi pada substrat 20 mesh dan 40 mesh, namun untuk substrat 60 mesh cenderung lebih konstan sampai hari ke-8. Aktifitas enzim  $\beta$ -glukosidase terlihat mulai hari ke-3 dan meningkat sampai hari ke-4 untuk selanjutnya konstan.

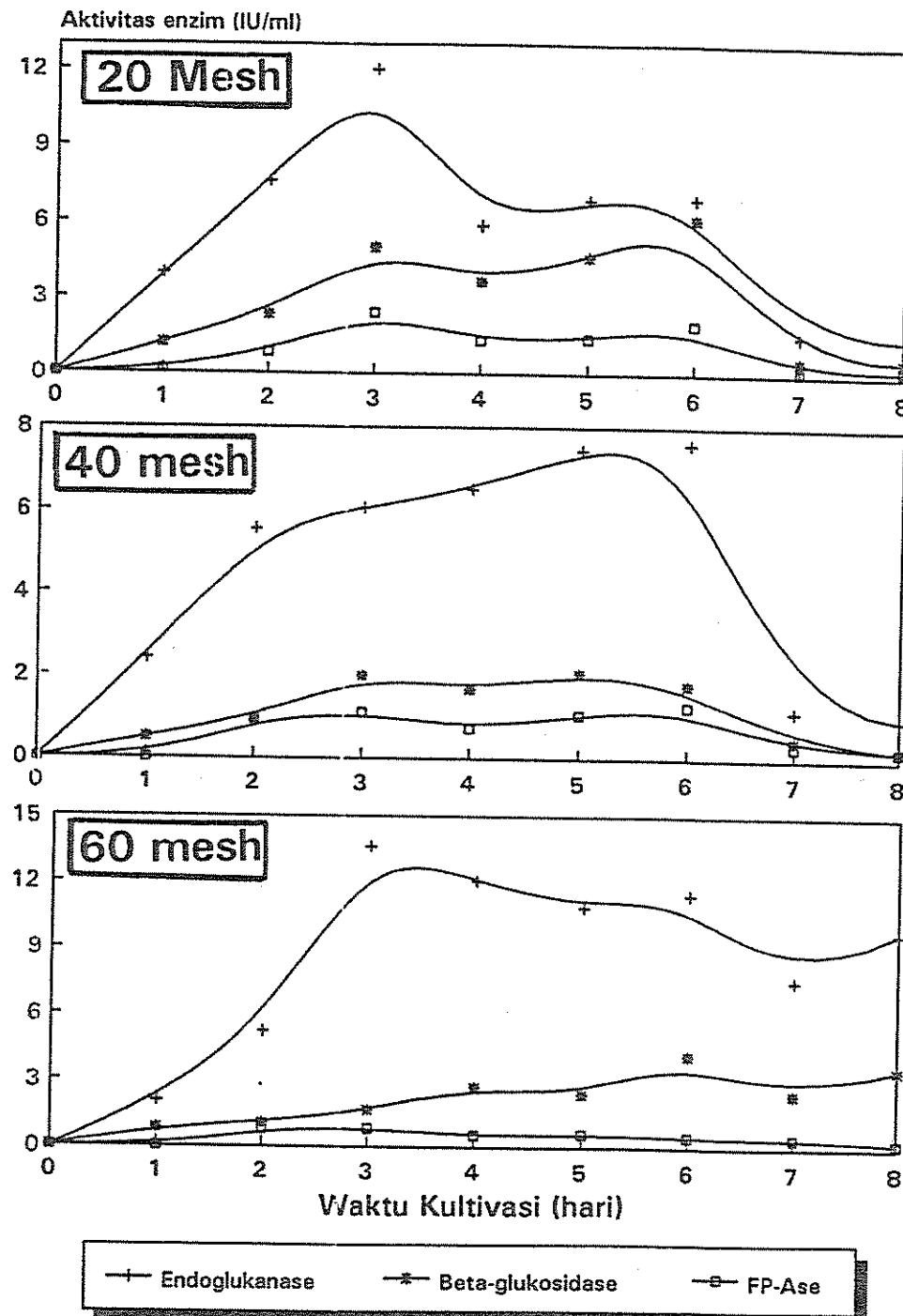
Kecenderungan nilai aktifitas enzim diatas, diduga dikarenakan pertumbuhan *P. crisosporium* dengan substrat 20 dan 40 mesh tidak merata. Beberapa faktor menjadi penyebab hal tersebut diantaranya adalah pasokan udara yang tidak optimal dan adanya lignin yang lebih besar dan terdegradasi serta menyebar pada substrat menjadi inhibitor pertumbuhan. Selain itu pada ukuran substrat 20 dan 40 mesh, ikatan antar partikel juga lebih longgar sehingga kandungan air cepat hilang dan menyebabkan sistem biosintesis enzim tidak stabil. Adanya variasi suhu menyebabkan molekul air cepat terlepas karena



penguapan. Pada substrat 60 mesh kondisi lebih stabil, karena ikatan antar partikel lebih rapat dan permukaan lebih luas, sehingga pertumbuhan kapang dapat lebih merata.

Pengaruh pH terhadap aktifitas enzim terjadi disebabkan adanya perubahan tingkat ionisasi pada enzim atau substrat. Enzim merupakan suatu protein dan terdiri dari asam-asam amino yang dapat mengadakan ionisasi pada gugus amino, karboksil dan gugus fungsional lainnya (Irawadi, 1991). Nilai pH optimum untuk kerja enzim selulase adalah 5.8 - 5.9, namun dari penelitian lain enzim dapat juga bekerja pada kisaran pH 4 - 5.

Aktifitas enzim  $\beta$ -glukosidase mulai terlihat pada hari ke-3. Hal ini menunjukkan bahwa proses biosintesis enzim  $\beta$ -glukosidase lebih lambat dibandingkan dengan enzim endoglukanase. *P. crysosporum* menghasilkan enzim lengkap secara bertahap, tergantung dari kondisi dan kandungan substrat. Masing-masing tahap menghasilkan enzim yang dapat menjadi inhibitor untuk kerja enzim yang lain. Dalam hal ini enzim  $\beta$ -glukosidase menjadi inhibitor enzim endoglukanase, karena pada hari ke-4 aktifitas enzim  $\beta$ -glukosidase meningkat dan bersamaan dengan itu endoglukanase menurun. Menurut Enari (1983) pada biosintesis enzim selulase, enzim  $\beta$ -glukosidase merupakan inhibitor enzim endoglukanase.



Gambar 19. Pola perubahan nilai aktifitas enzim selama KMP menggunakan *P. crysosporium* pada inkubator.

Aktifitas enzim endoglukanase tertinggi adalah 12.2 IU/ml diperoleh pada hari ke-3 pada substrat 60 mesh, sedangkan aktifitas  $\beta$ -glukosidase tertinggi adalah 6.56 IU/ml diperoleh pada hari ke-6 pada substrat 20 mesh. Aktifitas total selulase menunjukkan rata-rata dibawah 2 IU/ml dan bahkan sangat rendah untuk substrat 60 mesh. Rendahnya aktifitas total selulase berimplikasi pada kemampuan hidrolisis selulosa menjadi gula glukosa. Pengujian aktifitas FP-ase hanya untuk mengetahui aktifitas kualitatif enzim selulase secara keseluruhan, Sedangkan penentu keberhasilan hidrolisis adalah enzim  $\beta$ -glukosidase (Enari, 1983).

## 2. KMP Menggunakan Erlenmeyer

Kultivasi media padat (KMP) menggunakan *Phanerochaete crysosporium* yang dilakukan pada erlenmeyer dengan suhu ruangan, menunjukkan pertumbuhan yang lebih lambat dari pada yang dilakukan dalam inkubator. Hal tersebut mudah dipahami karena kondisi yang berbeda dalam hal aerasi udara dan ketersediaan oksigen bebas. Tujuan penggunaan erlenmeyer untuk proses KMP adalah sebagai pembanding dan kontrol, karena selama ini penelitian KMP menggunakan *P. crysosporium* jarang dilakukan.

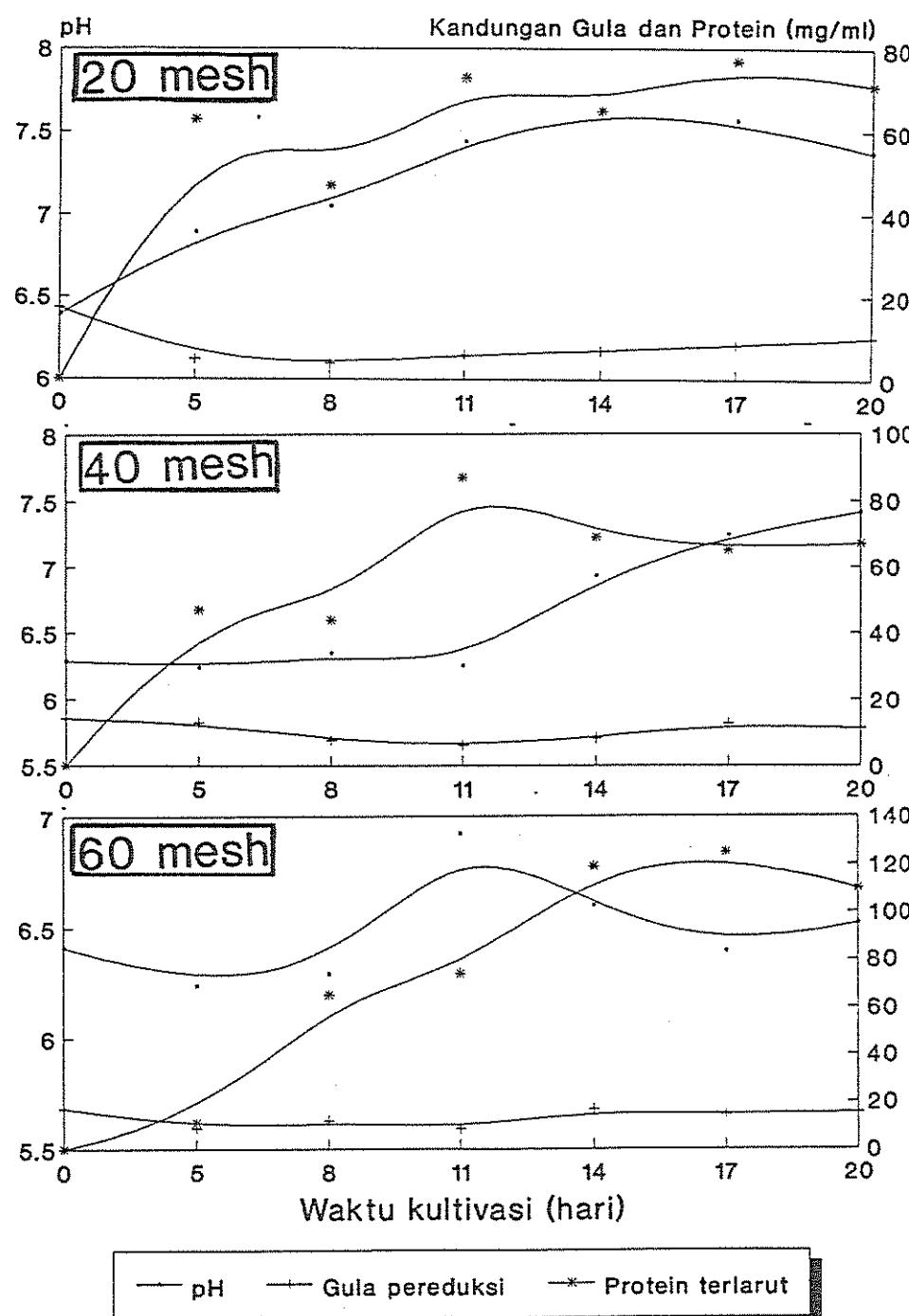
### a. Gula Pereduksi dan Protein Terlarut

Grafik pola perubahan nilai pH, kandungan gula pereduksi dan protein terlarut di dalam enzim disajikan pada Gambar 20.

Kecenderungan kenaikan pH lebih tinggi, dibandingkan dengan KMP pada inkubator. Hal ini karena waktu pengambilan sampel yang dilakukan lebih lama, sehingga proses degradasi lignin lebih banyak. Dengan demikian, senyawa turunan lignin yang terbentuk juga banyak dan meningkatkan pH. Degradasi lignin terjadi pertama kali, karena *P. crysosporium* menghasilkan enzim ligninase terlebih dulu.

Pada substrat 60 mesh, nilai pH lebih berfluktuasi, hal tersebut dikarenakan kandungan asam yang lebih banyak dihasilkan, meskipun juga berfluktuasi. Asam dihasilkan sebagai akibat pertumbuhan kapang yang lebih baik, karena ketersediaan gula yang lebih banyak. Kandungan gula pereduksi menurun sampai hari ke-8 pada substrat 20 mesh dan hari ke-11 pada substrat 40 mesh, untuk selanjutnya mengalami peningkatan. Pada substrat 60 mesh, gula menurun sampai hari ke-5, untuk selanjutnya mengalami sedikit kenaikan. Perbedaan tersebut diatas diduga karena perbedaan ukuran partikel substrat.

Kandungan protein mengalami peningkatan, dan kecenderungan yang hampir sama dengan pertumbuhan biomassa. Kandungan protein tertinggi (125 mg/ml) diperoleh pada hari ke-17 pada substrat 60 mesh. Kecenderungan peningkatan kandungan protein terlarut lebih stabil dibandingkan pada KMP dalam inkubator (Gambar 20).



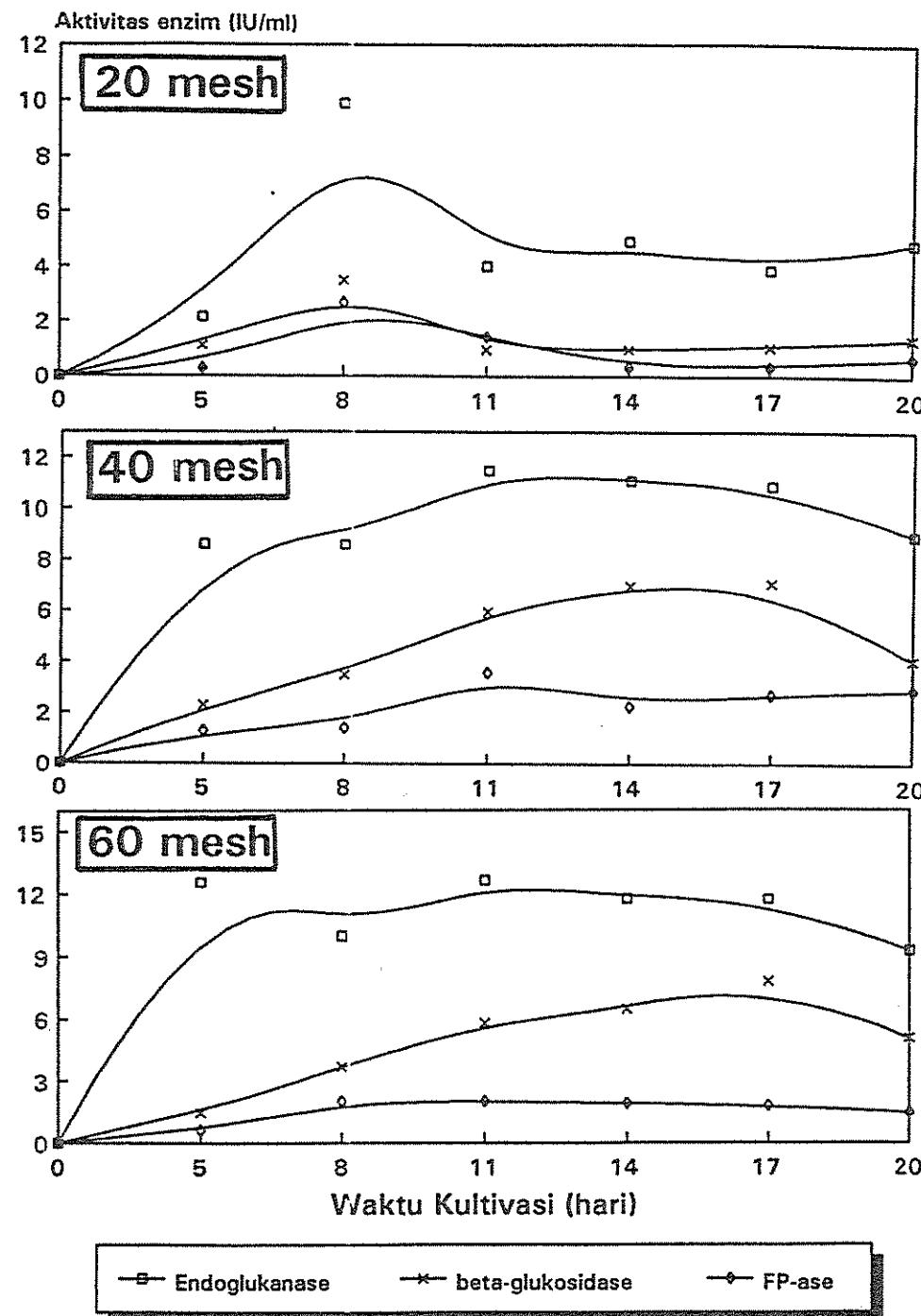
Gambar 17. Pola perubahan nilai pH, kandungan gula pereduksi dan protein terlarut pada KMP menggunakan *P. crysosporium* pada erlenmeyer.



### b. Aktifitas Enzim

Aktifitas enzim mengalami kenaikan pada hari ke 5 - 11 untuk selanjutnya mengalami penurunan. Grafik pola perubahan nilai pH dan aktifitas enzim dapat dilihat pada Gambar 21. Pada substrat 20 mesh aktifitas enzim endoglukanase,  $\beta$ -glukosidase dan FP-ase tertinggi dicapai pada hari ke-8 selanjutnya mengalami penurunan. Pada substrat 40 mesh aktifitas endoglukanase dan FP-ase tertinggi dicapai pada hari ke-11 sedangkan aktifitas  $\beta$ -glukosidase dicapai pada hari ke-14. Pada substrat 60 mesh, aktifitas endoglukanase tertinggi diperoleh pada hari ke-5 dan seterusnya konstan sampai hari ke-17, sedangkan aktifitas FP-ase dicapai pada hari ke-8 untuk selanjutnya konstan sampai hari ke-17. Namun demikian aktifitas enzim  $\beta$ -glukosidase meningkat sampai hari ke-17.

Pada partikel 60 mesh, kandungan gula lebih tinggi, demikian juga kandungan selulosa yang telah terpotong, sehingga menjadi induser untuk mempercepat pertumbuhan dan terbentuknya enzim. Enzim endoglukanase diduga merupakan enzim pertama yang dibentuk dalam biosintesis enzim selulase. Hal ini dikarenakan enzim endoglukanase merupakan enzim pertama yang bekerja dalam suatu proses hidrolisis selulosa. Endoglukanase bekerja dengan mengaktifkan selulosa non-reaktif menjadi selulosa reaktif yang siap untuk dihidrolisa. Penggunaan partikel substrat 60 mesh, menghasilkan aktifitas enzim terbaik. Penurunan aktifitas enzim, diduga karena variasi suhu dan peningkatan pH.



Gambar 21. Pola perubahan nilai aktifitas enzim selama KMP menggunakan *P. crysosporum* dalam erlenmeyer.

## D. PENGARUH KMP TERHADAP SUBSTRAT TKKS

#### 1. KMP dengan *Trichoderma viride*

Proses biodegradasi bahan lignoselulosik melibatkan beberapa kelompok enzim. Enzim berperan untuk proses hidrolisis lignoselulosik menjadi senyawa-senyawa sederhana turunannya. Gambar 22 menunjukkan perubahan kandungan selulosa, lignin dan hemiselulosa substrat selama kultivasi menggunakan *T. viride* dengan TKKS didelignifikasi. Perubahan dihitung berdasarkan persen bobot kering dari awal kultivasi. Jumlah selulosa terkonversi dipersentasikan terhadap jumlah kandungan selulosa awal, demikian juga terhadap lignin dan hemiselulosa.

Dari data, terlihat bahwa kandungan hemiselulosa terdegradasi paling besar yaitu  $\pm$  74 persen, yang dicapai pada jam ke-60. Hal ini dikarenakan hemiselulosa merupakan polisakarida yang paling mudah larut diantara bahan lignoselulosik.

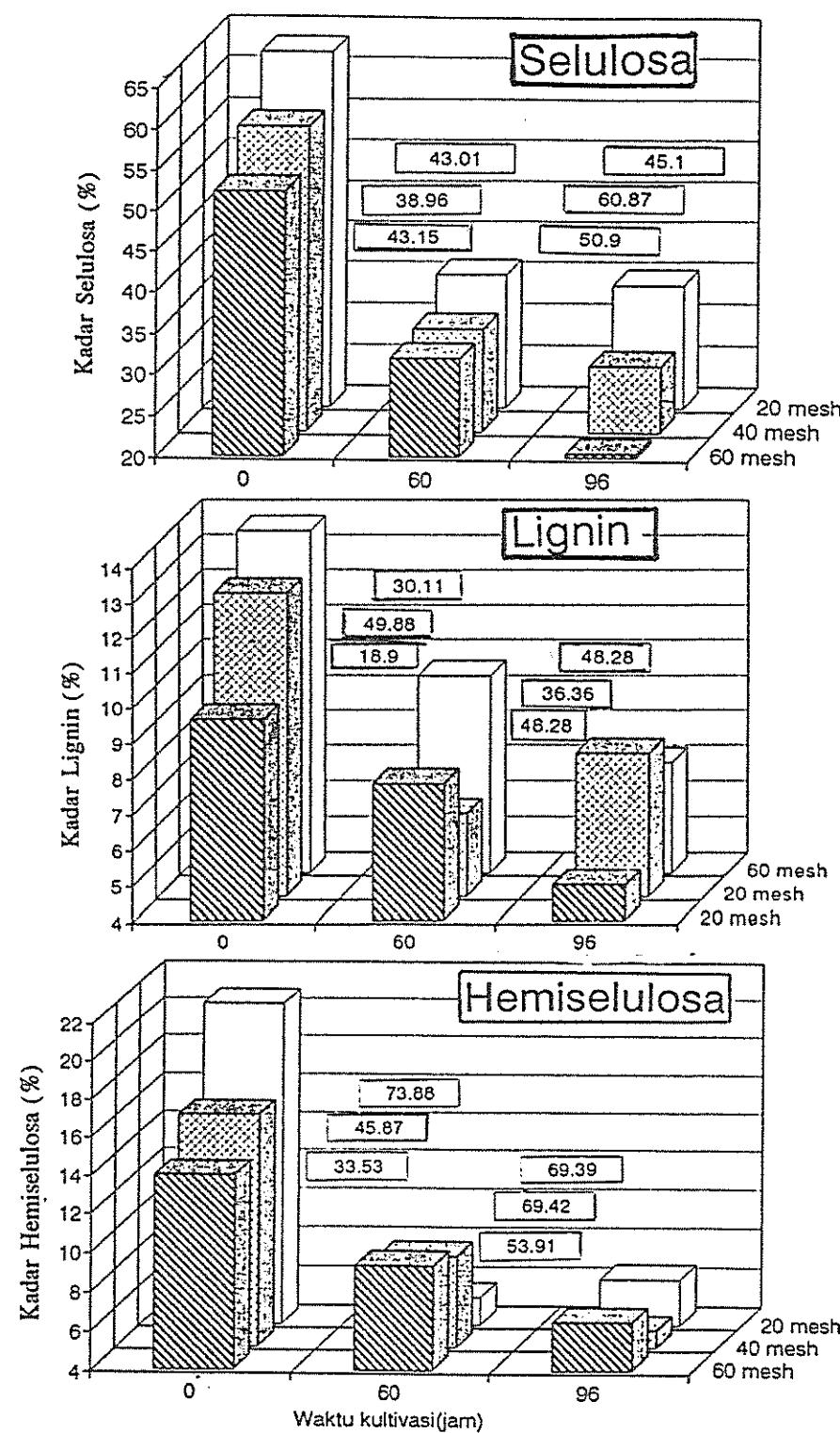
Kandungan selulosa terkonversi sekitar 45 persen yang dicapai pada jam ke 96. Selulosa yang terdegradasi diduga merupakan selulosa amorf yang tersisa setelah delignifikasi ditambah dengan selulosa kristal yang renggang ikatannya akibat delignifikasi. Lignin terdegradasi karena pengaruh delignifikasi, sehingga lignin terpecah menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana. Penurunan kandungan lignin diduga karena pengaruh hidrolisis selulosa dan hemiselulosa.



Pada substrat 60 mesh, degradasi selulosa sekitar 50 persen, hemiselulosa 50 persen dan lignin 48 persen. Dari keseluruhan data, biodegradasi terbaik terjadi pada substrat 40 mesh, dimana pengurangan selulosa adalah sekitar 60 persen, hemiselulosa 69 persen dan lignin 48 persen.

Pada proses KMP dengan substrat yang tidak didelignifikasi, ternyata proses konversi lebih kecil dibandingkan dengan TKKS didelignifikasi. Gambar 23 menunjukkan penurunan selulosa, lignin dan hemiselulosa selama KMP menggunakan *T. viride* dengan substrat TKKS tidak didelignifikasi. Kandungan selulosa terkonversi hanya  $\pm$  15 persen, sedangkan lignin sekitar 30 persen dan hemiselulosa  $\pm$  45 persen.

Hemiselulosa merupakan komponen tertinggi yang terdegradasi. Hal ini dikarenakan sifat hemiselulosa yang mudah larut. Selulosa yang terkonversi adalah selulosa amorf, karena dengan adanya lignin, maka ikatan selulosa dengan lignin sulit untuk dipecah oleh enzim. Di lain pihak enzim yang dihasilkan mempunyai aktifitas rendah, karena pengaruh keberadaan lignin. Jumlah sekitar 15 persen selulosa terkonversi diatas, diduga merupakan selulosa amorf, karena sekitar 15 persen dari selulosa dalam bahan lignoselulosik adalah selulosa amorf yang mudah terdegradasi dan terputus antar ikatannya.



Gambar 19. Penurunan kandungan selulosa, lignin dan hemiselulosa pada KMP dengan *T. viride* dengan TKKS didelignifikasi. didelignifikasi.

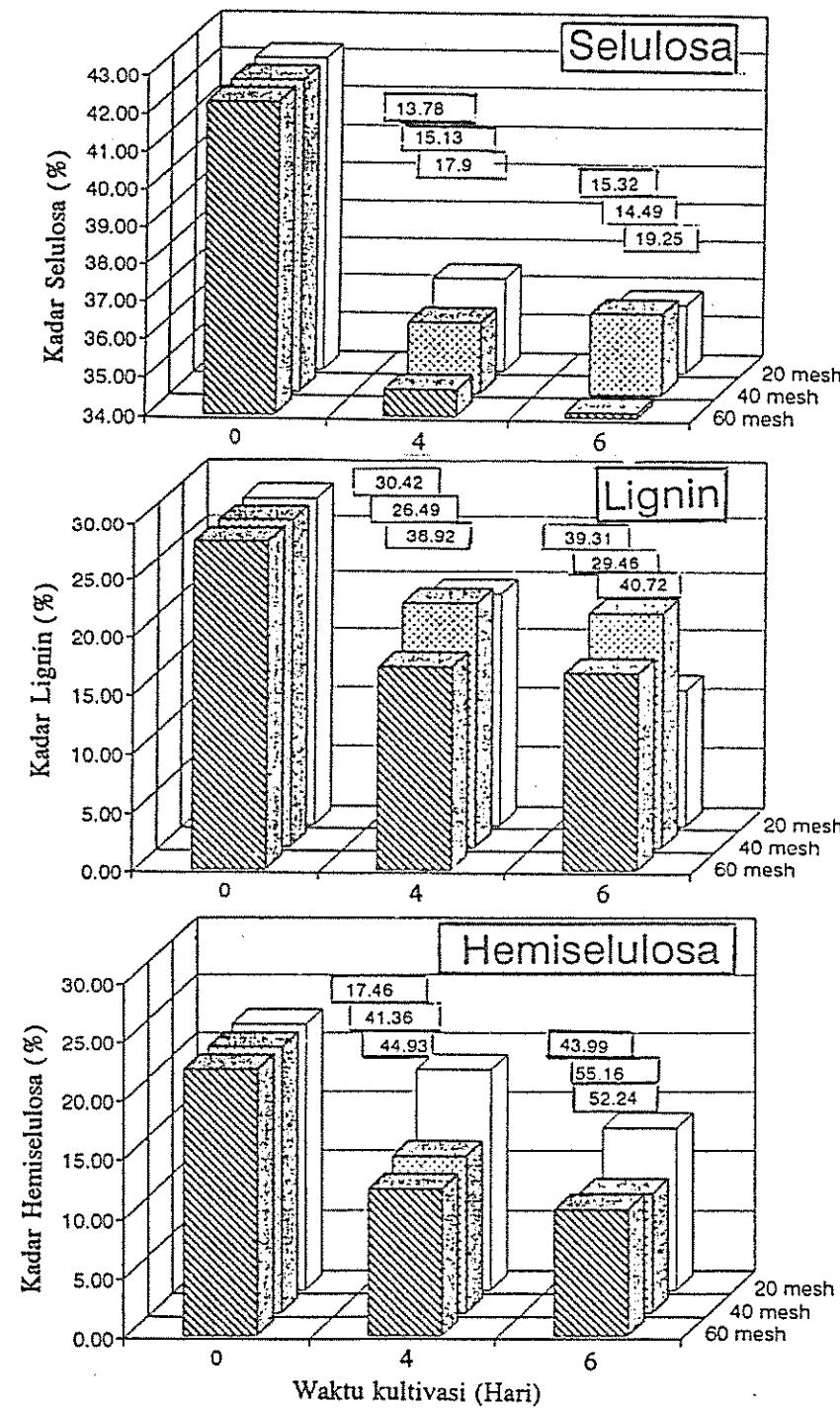


## 2. KMP dengan *Neurospora sitophila*

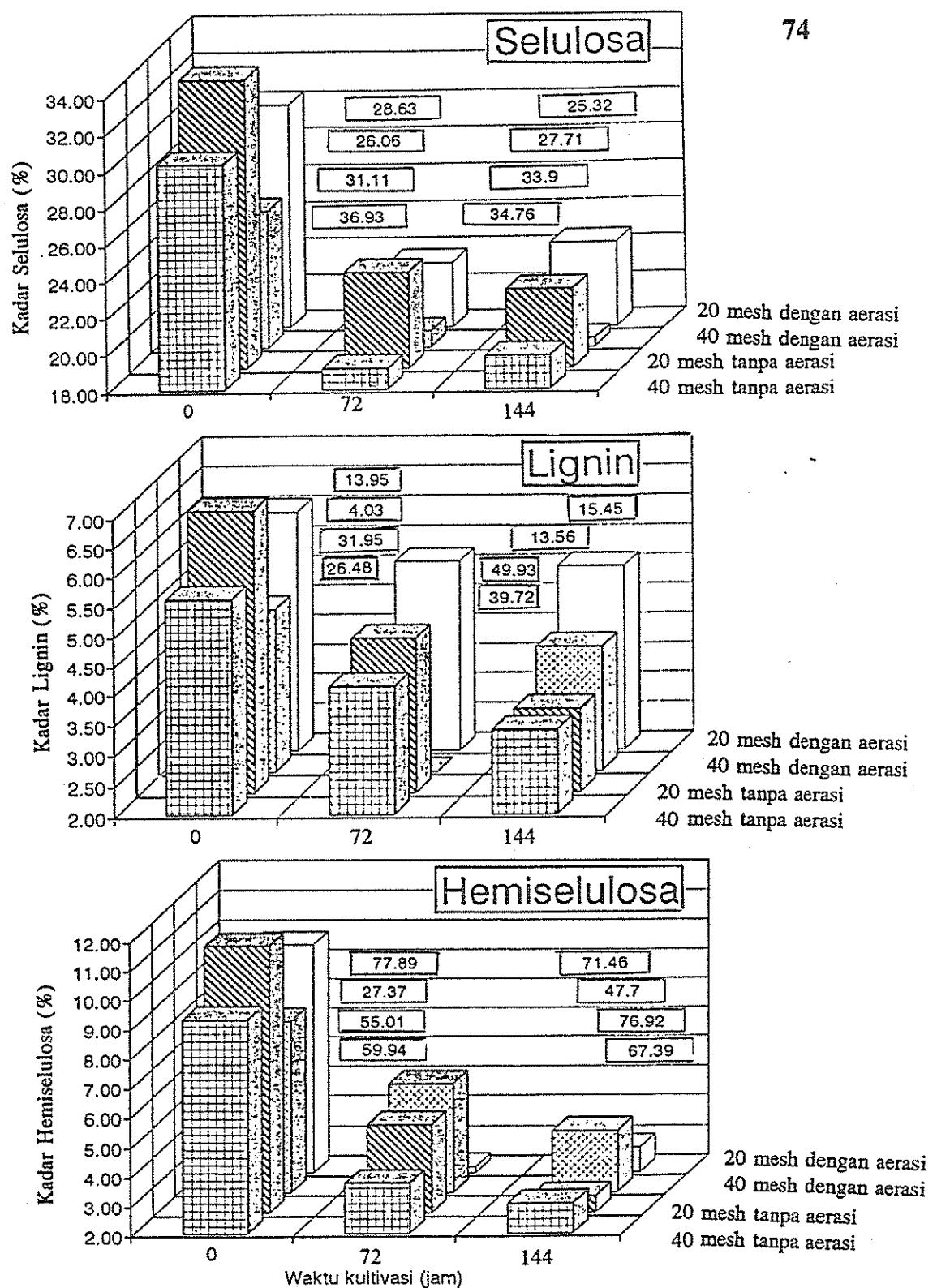
Proses KMP menggunakan *N. sitophila*, pada sistem di aerasi memberikan hasil yang lebih buruk dibandingkan dengan penggunaan sistem yang tidak di aerasi. Gambar 24 menunjukkan perubahan kandungan selulosa, lignin dan hemiselulosa substrat selama KMP menggunakan *N. sitophila* dengan sistem di aerasi dan tidak di aerasi.

Pengambilan sampel pada analisis perubahan kandungan lignin, selulosa dan hemiselulosa, dilakukan pada saat aktifitas enzim tertinggi dan kandungan gula pereduksi yang diperoleh adalah maksimal. Kandungan selulosa terdegradasi antara 25 - 28 persen, hemiselulosa 27 - 77 persen dan lignin antara 4 - 15 persen pada KMP dengan sistem di aerasi. Pada sistem tidak di aerasi, selulosa terdegradasi adalah antara 31 - 36 persen, hemiselulosa antara 55 - 76 persen dan lignin antara 26 - 50 persen.

Pada KMP dengan sistem di aerasi, adanya oksigen yang terlalu banyak justru menghambat penyebaran pertumbuhan *N. sitophila*. Hal ini dikarenakan karakteristik *N. sitophila* akan mempercepat membentuk spora jika ketersediaan oksigen terlalu tinggi, dimana keadaan ini menyebabkan pertumbuhan melambat (Alexopolus dan Mims, 1979 ; Rau *et al.*, 1988). Sebaliknya justru terjadi pada KMP dengan aerasi yang terbatas. Adanya oksigen yang terbatas, membuat pertumbuhan *N. sitophila* lebih banyak pada pembentukan miselia dari pada spora, sehingga dalam kaitan dengan proses degradasi, miselia cenderung lebih aktif menggunakan selulosa sebagai substrat.



Gambar 20. Penurunan kandungan selulosa, lignin dan hemiselulosa selama KMP menggunakan *T. viride* dengan substrat tidak didelignifikasi.



Gambar 21. Penurunan kandungan selulosa, lignin dan hemiselulosa selama KMP dengan *N. sitophila*.

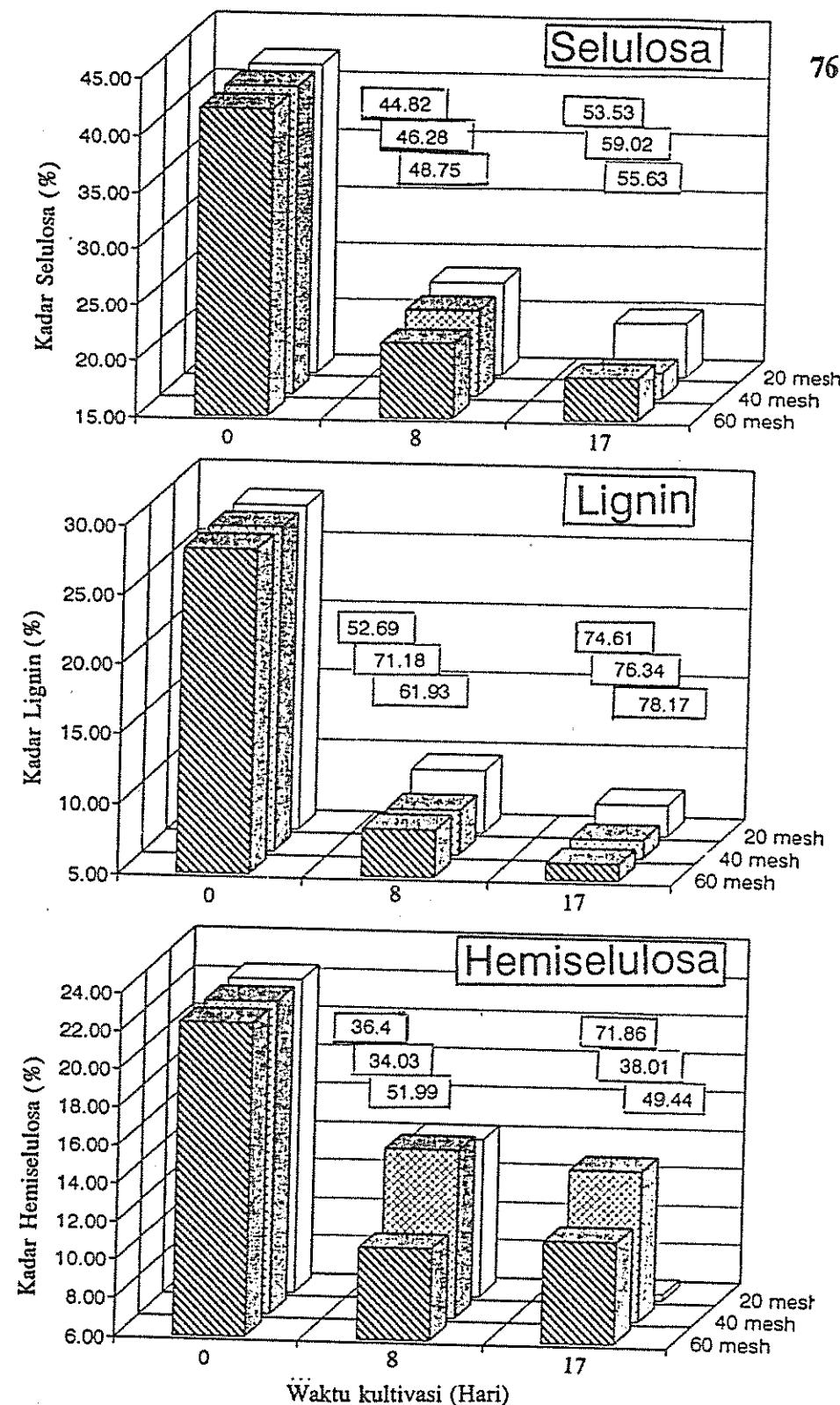


### 3. KMP dengan *Phanerochaete crysosporium*

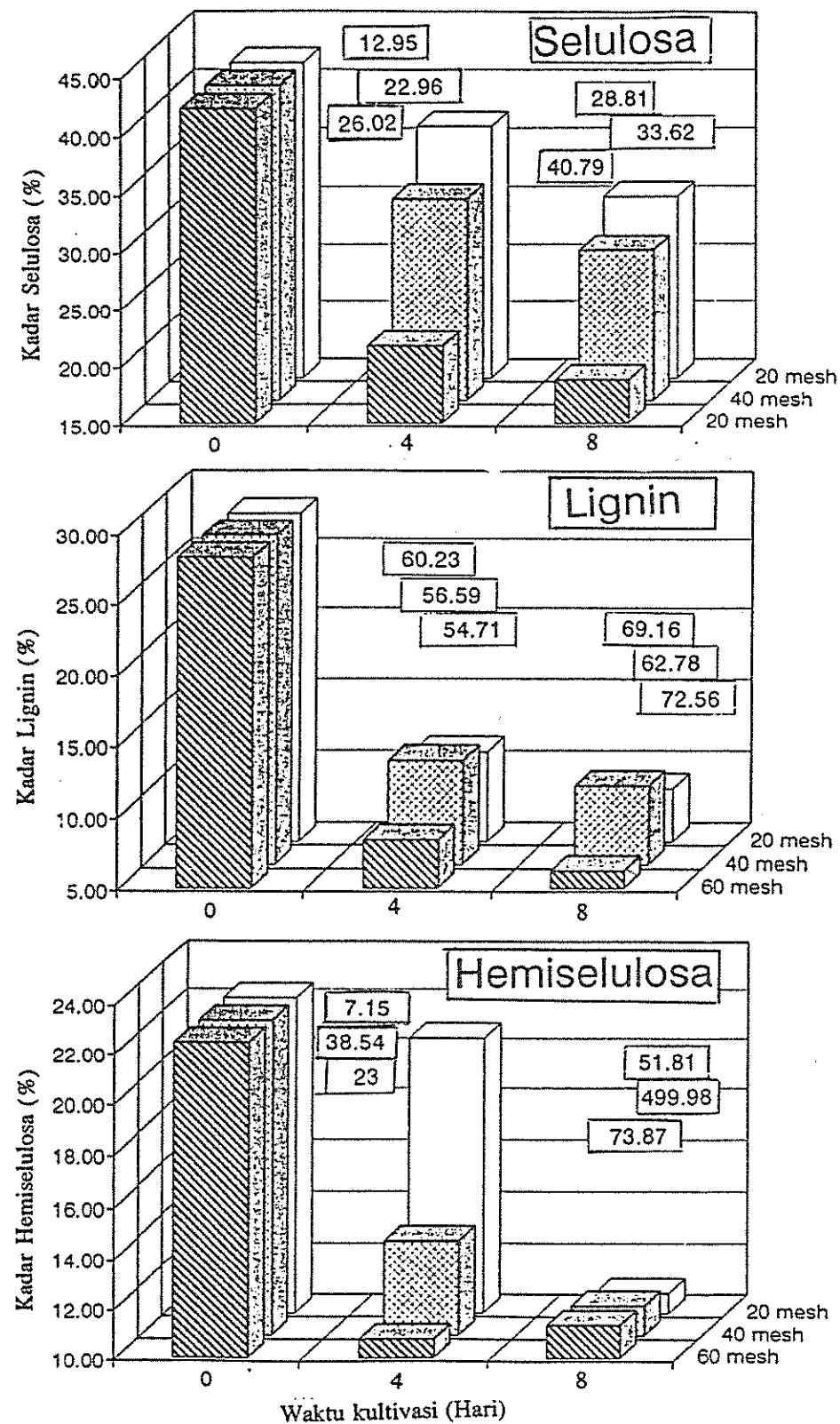
Pada proses KMP menggunakan *Phanerochaete crysosporium*, biodegradasi TKKS terutama terjadi pada komponen lignin. Penurunan kandungan lignin terjadi paling tinggi dibandingkan hemiselulosa dan selulosa. Pada KMP dengan erlenmeyer, proses degradasi lebih besar dibandingkan pada inkubator. Gambar 25 menyajikan hasil degradasi kandungan lignin, selulosa dan hemiselulosa selama KMP menggunakan erlenmeyer.

Pada proses biodegradasi pada inkubator, kandungan selulosa terkonversi sangat rendah, sebaliknya terjadi pada lignin. Keadaan tersebut hampir sama dengan kontrol yaitu dalam erlenmeyer. Kandungan lignin terdegradasi demikian besar karena *P. crysosporium* menghasilkan enzim ligninase. Sebaliknya enzim endoglukanase dan  $\beta$ -glukosidase diproduksi lebih lambat. Hal ini dapat dimengerti karena adanya lignin, yang langsung terbentunya enzim ligninase. Gambar 26 menunjukkan hasil degradasi TKKS oleh *P. crysosporium* pada KMP dalam inkubator.

Kandungan lignin menurun sebesar 72 persen dari kandungan awal, pada KMP dalam inkubator, sedangkan pada KMP dalam erlenmeyer adalah sekitar 79 persen. KMP pada erlenmeyer lebih lama yaitu 20 hari dengan hari puncak adalah hari ke-8, sedangkan KMP pada inkubator hanya 8 hari dengan hari ke-5 adalah hari puncak. Dalam hal ini KMP pada erlenmeyer adalah lebih stabil dan variasi suhu kecil, meskipun pertumbuhan lambat.



Gambar 22. Penurunan kandungan selulosa, hemiselulosa dan lignin selama KMP menggunakan *P. crysosporium* dalam erlenmeyer.



77

Gambar 23. Penurunan kandungan selulosa, lignin dan hemiselulosa pada KMP menggunakan *P. crysosporium* pada inkubator.



## VI. KESIMPULAN DAN SARAN

### A. KESIMPULAN

Jumlah limbah padat pengolahan minyak kelapa sawit, yaitu tandan kosong kelapa sawit mengalami peningkatan terus, sejalan dengan peningkatan semakin kapasitas pengolahan minyak kelapa sawit. TKKS potensial untuk dimanfaatkan sebagai substrat pertumbuhan kapang dan fungi untuk biokonversi menjadi beberapa produk seperti enzim, protein/biomasa untuk pakan maupun untuk pelarut organik seperti ABE.

Produksi enzim lignoselulase dari proses KMP dengan substrat TKKS, potensial untuk dikembangkan. Pada penelitian ini enzim yang diperoleh mempunyai aktifitas yang bervariasi, dengan aktifitas enzim endoglukanase tertinggi 13.6 IU/ml dan aktifitas enzim  $\beta$ -glukosidase tertinggi (7.76 IU/ml) diperoleh pada KMP menggunakan *P. crysosporum* dalam inkubator, sedangkan aktifitas enzim FP-ase tertinggi (3.26 IU/ml) diperoleh pada KMP menggunakan *T. viride*.

Faktor suhu, RH dan kondisi kestabilan KMP serta karakteristik substrat pengujian mempunyai pengaruh yang besar pada nilai aktifitas enzim yang dihasilkan. Produksi biomassa meningkat, kemudian mengalami fase konstan. Kandungan protein terlarut dalam enzim tertinggi pada KMP dengan *T. viride* adalah 30.59 mg/ml pada substrat 60 mesh didelignifikasi. Demikian juga terhadap kandungan gula pereduksi yang dihasilkan. Pada substrat didelignifikasi kandungan gula pereduksi meningkat pada waktu tertentu kemudian menurun, sedangkan pada substrat yang tidak dilakukan

delignifikasi, kandungan gula pereduksi menurun pada beberapa saat untuk kemudian meningkat secara perlahan-lahan. Kandungan gula pereduksi tertinggi (16.17 mg/ml) diperoleh pada KMP menggunakan *T. viride* dengan substrat didelignifikasi.

Proses degradasi oleh kapang dan *white rot fungi*, berbeda pada komponen pertama yang didegradasi. Pada KMP dengan *T. viride* dan *N. sitophila*, selulosa merupakan substrat pertama didegradasi, sedangkan pada KMP dengan *P. crysosporium* lignin merupakan komponen pertama yang didegradasi.

Pada KMP menggunakan *T. viride* dengan substrat didelignifikasi, kandungan selulosa terdegradasi 38.96 - 60.87 persen, lignin 18.90 - 49.88 persen dan hemiselulosa 33.53 - 73.88 persen, sedangkan pada substrat yang tidak didelignifikasi, kandungan selulosa terdegradasi 13.78 - 19.25 persen, lignin 26.49 - 40.72 persen dan hemiselulosa 17.46 - 55.16 persen. Pada KMP dengan *N. sitophila* dengan sistem di aerasi, kandungan selulosa terdegradasi 25.32 - 28.63 persen, lignin 4.03 - 15.45 persen dan hemiselulosa 27.37 - 77.89 persen, sedangkan pada sistem tidak di aerasi, kandungan selulosa, lignin dan hemiselulosa terdegradasi masing-masing 31.11 - 36.93 persen, 26.48 - 49.93 persen dan 55.01 - 76.92 persen. Pada KMP dengan *P. crysosporium* dalam inkubator, kandungan selulosa, lignin dan hemiselulosa terdegradasi masing-masing 12.95 - 40.73 persen, 54.71 - 72.56 persen dan 7.15 - 73.87 persen, sedangkan pada KMP dalam erlenmeyer, kandungan selulosa terdegradasi 44.82 - 59.02 persen, lignin 52.69 - 78.17 persen dan hemiselulosa 34.03 - 71.86 persen.

## B. SARAN

Perlu dilakukan penelitian terpadu secara sinambung untuk pemanfaatan TKKS, guna memberikan nilai tambah pada bahan tersebut. Pada proses KMP perlu dilakukan pengukuran variabel-variabel seperti laju aerasi, ketebalan substrat, pengaruh RH, dan lain-lain agar hasilnya optimal.

Hal penting yang juga perlu diperhatikan adalah upaya melakukan pemodelan pengembangan KMP dengan substrat lignoselulosa agar biokonversi lignoselulosa dapat menghasilkan data yang optimal. Penelitian menggunakan jenis dan strain mikroorganisme lain perlu dilakukan, terutama menggunakan kelompok mikroorganisme yang termasuk *White rot fungi*.



## DAFTAR PUSTAKA

- Achmadi, S. 1989. Kimia Kayu. Diktat PAU Ilmu Hayati, IPB, Bogor.
- Aidoo, K.E., R. Henry dan B.J.B. Wood. 1982. Solid Substrate Fermentation. Advance in Applied Microbiology Vol. 28.
- Alexopoulos, C.J. dan C.W. Mims. 1979. Introductory Mycology. John Wiley and Sons, New York.
- Aritonang, D. 1986. Perkebunan Kelapa Sawit, Sumber Pakan Ternak di Indonesia. J. Litbang Pertanian 5(4) : 93 - 99.
- Azemi, M, B.M.N., A.A. Astimer, M. Anis, and K. Dar. 1994. An Overview of Process Studies on Bioconversion of Palm Waste into Useful Products. Division of Food Technology, Universiti Sains Malaysia, Penang.
- Bajracharya, R. dan R.E. Mudgett. 1980. Effect on Controlled Gas Environment in Solid State Fermentation of Rice. J. Biotech. Bioeng.
- Banerjee, V.C., Y. Chisti dan M. Moo-Young. 1994. Protein Enrichment of Corn Stover Using *Neurospora sitophila*. Symp. Bioproducts Processing, 4 - 7 January 1994, Malaysia.
- Burdsall, H.H.Jr., and W.E. Eslyn. 1974. A New *Phanerochaete* with a *Chrysosporium* Imperfect State. Mycotaxon 1 : 123 - 133.
- Breuil, C., P. Maters and J.N. Sadler. 1986. Substrate Conditions that Influence the assays Used for Determining the  $\beta$ -glucosidase activity of Cellulolytic Microorganism. Biotechnol. Bioeng. 28 : 1653 - 1656.
- Cautler, C., J. T. G. Hamilton and D. B. Harper. 1993. Evidence for the Existence of Independent Chloromethane and S-Adenosylmethionine Utilizing system for Methylation in *P. Crysosporium*. Appl. Environ. Microl. Vol. 9 no. 5 : 1461 - 1466.
- Chahal, P. S., D.S. Chahal and A. Gerard. 1992. Cellulase Production Profile of *T. reesei* on Different Cellulosic Substrates at Various pH Levels. J. Ferment. and Bioeng. Vol. 74 No 2 : 126 - 128.
- Chahal, D. S. 1985. Solid State Fermentation with *T. reesei* for Cellulase Production. Appl. Environ. Microl. Vol 49 No 1 : 205 - 210.
- Cowling, E.B. 1975. Physical and Chemical Constraints in the Hydrolysis of Cellulose and Lignocellulosic materials. Biotechnol. Bioeng. Symp. 5 : 163 - 181.

- Cowling, E.B. and T.K. Kirk. 1976. Properties of Cellulose and Lignocellulose Materials ad Substrates for Enzymatic Conversion Process. Biotehnol. Bioeng. Symp. 6 : 95 - 123.
- Daniel, G., J. Volc, E. Kubotova and T. Nilsson. 1992. Ultra Structural and Immunocytochemical Studies of the  $H_2O_2$ -Producing Enzyme Pyranoxidase in *P. crysosporium* Growth under Liquid Culture Condition. Appl. Environ. Microl. Vol 58 No 11 : 3667 - 3676.
- Daubre, P., Ntibashirwa, A. Gheysen dan J. A. Meyer. 1987. A Processor for the Protein Enrichment of Casava by Solid Substrates Fermentation in Rural Conditions. Biotech. Bioeng. Vol. 29.
- Dhawale, S. S. and K.Kessler. 1993. Alternative Methodes for Production and Staining of *P. crysosporium* Basidiospore. Appl. Environ. Microl. Vol 59 No 5 : 1675 - 1677.
- Dinesh, N., S. Vikineswary dan T. K. Mukherjee. 1994. Bioconversion of Oil Palm Frond Parenchyme Tissue (OPFPT) with *Pleurotus sajor-caju*. Proceedings of the 2nd. symp. on Trends in Biotechnology, Malaysia.
- Dobozi, M. S., G. Szakacs and C. V. Bruschi. Xylanase Activity of *P. crysosporium*. Appl. Environ. Microl. Vol 58 No 11 : 3466 - 3471.
- Erickson, K. E. and B. Pettersson. 1972. Extracellular Enzyme System Utilized by the Fungus *Crysosporium lignorum* for the Break Down Cellulase Deterioration of Material. In Microbial Processes : Promising Technologies for Developing Countries. 1981. National Academy of Science.
- Enari, T. M. 1983. Microbial Cellulases. In Forgarty, W. M. (ed). Microbial Enzyme and Biotechnology. Appl. Science. Publiesher, London and New York.
- Fan, L. T. and Y. H. Lee. 1983. Kinetic Studies of Enzymatic Hydrolysis of on Soluble Cellulose : Derivatin of a Mechanistis Kinetic Model. Biotechnol. Bioeng. 25 : 2707 - 2733.
- Fardiaz, S. 1989. Mikrobiologi Pangan I. fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Fengel, D. and D. Wegener. 1984. Wood Chemistry, Ultra Structure Reaction. Walter de Gruyter New York.
- Frazier, W. C. 1967. Food Microbiology. Mc-Graw Hil Pub. Co. Ltd, New Delhi.
- Gaden, E. L., M. H. Mandels, and L. A. Spano. 1976. Enzymatic Conversion of Cellulosic Material : Tehcnology and Applications. Biotechnol. Bioeng. Symp. 6.

- Gervais, P. dan C. Bazelin. 1986. Development of Solid State Fermenter Allowing the Control of Substrate Water Activity. *Biotechnology letter* Vol. 8.
- Glenn, D. R. dan P. L. Rogers. 1988. A Solid Substrates Fermentation Process for an Animal Feed Product : Studies of Fungal Starin improvement. *Australasian Journal of Biotechnology* Vol. 2.
- Gong, C. S. and G. T. Tsao. 1979. Cellulase and Biosynthesis Regulation. *Di Dalam* D. Pearlman (ed). Annual Report on Fermentation Process. Academic Press, New York.
- Gumbira-Sa'id, E. 1992a. Teknologi dan Peluang Bisnis Cassapro. *Agrotek* Vol 1 No. 1., Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Gumbira-Sa'id, E. 1992b. Development of Packed Bed Solid-State Cultivation System for the Protein Enrichment of Sago Starch. PhD Thesis. Dept. of Chemical Eng. and Dept. of Microbiology. Univ. of Queensland, Queensland Australia.
- Gumbira-Sa'id, E. 1994. Pemanfaatan Limbah untuk Produksi ABE. *Agrotek* 2, 1 : 47 - 53.
- Haigler, C. H. 1985. ·The Function and Biogenesis of Native Cellulose. *Di dalam* Nevel dan Zeronian, S. H. (eds) *Cellulose Chemistry and Its Application*. Ellis Hardwood Limited, New York.
- Hartley, C. W. S. 1967. *The Oil Palm*. Longman Group, Ltd., London.
- Hoffman, R. M. dan T. M. Wood. 1985. Isolation and Partial Characterization of a Mutant of *Penicillium funiculosum* for the Sacharification of Straw. *Biotech. Bioeng.* Vol. 28 81 - 85, John Wiley Sons, Inc., New York.
- Huang, S. Y., H. H. Wang, C. J. Wei, G. W. Malaney dan R. D. Tanner. 1985. Kinetic Response of the Koji Solid State Fermentation Process. *Di dalam* A. Wiseman (eds). 1985. Topic in Enzyme and Fermentation Biotechnology Vol. 10., Ellis Horwood, Chishester.
- Irawadi, T. T. 1991. Produksi Enzim Ekstraselular (Xylanase dan Selulase) dari Tandan Kosong Kelapa Sawit Menggunakan Kapang *Neurospora sitophila*. Disertasi. Fakultas Pasca Sarjana, IPB, Bogor.
- Judoamidjojo, R. M., E. Gumbira-Sa'id dan L. Hartoto. 1989. Biokonversi. PAU Bioteknologi IPB, Bogor.
- Koyama, Y., Narahara, H. Yoshida, S. Pichyangkora, R. Ueda dan H. Taguchi. 1981. Growth and Enzyme Production in Solid State Culture of *Aspergillus oryzae*. *J. Ferment. Tehcnol.* 60 : 311 - 319.

- Lidnert, W. A., Dennison and G. V. Quicke. 1983. Pitfalls in the Assay of Caeboxymethyl Cellulase Activity. *Biotechnol. Bioeng.* 25 : 377 - 385.
- Loebis, B. 1992. Kelapa Sawit di indonesia. Puslitbun Marihat, Bandar Kuala, Medan.
- Lonsane, B. K., N. P. Ghidyal, S. Budyatman dan S. V. Ramakhrisna. 1985. Engineering Aspect of Solid State Fermentation. *J. of Food Engineering* Vol. 9., India.
- Lowry, O. H., N. J. Rosenbrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein Measurements with Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265 - 275.
- Mananmani, H. K. and K. R. Screekantiah. 1987. Sacharification of Sugar-cane Bagasse with Enzymes from *Aspergillus ustus* and *Trichoderma viride*. *Enzyme Microb. Technol.* Vol. 9 August.
- Mandels, M.m L. Hontz, dan J. Nystrom. 1974. Enzymatic Hydrolysis of Waste Cellulose. *Biotechnol. Bioeng.* 16 : 1471 - 1493.
- Moo-Young, M., A. R. Moreira dan R. P. Tengerdy. 1983. Principle of Solid State Substrate Fermentation. Di dalam J. E. Smith., D. R. Berry dan B. Kristiansen (eds). 1983. Sago the Equatorial Swam as a Natural Resource. Martinus Nijhoff Publishser.
- Moss, M. C. and K. Sighler. 1983. Method in Industrial Microbiology. Ellis Hardwood Limited - johh Willys and Sons, New York.
- Naibaho, P.M. 1983. Peranan Kelapa Sawit sebagai Usaha Pengembangan Industri hasil pertanian. *Buletin PPP*, Medan. Vol. 14 : 27 - 34.
- Nevel, T.P. dan S.H. Zeronian. 1985. Cellulose Chemistry and Its Applications. Ellis Hardwood Inited, Chicester.
- Pelczar, M.J.Jr. dan E.S.C. Chan. 1986. Dasar-dasar Mikrobiologi. Terjemahan. UI Press, Jakarta.
- Perez, J. and T. W. Jeffries. 1992. Role of Manganese and Organic Acid Chelators in Regulating Lignin Degradation and Biosynthesis of Peroxidases by *P. crysosporium*. *Appl. and Environ. Microl.* Vol. 58 no. 8 : 2402 - 2409.
- Poulsen, O. M. and L.W. Pettersson. 1987. Purification of an Extracellular Cellulose-binding Endoglucanase of *Cellulomonas* Sp. ATCC 21399 by Affinity Chromatography on  $H_3PO_4$ -Swollen Cellulase. *Biotechnol. Bioeng.* 29 : 799 - 804.
- Pratiwi, W., A. Askari dan S.P. Rohadi. 1988. Pembuatan Pulp Kertas dari TKKS dengan proses Antrakinson. *Menara Perkebunan* 56(2) : 49 - 52.

- Rao, M., Gaikwad, C. Mishra and V. Deshpande. 1988. Induction and Catabolic Repression of Cellulases in *P. funiculosum*. *Appl. Biochem. and Biotechnol.* 19 : 129 - 137.
- Saarkanen, K.V. and C.H Ludwig. 1971. Lignins Occurrence, Formation, Structure and Reaction. Wiley Intersci, Washington.
- Sato, K., M. Nagatani, Nakamura dan S. Sato. 1983. Growth Estimation of *Candida lipolytica* from Oxygen Uptake in a Solid Culture with Forced Aeration. *Journal of Fermentation Technology* Vol. 66.
- Shambe, T., and O. Ejembi. 1986. Production of Amylase and Cellulase : Degradation of Starch and Carboxymethyl Cellulase by Extracellular Enzymes from Four Funggal Species. Dept. of Chemistry, Univ. of Jost. Private mail Bug 2084, Jost, Nigeria.
- Tanaka, M., M. Ikesaka and R. Matsuno. 1988. Effect of Presize in Substrate and Siffusion on Enzyme on Hydrogen of Cellulosic with Cellulases. *Biotechnol. Bioeng.* 32 : 689 - 706.
- Tsao, G.T., M. Ladisch, C. Ladisch, T.A. Hsu, B. Dale dan T. Chou. 1987. Fermentation Substrat from Cellulosic Material. Annual Report on Fermentation Process 2 : 1 - 21.
- Van Veen, A.G., D.W.C. Graham dan K.H. Steinkrous. 1968. Fermented Peanut Press Cake. *Cereal Sci. Today*.
- Whitaker, D. R. 1971. Cellulases, Dalam P. D. Boyer (ed) Enzime. Vol. 5 : 273. Acvademic Press, New York.
- Wibowo, E. 1994. Kajian Awal Produksi Aseton-Butanol-Etanol secara Sinambung dari Substrat Hidrolisat Tandan Kosong Kelapa Sawit (*Elaesi guineensis* JACQ) Menggunakan Bioreaktor Unggun Diam. Skripsi. Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
- Zadrazil, F. dan P. Reineger. 1970. Treatment of Lignocelluloics with *White Rot Fungi*. Elsevier Applied Science, London and New York.



## Lampiran 1. Rekapitulasi Data Hasil Penelitian

86

### Rekapitulasi Data KMP Menggunakan *T. viride*

Dengan Substrat Didelignifikasi

#### Hubungan pH-Gula-protein terlaut

Jam Ke	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300
0	6.56	6.68	5.80	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
24	7.08	7.48	6.16	5.01	1.87	3.07	4.50	5.90	8.20						
36	4.97	4.83	5.68	5.06	5.45	4.66	3.60	11.70	16.89						
42	4.40	4.52	5.06	9.87	9.07	5.40	13.80	16.80	19.03						
48	4.36	4.24	4.57	9.62	16.17	10.29	18.30	26.20	23.52						
54	4.46	4.24		10.88	7.90		18.10	23.80							
60	4.32	4.18	4.31	7.88	10.83	11.07	21.00	28.90	19.04						
66	4.22	4.12		8.71	8.46		18.40	28.90							
72	4.25	4.13	4.06	5.25	7.71	11.68	18.00	25.70	25.89						
78	4.31	4.40		4.17	6.35		18.10	24.10							
84	4.40	4.27	4.33	4.71	7.30	13.63	19.30	29.40	30.59						
90	4.04	4.05		5.10	10.11		20.90	25.90							
96	4.13	4.24	3.87	6.55	7.50	7.71	15.40	30.10	23.56						

### Rekapitulasi Data KMP menggunakan *T. viride*

Dengan Substrat Didelignifikasi

#### Hubungan PH dengan aktifitas enzim

Jam Ke	pH	Endoglukuronase (U/ml)	Beta-glukuronidase (U/ml)	FDP Acet (U/ml)
0	6.56	6.68	5.80	0.00
24	7.08	7.48	6.16	1.30
36	4.97	4.83	5.68	4.18
42	4.40	4.52	5.06	4.15
48	4.36	4.24	4.57	5.43
54	4.46	4.24		5.08
60	4.32	4.18	4.31	2.59
66	4.22	4.12		1.72
72	4.25	4.13	4.06	1.58
78	4.31	4.40		2.51
84	4.40	4.27	4.33	1.61
90	4.04	4.05		2.04
96	4.13	4.24	3.87	1.27



### KMP dilakukan dalam Erlenmeyer suhu ruangan

#### Hubungan pH dengan Aktifitas enzim

Hari ke	pH					Aktivitas Enzim (unit)				
	20	40	60	80	100	20	40	60	80	100
0	6.39	6.29	6.41	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	6.89	6.24	6.24	2.14	8.60	12.53	1.11	2.30	1.46	0.26
2	7.05	6.35	6.29	9.90	8.57	9.96	3.50	3.49	3.68	2.67
3	2.00	6.25	6.92	3.20	11.47	12.61	0.96	5.94	0.80	1.44
4	7.69	6.93	6.60	4.89	11.07	11.71	0.98	6.96	6.46	0.34
5	7.57	7.24	6.39	2.87	10.86	11.67	1.06	7.06	7.76	0.33
6	7.37	7.41	6.52	4.80	8.92	9.23	1.36	4.06	5.05	0.65
7	7.37	7.37	7.41	6.52	4.80	8.92	9.23	1.36	4.06	5.05

#### Rekapitulasi data KMP menggunakan P. cryosporum

#### KMP dilakukan dalam erlenmeyer pada suhu kamar

#### Hubungan antara pH-Gula dan protein

Hari ke	pH					Gula (gram)					Protein (gram)				
	20	40	60	80	100	20	40	60	80	100	20	40	60	80	100
0	6.39	6.29	6.41	0.00	0.00	9.77	14.49	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	6.89	6.24	6.24	9.77	9.17	10.23	10.23	63.00	63.00	47.00	47.00	11.00	11.00	11.00	11.00
2	7.05	6.35	6.29	4.81	4.77	4.81	4.77	6.41	6.41	47.00	44.00	65.00	65.00	65.00	65.00
3	7.74	6.25	6.92	4.85	4.81	4.85	4.81	6.21	6.21	73.00	87.00	74.00	74.00	74.00	74.00
4	7.69	6.93	6.60	5.12	5.04	5.12	5.04	4.69	4.69	65.00	69.00	119.00	119.00	119.00	119.00
5	7.57	7.24	6.39	5.26	5.20	5.26	5.20	5.42	5.42	77.00	65.00	125.00	125.00	125.00	125.00
6	7.37	7.41	6.52	5.42	4.96	5.42	4.96	9.17	9.17	71.00	67.00	110.00	110.00	110.00	110.00



### KMP dilakukan dalam inkubator Hubungan pH dengan Aktivitas enzim

Hari ke	Enzimoglutinato (KU)						Gelatofitotestata (KU)						Pectin (KU)					
	20	40	60	80	100	120	20	40	60	80	100	120	20	40	60	80	100	
0	6.45	6.37	6.47	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
1	6.44	6.41	6.62	3.94	2.42	2.04	1.20	0.50	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
2	6.31	6.32	6.92	7.57	5.56	5.22	2.31	0.97	0.05	0.83	0.93	0.80	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
3	6.72	6.51	7.18	12.00	6.60	13.61	4.98	1.00	0.65	2.40	1.11	0.81	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
4	7.15	6.95	7.04	5.84	6.52	12.05	3.05	0.68	0.68	2.71	1.32	0.54	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
5	7.28	7.25	7.21	6.85	7.46	10.89	2.61	2.07	2.40	1.40	1.06	0.60	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
6	6.69	6.67	7.06	6.10	7.60	11.44	7.11	1.79	4.16	1.94	1.27	0.48	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
7	6.85	6.85	6.95	1.52	1.17	7.55	0.54	0.45	2.42	0.14	0.30	0.43	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
8	6.65	6.87	6.75	1.44	0.99	9.73	0.61	0.23	3.55	0.24	0.24	0.25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	

Rekapitulasi data KMP menggunakan *P. cryosporium*  
KMP dilakukan dalam inkubator  
Hubungan antara pH-Gula dan protein

Hari ke	pH						gula pantesan (mg/ml)						Protein (mg/ml)					
	20	40	60	80	100	120	20	40	60	80	100	120	20	40	60	80	100	
0	6.45	6.37	6.47	15.58	16.20	17.12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
1	6.44	6.41	6.62	10.52	10.97	10.88	7.87	13.00	13.00	13.00	13.00	13.00	8.80	8.80	8.80	8.80	8.80	
2	6.31	6.32	6.92	9.74	9.36	12.45	23.95	34.00	34.00	34.00	34.00	34.00	11.20	11.20	11.20	11.20	11.20	
3	6.72	6.51	7.18	4.44	6.22	6.22	42.67	335.00	335.00	335.00	335.00	335.00	23.00	23.00	23.00	23.00	23.00	
4	7.15	6.95	7.04	6.34	12.91	9.23	55.47	64.00	64.00	64.00	64.00	64.00	24.80	24.80	24.80	24.80	24.80	
5	7.28	7.25	7.21	6.08	16.97	10.72	64.00	43.00	43.00	43.00	43.00	43.00	53.00	53.00	53.00	53.00	53.00	
6	6.69	6.67	7.06	7.74	15.21	11.78	68.00	87.00	87.00	87.00	87.00	87.00	55.00	55.00	55.00	55.00	55.00	
7	6.85	6.85	6.95	8.96	8.93	8.93	120.00	51.00	51.00	51.00	51.00	51.00	88.00	88.00	88.00	88.00	88.00	
8	6.65	6.87	6.75	9.31	8.18	8.18	86.00	87.00	87.00	87.00	87.00	87.00	43.00	43.00	43.00	43.00	43.00	



**Rekapitulasi Data KMP menggunakan N. sitophila  
Dengan Substrat Didelignifikasi dan di aerasi  
Aktifitas enzim kasar**

Jam ke	Endo-glukuronidase (IU/ml)		Beta-glukosidase (IU/ml)		FP-Ase (IU/ml)	
	20	40	20	40	20	40
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
18	0.60	0.64	0.35	0.63	0.30	0.36
36	1.12	0.76	0.36	1.16	0.70	0.46
48	1.54	1.25	1.71	1.74	0.72	0.60
60	1.85	2.44	1.12	2.68	1.26	1.27
72	2.35	3.32	2.01	2.59	1.46	1.15
86	3.27	3.05	2.30	1.83	1.52	0.85
120	2.52	3.17	2.14	2.11	0.88	1.04
144	1.89	2.94	2.62	1.80	0.92	0.86

**Rekapitulasi Data KMP menggunakan N. sitophila  
Dengan Substrat Didelignifikasi dan tidak di aerasi  
Aktifitas enzim kasar**

Jam ke	Endo-glukuronidase (IU/ml)		Beta-glukosida		FP-Ase (IU/ml)	
	20	40	20	40	20	40
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
18	0.35	0.73	0.76	0.88	0.86	0.47
36	1.37	1.68	1.08	0.90	1.28	0.71
48	1.14	2.13	1.04	1.54	1.59	0.88
60	2.35	2.41	1.27	1.88	2.04	1.25
72	3.19	1.85	2.54	2.17	1.62	1.89
86	3.27	3.58	2.58	1.54	2.38	1.87
120	2.42	2.18	1.90	2.04	1.32	1.95
144	2.76	3.09	1.89	1.54	1.29	0.95



**Rekapitulasi Data KMP menggunakan *N. sitophila***  
**Dengan Substrat Didelignifikasi dan di aerasi**  
**Hubungan pH-Gula-protein terlarut**

91

S	pH		Gula pereduksi(mg/ml)		Protein Terlarut	
	20	40	20	40	20	40
0	6.26	6.26	0.00	0.00	0.00	0.00
12	6.31	6.37	4.77	3.04	9.53	9.81
24	6.58	6.32	5.38	4.51	10.87	10.68
36	6.14	6.11	7.26	8.01	10.03	12.32
48	6.04	5.94	8.32	8.63	11.41	13.15
60	5.94	5.88	8.90	11.15	12.29	15.69
72	5.96	5.67	9.80	7.91	13.62	14.18
84	5.87	5.62	11.57	7.65	15.18	16.41
96	5.72	5.51	9.22	7.21	13.21	15.09
108	5.68	5.63	9.05	6.07	11.29	13.14
120	5.61	5.65	10.95	5.25	13.32	12.16

**Rekapitulasi Data KMP menggunakan *N. sitophila***  
**Dengan Substrat Didelignifikasi dan tidak di aerasi**  
**Hubungan pH-Gula-protein terlarut**

Item ke	pH		Gula pereduksi(mg/ml)		Protein Terlarut	
	20	40	20	40	20	40
0	6.17	6.17	0.00	0.00	0.00	0.00
12	6.12	6.15	2.90	2.79	6.99	7.46
24	6.18	6.07	5.59	3.57	7.71	11.92
36	5.80	6.28	6.13	4.09	8.00	13.04
48	5.99	6.06	5.34	6.29	12.74	11.60
60	5.79	5.15	6.80	9.51	14.32	13.43
72	2.52	4.99	8.52	9.20	15.02	12.29
84	5.46	5.20	7.78	10.33	13.64	18.31
96	5.56	5.59	8.51	9.41	14.01	21.64
108	5.77	5.19	6.48	8.79	14.01	17.35
120	5.63	4.73	7.28	9.86	14.78	16.37
122	5.48	4.93	6.78	9.39	11.29	16.01
124	5.61	4.60	6.28	5.26	12.59	14.78



Hasil analisa kandungan selulosa, hemiselulosa dan lignin

KMP dengan T. viride dengan delignifikasi

A = 20 mesh, kadar air awal 2.02 %

Jam ke	Data mentah			Konversi awal			% Konversi		
	selulosa	hemiselulosa	lignin	selulosa	hemiselulosa	lignin	selulosa	hemiselul	lignin
0	19.51	6.41	3.89	63.13	20.71	12.57	0.00	0.00	0.00
60	19.71	2.97	3.46	35.98	5.41	6.30	43.01	73.88	49.88
96	24.99	4.57	5.77	34.66	6.34	8.00	45.10	69.39	36.36

Hasil analisa kandungan selulosa, hemiselulosa dan lignin

KMP dengan T. viride dengan delignifikasi

B = 40 mesh, kadar air awal 4.4 %

Jam ke	Data mentah			Konversi awal			% Konversi		
	selulosa	hemiselulosa	lignin	selulosa	hemiselulosa	lignin	selulosa	hemiselul	lignin
0	17.06	5.22	3.13	52.16	15.96	9.63	0.00	0.00	0.00
60	19.17	5.20	4.70	31.84	8.64	7.81	38.96	45.87	18.90
96	16.19	3.87	3.95	20.41	4.88	4.98	60.87	69.42	48.28

Hasil analisa kandungan selulosa, hemiselulosa dan lignin

KMP dengan T. viride dengan delignifikasi

C = 60 mesh, kadar air awal 3.63 %

Jam ke	Data mentah			Konversi awal			% Konversi		
	selulosa	hemiselulosa	lignin	selulosa	hemiselulosa	lignin	selulosa	hemiselul	lignin
0	16.19	3.95	3.87	57.11	13.93	13.65	0.00	0.00	0.00
60	19.78	5.64	5.81	32.47	9.26	9.54	43.15	33.53	30.11
96	18.47	4.65	4.23	28.04	6.42	7.06	50.90	53.91	48.28

Hasil analisa kandungan selulosa, hemiselulosa dan lignin

KMP dengan *T. viridis* KMP dengan *T. viride* tanpa delignifikasi

A = 20 mesh, kadar air awal 2,02 %

Jenis	Data mentah			Konversi awal			% Konversi		
	seidosa	Hemicelulosa	Lignin	seidosa	hemicelulosa	lignin	seidosa	hemicelulosa	lignin
1	0.00	0.00	0.00	42.24	22.39	28.24	0.00	0.00	0.00
2	8.98	4.56	4.38	36.42	18.48	19.65	13.78	17.46	30.42
3	9.75	6.02	5.07	35.77	13.54	11.49	15.32	43.99	39.31

Hasil analisa kandungan selulosa, hemiselulosa dan lignin

KMP dengan T<sub>1</sub> viride tanpa delignifikasi

B = 40 mesh, kadar air awal 4,4 %

Jml. kg	Data mentah			Konversi awal			% Kohversi		
	celulosa	hemiselulosa	Lignin	celulosa	hemiselulosa	Lignin	celulosa	hemiselulosa	Lignin
0	0.00	0.00	0.00	42.24	22.39	28.24	0.00	0.00	0.00
10	10.22	6.71	5.12	35.85	13.13	20.76	15.13	41.36	26.49
25	9.79	5.43	6.23	36.12	10.04	19.92	14.49	55.16	29.46

Hasil analisa kandungan selulosa, hemiselulosa dan lignin

KMP dengan T. viride tanpa delapanifikasi

$G = 60$  mesh, kadar air awal 3,63 %

Jam re	Data mentah			Konversi awal			% Konversi		
	seitloosa	hemiselosida	Lignin	seitloosa	hemiselosida	Selul	seitloosa	hemiselut	lignin
0	0.00	0.00	0.00	42.24	22.39	28.24	0.00	0.00	0.00
50	9.48	6.66	4.35	34.68	12.36	17.25	17.90	44.93	38.92
95	9.85	5.47	4.68	34.11	10.67	16.74	19.25	52.24	40.72

Hasil analisa kandungan selulosa, hemiselulosa dan lignir

KMP dengan N. sitophila dengan sistem di aerasi

A = 20 mesh, kadar air awal 2.02 %

Jenis	Data inputan			Konversi akar			% konversi		
	sejosa	hemiselul	lignin	sejosa	hemiselulosa	lignin	sejosa	hemiselul	lignin
0	19.51	6.41	3.89	30.18	9.75	6.02	0.00	0.00	0.00
50	14.30	1.70	4.00	21.54	2.20	5.18	28.63	77.89	13.95
95	17.20	2.50	3.90	22.55	2.84	5.08	25.32	71.46	15.45

Hasil analisa kandungan selulosa, hemiselulosa dan lignin

KMP dengan *N. sitophila* dengan sistem di aerasi

B = 40 mesh, kadar air awal 4,4 %

Jan. ke	Data mentan			Konversi awal			% Konversi		
	sektosa	Hemiselulosa	Lignin	sektosa	hemiselulosa	Lignin	sektosa	hemiselulosa	Lignin
0	17.06	5.22	3.15	25.54	7.82	4.72	0.00	0.00	0.00
72	13.80	4.80	3.20	18.88	5.68	2.00	26.06	27.37	4.03
96	16.90	3.70	4.50	18.46	4.09	4.08	27.71	47.70	13.56

2

Hasil analisa kandungan selulosa, hemiselulosa dan lignin

KMP dengan *N. sitophila* dengan sistem tidak di aerasi.

A = 20 mesh, kadar air awal 2,02 %

Jari ke	Data mentas			Konversi awal			% Konversi		
	scissosa	Hemisetafo	Lignin	scissosa	hemisetafo	Lignin	scissosa	Hemisetafo	Lignin
0	19.51	6.41	3.89	33.75	11.09	6.73	0.00	0.00	0.00
60	11.90	3.60	3.30	23.25	4.99	4.58	31.11	55.01	31.95
95	13.40	2.20	2.90	22.31	2.56	3.37	33.90	76.92	49.93

Hasil analisa kandungan selulosa, hemiselulosa dan lignin

KMP dengan *N. sitophila* dengan sistem tidak di aerasi.

B = 40 mesh, kadar air 4,4 %

Jenis K	Data makanan			Konversi awal			% Konversi		
	celulosa	hemiselul	Lipin	celulosa	hemiselulosa	Lipin	celulosa	hemiselul	Lipin
0	17.06	5.22	3.15	30.26	9.26	5.59	0.00	0.00	0.00
72	11.20	2.80	3.10	19.08	3.71	4.11	36.93	59.94	26.48
55	4.80	2.60	2.90	19.74	3.02	3.37	34.76	67.39	39.72



Hasil analisa kandungan selulosa, hemiselulosa dan lignin

KMP dengan P. crysosporium dalam inkubator

A = 20 mesh, kadar air awal 2.02 %

Hari ke	Data mentah			Konversi awal			% Konversi		
	selulosa	hemiselulosa	Lignin	selulosa	hemiselulosa	Lignin	selulosa	hemiselulosa	Lignin
0	0.00	0.00	0.00	42.24	22.39	28.24	0.00	0.00	0.00
5	11.55	8.97	3.12	36.77	20.79	11.23	12.95	7.15	60.23
17	13.24	6.90	3.65	30.70	10.79	8.71	28.81	51.81	69.16

Hasil analisa kandungan selulosa, hemiselulosa dan lignin

KMP dengan P. crysosporium dalam inkubator

B = 40 mesh, kadar air awal 4.4 %

Hari ke	Data mentah			Konversi awal			% Konversi		
	selulosa	hemiselulosa	Lignin	selulosa	hemiselulosa	Lignin	selulosa	hemiselulosa	Lignin
0	0.00	0.00	0.00	42.24	22.39	28.24	0.00	0.00	0.00
5	11.87	7.25	4.35	32.54	13.76	12.26	22.96	38.54	56.59
17	14.21	8.82	5.65	28.04	11.20	10.51	33.62	499.98	62.78

Hasil analisa kandungan selulosa, hemiselulosa dan lignin

KMP dengan P. crysosporium dalam inkubator

C = 60 mesh, kadar air awal 3.63 %

Hari ke	Data mentah			Konversi awal			% Konversi		
	selulosa	hemiselulosa	Lignin	selulosa	hemiselulosa	Lignin	selulosa	hemiselulosa	Lignin
0	0.00	0.00	0.00	42.24	22.39	28.24	0.00	0.00	0.00
5	10.22	8.29	4.23	31.25	17.24	12.79	26.02	23.00	54.71
17	9.60	3.72	3.02	25.10	5.85	7.75	40.79	73.87	72.56

Hasil analisa kandungan selulosa, hemiselulosa dan lignin

KMP dengan P. crysosporium dalam Erlenmeyer

A = 20 mesh, kadar air awal 2.02 %

Hari ke	Data mentah			Konversi awal			% Konversi		
	selulosa	hemiselulosa	Lignin	selulosa	hemiselulosa	Lignin	selulosa	hemiselulosa	Lignin
0	0.00	0.00	0.00	42.24	22.39	28.24	0.00	0.00	0.00
5	11.94	8.37	2.56	23.31	14.24	9.36	44.82	36.40	52.69
17	9.50	4.04	2.69	19.83	6.30	7.17	53.53	71.86	74.61

Hasil analisa kandungan selulosa, hemiselulosa dan lignin

KMP dengan P. crysosporium dalam Erlenmeyer

B = 40 mesh, kadar air awal 4.4 %

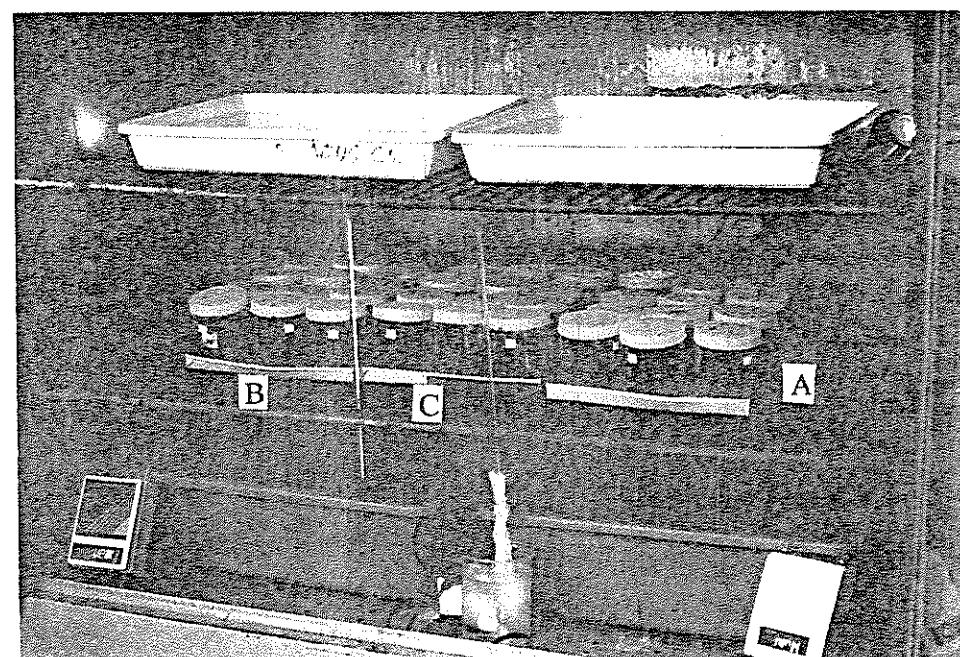
Hari ke	Data mentah			Konversi awal			% Konversi		
	selulosa	hemiselulosa	Lignin	selulosa	hemiselulosa	Lignin	selulosa	hemiselulosa	Lignin
0	0.00	0.00	0.00	42.24	22.39	28.24	0.00	0.00	0.00
5	12.28	8.82	4.86	22.69	14.77	8.14	46.28	34.03	71.18
17	11.66	9.35	4.22	17.31	13.88	6.27	59.02	38.01	76.34

Hasil analisa kandungan selulosa, hemiselulosa dan lignin

KMP dengan P. crysosporium dalam Erlenmeyer

C = 60 mesh, kadar air awal 3.63 %

Hari ke	Data mentah			Konversi awal			% Konversi		
	selulosa	hemiselulosa	Lignin	selulosa	hemiselulosa	Lignin	selulosa	hemiselulosa	Lignin
0	0.00	0.00	0.00	42.24	22.39	28.24	0.00	0.00	0.00
5	10.42	6.03	3.00	21.65	10.75	8.36	48.75	51.99	61.93
17	8.74	7.20	3.92	18.74	11.32	6.16	55.63	49.44	78.17

**Lampiran 2. Gambar Penampakan KMP Menggunakan *Trichoderma viride*****Keterangan :**

Kondisi kultivasi pada umur 24 jam, A = 20 mesh, B = 40 mesh dan C = 60 mesh.

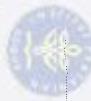
**Lampiran 3. Gambar Penampakan KMP Menggunakan *Neurospora sitophila*****Keterangan :**

- Kondisi KMP pada umur 44 jam, A = 20 mesh, B = 40 mesh, 1 = sistem dengan aerasi dan 2 = sistem tidak diaerasi.

**Lampiran 4. Gambar Penanaman KMP Menggunakan *Phanerochaete crysosporium***

Keterangan :

Kondisi KMP pada umur 4 hari, A = 20 mesh, B = 40 mesh dan C 60 mesh, 1 = KMP pada Inkubator dan 2 = KMP pada Erlenmeyer.



## Lampiran 5. Prosedur dan Cara Analisis Sampel

### 1. Pengukuran pH

Sebanyak satu sampai dua gram sampel dilarutkan dalam limapuluhan mililiter aquades dalam suatu tabung reaksi atau labu erlemeyer. Pengadukan dilakukan dengan merata menggunakan homogenizer, diendapkan dan kemudian pengukuran dilakukan dengan pH-meter.

### 2. Kadar Protein (Lowry, 1952)

Empat jenis pereaksi yaitu A, B, C, dan D dibuat dalam labu erlemeyer. Masing-masing pereaksi adalah pereaksi A = dua gram Natrium karbonat dilarutkan dalam 100 ml larutan NaOH 0.1 N. Pereaksi B = 0.5 gram kuprisulfat pentahidrat dilarutkan dalam 100 ml potassium nitrat dengan konsentrasi 1 persen. Pereaksi C = 50 bagian dari pereaksi A ditambah satu bagian pereaksi B. Pereaksi D = Satu bagian folin clalteu dengan satu bagian aquades.

Satu bagian filtrat substrat ditambahkan dengan lima mililiter pereaksi C dan dibiarkan selama 10 menit. Kemudian ditambah dengan 0.5 mililiter pereaksi D dan dibiarkan selama 30 menit pada suhu kamar. Larutan yang ada dipipet 5 mililiter dan dimasukkan ke dalam kuvet untuk diukur absorbasinya pada panjang gelombang 550 nm.

Kurva standar ditetapkan dengan lartan *bovine serum albumin* pada selang konsentrasi 25 - 300 mikrogram per mililiter. Dari persamaan yang diperoleh, konsentrasi sampel dapat dihitung.

### 3. Kadar Gula Pereduksi DNS (Miller, 1959)

#### a. Pembuatan pereaksi DNS

Sebanyak 10.6 gram asam 3,5 dinitrosalisilat dan 19.8 gram NaOH dilarutkan ke dalam 1416 mililiter aquades. Kemudian ditambahkan 306 gram Na-K-Tartrat, 7.6 mililiter fenol yang telah dicairkan pada suhu 50 °C dan 8.3 gram Na-metabisulfit, kemudian dicampurkan secara merata. Keasaman pereaksi DNS ditentukan dengan cara titrasi. Sebanyak 3 mililiter larutan DNS diambil dan dititrasi dengan HCl 0.1 N, menggunakan fenolptalin sebagai indikator (biasanya 5 - 6 ml). Selanjutnya ditambahkan dua gram NaOH untuk setiap ml kekurangan HCl 0.1 N pada saat titrasi.

#### b. Persiapan Sampel

Untuk menentukan kadar gula pereduksi dengan DNS, sampel harus dalam keadaan larutan jernih. Sampel yang mengandung gula pereduksi dijernihkan dengan Pb-asetat jenuh tetes demi tetes. Kelebihan Pb-asetat dihilangkan dengan menambahkan tetes demi tetes Natrium karbonat 8 persen. Selanjutnya filtrat disaring atau disentrifuse untuk mendapatkan filtrat jernih yang siap untuk diukur kandungan gula pereduksinya.

**c. Pembuatan Kurva Standar**

Kurva standar dibuat dengan melarutkan glukosa dengan konsentrasi pada selang 0.2 - 0.5 mg/ml. Blanko dibuat dengan proedur yang sama, tetapi hanya menggunakan buffer atau aquades.

**d. Pengukuran Gula Pereduksi**

Filtrat jernih sebanyak 1 ml ditambah dengan 3 ml pereaksi DNS, dan dipanaskan dalam penangas air selama lima menit, kemudian didinginkan pada suhu kamar. Pembacaan OD dilakukan dengan spektroskopy pada panjang gelombang 550 nm. Hasil pengukuran diperhitungkan dengan kurva standar yang telah dibuat.

**4. Kadar Selulosa dan Lignin (Goering dan Van Soest, 1970)**

Sampel berukuran 20 - 30 mesh sebanyak 1 gram dinalisis serat deterjen asam-nya (ADF = W1). Cawan pengabuan ditempatkan pada talam berisi air setinggi 1 cm (serat jangan sampai basah). Reagen A ditambahkan sebanyak 25 mililiter ke dalam talam ditambahkan sampai 2 - 3 cm, diaduk dan dibiarkan selama 90 menit. Jika perlu ditambahkan reagen A (warna Ungu). Kemudian dilakukan penyaringan secara vacum, cawan ditempatkan pada talam yang bersih. Ke dalam cawan ditambahkan reagen B sampai setengahnya, dan setelah 5 menit dilakukan penyaringan sampai serat menjadi 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 500 °C selama dua jam, didinginkan dan ditimbang (W3).

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

$$\text{Kadar Lignin} = ((W1 - W2)/S) \times 100 \%$$

Reagen A dibuat dengan komposisi 50 gram kalium permanganat, 0.05 gram perak sulfat dalam satu liter aquades. Kalium permanganat dan perak sulfat dilarutkan dalam air dan dijauhkan dari sinar matahari. Reagen B dibuat dengan komposisi 50 gram asam oksalat dihidrat, 700 ml etanol 95 persen, 50 ml HCl pekat (12 N) dalam aquades 250 ml. Asam oksalat dilarutkan dalam etanol kemudian ditambahkan asam klorida dan air.

Analisis ADF atau *Acid Detergent Fiber* dilakukan dengan menimbang sampel kering berukuran 20 - 30 mesh sebanyak kurang lebih satu gram, ditambahkan 100 ml reagent ADF dan dua ml Dekahidronaftalena dalam labu refluks. Setelah dididihkan 5 - 10 menit direfluks selama 60 menit dan disaring dengan vakum dalam cawan pengabuan pengaabuan yang telah diketahui bobotnya. Sampel kemudian dicuci dengan air panas dan disaring kembali. Kemudian dicuci dengan aseton dan heksan hingga sampel tidak berwarna. Cawan berisi sampel dikeringkan pada suhu 100 °C selama semalam.



$$ADF = \frac{(W_1 - W_0)}{S} \times 100 \%$$

$W_1$  = bobot Cawan berisi

$W_0$  = Bobot Cawan kosong

S = Bobot sampel kering

## 6. Penentuan Kadar Hemiselulosa

Kadar hemiselulosa diperoleh dengan menghitung selisih NDF (Neutral Detergent Fiber) dengan ADF. Analisa NDF (serat deterjen netral) dilakukan dengan menimbang 0.5 - 1.0 gram sampel berukuran 20 - 30 mesh dan kemudian dimasukkan dalam labu refluks, ditambahkan 100 ml reagent NDF, 2.0 ml Dekahidronaftalena dan 0.5 gram sodium sulfit kemudian dididihkan 5.0 - 10 menit. Setelah mendidih direfluks selama 60 menit dan disaring dengan Goog Cawan pengabuan yang telah diketahui bobotnya secara vakum. Dengan air panas sampel dicuci dan disaring beberapa kali. Pencucian terakhir dilakukan dengan aseton dua kali dan disaring kembali. Cawan dikeringkan pada 100 °C selama semalam.

$$NDF = \frac{(W_1 - W_0)}{S} \times 100 \%$$

$W_1$  = Bobot Cawan berisi

$W_0$  = Bobot Cawan Kosong

S = Bobot sampel kering

Kadar hemiselulosa = NDF - ADF. Reagen NDF dibuat dengan komposisi sodium dedosil sulfat 30.00 gram, EDTA 18.61 gram, sodium borat dekahidrat 6.81 gram, disodium hidrogen sulfat 4.56 gram etilen dlikol moetyl eter 10.00 ml dan aquades satu liter.

EDTA dan sodium borat dekahidrat dimasukkan dalam gelas piala, ditambahkan air secukupnya dan dipanaskan sampai larut. Larutan yang dihasilkan ditambahkan ke sodium dedosil sulfat dan etilen glikol monoetileter. Disodium hidrogen sulfat dimasukkan ke dalam gelas piala dan dipanaskan hingga larut dan dicampurkan dengan larutan sebelumnya, pH diatur 6.7 - 7.1.

Reagen ADF dibuat dengan komposisi kimia asam sulfat 49.00 gram, cetil trimetil ammonium bromida 20.00 gram dan aquades satu liter. Larutan asam sulfat dibuat dan di-standardisasi dengan cara titrasi (1 N), kemudian ditambahkan cetil trimetil ammonium bromida.



7.

## Analisa Aktifitas Enzim Kasar

102

Pengukuran aktifitas ketiga kelompok enzim selulase, yaitu endoglukanase, selbiohidrolase dan  $\beta$ -glukosidase dilakukan dengan cara mengukur produksi dari enzim CMC-ase yang menghidrolisa CMC, enzim FP-ase yang menghidrolisa kertas saring whatman no. 1 (FP-ase) dan enzim salisinase yang menghidrolisis salisin (mandels *et al.*, 1976 ; Breuil *et al.*, 1986). Produksi dari semua enzim tersebut diukur dengan cara mengukur gula pereduksi yang dihasilkan, yaitu berupa glukosa untuk kelompok enzim selulase yang dilakukan dengan metoda DNS. Untuk mengetahui aktifitas spesifik dari enzim (IU/mg protein), diperlukan data kadar protein filtrat. Kadar protein terlarut dari filtrat enzim diukur dengan metode Bradford (1976).

### a. Pengujian Aktifitas CMC-ase (Endoglukanase)

Karboksimetil selulosa yang akan digunakan sebagai substrat diukur dulu derajat substitusinya (DS) dengan melakukan titrasi menggunakan alkali. Penentuan derajat substitusi CMC dilakukan dengan cara sebagai sebanyak 100 mg CMC yang berada dalam erlemeyer berukuran 250 ml diberi 10 ml NaOH 0.1 N, kemudian digoyang sehingga semua CMC larut sebagai garam natrium. Setelah beberapa jam, alkali yang digunakan untuk membentuk garam ditentukan jumlahnya dengan cara menitrasikan larutan tersebut dengan larutan HCl 0.1 N. Melalui rumus di bawah ini dapat diketahui derajat dari substitusi CMC.

$$a = (W \times S) / ((162 + 58) \times S)$$

dimana a adalah miliequivalen alkali yang terpakai, W adalah bobot kering CMC dalam mg, 162 merupakan bobot sati residu glukosa dan 58 merupakan kenaikan bobot rumus per  $-\text{CH}_2\text{COOH}$  dan S adalah derajat substitusi.

Penentuan nilai aktifitas CMC-ase dilakukan dengan cara sebagai berikut : Sebanyak 0.5 ml larutan enzim dan 0.5 ml larutan CMC satu persen diinkubasi pada suhu 48 °C selama 30 menit. Untuk menghentikan reaksi ditambahkan pereaksi DNS sebanyak 3 ml, dan dipanaskan dalam air mendidih selama lima menit. Setelah dingin disentrifugasi pada kecepatan 3000 x gr selama 15 menit. Kandungan glukosa yang terbentuk diukur pada spektrofotometri pada panjang gelombang 515 nm. Blanko yang terdiri dari 1.0 ml buffer dan 3.0 ml pereaksi DNS digunakan untuk menentukan titik nol absorbansi. Pengukuran gula pereduksi dilakukan juga terhadap filtrat enzim tanpa substrat dan substrat tanpa enzim. Pengukuran tersebut digunakan untuk mengoreksi nilai gula reduksi yang dihasilkan dari hidrolisis substrat oleh enzim yang terdapat pada sampel. Bila nilai gula sampel berada diluar batas absorbansi standar, maka dilakukan pengenceran filtrat enzim dengan menggunakan larutan buffer sitrat 0.05 M. Perhitungan untuk mendapatkan aktifitas enzim CMC-ase dibuat berdasarkan bahwa satu  $\mu$  mol glukosa = 0.18 mg dan satu unit aktifitas CMC-ase adalah satu



$\mu$  mol glukosa yang dihasilkan per menit. Apabila inkubasi dilakukan selama 30 menit, maka 1 mg glukosa yang dihasilkan per ml adalah :

$$(1/(30 \times 0.18)) \times (\text{Unit/Menit.mg Glukosa}) = \\ 0.185 \times (\text{Unit/menit.mg glukosa})$$

Satu unit enzim =

$$\frac{\text{mg glukosa} \times 0.185}{\text{setiap ml enzim}} \times \text{Unit CMC-ase (IU/ml) menit.mg glukosa}$$

#### b. Pengujian Aktifitas Salisinase ( $\beta$ -glukosidase)

Pereaksi yang dibutuhkan untuk pengujian ini dan prosedurnya sama dengan yang digunakan pada pengujian CMC-ase, hanya saja pada pengujian ini digunakan salisin pada konsentrasi satu persen sebagai substrat.

#### c. Pengujian Aktifitas Total Selulase (FP-ase)

Pereaksi yang dibutuhkan untuk pengujian ini sama dengan yang digunakan pada pengujian CMC-ase. Hanya pada pengujian aktifitas FP-ase digunakan kertas saring whatman no. 1 ukuran 1 x 6 cm (50 mg) sebagai substrat.

Penentuan nilai aktifitas enzim dilakukan sebagai berikut : Filtrat enzim sebanyak 0.5 ml dan larutan buffer sebanyak 1.0 ml beserta kertas saring diinkubasikan selama satu jam pada suhu 48 °C. Reaksi dihentikan dengan menambahkan tiga ml pereaksi DNS dan dipanaskan dalam air mendidih selama lima menit. Penentuan gula pereduksi yang dihasilkan oleh enzim dilakukan sama dengan penentuan aktifitas enzim lainnya. sehingga apabila inkubasi dilakukan selama satu jam, maka satu mg glukosa yang dihasilkan per ml filtrat :

$$(1/60 \times 0.18) = 0.0925 \text{ unit, sehingga}$$

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