

C/PTP
2001
0089

PEMANFAATAN LIMBAH AGAR-AGAR KERTAS UNTUK PRODUKSI ENZIM SELULASE DARI KAPANG *Trichoderma viride*

Oleh:

**SRI HARTATI
C03496053**

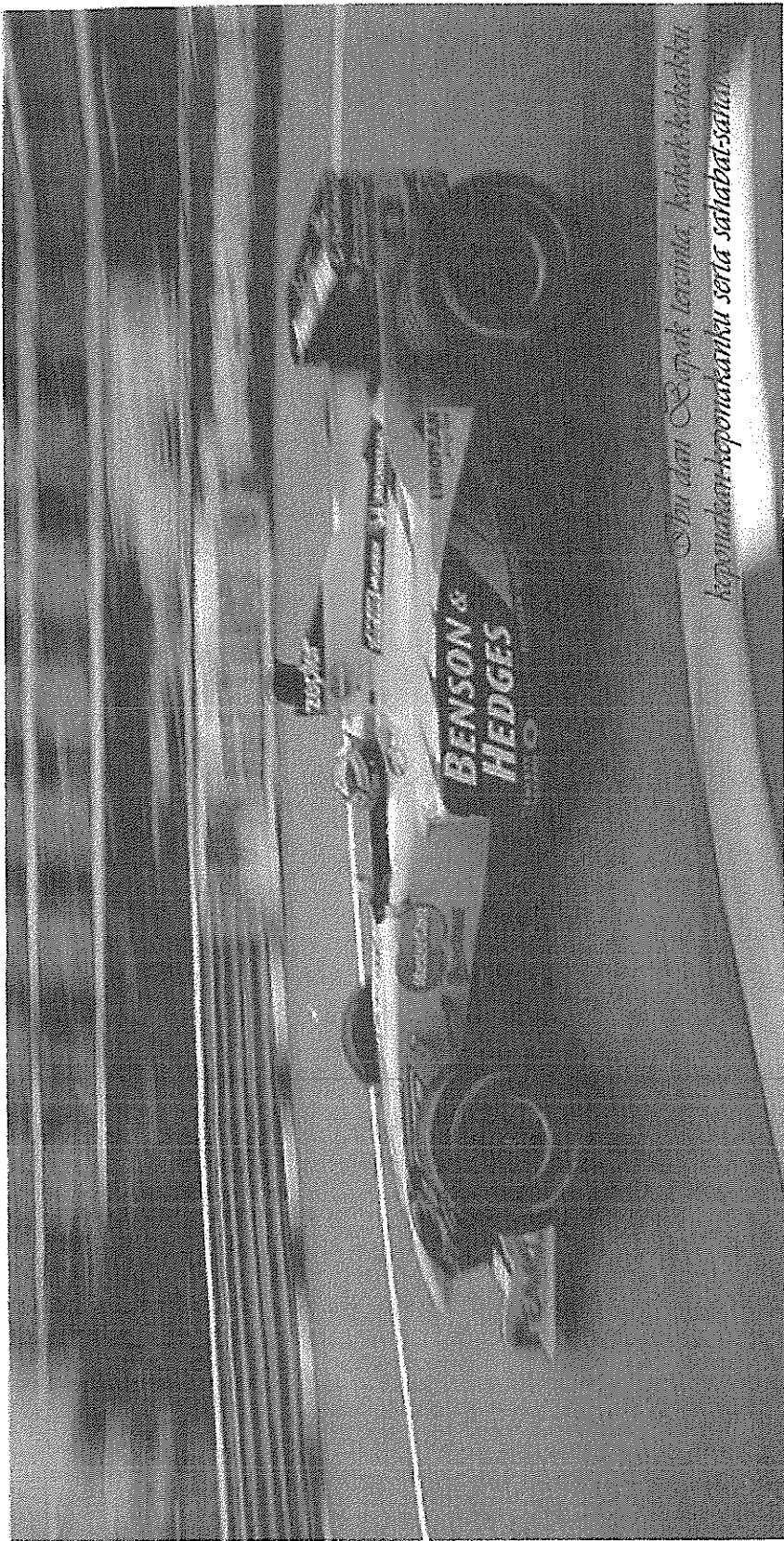
SKRIPSI

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh Gelar Sarjana
pada Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan**



**PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
2001**

Dan Dialah yang menjadikan binatang-binatang bagimu
agar kamu menyadarkannya pernyataan kegelapan di darat dan di laut.
Sesungguhnya kami telah menjelaskan tanda-tanda kebesaran (kami)
kepada orang-orang yang mengetahui.
(Al - Anam : 97)



Siapa yang tidak berharap
kemudian membangunku serta setia bersamaku

SRI HARTATI. C03496053. Pemanfaatan Limbah Agar-agar Kertas untuk Produksi Enzim Selulase dari Kapang *Trichoderma viride*. (Dibawah Bimbingan SRI PURWANINGSIH dan RUDDY SUWANDI).

RINGKASAN

Industri pembuatan agar-agar kertas menghasilkan limbah hasil samping pengolahan yang cukup banyak. Penanggulangan dan pemanfaatan limbah ini belum tertangani secara baik sehingga perlu mendapatkan perhatian yang cukup. Limbah pengolahan agar-agar kertas merupakan salah satu limbah yang banyak mengandung komponen lignoselulotik yang dapat dimanfaatkan sebagai medium pertumbuhan mikroorganisme. Penelitian ini bertujuan untuk memanfaatkan limbah agar-agar kertas sebagai medium fermentasi kapang *Trichoderma viride* untuk produksi enzim selulase.

Penelitian ini dilakukan dalam dua tahap. Penelitian tahap I bertujuan untuk mendapatkan serbuk limbah pengolahan agar-agar kertas yang akan digunakan untuk media pertumbuhan kapang *Trichoderma viride*. Serbuk limbah agar-agar kertas dianalisis kadar air, abu, protein, lemak, karbohidrat, selulosa, hemiselulosa, lignin, dan serat kasar. Penelitian tahap II bertujuan untuk mempelajari pengaruh penambahan nutrisi dan waktu inkubasi terhadap aktivitas enzim selulase yang dihasilkan. Sebanyak 10 gram serbuk limbah agar-agar kertas dimasukkan ke dalam erlenmeyer berkapasitas 250 ml dan ditambahkan larutan nutrisi sesuai perlakuan yaitu 0:4 (A₁), 1:4 (A₂), 2:4 (A₃) terhadap substrat. Kemudian ditambahkan akuades hingga kadar air mencapai 80 % berat basah dan disterilkan pada suhu 121°C selama 30 menit. Biakan *Trichoderma viride* yang berumur 7 hari pada agar miring disuspensiikan ke dalam 10 ml akuades steril. Suspensi kapang ini sebanyak 4 % diinokulasikan ke dalam media pertumbuhan yang telah steril, kemudian diinkubasikan pada suhu 30°C selama 3 hari (B₁), 6 hari (B₂), 9 hari (B₃), dan 12 hari (B₄). Ekstraksi dilakukan dengan menambahkan larutan pengekstrak (Tween 80 0,2 %) sebanyak 10 kali berat substrat dan dikocok dengan menggunakan shaker 150 rpm selama satu jam. Selanjutnya disentrifusi dengan kecepatan 2000 rpm selama 20 menit untuk menghasilkan filtrat enzim kasar. Enzim kasar yang diperoleh di uji aktivitas selulase total (*filter paperase*), aktivitas endoglukanase (*carboxy methyl celulase*), gula pereduksi, protein terlarut, dan pH.

Rancangan percobaan yang digunakan yaitu rancangan acak lengkap pola faktorial 3 x 4 untuk aktivitas enzim, gula pereduksi, protein terlarut, dan pH dengan uji lanjut Duncan.

Hasil analisis terhadap komponen kimia limbah pengolahan agar-agar kertas setelah dikeringkan dengan *drum drier* mempunyai kadar air 7,63 %, kadar abu 15,30 %, protein 15,53 %, lemak 0,19 %, karbohidrat (*by difference*) 61,35 %, selulosa 16,03 %, hemiselulosa 25,23 %, lignin 3,10% dan serat kasar 11,56 %.

Aktivitas *filter paperase* (FP-ase) yang dihasilkan oleh kapang *Trichoderma viride* berkisar antara 0,120-0,387 Unit/ml filtrat biakan dengan nilai rata-rata 0,236 Unit/ml filtrat biakan. Aktivitas *carboxy methyl celulase* (CMC-ase) yang dihasilkan oleh kapang *Trichoderma viride* berkisar antara 0,3472-0,9510 Unit/ml filtrat biakan dengan nilai rata-rata 0,6235 Unit/ml filtrat biakan. Kandungan gula pereduksi yang dihasilkan oleh kapang *Trichoderma viride* berkisar antara 0,0757-0,2454 mg/ml filtrat biakan dengan nilai rata-rata 0,1755mg/ml filtrat biakan. Kandungan protein terlarut yang dihasilkan oleh kapang *Trichoderma viride* berkisar antara 1,585-5,89 mg/ml filtrat biakan dengan nilai rata-rata 4,066 mg/ml filtrat biakan. Nilai pH yang didapatkan selama fermentasi berkisar antara 5,15-6,70. Analisis sidik ragam perlakuan penambahan nutrisi, waktu inkubasi, dan interaksi antara keduanya menunjukkan hasil yang berbeda nyata.

Kondisi terbaik untuk produksi enzim selulase dari serbuk limbah agar-agar kertas dengan menggunakan kapang *Trichoderma viride* pada penelitian ini secara umum adalah pemberian nutrisi tambahan dengan perbandingan 2:4 terhadap substrat dan lama inkubasi 12 hari dengan pH 5,5.

Penelitian ini masih merupakan penelitian pendahuluan dimana enzim yang dihasilkan masih belum optimum sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk pemurnian enzim selulase dan peggunaan kapang dari jenis yang berbeda.

SKRIPSI

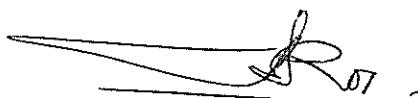
Judul : Pemanfaatan Limbah Agar-agar Kertas untuk Produksi Enzim Selulase dari Kapang *Trichoderma viride*
Nama Mahasiswa : SRI HARTATI
Nomor Pokok : C03496053
Program Studi : Teknologi Hasil Perikanan

Menyetujui,

I. Pembimbing



Ir. Sri Purwaningsih, MSi.
Ketua

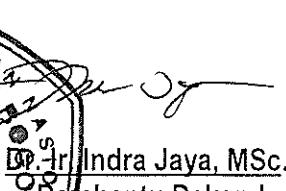


Ir. Ruddy Suwandi, MS., MPhil.
Anggota

II. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan



Ir. Ruddy Suwandi, MS., MPhil.
Ketua Program Studi



Dr. Ir. Indra Jaya, MSc.
Bebantuan Dekan I

Tanggal lulus : 14 Mei 2001

DAFTAR RIWAYAT HIDUP



Penulis dilahirkan di Bandar Lampung pada tanggal 13 April 1977 dari pasangan Bapak Ngatmin dan Ibu Harni merupakan anak ke sembilan dari sembilan bersaudara. Penulis menempuh pendidikan Sekolah Dasar di SDN 2 Natar Lampung Selatan dan lulus pada tahun 1989. Pada tahun 1992 penulis berhasil menyelesaikan Sekolah Menengah Pertama di SMPN 1 Natar Lampung Selatan. Penulis menyelesaikan pendidikan di SMAN 3 Tanjung Karang dan lulus tahun 1995. Pada tahun 1995 penulis diterima di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Jurusan Kimia UNILA. Dan pada tahun 1996 penulis diterima di Institut Pertanian Bogor melalui Ujian Masuk Perguruan Tinggi Negeri (UMPTN), di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Jurusan Teknologi Hasil Perikanan.

Selama menjadi mahasiswa Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Jurusan Teknologi Hasil Perikanan penulis menjadi pengurus Himpunan Mahasiswa Teknologi Hasil Perikanan (HIMASILKAN) periode tahun 1997-1999. dan menjadi asisten luar biasa pada mata kuliah Ekologi Perairan, Teknologi Pengolahan Hasil Perikanan Tradisional, Komoditi Hasil Perikanan, dan Biokimia Hasil Perikanan.

Penulis menyelesaikan tugas akhir dengan judul **Pemanfaatan Limbah Agar-agar Kertas untuk Produksi Enzim Selulase dari Kapang *Trichoderma viride*** dan dinyatakan lulus pada tanggal 14 Mei 2001.

KATA PENGANTAR

بِسْمِ اللّٰهِ الرَّحْمٰنِ الرَّحِيْمِ

Segala puji dan syukur semoga selalu penulis panjatkan kepada Allah SWT atas rahmat dan hidayah-Nya yang selalu tercurah sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan baik. Skripsi ini berjudul Pemanfaatan Limbah Agar-agar Kertas untuk Produksi Enzim Selulase dari Kapang *Trichoderma viride* yang membahas tentang pemanfaatan limbah agar-agar kertas sebagai medium fermentasi kapang *Trichoderma viride* dan aktivitas enzim selulase yang dihasilkan dari kapang tersebut. Skripsi ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana pada Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor.

Dalam kesempatan ini penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada Ibu Ir. Wini Trilaksani, MSc. selaku ketua Jurusan Teknologi Hasil Perikanan dan Ibu Ir. Sri Purwaningsih, MSi. selaku ketua komisi pembimbing skripsi serta Bapak Ir. Ruddy Suwandi MS., MPhil selaku anggota komisi pembimbing yang telah membantu penulis dalam penyusunan skripsi ini. Terima kasih juga penulis ucapkan kepada Ibu Tati Nurhayati, SPI., MSi. yang telah bersedia menjadi dosen penguji, atas masukannya guna lebih menyempurnakan skripsi ini, Pak Uju, SPI. atas kesediaannya menjadi moderator pada seminar hasil penelitian, serta seluruh staf Jurusan Teknologi Hasil Perikanan.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu kritik dan saran yang membangun akan penulis terima dengan senang hati dan penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi penulis sendiri dan terutama bagi pembaca.

Bogor Mei 2001

Penulis

□ UCAPAN TERIMA KASIH

- Ibu dan Bapak serta kakak-kakakku tersayang atas semua kasih sayang, perhatian, dukungan dan do'a restu yang senantiasa diberikan selama ini.
- Ibu Ir. Sri purwaningsih, MSi. dan Bapak Ir. Ruddy Suwandi, MS. MPhil selaku dosen pembimbing yang dengan sabar membimbing, mengarahkan dan memberi semangat selama pelaksanaan penelitian sampai penyusunan skripsi ini.
- Ibu Tati Nurhayati, S.Pi, MSi. selaku dosen penguji yang telah banyak memberi masukan demi kesempurnaan skripsi ini
- Kang Uju, S.Pi. selaku moderator seminar hasil penelitian
- Bapak Ir. Sukarno, MSc. Atas kesedianya menjadi dosen pembimbing sementara
- Staf Jurusan Teknologi Hasil Perikanan
- Mbak Eni, Mbak pepy, dan mbak emi (PAU) atas bantuan yang diberikan
- Ibu Wayan, m'dede, Pak Rahman, Feby, Herman (LIPI-Cibinong) atas bantuan yang diberikan, walaupun harus kutinggalkan
- Untuk orang-orang yang selalu membuatku bersyukur bersamanya (Susi, Inoenk, Vien) untuk persahabatan terindah yang diberikan "semoga kasih sayang itu selalu ada dimana dan dalam keadaan apapun kita nanti (like my classic history)"
- Heru Gustian untuk semangat, Do'a, pelajaran berharga dan kenangannya "semoga persahabatan ini selalu terjaga"
- Untuk teman-temanku THP'33 : Hendra (kemana aja coy.), Lukman, Lulusuk (cepet nyusul ya..), Heksi, Aam, Soni, Tati (A'Erik dan Aura cayang), Brenda (jangan nangis lagi ya....), Nurholik, Eno (cepet married ya...), Rita, Wendi, Erny, Rani, Ipus, Steven, Egi, Esih, Maya (Kapan marriednya..), Dimas, Umbu, Gunadi, Asep (makasih udah mau nungguin ujian), Birtoni (selamat berjuang and nikmati kegagalan), Dedy, Rini, Tari + Dino, Indah (kurus dikit napa), Novita, Heru + Salma (masakannya enak, sering" ya..), Dewi, Iza, Enung, Sane, dan Kjky(makan-makannya kapan..) untuk kebersamaannya selama ini

- Ribut (transparasinya oke juga), Mulyadi (makasih ide dan bantuannya), dan Dodo (kayaknya kurang asik kalau enggak ngerepotin)
- Ani (makasih agar miring dan pinjaman bukunya), Hendar, Bond, Ecom, Wanda, Nia, Emi, spesial untuk Ari (makasih untuk persahabatannya)
- Untuk adik-adik kelasku THP dan AHP yang ikut mewarnai hidupku
- Temen-teman "kurnia boarding house" Ambar yang baik, pipit (cepet nyusul ya....), rika (main m'lulu), tirin (jagaai ayamnya), ryan (banyakin makannya yaa..), siska (laporan terus...), tita (jangan mainin anak yatim), m'deni (selamat menempuh hidup baru), m'rini, K'memey untuk semangat, dukungan dan kenyamanan yang diberikan
- Temen-temen "Afra" : Mia, m'Fit dan keluarga, m'santi, kedua yeni, eno, eik, m'inoenk, kedua heni, wiwit, m'is dan m'lia.
- Rahmat Budi Santoso atas semangat dan do'anya
- Putu, Tanti (kapan sich enggak buat sebel), Wida untuk persahabatannya
- Temen-temen di FMIPA Kimia UNILA "95" terutama untuk ita dan eko (kapan ya...gua nyusul), wiji dan keluarga, andri untuk masa-masa yang indah
- For My inspiration "DD" that make my life so peaceful
- Spesial untuk Ibu Sri Purwaningsih untuk semua kebaikan yang diberikan selama ini
- Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu yang telah membantu dalam menyelesaikan penyusunan skripsi ini.

DAFTAR ISI

| | Halaman |
|--|---------|
| DAFTAR TABEL | iv |
| DAFTAR GAMBAR | v |
| DAFTAR LAMPIRAN..... | vi |
| 1. PENDAHULUAN | 1 |
| 1.1 Latar Belakang | 1 |
| 1.2 Tujuan | 2 |
| 1.3 Waktu dan Tempat..... | 2 |
| 2. TINJAUAN PUSTAKA..... | 3 |
| 2.1 Kapang <i>Trichoderma viride</i> | 3 |
| 2.2 Limbah Pengolahan Agar-agar Kertas | 4 |
| 2.3 Komponen Lignoselulotik | 5 |
| 2.3.1 Selulosa | 5 |
| 2.3.2 Hemiselulosa | 6 |
| 2.3.3 Lignin | 7 |
| 2.4 Mikroba Penghasil Selulase | 7 |
| 2.5 Enzim Selulase | 8 |
| 2.6 Biosintesa Enzim Selulase | 10 |
| 2.7 Fermentasi | 11 |
| 3. METODOLOGI | 14 |
| 3.1 Bahan dan Alat..... | 14 |
| 3.1.1 Bahan | 14 |
| 3.1.2 Alat | 14 |
| 3.2 Metode Penelitian | 14 |
| 3.2.1 Penelitian tahap I | 14 |
| 3.2.1.1 Kadar air | 15 |
| 3.2.1.2 Kadar abu | 15 |
| 3.2.1.3 Kadar protein | 16 |
| 3.2.1.4 Kadar lemak | 16 |
| 3.2.1.5 Kadar karbohidrat | 17 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2.1.6 Kadar serat kasar | 17 |
| 3.2.1.7 Neutral detergent fiber (NDF) | 18 |
| 3.2.1.8 Acid detergent fiber (ADF) | 18 |
| 3.2.1.9 Hemiselulosa | 19 |
| 3.2.1.10 Lignin dan selulosa | 19 |
| 3.2.2 Penelitian tahap II | 20 |
| 3.2.2.1 Persiapan medium fermentasi | 20 |
| 3.2.2.2 Pembuatan inokulum | 20 |
| 3.2.2.3 Ekstraksi enzim kasar | 20 |
| 3.3 Analisa Produk Akhir | 21 |
| 3.3.1 Pengujian aktivitas enzim <i>filter paperase</i> | 21 |
| 3.3.2 Pengujian aktivitas enzim carboxy methyl celulase | 21 |
| 3.3.3 Pengujian kadar gula pereduksi | 22 |
| 3.3.4 Pengujian protein terlarut | 22 |
| 3.3.5 Derajat keasaman (pH) filtrat | 23 |
| 3.4 Analisa Data | 23 |
| 4. HASIL DAN PEMBAHASAN | 24 |
| 4.1 Analisa Kimia Limbah Agar-agar Kertas | 24 |
| 4.2 Aktivitas FP-ase Selama Fermantasi | 25 |
| 4.3 Aktivitas CMC-ase Selama Fermentasi | 28 |
| 4.4 Gula Pereduksi Selama Fermentasi | 30 |
| 4.5 Protein Terlarut Selama Fermentasi | 32 |
| 4.6 Derajat Keasaman (pH) | 34 |
| 5. KESIMPULAN DAN SARAN | 37 |
| 5.1 Kesimpulan | 37 |
| 5.2 Saran | 38 |
| DAFTAR PUSTAKA | 39 |
| LAMPIRAN | 43 |

DAFTAR TABEL

| Nomor | Teks | Halaman |
|-------|--|---------|
| 1. | Analisis Kimia Limbah Agar-agar Kertas | 24 |
| 2. | Aktivitas FP-ase Selama Fermentasi oleh <i>Trichoderma viride</i> | 25 |
| 3. | Aktivitas CMC-ase Selama Fermentasi oleh <i>Trichoderma viride</i> | 28 |
| 4. | Kandungan Gula Pereduksi Selama Fermentasi oleh <i>Trichoderma viride</i> | 31 |
| 5. | Kandungan Protein Terlarut Selama Fermentasi oleh <i>Trichoderma viride</i> | 33 |
| 6. | Hasil Pengukuran pH Selama Fermentasi | 35 |

DAFTAR GAMBAR

| Nomor | Teks | Halaman |
|-------|---|---------|
| 1. | <i>Trichoderma viride</i> | 3 |
| 2. | Struktur Kimia Selulosa (Bastaman, 1989)..... | 6 |
| 3. | Struktur Kimia Hemiselulosa | 6 |
| 4. | Pengelompokan Enzim Selulase Berdasarkan Spesifitas Substrat Masing-masing (Enari, 1983) | 9 |
| 5. | Mekanisme Hidrolisis Selulosa secara Enzimatis (Reese <i>et al.</i> , 1950 <i>dalam</i> Muchtadi <i>et al.</i> , 1992)..... | 9 |
| 6. | Aktivitas FP-ase Selama Fermentasi oleh <i>Trichoderma viride</i> | 26 |
| 7. | Aktivitas CMC-ase Selama Fermentasi oleh <i>Trichoderma viride</i> | 29 |
| 8. | Kandungan Gula Pereduksi Selama Fermentasi | 31 |
| 9. | Kandungan Protein Terlarut Selama Fermentasi | 33 |
| 10. | Pengukuran pH Selama Fermentasi..... | 35 |

DAFTAR LAMPIRAN

| Nomor | Halaman |
|--|---------|
| 1. Diagram Alir Proses Produksi Enzim Selulase (Pratiwi, 1994) | 43 |
| 2. Komposisi Media Chahal yang Dimodifikasi (1985)..... | 44 |
| 3. Proses Pembuatan Perekusi untuk Analisa | 45 |
| 4. a. Analisa Sidik Ragam Aktivitas FP-ase (Unit/ml) Selama Fermentasi | 47 |
| b. Uji Lanjut Duncan Pengaruh Penambahan Nutrisi terhadap Aktivitas FP-ase | 47 |
| c. Uji Lanjut Duncan Pengaruh Lama Inkubasi terhadap Aktivitas FP-ase Selama Fermentasi..... | 48 |
| d. Uji Lanjut Duncan Pengaruh Interaksi Antar Perlakuan terhadap Aktivitas FP-ase Selama Fermentasi..... | 48 |
| 5. a. Analisa Sidik Ragam Aktivitas CMC-ase (Unit/ml) Selama Fermentasi .. | 49 |
| b. Uji Lanjut Duncan Pengaruh Penambahan Nutrisi terhadap Aktivitas CMC-ase | 49 |
| c. Uji Lanjut Duncan Pengaruh Lama Inkubasi terhadap Aktivitas CMC-ase Selama Fermentasi..... | 50 |
| d. Uji Lanjut Duncan Pengaruh Interaksi Antar Perlakuan terhadap Aktivitas CMC-ase Selama Fermentasi | 50 |
| 6. a. Analisa Sidik Ragam Gula Pereduksi (mg/ml) Selama Fermentasi | 51 |
| b. Uji Lanjut Duncan Pengaruh Penambahan Nutrisi terhadap Gula Pereduksi Selama Fermentasi | 51 |
| c. Uji Lanjut Duncan Pengaruh Lama Inkubasi terhadap Gula Pereduksi Selama Fermentasi..... | 52 |
| d. Uji Lanjut Duncan Pengaruh Interaksi Antar Perlakuan terhadap Gula Pereduksi Selama Fermentasi | 52 |
| 7. a. Analisa Sidik Ragam Protein Terlarut (mg/ml) Selama Fermentasi | 53 |
| b. Uji Lanjut Duncan Pengaruh Penambahan Nutrisi terhadap Protein Terlarut Selama Fermentasi | 53 |
| c. Uji Lanjut Duncan Pengaruh Lama Inkubasi terhadap Protein Terlarut Selama Fermentasi..... | 54 |
| d. Uji Lanjut Duncan Pengaruh Interaksi Antar Perlakuan terhadap Protein Terlarut Selama Fermentasi | 54 |
| 8. a. Analisa Sidik Ragam pH Selama Fermentasi..... | 55 |
| b. Uji Lanjut Duncan Pengaruh Penambahan Nutrisi terhadap pH Selama Fermentasi | 55 |
| c. Uji Lanjut Duncan Pengaruh Lama Inkubasi terhadap pH Selama Fermentasi | 56 |
| d. Uji Lanjut Duncan Pengaruh Interaksi Antar Perlakuan terhadap pH Selama Fermentasi | 56 |

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

“ Usaha pengembangan pengolahan rumput laut untuk industri masih terbatas sebagai bahan baku industri agar-agar, baik dalam bentuk tepung maupun lembaran kertas. Industri pembuatan agar-agar kertas selama ini masih dilakukan dengan teknologi yang sederhana, sehingga belum efisien dan mutu produk yang dihasilkan masih belum memuaskan.” Selain produk yang belum optimal juga diperoleh limbah hasil samping pengolahan yang cukup banyak. Limbah pengolahan agar-agar kertas termasuk dalam limbah organik yang dapat terdekomposisi secara alamiah. Limbah pengolahan agar-agar kertas terdiri dari dua bentuk, yaitu limbah padat (ampas hasil penyaringan dan penirisan) dan limbah cair (dari proses pengepresan, pencucian, pemucatan, dan penirisan)” (Riyanto, 1998). ”

Penanggulangan dan pemanfaatan limbah rumput laut hasil samping pengolahan agar-agar kertas selama ini masih belum tertangani secara baik. Penanganan limbah tersebut perlu mendapatkan perhatian, karena selain digunakannya bahan kimia dalam proses pengolahan agar-agar kertas, limbah tersebut selalu menimbulkan bau yang tidak sedap, terutama pada saat musim kemarau. Limbah pengolahan agar-agar kertas merupakan salah satu limbah yang banyak mengandung komponen lignoselulotik yang dapat dimanfaatkan sebagai medium pertumbuhan mikroorganisme sebagai pengganti bahan-bahan kimia sintetik yang mahal.

Menurut Mandels *et al.* (1976), selulase merupakan salah satu enzim yang sangat penting peranannya dalam proses biokonversi limbah-limbah organik berselulosa menjadi glukosa, makanan ternak, dan etanol.

Prinsip utama produksi enzim selulase yaitu dihasilkan oleh mikroorganisme yang diinkubasi dalam substrat yang diperkaya dengan nutrien pendukung seperti nitrogen dan fosfat. Mikroorganisme berperan sebagai pemecah glukosa yang terdapat dalam substrat. Aktivitas mikroorganisme sangat dipengaruhi kondisi lingkungan pada saat inkubasi seperti kandungan nutrien, oksigen bagi organisme aerob dan derajat keasaman (pH).

Enzim selulase dapat diperoleh dari berbagai sumber seperti mikroorganisme. Menurut Hariyum (1986), mikroorganisme yang sering digunakan antara lain ganggang,

bakteri, kapang dan ragi (khamir). Penggunaan mikroorganisme sebagai penghasil enzim selulase sangat menguntungkan karena selain mudah dibiakan, mikroorganisme juga mempunyai kecepatan tumbuh yang tinggi dan mudah dikontrol pertumbuhannya. Salah satu kapang yang dapat menghasilkan enzim selulase adalah *Trichoderma viride*.

Pada penelitian ini digunakan kapang *Trichoderma viride* karena menurut Kosaric *et al* (1980) kapang ini menghasilkan enzim yang efisien, terutama yang menghidrolisis selulosa kristal.

1.2 Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk memanfaatkan limbah agar-agar kertas sebagai medium fermentasi *Trichoderma viride* untuk produksi enzim selulase.

1.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari sampai Maret 2001 di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan-IPB, Laboratorium Nutrisi dan Makanan Ternak, Fakultas Peternakan, dan Laboratorium Mikrobiologi dan Biokimia Pusat Antar Universitas (PAU) IPB.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kapang *Trichoderma viride*

Klasifikasi kapang ini menurut Domsch dan Gams (1972) adalah sebagai berikut:

Divisio : Thallophyta

Phylum : Fungi (Eumycota)

Kelas : Deuteromycetes (fungi imperfecti)

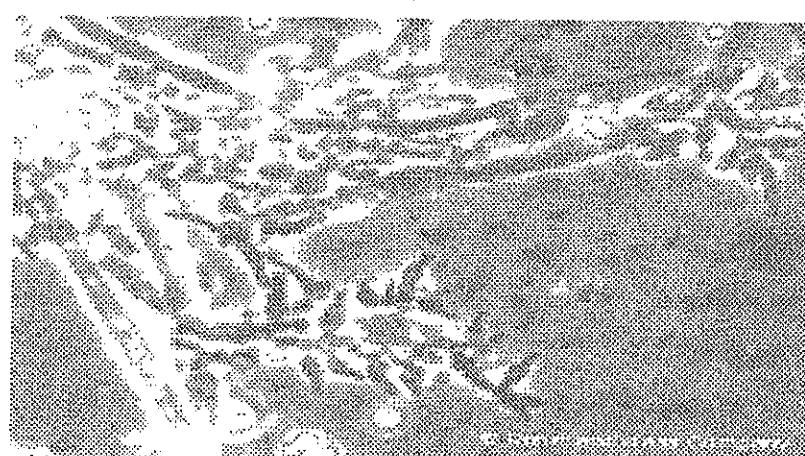
Famili : Moniliales

Ordo : Moniliaceae

Genus : *Trichoderma* (genus dengan fialospora ameros porous)

Spesies : *Trichoderma viride*

Kapang *Trichoderma viride* dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. *Trichoderma viride*

Trichoderma viride adalah kapang tanah yang dikenal luas diberbagai daerah. Habitatnya mulai dari belahan bumi utara, daerah Pegunungan Alpen, hingga ke daerah tropis. Kapang ini juga ditemui pada sungai yang tercemar, daerah perairan, laut asin, rawa-rawa dan padang pasir (Domsch dan Gams, 1972).

Morfologi *Trichoderma viride* adalah miselium berseptat, bercabang banyak, konidioseptat dan cabang yang paling ujung berfungsi sebagai sterigma, konidia yang berwarna hijau cerah bergerombol menjadi satu berbentuk seperti bola, dan berkas hifa yang

berwarna putih terlihat menonjol jelas antara konidiophora, serta mampu tumbuh linier hingga sepanjang 100-150 mm (Frazier dan Westhoff, 1977).

Pada medium agar dan pemberian sintetik, suhu optimum adalah 20-28°C. Pada suhu 6°C dan 32°C kapang terlihat masih tumbuh dengan baik. Kisaran pH pertumbuhan kapang adalah pada selang pH 1,5 hingga 9 dengan pH optimum antara 5 dan 5,5 (Domsch dan Gams, 1972). Kisaran pH 3,0-7,0 adalah ideal bagi kebanyakan kapang. Untuk mengurangi kemungkinan tumbuhnya bakteri lebih disukai penggunaan pH 5,0 atau lebih rendah sebagai pH awal media. Kisaran suhu terbaik adalah pada 25 - 36°C dan laju pertumbuhan berkurang diatas kisaran ini (Lichfield, 1984). Enzim selulase yang diperoleh dari kapang *Trichoderma viride* menunjukkan aktivitas yang optimum pada kisaran pH 4,5-5,5. Selanjutnya dikatakan bahwa pH optimum enzim yang sama dapat bervariasi, tergantung pada substratnya. Bahkan pada substrat yang sama, pH optimum dipengaruhi oleh tipe assay yang digunakan (Kulp, 1975).

Trichoderma viride adalah penghasil enzim yang sangat efisien, terutama enzim yang dapat menghidrolisis kristal selulosa. Aktivitas selulotik mikroba tersebut dengan sistem enzim dari *Trichoderma* (Kosaric et al., 1980).

Para peneliti dalam Laboratorium *The USA Army Natick*, telah menyatakan bahwa *Trichoderma viride* memiliki sistem enzim selulase yang lengkap yang mampu mengkatalisis konversi dari selulosa menjadi selobiosa dan selobiosa menjadi glukosa (Lichfield, 1984).

Trichoderma viride merupakan salah satu cendawan selulotik yang sangat kuat dan merupakan agen pada degradasi selulosa (Alexander, 1977). Selain itu *Trichoderma viride* merupakan organisme yang juga dapat menguraikan lignin, kitin dan bahan organik lain melalui proses secara aerobik (Rao, 1975).

2.2 Limbah Pengolahan Agar-agar Kertas

Limbah industri hasil pertanian adalah produk suatu proses industri yang belum mempunyai nilai ekonomis, yang dibatasi ruang dan waktu atau produk sisa yang hampir tidak digunakan dari suatu kegiatan pertanian dalam arti luas (Judoamidjojo et al., 1989).

Rolz (1979) menggolongkan hasil samping pertanian ke dalam lima kelompok yaitu:

1. Limbah yang kaya dengan di dan monosakarida saja.
2. Kaya dengan di dan monosakarida, tetapi juga mengandung beberapa polisakarida.
3. Campuran bahan yang berstruktur polisakarida dan senyawa-senyawa lain.
4. Bahan yang sebagian besar berstruktur selulosa dan lignin
5. Campuran bahan organik termasuk pati, gula, protein, asam dan lain-lain zat yang mudah larut.

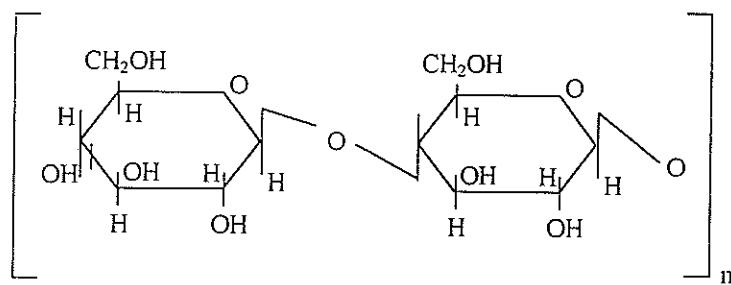
Menurut Muldani (1997), limbah pengolahan agar-agar kertas terdiri dari dua bentuk, yaitu limbah padat (ampas hasil penyaringan dan penirisan) dan limbah cair (dari proses pengepresan, pencucian, pemucatan dan penirisan). Penanganan limbah tersebut sangat perlu dan segera mendapat perhatian yang cukup besar, karena selain digunakannya bahan kimia dalam proses pengolahan agar-agar kertas, limbah tersebut selalu menimbulkan bau yang tidak sedap, terutama pada saat musim kemarau.

Berdasarkan hasil studi oleh Suwandi *et al.* (1998), tingkat efisiensi pemanfaatan rumput laut dalam proses produksi pengolahan agar-agar kertas adalah sekitar 30 % atau dari 12,5 kg bahan baku rumput laut menjadi 4 kg agar-agar kertas per proses produksinya, dengan produksi limbah padat atau ampas rumput laut sebanyak 2 kg atau sekitar 20 %. Bagi usaha pengolahan agar-agar kertas sendiri, sebenarnya adanya pemanfaatan limbah rumput laut tersebut akan dapat menciptakan sumber pendapatan baru dalam peningkatan nilai keuntungannya, selain dari tertanggulanginya berbagai dampak negatif yang timbul akibat dari keberadaan usaha pengolahannya.

2.3 Komponen Lignoselulotik

2.3.1 Selulosa

Selulosa adalah bahan penyusun utama dari serat dan dinding sel tanaman. Bahan ini terdiri dari sejumlah besar molekul glukosa yang saling berikatan melalui gugus β -gukosida dari molekul yang satu dengan gugus hidroksil C-4 dari molekul glukosa yang lain (Tjokroadikoesoemo, 1986). Struktur kimia selulosa dapat dilihat pada Gambar 2.



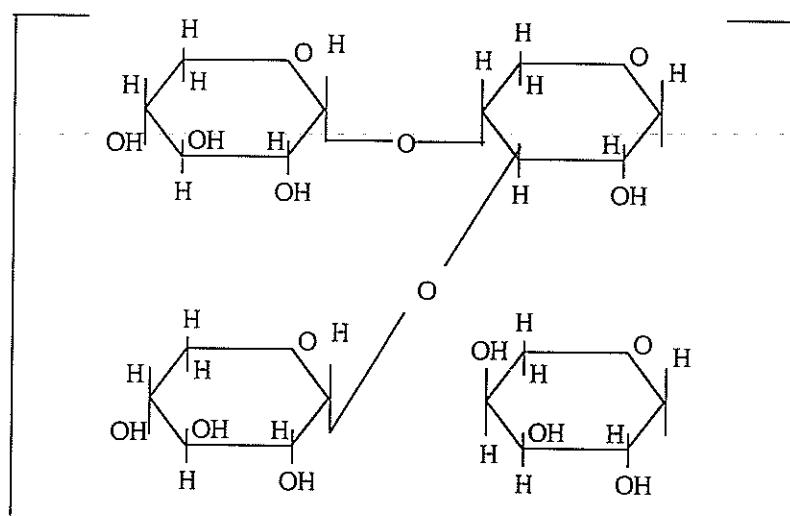
Gambar 2. Struktur Kimia Selulosa (Bastaman, 1989)

Dalam dinding sel, senyawa ini terdapat dalam bentuk mikrofibril yang terdiri dari beberapa rantai molekul. Konfigurasi molekulnya berupa suatu kumpulan yang sangat kokoh karena adanya ikatan hidrogen yang kuat antara rantai molekul yang pararel (Southgate dan Englyst, 1985)

Menurut Tsao *et al.* (1978), secara umum selulosa sulit dihidrolisis karena memiliki tingkat struktur kristal yang tinggi dan lapisan lignin yang menyelubungi jaringan selulosa merupakan suatu penghalang. Bagian selulosa yang mudah dihidrolisis disebut bagian amorf. Umumnya selulosa mengandung 15 % bagian amorf dan 85 % bagian kristalin.

2.3.2 Hemiselulosa

Hemiselulosa merupakan polisakarida yang mempunyai berat molekul lebih kecil dari pada selulosa. Hemiselulosa merupakan polimer dari sejumlah sarkida yang berbeda-beda. Susunan dari bahan-bahan tersebut di dalam rantai hemiselulosa tidak teratur (Tjokroadikoesoemo, 1986). Struktur kimia hemiselulosa dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Struktur Kimia Hemiselulosa



Rantai utama dalam struktur kimia hemiselulosa dapat terdiri dari xilosa, manosa, galaktosa, dan glukosa, sedangkan rantai cabangnya dapat terdiri dari arabinosa, galaktosa, asam glukoronat (Southgate dan Englyst, 1985)

2.3.3 Lignin

Lignin merupakan senyawa polimer yang berikatan dengan selulosa dan hemiselulosa pada jaringan tanaman. Satuan penyusun lignin yaitu fenol propana yang tersubstitusi pada dua atau tiga posisi dalam cincin benzenanya. Lignin umumnya tidak pernah ditemui dalam bentuk sederhana di antara polisakarida-polisakarida tersebut. Adanya lignin pada struktur kristal selulosa jaringan tanaman, membatasi hidrolisis selulosa oleh enzim ataupun asam. Perlakuan fisik (pengecilan ukuran) ataupun perlakuan kimiawi (penggunaan asam atau basa) merupakan perlakuan pendahuluan yang biasa dilakukan dalam proses delignifikasi limbah pertanian (Fengel dan Wegener, 1994 *di dalam* Irawadi, 1991).

Beberapa metode perlakuan awal untuk biomassa lignoselulosik menurut Rexen (1983) *dalam* Sukara (1993), adalah sebagai berikut:

- a. Pemindahan senyawa kontaminan lignin dan hemiselulosa melalui tahap-tahap pembuburan, biodelignifikasi peroksida, pengukusan, pemasakan bertekanan tertentu, atau penguapan yang diteruskan dengan pembekuan mendadak;
- b. Melonggarkan jaringan selulosik dengan perlakuan alkali;
- c. Menurunkan tingkat kristalinitas dari molekul selulosa dengan penggilingan, atau melarutkan selulosa dengan pelarut selektif; dan
- d. Menurunkan tingkat polimerilisasi dari molekul selulosa dengan perlakuan asam dan destruksi.

2.4 Mikroba Penghasil Selulase

Bakteri Penghasil enzim selulotik meliputi spesies yang bersifat aerobik seperti : *Myxobacterium*, *Actinomycetes* dan *Pseudomonas*, fakultatif aerobik seperti: *Bacillus cellulosolvens*, dan anaerobik seperti *Clostridium* dan *Bacteroides*. Kemampuan dalam menghasilkan enzim selulotik ekstraseluler tersebar luas diantara fungi. Fungi yang menghasilkan enzim yang baik adalah *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viride*,

Trichoderma koningii, *Penecillium fungiculosum*, *Penecillium orientis*, *Penecillium veruculosum*, *Fusarium solani*, *Aspergillus terreus*, *Phanerochaeta chrysosporium*, *Poliphorus adustus*, *Myrothecium verrucaria*, *Pellicularia filamentosa*, dan *Eupanicillium javanicum* (Enari, 1983). *Trichoderma viride* adalah penghasil enzim yang sangat efisien, terutama enzim yang menghidrolisa kristal selulosa (Kosaric *et al.*, 1980).

2.5 Enzim Selulase

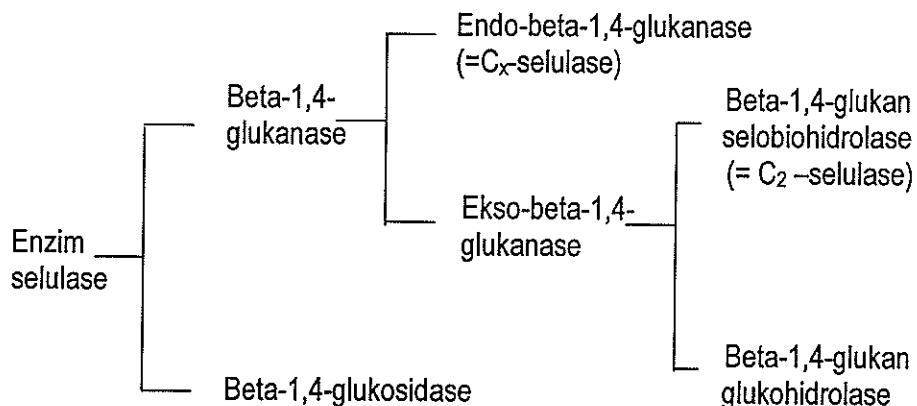
Selulase adalah nama trivial bagi semua enzim yang mampu memutuskan ikatan glikosidik beta-1,4 di dalam selulosa, selodekstrin, selobiosa, dan turunan selulosa lainnya (Enari, 1983).

Enzim selulase yang diproduksi oleh mikroorganisme adalah enzim ekstraseluler dan proses hidrolisa selulosa juga dilakukan di luar sel mikroorganisme tersebut. Selulase dari mikroorganisme yang bersifat selulotik adalah enzim yang terinduksi dan hanya diproduksi bila mikroorganisme ditumbuhkan pada selulosa atau glukan lain dengan ikatan beta-1,4 seperti selobiosa, laktosa dan sophorosa (Ghose, 1978).

Klasifikasi enzim selulotik menurut Prescott dan Dunn (1981) berdasarkan spesifitas substratnya masing-masing dapat dilihat pada Gambar 4. Keempat kelompok enzim tersebut adalah sebagai berikut:

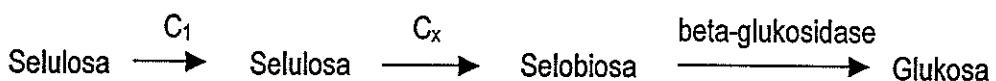
- a. Endo-beta-1,4-glukanase(beta-1,4-D-glukan-4-glukanohidrolase EC3.2.1.4) menghidrolisis ikatan glikosidik beta-1,4 secara acak. Enzim ini tidak menyerang selobiosa tetapi menghidrolisis selodekstrin dan selulosa yang telah dilonggarkan oleh asam fosfat serta selulosa tersubstitusi seperti CMC (*carboxy methyl cellulose*) dan HEC (*hydroxy ethyl cellulose*).
- b. Beta-1,4-D-glukan selobiohidrolase (EC 3.2.1.91); menyerang ujung rantai selulosa non pereduksi dan menghasilkan selobiosa. Enzim ini dapat menyerang selodekstrin tetapi tidak menyerang selulosa tersubstitusi dan tidak menghidrolisis selobiosa.
- c. Beta-1,4-D-glukan glukohidrolase (EC 3.2.1.74); menyerang ujung rantai selulosa non pereduksi dan menghasilkan glukosa. Enzim ini menyerang selulosa yang telah dilonggarkan oleh asam fosfat, selooligosakarisa, dan CMC.

- d. Beta-1,4-glukosidase (beta-1,4-D-glukosida glukohidrolase, EC 3.2.1.21); menghidrolisis selobiosa dan rantai pendek selo-oligosakarida menghasilkan glukosa. Enzim ini tidak menyerang selulosa maupun selodekstrin.



Gambar 4. Pengelompokan Enzim Selulase Berdasarkan Spesifitas Substrat Masing-masing (Enari, 1983)

Hidrolisis selulosa oleh enzim selulase terjadi dalam dua tahap, dimana tahap awalnya merupakan tahap aktivitas dan kemudian dilanjutkan dengan tahap hidrolisis sebagaimana dicantumkan dalam Gambar 5.



Gambar 5. Mekanisme Hidrolisis Selulosa secara Enzimatis (Reese et al. (1950) dalam Muchtadi et al. (1992))

Aktifitas selulosa disebabkan oleh enzim non hidrolitik C₁, hidrolisis selulosa yang telah diaktifkan dilakukan oleh enzim C_x. Menurut hipotesa ini, mikroba yang tumbuh pada selulosa kristal membentuk C₁, sedangkan mikroba yang hanya dapat menguraikan selulosa yang telah dilonggarkan oleh asam fosfat atau selulosa tersubstitusi akan kekurangan enzim C₁, tetapi banyak menghasilkan enzim C_x (Muchtadi et al., 1992).

Kerja enzim selulase dihambat dengan adanya glukanolakton dan logam-logam berat seperti tembaga dan merkuri, tetapi penghambatan dengan logam berat ini dapat dinetralisir dengan penambahan sistein, sehingga aktivitas enzim akan kembali normal.

Penghambatan oleh glokanolaktan lebih banyak terjadi pada substrat selobiosa dan oligosakarida lain yang lebih sederhana, dan lebih kecil pengaruhnya pada substrat selulosa (Kulp, 1975).

2.6 Biosintesa Enzim Selulase.

Sintesa enzim selulase dihambat dengan adanya glukosa dan gula-gula lain yang mudah di metabolisme dalam media pertumbuhan dan hal ini dikenal sebagai represi katabolit. Mekanisme sintesa enzim selulase yang diatur oleh induksi dan represi katabolit (Gong dan Tsao, 1979), sebagai berikut:

1. Selobiosa dan glukosa merupakan hasil hidrolisa selulosa yang dilakukan oleh enzim selulase yang jumlahnya sangat sedikit. Selobiosa kemudian berperan sebagai sumber karbon dan juga sebagai induser.
2. Dengan sistem aktif transpor selobiosa masuk ke dalam sel melalui membran sel. Enzim glukosidase yang terikat pada membran sel kemudian menghidrolisa selobiosa menjadi glukosa. Enzim glukosidase ini juga dibentuk sebagai respon terhadap adanya laktosa, sophorosa atau induser lain di dalam media pertumbuhan.
3. Setelah selobiosa masuk ke dalam sel, selobiosa ini menjadi induser yang aktif dan bereaksi dengan protein repressor dan membuat repressor inaktif sehingga terjadi induksi. Kemungkinan lain, induser yang potensial itu dapat dihidrolisa oleh enzim glukosidase intraseluler yang menyebabkan akumulasi glukosa sehingga merepresi sintesa enzim selulase.
4. Induksi pada sintesa selulase terjadi bila protein repressor telah diinaktifkan oleh induser aktif dan kemudian diteruskan dengan proses transkripsi dan translasi.
5. Selulase yang baru saja disintesa sebagai respon dari adanya induser, untuk sementara masih terikat pada membran sel. Pelepasan selulase melewati membran sel diatur oleh suatu mekanisme pelepasan yang spesifik, mungkin oleh enzim protease asam yang bersifat intraseluler. Kondisi pH rendah mempermudah pelepasan enzim selulase, sedangkan pada pH tinggi pelepasan enzim selulase keluar sel akan terhambat.
6. Enzim selulase yang baru saja dilepaskan keluar sel akan menghidrolisa selulosa menjadi glukosa atau selobiosa. Jumlah enzim selulase yang dikeluarkan mempengaruhi jumlah

glukosa dan selobiosa kemudian menyokong pertumbuhan sel dan juga berperan dalam mekanisme induksi-represi.

7. Glukosidase intraseluler menghidrolisis sebagian dari selobiosa intraseluler menjadi glukosa.
8. Kadar glukosa intraseluler yang tinggi akan menghambat aktivitas enzim glukosidase intraseluler.
9. Pada mikroorganisme yang mampu memproduksi enzim glukosidase intraseluler sebagai respon pada terjadinya akumulasi glukosa intraseluler, akan terjadi proses oksidasi glukosa oleh glukooksidase menghasilkan produk berupa glukonolakton dan asam glukonat.
10. Glukonolakton akan menghambat kerja enzim glukooksidase sehingga aktivitasnya akan menurun dan akibatnya respon terhadap sintesa juga akan berkurang.
11. Konsentrasi glukosa intraseluler mempengaruhi sintesa enzim selulase dengan mekanisme represi.

Induser terhadap sintesa enzim selulase pada mikroorganisme yaitu selulosa, selobiosa, laktosa dan sophorosa, semuanya dapat digunakan sebagai sumber karbon oleh mikroorganisme itu sendiri. Pembentukan selulase secara kontinyu dipengaruhi oleh penyediaan induser aktif secara kontinyu pula sehingga untuk menjadi produsen selulase yang kontinyu perlu digunakan induser yang tidak dapat digunakan sebagai sumber karbon dan juga mempunyai afinitas yang tinggi terhadap protein represor (Muchtadi *et al*, 1992).

2.7 Fermentasi

Menurut Chahal (1985), jenis medium pada proses fermentasi dibagi menjadi dua golongan, yaitu fermentasi medium padat dan fermentasi medium cair. Fermentasi medium padat adalah fermentasi yang substratnya tidak larut dan tidak mengandung air bebas, tetapi cukup mengandung air untuk keperluan mikroba. Sebaliknya fermentasi cair adalah proses fermentasi yang substratnya larut atau tersuspensi di dalam fase cair.

Pengaturan suhu dan pH media merupakan input yang penting untuk mendapatkan hasil enzim selulase yang baik. Kontrol pH merupakan faktor kritis karena bila pH tidak terkontrol maka enzim yang dihasilkan akan menjadi inaktif oleh keadaan lingkungan yang bersifat

terlalu asam, sebaliknya pada kondisi pH yang tinggi rendemen selulase akan mengalami penurunan (Ghose, 1978). Chahal (1985) menambahkan bahwa pengaturan pH selama fermentasi medium padat sukar dilakukan, tetapi karena pH merupakan faktor yang kritis bagi pertumbuhan dan produksi enzim mikroba, maka pH diatur sedapat mungkin, salah satu caranya yaitu dengan menambahkan larutan penyangga. Nilai pH medium fermentasi biasanya diatur mendekati nilai pH optimum bagi aktivitas enzim yang dihasilkan. Mandels *et al.* (1976) menggunakan pH awal medium 5,5 – 6,0 untuk memproduksi enzim selulase dari *Trichoderma reesei*.

Menurut Chahal (1983), fermentasi medium padat secara alami umumnya berlangsung pada medium dengan kadar air antara 60 – 80 % (berat basah), karena pada keadaan ini medium mengadung air yang cukup untuk pertumbuhan mikroba. Pada hakikatnya kadar air substrat pada fermentasi medium padat tergantung pada sifat alamiah substrat, jenis organisme, dan tipe produk akhir yang dikehendaki.

Dibanding dengan medium cair, proses fermentasi medium padat memiliki beberapa keuntungan (Frost dan Moss, 1987) antara lain:

- a. Media yang digunakan relatif sederhana
- b. Ruangan yang digunakan relatif lebih kecil dibandingkan dengan rendemen yang dihasilkan
- c. Ekstraksi enzim lebih mudah, yaitu hanya dengan menambahkan pelarut secara langsung
- d. Larutan enzim yang didapat relatif lebih pekat bila digunakan sedikit air sebagai pelarut
- e. Kondisi inkubasi hampir menyerupai kondisi alami sehingga tidak memerlukan kontrol suhu dan pH yang teliti
- f. Aerasi dapat berlangsung lebih optimal karena ruangan lebih besar
- g. Inokulasi dapat langsung dari spora, tanpa melalui media inokulasi, dan
- h. Rendahnya kadar air, menyebabkan kemungkinan tumbuhnya bakteri yang tidak diinginkan lebih kecil.

Selain kelebihan-kelebihan tersebut, media fermentasi padat memiliki kekurangan (Frost dan Moss, 1987) antara lain, yaitu :

- a. Hanya terbatas untuk pertumbuhan kapang saja, yaitu mikroba yang dapat mentolerir rendahnya kadar air

- b. Pengukuran parameter-parameter proses sukar karena kultur kurang homogen
- c. Sebagian substrat (kecuali beras) memerlukan pra perlakuan

Penambahan pepton ke dalam medium pertumbuhan adalah untuk menurunkan fase lag dalam pertumbuhan dan produksi enzim selulase dari *Trichoderma viride* (Sternberg, 1976). Menurut Mandels *et al.* (1975), selain itu ditambahkannya pepton ke dalam medium fermentasi bertujuan untuk memaksimumkan produksi enzim walaupun garam amonium cukup baik sebagai sumber nitrogen untuk pertumbuhan.

Mineral tambahan banyak dipakai dalam memproduksi enzim selulase, tujuan pemakaiannya adalah untuk mengoptimalkan pertumbuhan dan meningkatkan aktivitas enzim selulase yang dihasilkan. Berbagai formulasi mineral yang dipakai oleh peneliti mengandung komponen-komponen utama seperti amonium sulfat dan urea sebagai sumber nitrogen anorganik.

Mineral lainnya meliputi komponen yang umumnya terdapat dalam medium untuk fungi seperti kalium dihidrogen fosfat dan magnesium sulfat. Penambahan kobalt (Co) dan kalsium (Ca) tidak merupakan suatu keharusan untuk pertumbuhannya tetapi meningkatkan produksi selulase (Sternberg, 1976).

3. METODOLOGI

3.1 Bahan dan Alat

3.1.1 Bahan

Bahan baku utama yang digunakan pada penelitian ini adalah limbah pengolahan agar-agar kertas yang diambil dari Perusahaan Agar-agar Kertas "Pantai Samudra" di daerah Cikole, Kelurahan Kebonjati, Kotamadya Sukabumi, Jawa Barat. Biakan murni kapang *Trichoderma viride* diperoleh dari Laboratorium Bioindustri FATEKA IPB.

Bahan pembantu yang digunakan terdiri atas nutrien dan mineral yang meliputi media yang digunakan oleh Chahal yang dimodifikasi (1985) serta bahan kimia yang digunakan untuk analisa berbentuk pereaksi spesifik disajikan pada Lampiran 2 dan 3.

3.1.2 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi tabung reaksi, erlenmeyer, gelas piala, labu takar, spektrofotometer *Pharmacia*, inkubator, oven, *drum drier*, sentrifuse, timbangan sartorius, pH meter, dan lain-lain.

3.2 Metode Penelitian

Metode penelitian ini dibagi menjadi dua tahap. Tahap pertama meliputi perlakuan pendahuluan limbah pengolahan agar-agar kertas dan analisa proksimat serbuk limbah pengolahan agar-agar kertas. Perlakuan pendahuluan, yaitu pembuatan serbuk limbah pengolahan agar-agar kertas yang bertujuan akan digunakan sebagai medium pertumbuhan kapang *Trichoderma viride*.

Tahap kedua meliputi pembuatan enzim selulase kasar dan analisis produk akhir. Penelitian tahap kedua ini bertujuan untuk mempelajari pengaruh perbandingan nutrien tambahan dan waktu inkubasi terhadap aktivitas enzim selulase yang dihasilkan.

3.2.1 Penelitian tahap I

Penelitian tahap pertama bertujuan untuk mendapatkan serbuk limbah pengolahan agar-agar kertas yang digunakan untuk media pertumbuhan kapang *Trichoderma viride*.

Pembuatan serbuk limbah pengolahan agar-agar kertas terdiri dari proses pencucian, pengeringan dan penggilingan. Proses pencucian bertujuan untuk menghilangkan kotoran dan bau, sedangkan proses pengeringan dilakukan dengan menggunakan alat pengering *drum drier*, kemudian dilanjutkan dengan penggilingan menggunakan grinder untuk menggiling ampas agar-agar kertas menjadi serbuk.

Analisa proksimat substrat meliputi analisa kadar air, kadar abu, protein, lemak, karbohidrat, serat kasar, selulosa, hemiselulosa dan lignin. Prosedur pengujinya seperti tersebut di bawah ini.

3.2.1.1 Kadar air (Apriyantono *et al.*, 1989)

Metode ini digunakan untuk seluruh produk makanan, kecuali jika produk tersebut mengandung komponen-komponen yang mudah menguap atau jika produk tersebut mengalami dekomposisi pada pemanasan 100°C. Prinsipnya adalah sampel dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C.

Cawan dikeringkan dalam oven selama 15 menit dan didinginkan dalam desikator, kemudian ditimbang. Sampel sebanyak 5 gram yang sudah dihomogenkan dimasukkan dalam cawan. Cawan yang telah berisi sampel dimasukkan dalam oven selama 6 jam. Sebelum ditimbang cawan disimpan dalam desikator untuk memperoleh berat yang tetap. Kadar air diperoleh dengan menggunakan rumus perhitungan sebagai berikut :

$$\% \text{ Air} = \frac{W_2}{W_1} \times 100 \%$$

W_1 = Berat sampel (gram)
 W_2 = Kehilangan berat (gram)

3.2.1.2 Kadar abu (Apriyantono *et al.*, 1989)

Abu dalam bahan pangan ditetapkan dengan menimbang sisa mineral hasil pembakaran bahan organik pada suhu sekitar 550°C. Sampel sebanyak 3 – 5 gram dimasukkan dalam cawan yang telah diketahui beratnya. Cawan yang telah berisi sampel dimasukkan dalam tanur pengabuan, kemudian dibakar sampai didapat abu berwarna

abu-abu atau sampel beratnya tetap. Pengabuan dilakukan dalam dua tahap yaitu pada suhu 400°C dan kedua pada suhu 550°C.

Kadar abu dapat diperoleh dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ Abu} = \frac{\text{Berat abu (gram)}}{\text{Berat sampel (gram)}} \times 100 \%$$

3.2.1.3 Kadar protein (Sulaeman *et al.*, 1997)

Analisis kadar nitrogen dengan metode *kjedhal-mikro* sebanyak 0,5-10 gram sampel dimasukkan dalam tabung *kjedhal*. Sebanyak 2,5-5 gram atau 0,5-1 sendok selenium mix atau campuran 5 gram CuSO₄ dan KMnO₄ (1:9) dan 25 ml H₂SO₄ pekat serta beberapa batu didih. Kemudian dipanaskan dengan api kecil dan dibesarkan sampai terjadi larutan yang berwarna jernih kehijauan dan uap SO₂ hilang lalu dipindahkan ke dalam labu ukur 100 ml dan diencerkan sampai tanda tera. Sebanyak 10 ml diambil dan ditambahkan 10 ml NaOH 10 % atau lebih, kemudian disuling dan ditampung ke dalam 20 ml larutan asam borat 3 %. Destilasi dilakukan sampai ujung destilat tidak bereaksi basa lagi. Setelah itu larutan asam borat dititrasi dengan HCl standar dengan menggunakan metil merah sebagai indikator. Kadar protein diperoleh dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ N} = \frac{(\text{ml contoh}) \times \text{N HCl} \times \text{fp} \times 14 \times 100}{\text{mg sampel}}$$

$$\% \text{ protein} = \% \text{ N} \times 6,25$$

Fp = faktor pengenceran

3.2.1.4 Kadar lemak (Apriyantono *et al.*, 1989)

Lemak diekstrak dengan pelarut dietil eter. Setelah pelarutnya diuapkan, lemaknya dapat ditimbang dan dihitung persentasenya. Sampel sebanyak 5 gram dimasukkan dalam saringan timbel dan ditutup dengan menggunakan kapas wool yang bebas lemak. Timbel yang berisi sampel dimasukkan dalam alat ekstraksi soxhlet. Pelarut organik yaitu

dietil eter atau petroleum eter dimasukkan ke dalam labu lemak yang telah diketahui beratnya. Refluks dilakukan selama 5 jam sampai pelarut yang turun kembali ke labu lemak berwarna jernih.

Pelarut yang ada dalam labu lemak didestilasi dan ditampung. Selanjutnya labu lemak yang berisi lemak hasil ekstraksi dipanaskan dalam oven pada suhu 105°C. Setelah dikeringkan sampai berat tetap dan didinginkan dalam desikator, labu beserta lemaknya ditimbang.

Berat lemak dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ Lemak} = \frac{\text{berat lemak (gram)}}{\text{berat sampel (gram)}} \times 100 \%$$

3.2.1.5 Kadar karbohidrat (Apriyanto *et al.*, 1989)

Penentuan kadar karbohidrat ditentukan setelah nilai protein, lemak, air dan abu diperoleh. Kadar karbohidrat dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\text{Kadar karbohidrat} = 100 \% - (\text{Kadar protein} + \text{kadar lemak} + \text{kadar air} + \text{kadar abu})$$

3.2.1.6 Kadar serat kasar (AOAC, 1984)

Serat kasar merupakan residu dari bahan makanan atau pertanian setelah diperlakukan dengan asam dan alkali mendidih yang terdiri atas selulosa dengan sedikit lignin dan pentosan. Sampel yang akan diukur dihaluskan terlebih dahulu sehingga dapat melalui saringan diameter 1 mm dan diaduk merata. Sebanyak 2 gram sampel yang telah halus diekstraksi lemaknya dengan menggunakan metode soxhlet.

Sampel dipindah ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan 200 ml H₂SO₄ 1,25 % mendidih. Selama 30 menit dididihkan dengan sesekali digoyang-goyang. Suspensi yang terbentuk disaring dengan penyaring Van Bosch vakum dan dicuci dengan air panas. Residu dalam kertas saring dicuci sampai air cucian tidak bersifat asam lagi. Residu dimasukkan dalam erlenmeyer dan ditambahkan 200 ml NaOH 3,25 % mendidih. Erlenmeyer yang telah terisi sampel dan NaOH dидidihkan selama 30 menit, kemudian disaring

dengan kertas saring yang telah diketahui beratnya (A) sambil dicuci dengan larutan K_2SO_4 10 %. Residu yang diperoleh dicuci dengan air mendidih kemudian dicuci dengan alkohol 95 % sebanyak 15 ml. Kertas saring dioven pada suhu 110°C sampai berat konstan, distabilkan dalam desikator dan ditimbang (B), residu dipijarkan di dalam *muffle furnace* selama 4 jam, sisa pijaran ditimbang sebagai abu (C).

Kadar serat kasar dapat diperoleh dengan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ Serat kasar} = \frac{B - (A + C)}{\text{Beratsampel(gram)}} \times 100 \%$$

A = Berat kertas saring (gram)

B = Berat kertas saring + berat sampel (gram)

C = Berat abu (gram)

3.2.1.7 Neutral detergent fiber (NDF) (Goering dan Van Soest, 1970)

Contoh sebanyak 0,5 gram ditimbang (a gram) dalam gelas piala dan ditambah 100 ml larutan *dinitrosalisisilat* (DNS), (0,5 g natrum sulfat), (2 ml *dekahidronaftalen*) dipanaskan selama 5 sampai 10 menit. Setelah mulai mendidih timer dijalankan sampai 60 menit.

Hasilnya disaring dengan cawan masir yang beratnya diketahui (b gram) menggunakan pompa vakum. Residu dibilas dengan air panas (90°C –100°C) beberapa kali dan yang terakhir dengan aseton.

Cawan dikeringkan dalam oven 100°C selama 8 jam, didinginkan dan ditimbang (c gram). Kadar NDF (fraksi total dinding sel) merupakan residu setelah ekstraksi.

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

3.2.1.8 Acid detergent fiber (ADF) (Goering dan Van Soest, 1970)

Contoh sebanyak 0,5 gram (a) diekstrak dengan 100 ml larutan ADS dan 2 ml *dekahidronaftalen* selama 60 menit. Jika diperlukan dicuci dengan n-heksan setelah pencucian dengan aseton, untuk menghindari penggumpalan pada penetapan lignin.

Cawan masir dan residu ditimbang (c gram), berat cawan kosong (b gram). Untuk menghitung abu dari penetapan ADF maka cawan bersama residunya diabukan pada 500-550°C dan ditimbang kembali (d gram), bila lignin akan ditentukan pengabuan dikerjakan setelah residu diekstrak dengan kalium permanganat atau asam sulfat.

$$\% ADF = \frac{c - b}{a} \times 100 \%$$

3.2.1.9 Hemiselulosa (Goering dan Van Soest, 1970)

Kadar hemiselulosa diperoleh dengan menghitung selisih NDF dan ADF

$$\% \text{Hemiselulosa} = \% \text{NDF} - \% \text{ADF}$$

3.2.1.10 Lignin dan selulosa (Goering dan Van Soest, 1970)

Residu ADF dalam cawan masir (c gram) diletakkan dalam nampan yang mengandung air setinggi 1 cm dan serat dalam cawan masir tidak basah. Kemudian ditambahkan 25 ml larutan lignin ke dalam cawan, permukaan air dalam nampan diatur tingginya (2-3 cm) untuk mengurangi aliran larutan dari dalam cawan. Larutan diaduk dan dibiarkan 9-10 menit pada suhu 20-25°C, jika perlu ditambahkan larutan lignin, warna ungu tidak boleh berubah.

Cawan-cawan dipindahkan ke saringan vakum, cairan dikeluarkan cawan dipindahkan ke nampan yang lain dan direndam dalam es tidak melampaui tinggi cawan. Kemudian dibiarkan dalam cawan selama 5 menit dan disaring. Pekerjaan ini diulangi sampai didapatkan serat yang berwarna putih (20-30 menit). Lalu dicuci berturut-turut dengan etanol 80 % dua kali dan aseton dua kali pencucian. Cawan dan residu disimpan dalam oven 100°C selama 8 jam dan ditimbang (e gram). Untuk menghitung kadar abu yang tidak larut dalam detergen (AIA), cawan dan residu diabukan pada suhu 500°C selama tiga jam dan ditimbang (f gram).

$$\% \text{Selulosa} = \frac{e - f}{a} \times 100$$

$$\% \text{Lignin} = \frac{c - e}{a} \times 100\%$$

3.2.2 Penelitian tahap II

Penelitian tahap kedua bertujuan untuk mempelajari pengaruh perbandingan nutrien tambahan dan waktu inkubasi terhadap aktivitas enzim selulase yang dihasilkan.

3.2.2.1 Persiapan medium fermentasi

Sebanyak 10 gram tepung limbah pengolahan agar-agar kertas sebagai substrat dimasukkan ke dalam erlenmeyer berkapasitas maksimum 300 ml. Kemudian ditambahkan larutan nutrisi yang meliputi KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, urea, CaCl_2 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dan bakto pepton (media Chahal yang dimodifikasi sebanyak 0,00 ml; 1,33 ml; 6,67 ml), dan ditambahkan akuades hingga mencapai kadar air 80 % berat basah. Media kemudian disterilkan pada suhu 121°C selama 30 menit.

Adapun perlakuan yang diberikan pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

Komposisi media : A1 = (N : S = 0 : 4)

 A2 = (N : S = 1 : 4)

 A3 = (N : S = 2 : 4)

N = Larutan nutrisi (ml) ; S = substrat limbah agar-agar kertas (gram)

3.2.2.2 Pembuatan inokulum

Biakan *Trichoderma viride* yang berumur 7 hari pada agar miring disuspensikan ke dalam 10 ml akuades steril. Suspensi kapang ini sebanyak 4 % diinokulasikan ke dalam media pertumbuhan yang telah disterilkan. Selanjutnya diinkubasikan pada suhu 30°C selama 3 hari (B1), 6 hari (B2), 9 hari (B3) dan 12 hari (B4).

3.2.2.3 Ekstraksi enzim kasar (Darwis dan Sunarti, 1992)

Ekstraksi enzim dilakukan dengan cara menambahkan larutan pengekstrak (Tween-80 0,2 %) sebanyak 10 kali berat substrat dan dikocok dengan menggunakan shaker 150 rpm selama satu jam. Selanjutnya disentrifusi dengan kecepatan 2000 rpm selama 20 menit untuk menghasilkan filtrat enzim kasar.

Analisa filtrat enzim kasar yang terekstrak meliputi aktivitas selulase total (*filter paperase*), aktivitas endoglukanase (*carboxy methyl cellulase*), kadar gula pereduksi, kadar protein terlarut, dan pH akhir filtrat.

3.3 Analisa Produk Akhir

3.3.1 Pengujian aktivitas enzim *filter paperase* (Mandels et al., 1976)

Pengujian aktivitas enzim *filter paperase* (FP-ase) dapat mencerminkan aktivitas umum selulase, karena substrat untuk pengujinya digunakan serat yang masih bersifat kristal sehingga melibatkan aktivitas C₁ yang berperan sebagai pengaktif selulosa kristal menjadi selulosa reaktif (Reese et al., 1950).

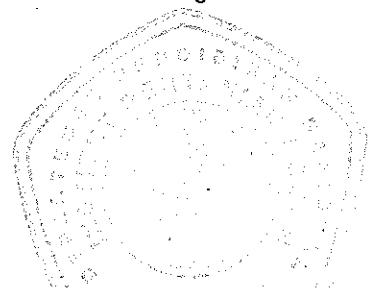
Sebanyak 1 ml bufer sitrat (pH 5,5) dan 1 ml filtrat enzim kasar dengan pengenceran yang sesuai ditambahkan pada kertas saring Whatman no.1 diinkubasikan pada suhu 55°C selama satu jam. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 3 ml pereaksi *dinitrosalisilat* (DNS), aduk kembali dan dimasukkan ke dalam air mendidih selama 5 menit. Kandungan gula pereduksi ditentukan dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 550 nm.

Perhitungan untuk mendapatkan aktivitas enzim FP-ase dibuat berdasarkan bahwa 1 μ mol glukosa = 0,18 mg glukosa dan 1 Unit aktivitas FP-ase adalah 1 μ mol glukosa yang dihasilkan per menit. Apabila inkubasi dilakukan selama 60 menit 1 mg glukosa yang dihasilkan per ml filtrat adalah 0,0925 Unit. Aktivitas enzim selulase diperoleh dengan rumus :

$$\text{Aktivitas FP-ase (Unit/ml)} = \frac{\text{mg glukosa} \times 0,0925}{\text{ml}}$$

3.3.2 Pengujian aktivitas enzim *carboxy methyl celulase* (Mandels et al., 1976)

Pengujian aktivitas enzim *carboxy methyl celulase* (CMC-ase) dapat mencerminkan aktivitas enzim endoglukanase dan glukan-glukanohidrolase, yang menyerang selulosa yang telah direnggangkan struktur seratnya ataupun selulosa yang telah disubsitusi. Sebanyak 0,5 ml filtrat enzim kasar dengan pengenceran yang sesuai ditambahkan pada 0,5 ml larutan CMC 1 % dalam buffer sitrat (pH 5,5), kemudian diinkubasi pada suhu 55°C selama 30 menit. Sebanyak 3 ml pereaksi DNS ditambahkan untuk menghentikan reaksi. Tabung ditempatkan di dalam air mendidih selama 5 menit. Gula pereduksi terlarut dihitung



sebagai glukosa terlarut dengan mengukur larutan tersebut dengan panjang gelombang 550 nm.

Perhitungan dilakukan, dimana satu unit aktivitas enzim CMC-ase didefinisikan sebagai 1 μ mol glukosa yang dihasilkan dari hidrolisa larutan CMC 1 % oleh 1 ml filtrat enzim selulase selama 1 menit pada kondisi optimum. 1 μ mol glukosa sama dengan 0,18 mg glukosa. Apabila inkubasi dilakukan selama 30 menit 1 mg glukosa yang dihasilkan per ml filtrat adalah 0,185 Unit. Dengan kondisi pengujian tersebut, maka aktivitas enzim CMC-ase adalah:

$$\text{Aktivitas CMC- ase (Unit/ml)} = \frac{\text{mg glukosa} \times 0,18}{\text{ml}}$$

3.3.3 Pengujian kadar gula pereduksi (Miller, 1959)

Kadar gula pereduksi ditentukan dengan menggunakan metode DNS, menggunakan pereaksi DNS (*dinitrosalisilat*). Satu mililiter filtrat dalam tabung reaksi ditambahkan 3 ml pereaksi DNS dan dipanaskan dalam air mendidih selama 5 menit sampai terbentuk warna kuning kecoklatan. Kemudian didiamkan pada suhu kamar sampai dingin, absorbansinya diukur pada panjang gelombang 550 nm. Nilai absorbansinya dibandingkan dengan kurva standar. Kurva standar dipersiapkan dengan konsentrasi gula antara 0,05-0,20 mg/ml, dan sebagai blanko digunakan akuades sebagai pengganti glukosa.

Pereaksi DNS dibuat dengan melarutkan 10,6 gr DNS (3,5-asam dinitrosalisilat) dan 19,8 gram NaOH dalam 1.416 ml akuades. Kemudian ditambahkan 306 gram NaK-Tartrat, 7,6 ml fenol yang telah dicairkan pada suhu 55°C, dan 8,3 gram Na-metabisulfit.

3.3.4 Pengujian protein terlarut (Lowry *et al.*, 1951)

Kadar protein terlarut ditentukan dengan metode Lowry *et al* (1951), dengan menggunakan pereaksi fenol dan Bovin Serum Albumin (BSA) sebagai standar. Satu mililiter filtrat dalam tabung reaksi ditambahkan akuades sampai volume 4 ml dan 5,5 ml campuran Na-karbonat 2 % dalam NaOH 0,1 N dengan larutan CuSO₄ 0,5 % dalam NaK-tartarat 1 % pada perbandingan 50:1, dan dibiarkan selama 15 menit. Kemudian ditambahkan pereaksi

fenol dan dibiarkan selama 30 menit sampai terbentuk warna biru. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 650 nm.

Nilai absorbansi sampel dibandingkan dengan kurva standar. Kurva standar dipersiapkan dari larutan BSA antara 25 - 200 ug/ml, dan sebagai blanko digunakan akuades untuk mengantikan protein.

3.3.5 Derajat keasaman (pH) filtrat

Derajat keasaman (pH) filtrat enzim kasar diukur dengan menggunakan pH-meter.

3.4 Analisa Data (Steel dan Torry, 1991)

Penelitian ini menggunakan racangan percobaan pola faktorial dengan dua faktor yaitu pemberian nutrisi tambahan dan lama inkubasi. Faktor pemberian nutrisi tambahan terdiri dari tiga taraf (0:4; 1:4; 2:4 terhadap substrat) dan lama inkubasi terdiri dari empat taraf (3, 6, 9, dan 12 hari), setiap perlakuan diulang sebanyak dua kali.

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Keterangan :

Y_{ijk} = nilai pengamatan

μ = rata-rata umum (sebenarnya)

α_i = faktor perlakuan pemberian nutrisi tambahan ke-*i* (1,2,3)

β_j = faktor perlakuan lama inkubasi ke-*j* (1,2,3,4)

$(\alpha\beta)_{ij}$ = interaksi kedua faktor

ε_{ijk} = galat percobaan dari kedua faktor pada ulangan ke-*k* (1,2)

Data yang diperoleh dianalisa dengan menggunakan analisa ragam (ANOVA) keadatifan model, kenormalan galat, kehomogenan galat dan kebebasan antar galat. Sebelumnya dilakukan analisa pra ANOVA (uji asumsi). Apabila salah satu atau lebih dari uji asumsi tersebut tidak terpenuhi maka dilakukan transformasi data terlebih dahulu. Bila hasil ANOVA berbeda nyata dilakukan uji lanjut dengan uji Duncan (Steel dan Torrie, 1991).

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Analisis Kimia Limbah Agar-agar Kertas

Hasil analisis terhadap komponen kimia limbah pengolahan agar-agar kertas setelah dikeringkan dengan *drum drier* dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi Kimia Serbuk Limbah Agar-agar Kertas

| Komponen | Kandungan (% berat kering) |
|-----------------------------|-------------------------------|
| Air | 7,63 |
| Abu | 15,30 |
| Protein | 15,53 |
| Lemak | 0,19 |
| Karbohidrat (by difference) | 61,35 |
| Selulosa | 16,03 |
| Hemiselulosa | 25,23 |
| Lignin | 3,16 |
| Serat kasar | 11,56 |

Dari Tabel 1 dapat dilihat kandungan protein, lemak, dan karbohidrat, serbuk limbah agar-agar kertas berturut-turut yaitu 15,53 %, 0,19 %, 61,35 %. Karbohidrat, protein, lemak merupakan sumber energi yang dibutuhkan sebagai sumber karbon bagi pertumbuhan mikroorganisme (Judoamidjojo *et al.*, 1989) sedangkan selulosa selain merupakan sumber karbon juga merupakan induser terhadap sintesis enzim selulas pada mikroba (Gong dan Tsao, 1979).

Kandungan lignin yang rendah yaitu sebesar 3,16 % sangat baik bagi pertumbuhan mikroorganisme karena lignin dapat menghambat mekanisme pemecahan selulosa. Selain lignin mekanisme pemecahan molekul selulosa juga dipengaruhi oleh derajat polimerisasi dan derajat kristalisasi. Selama kandungan lignin, derajat polimerisasi, dan derajat kristalisasi masih tinggi, selulosa akan sulit untuk dihidrolisis. Pada kondisi demikian

produktivitas mikroorganisme dalam menghasilkan enzim selulosa akan rendah (Suhartono, 1989).

Pada penelitian ini dilakukan pengecilan ukuran limbah agar-agar kertas dengan cara penggilingan. Pengecilan ukuran limbah agar-agar kertas ini merupakan salah satu upaya untuk meningkatkan efektivitas hidrolisis selulosa yang pada akhirnya akan meningkatkan produktivitas *Trichoderma viride* dalam memproduksi selulase dan memperluas permukaan yang akan kontak dengan kapang tersebut. Pengecilan ukuran menyebabkan terputusnya rantai polimer yang panjang menjadi rantai polimer yang pendek, meningkatkan daerah amorf dan memisahkan bagian lignin dari bagian selulosa (Suhartono, 1989).

Pemberian nutrisi tambahan ke dalam media fermentasi dimaksudkan untuk mengoptimalkan produksi enzim selulase. Hal ini di dukung oleh penelitian yang dilakukan Irawadi (1991), dengan menggunakan limbah kelapa sawit tandan dan sabut untuk produksi enzim selulase oleh *Neurospora sitophyla* dengan media padat maupun cair mampu meningkatkan aktivitas selulase. Lee *et al.* (1998), menyatakan penambahan garam-garam mineral seperti KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 , CaCl_2 , MnSO_4 , CoCl_2 , dan ZnSO_4 mampu meningkatkan aktivitas selulase yang dihasilkan.

4.2 Aktivitas *Filter Paperase* (FP-ase)

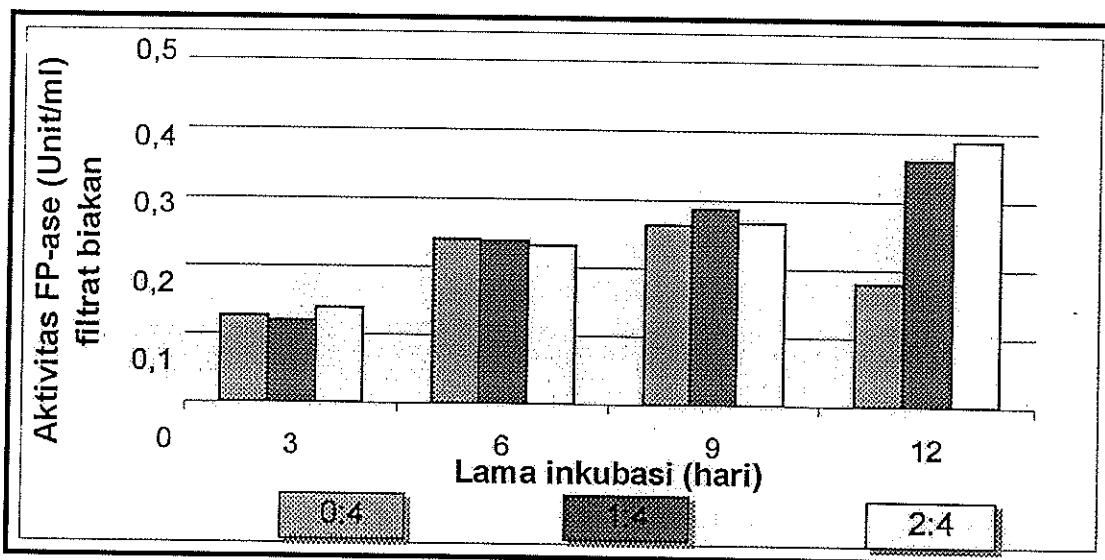
Pengukuran aktivitas total enzim yang dikenal dengan nama FP-ase (*filter paper-ase*) bertujuan untuk mengukur aktivitas campuran enzim yang menghidrolisis bahan yang mengandung selulosa dan menghasilkan glukosa sebagai produk akhir. Hasil pengukuran aktivitas FP-ase dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Aktivitas FP-ase Selama Fermentasi oleh *Trichoderma viride*

| Lama inkubasi (hari) | Perbandingan media (larutan nutrisi : substrat) | | |
|-------------------------|---|-------|-------|
| | 0 : 4 | 1 : 4 | 2 : 4 |
| 3 | 0,126 | 0,120 | 0,138 |
| 6 | 0,240 | 0,238 | 0,232 |
| 9 | 0,263 | 0,287 | 0,267 |
| 12 | 0,179 | 0,360 | 0,387 |

Dari Tabel 2 di atas aktivitas terlihat bahwa FP-ase yang dihasilkan oleh kapang *Trichoderma viride* berkisar antara 0,120 Unit/ml sampai 0,387 Unit/ml filtrat biakan dengan nilai rata-rata 0,236 Unit/ml filtrat biakan.

Aktivitas total selulase menggambarkan pengaruh sinergisme antara enzim yang berbeda dan pengaruh hambatan produk akhir. Substrat yang digunakan adalah selulosa yang tidak larut, sehingga diperlukan waktu reaksi yang cukup agar enzim dapat berdifusi ke dalam serat selulosa dan menghasilkan produk hidrolisisnya. Kertas saring Whatman no.1 adalah substrat yang biasa digunakan untuk penentuan aktivitas total selulase sedangkan produk yang diukur adalah glukosa. Dalam bentuk diagram, aktivitas FP-ase dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Aktivitas FP-ase Selama Fermentasi oleh *Trichoderma viride*

Dari Gambar 6 terlihat bahwa aktivitas FP-ase tertinggi dicapai pada media yang diberi nutrisi tambahan dengan perbandingan 2:4 terhadap substrat dan lama inkubasi 12 hari. Pada media yang tidak diberi larutan tambahan, aktivitas FP-ase mengalami peningkatan sampai inkubasi hari ke-9 dan setelah hari ke-9 aktivitas FP-ase mengalami penurunan. Penurunan aktivitas FP-ase ini diduga karena adanya inhibisi produk akhir, selain itu juga karena adannya aktivitas enzim lain. Bila produk hidrolisis di luar sel meningkat lebih cepat daripada penggunaannya oleh mikroorganisme, maka mikroorganisme tersebut akan

mengatur ekskresi enzimnya agar tidak terjadi produk berlebih yang tidak terpakai. Untuk perlakuan penambahan nutrisi, aktivitas enzim FP-ase baik pada penambahan nutrisi 1 : 4 ataupun 2 : 4 terhadap substrat mengalami kenaikan sampai hari ke-12. Aktivitas enzim FP-ase yang lebih tinggi masih mungkin dihasilkan pada waktu fermentasi yang lebih lama.

Analisa sidik ragam terhadap aktivitas FP-ase menunjukkan bahwa pada taraf signifikansi 5 persen, perlakuan pemberian nutrisi tambahan, lama inkubasi serta interaksi antara keduanya berpengaruh nyata terhadap aktivitas FP-ase enzim selulase yang dihasilkan (Lampiran 4a).

Uji lanjut Duncan yang dilakukan untuk menunjukkan pengaruh pemberian nutrisi terhadap aktivitas FP-ase pada taraf signifikansi 5 persen dapat dilihat pada Lampiran 4b, dimana penambahan nutrisi berbeda nyata dengan aktivitas enzim yang tidak diberi penambahan nutrisi. Perbedaan ini diduga karena penambahan nutrisi dapat meningkatkan aktivitas enzim sebagaimana didukung oleh Mandels *et al.* (1975), yang menyatakan bahwa kombinasi mineral Fe atau Mn dengan Zn atau Co akan meningkatkan aktivitas enzim selulase yang dihasilkan.

Uji lanjut Duncan untuk lama inkubasi terhadap aktivitas FP-ase pada taraf signifikansi 5 persen (Lampiran 4c) menunjukkan perbedaan yang nyata untuk semua waktu inkubasi kecuali pada lama inkubasi hari ke-9 dan hari ke-12. Hal ini menunjukkan bahwa semakin lama waktu inkubasi semakin tinggi aktivitas enzim FP-ase yang dihasilkan.

Interaksi antara penambahan nutrisi dan lama inkubasi menunjukkan bahwa kombinasi penambahan nutrisi 2:4 terhadap substrat dan lama inkubasi 12 hari (A3B4) menghasilkan enzim dengan aktivitas FP-ase paling tinggi yaitu sebesar 0,3865 Unit/ml filtrat biakan (Lampiran 4d).

Menurut Irawadi (1991), aktivitas enzim FP-ase yang dihasilkan menunjukkan tingginya aktivitas eksoselulase (selobiohidrolase) yaitu enzim selulase yang menghidrolisis ikatan beta-1,4-glikosida pada ujung-ujung non pereduksi rantai selulase kristalin dan menghasilkan selobiosa. Selanjutnya selobiosa yang dihasilkan dihidrolisis oleh beta-glukosidase ataupun glukan-glukanohidrolase, sehingga tingginya aktivitas enzim FP-ase dapat menjadi petunjuk tingginya aktivitas beta-glukosidase pada filtrat media.

4.3 Aktivitas *Carboxy Methyl Celulase* (CMC-ase) selama Fermentasi

Menurut Enari (1983), pengukuran aktivitas CMC-ase dimaksudkan untuk mengetahui kerja enzim endo-glukanase dan glukan-glukanohidrolase. Kedua enzim ini merupakan bagian dari enzim selulase yang dapat menghidrolisa selulase yang telah direnggangkan dengan asam fosfat dan selulase yang telah disubstitusi seperti CMC (*carboksil metil celulase*) dan HEC (*hidroksi etil celulase*). Endo-glukanase menghidrolisis ikatan β -1,4-glukosidik secara acak, sedangkan glukan-glukanohidrolase pada ujung non pereduksi.

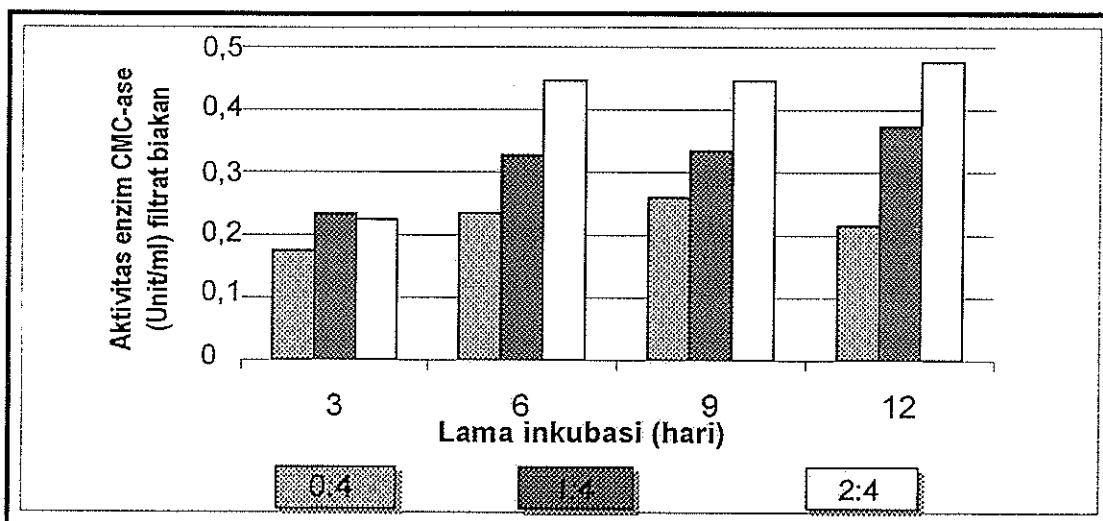
Menurut Irawadi (1991), CMC adalah turunan selulosa dapat larut yang digunakan sebagai substrat bagi enzim endoglukanase. Enzim yang dapat menghidrolisis CMC ini sering disebut CMC-ase (*carboxy methyl celulase*). Pengukuran aktivitas enzim endoglukanase ini dilakukan dengan cara mengukur gula pereduksi yang dihasilkan selama hidrolisis substrat melalui metode DNS.

Aktivitas CMC-ase dinyatakan dalam satuan unit per mililiter filtrat biakan per menit. Satu unit aktivitas enzim setara dengan satu mikromol glukosa yang dihasilkan dari perlakuan enzim terhadap larutan CMC-ase 1 % selama satu menit. Hasil pengukuran aktivitas CMC-ase pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Aktivitas CMC-ase Selama Fermentasi oleh *Trichoderma viride*

| Lama inkubasi (hari) | Perbandingan media (larutan nutrisi : substrat) Unit/ml filtrat | | |
|-------------------------|--|--------|--------|
| | 0 : 4 | 1 : 4 | 2 : 4 |
| 3 | 0,3477 | 0,4670 | 0,4477 |
| 6 | 0,4685 | 0,6537 | 0,8917 |
| 9 | 0,5192 | 0,6677 | 0,8924 |
| 12 | 0,4300 | 0,7457 | 0,9510 |

Dari Tabel 3 di atas dapat dilihat bahwa aktivitas CMC-ase dari kapang *Trichoderma viride* berkisar antara 0,3472 Unit/ml filtrat biakan sampai 0,9510 Unit/ml filtrat biakan, dengan hasil rata-rata 0,6235 Unit/ml filtrat biakan. Dalam bentuk diagram, aktivitas CMC-ase dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Aktivitas Enzim CMC-ase Selama Fermentasi oleh *Trichoderma viride*

Pada Gambar 7 terlihat bahwa aktivitas CMC-ase tertinggi didapat dari kombinasi perlakuan pemberian nutrisi tambahan 2:4 terhadap substrat dengan lama inkubasi 12 hari (A3B4). Aktivitas CMC-ase tertinggi dari kapang ini masih mungkin diperoleh dengan semakin lama inkubasi yang dilakukan.

Berdasarkan analisa sidik ragam (Lampiran 5a) menunjukkan bahwa pada taraf signifikansi 5 persen, faktor perlakuan penambahan nutrisi, lama inkubasi, serta interaksi penambahan nutrisi dan lama inkubasi berpengaruh nyata terhadap aktivitas CMC-ase yang dihasilkan.

Uji lanjut Duncan (Lampiran 5b) menunjukkan bahwa pengaruh pemberian nutrisi tambahan memberikan pengaruh nyata terhadap aktivitas CMC-ase yang dihasilkan, dimana pemberian nutrisi tambahan 2:4 terhadap substrat (A3) menghasilkan aktivitas lebih tinggi dibandingkan penambahan nutrisi 1:4 terhadap substrat. Pemberian nutrisi 1:4 terhadap substrat (A2) menghasilkan aktivitas lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan tanpa pemberian nutrisi tambahan (A1). Aktivitas CMC-ase yang dihasilkan semakin meningkat dengan semakin meningkatnya nutrisi yang diberikan.

Uji lanjut Duncan (Lampiran 5c) pengaruh lama inkubasi terhadap aktivitas CMC-ase filtrat biakan pada taraf signifikansi 5 persen menunjukkan hasil yang berbeda nyata kecuali pada hari ke-9 dan hari ke-12 tidak menunjukkan hasil yang berbeda nyata.

Aktivitas CMC-ase yang dihasilkan semakin meningkat dengan semakin lamanya waktu inkubasi.

Interaksi pemberian nutrisi tambahan dan lama inkubasi dengan uji Duncan (Lampiran 5d) menunjukkan bahwa kombinasi penambahan nutrisi 2:4 terhadap substrat dan lama inkubasi 12 hari (A3B4) menghasilkan rata-rata aktivitas CMC-ase tertinggi yaitu sebesar 0,9510 Unit/ml filtrat biakan.

Aktivitas CMC-ase umumnya lebih tinggi dibandingkan aktivitas FP-ase. Hal ini disebabkan CMC-ase menghidrolisis substrat yang lebih bersifat larut sehingga ikatan kohesi antara selulosa menjadi rendah dan struktur selulosanya sendiri menjadi lebih renggang bila dibandingkan struktur selulosa yang terdapat pada kertas saring Whatman no.1 yang merupakan substrat bagi enzim FP-ase. Kondisi ini memudahkan enzim untuk memotong atau menghidrolisis selulosa menjadi molekul-molekul penyusunnya yaitu glukosa dan selooligosakarida. Enzim salisinase ikut berperan dalam menghasilkan selooligosakarida sebagai produk antara, walaupun enzim glukan-glukanohidrolase yang menghidrolisa selooligosakarida tetapi tidak menutup kemungkinan adanya kerja beta-glukosidase yang dapat menghidrolisis selobiosa dan selooligosakarida rantai pendek sehingga aktivitas CMC-ase menjadi semakin besar.

Aktivitas CMC-ase terutama menunjukkan aktivitas endoselulase yang secara acak memutuskan ikatan pada bagian amorf selulosa yang sangat mudah mengalami hidrolisis (Irawadi, 1991). Selanjutnya Mandels *et al.* (1976), menyatakan bahwa bagian amorf selulosa dapat dihidrolisis dengan cepat dan kecepatan hidrolisis ini akan menurun dengan semakin banyaknya daerah kristal selulase yang diserang enzim selulase tersebut.

4.4 Gula Pereduksi Selama Fermentasi

Gula pereduksi merupakan produk hidrolisis enzim yang diukur dengan menggunakan metoda DNS (Miller, 1959). Mekanisme enzim selulase ekstraseluler didahului dengan dilepaskannya sejumlah kecil enzim selulase yang disebut selulase basal ke dalam media. Selulase basal ini kemudian menghidrolisis selulosa dalam media sehingga menghasilkan selobiosa dalam jumlah kecil. Selobiosa kemudian berperan sebagai induser produksi selulase yang pada kondisi tertentu selulase tersebut dapat dilepaskan ke luar sel yaitu

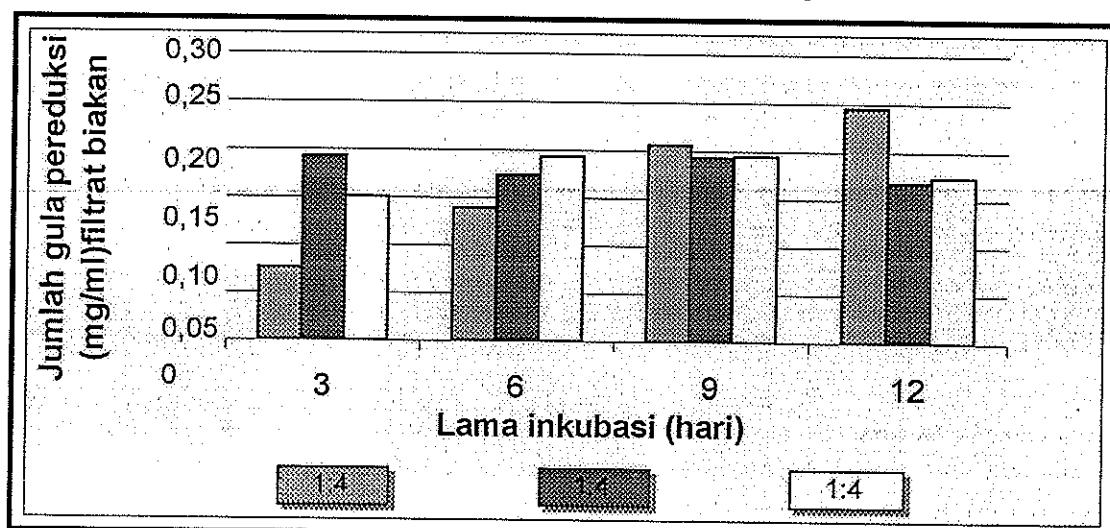
ke dalam media. Enzim yang dilepaskan ke luar sel akan menghidrolisis selulosa menjadi glukosa dan selobiosa. Jumlah enzim selulase yang dilepaskan mempengaruhi jumlah glukosa dan selobiosa yang dihasilkan. Menurut Gong dan Tsao (1979), glukosa dan selobiosa selain berperan sebagai penyokong pertumbuhan sel juga berperan dalam mekanisme induksi-represi.

Kandungan gula pereduksi yang dihasilkan pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 4 sedangkan dalam bentuk diagram dapat dilihat pada gambar 8.

Tabel 4. Kandungan Gula Pereduksi Selama Fermentasi oleh *Trichoderma viride*

| Lama inkubasi (hari) | Perbandingan media (tarutan nutrisi : substrat) mg/ml filtrat | | |
|----------------------|--|--------|--------|
| | 0 : 4 | 1 : 4 | 2 : 4 |
| 3 | 0,0757 | 0,1924 | 0,1503 |
| 6 | 0,1392 | 0,1737 | 0,1930 |
| 9 | 0,2060 | 0,1933 | 0,1943 |
| 12 | 0,2454 | 0,168 | 0,1734 |

Dari Tabel di atas dapat dilihat kandungan gula pereduksi berkisar antara 0,0757 mg/ml sampai 0,2454 mg/ml filtrat dengan nilai rata-rata sebesar 0,1755 mg/ml filtrat.



Gambar 8. Kandungan Gula Pereduksi Selama Fermentasi oleh *Trichoderma viride*

Dari Gambar 8 terlihat bahwa kombinasi perlakuan tanpa pemberian nutrisi dan lama inkubasi 12 hari menghasilkan kadar gula pereduksi yang lebih tinggi. Hal ini menunjukkan bahwa masih banyak glukosa yang belum digunakan oleh *Trichoderma viride* untuk pertumbuhan. Tingginya gula pereduksi ini dapat menyebabkan penghambatan terhadap produksi enzim selulase yang dihasilkan, terbukti dengan rendahnya aktivitas enzim selulase yang didapatkan pada perlakuan tersebut.

Dari hasil analisa sidik ragam terhadap gula pereduksi pada taraf signifikansi 5 persen, perlakuan pemberian nutrisi tambahan dan lama inkubasi memberikan hasil yang berbeda nyata (Lampiran 6a).

Uji lanjut Duncan (Lampiran 6b), perlakuan pemberian nutrisi tambahan terhadap kandungan gula pereduksi yang dihasilkan menunjukkan hasil yang berbeda nyata antara pemberian nutrisi tambahan dengan tanpa diberi nutrisi tambahan.

Uji lanjut Duncan (Lampiran 6c) pada taraf signifikansi 5 persen lama inkubasi terhadap kandungan gula pereduksi menunjukkan hasil berbeda nyata. Dimana inkubasi hari ke-9 menghasilkan gula pereduksi tertinggi yaitu sebesar 0,1993 mg/ml tetapi hasil ini tidak berbeda nyata dengan inkubasi hari ke-12 yaitu sebesar 0,1959 mg/ml. Lama inkubasi dari hari ke-3 sampai hari ke-9 menunjukkan kenaikan sedangkan setelah hari ke-9 mengalami penurunan. Penurunan kadar gula pereduksi ini diduga karena adanya penggunaan gula sebagai sumber karbon bagi pertumbuhan kapang *Trichoderma viride* yang ditumbuhkan pada media.

Interaksi antara perlakuan penambahan nutrisi dengan lama inkubasi pada taraf signifikansi 5 persen (Lampiran 6d) menunjukkan hasil yang berbeda nyata. Hasil tertinggi diperoleh dari kombinasi perlakuan tanpa penambahan nutrisi dengan lama inkubasi 12 hari (A1B4) sebesar 0,2454 mg/ml filtrat. Menurut Irawadi (1991) kadar gula yang tinggi dapat menjadi inhibitor sintesis selulase dari kapang.

4.5 Protein Terlarut Filtrat Medium Fermentasi

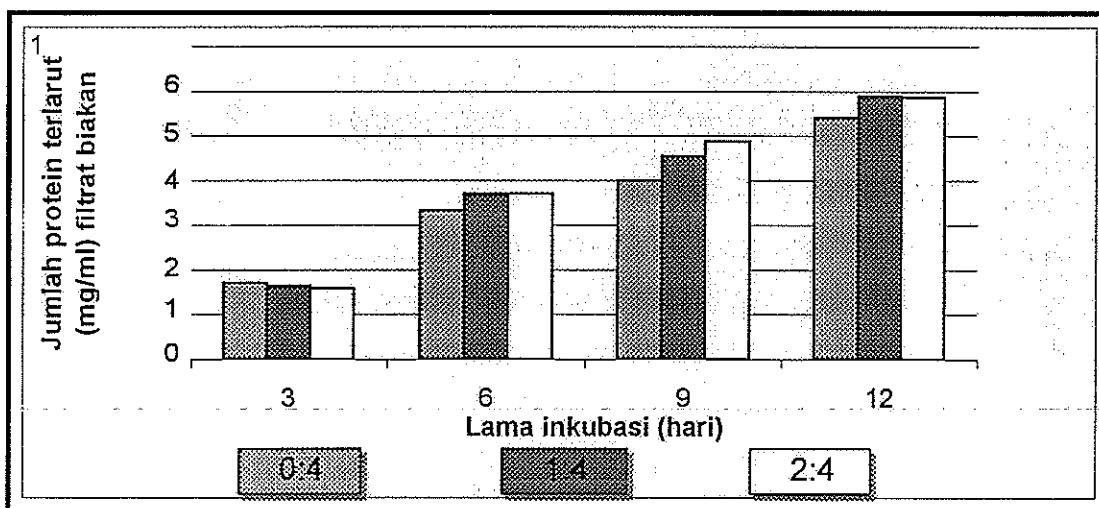
Protein terlarut dalam media fermentasi diukur untuk mengetahui jumlah enzim yang disintesis oleh mikroba dan untuk mengetahui aktivitas spesifik enzimnya. Kandungan protein terlarut yang terukur dalam penelitian ini masih merupakan *crude protein* karena di dalam medium juga mengadung protein terlarut yang berupa pepton atau hasil metabolisme protein

mikroorganisme yang disekresikan. Hasil pengukuran kandungan protein terlarut selama fermentasi dapat dilihat pada Tabel 5, sedangkan dalam bentuk diagram dapat dilihat pada Gambar 9.

Tabel 5. Kandungan Protein Terlarut Selama Fermentasi *Trichoderma viride*

| Lama inkubasi (hari) | Perbandingan media (larutan nutrisi : substrat) mg/ml filtrat | | |
|----------------------|--|-------|-------|
| | 0 : 4 | 1 : 4 | 2 : 4 |
| 3 | 1,714 | 1,634 | 1,585 |
| 6 | 3,327 | 3,699 | 3,704 |
| 9 | 3,998 | 4,550 | 4,873 |
| 12 | 5,411 | 5,890 | 5,871 |

Dari Tabel 5 di atas, protein terlarut yang dihasilkan berkisar antara 1,585 mg/ml sampai 5,89 mg/ml dengan nilai rata-rata 4,066 mg/ml.



Gambar 9. Kandungan Protein Terlarut Selama Fermentasi oleh *Trichoderma viride*

Dari Gambar 9 terlihat kandungan protein terlarut tertinggi didapat pada kombinasi perlakuan pemberian nutrisi tambahan 1 : 4 terhadap substrat dengan lama inkubasi 12 hari yaitu sebesar 5,89 mg/ml (A2B4).

Analisis sidik ragam perlakuan penambahan nutrisi, lama inkubasi serta interaksi antara keduanya menunjukkan hasil yang berbeda nyata terhadap kandungan protein yang dihasilkan (Lampiran 7a).

Uji lanjut Duncan (Lampiran 7b) menunjukkan bahwa pada taraf signifikansi 5 persen perlakuan pemberian nutrisi tambahan berpengaruh nyata terhadap kandungan protein terlarut, dimana kandungan protein terlarut pada filtrat yang diberi nutrisi tambahan relatif lebih besar dibanding filtrat yang tidak diberi nutrisi tambahan.

Lebih besarnya kandungan protein pada filtrat yang diberi nutrisi tambahan diduga karena adanya pepton yang terukur sebagai protein terlarut. Selain itu adanya penambahan nitrogen seperti ammonium sulfat dan urea yang baik untuk pertumbuhan juga terukur sebagai protein terlarut (Mendels *et al.*, 1975).

Uji lanjut Duncan (Lampiran 7c) pada lama inkubasi terhadap kandungan protein terlarut menunjukkan hasil yang berbeda nyata dimana makin lama inkubasi semakin tinggi kandungan protein terlarut yang dihasilkan. Hal ini diduga berhubungan dengan semakin tingginya aktivitas enzim selulase yang diperoleh. Mandels (1982) menyatakan bahwa *Trichoderma viride* dapat menghasilkan enzim selulase lengkap dengan semua komponen yang dibutuhkan untuk menghidrolisis selulosa kristalin serta memberikan rendemen protein yang tinggi. Selain itu diduga adanya enzim lain yang dihasilkan terukur sebagai protein terlarut.

Interaksi antara penambahan nutrisi tambahan dengan lama inkubasi menunjukkan bahwa kombinasi penambahan nutrisi 1 : 4 dan lama inkubasi 12 hari (A2B4) menghasilkan protein terlarut tertinggi yaitu sebesar 5,89 mg/ml.

4.6 Derajat Keasaman (pH)

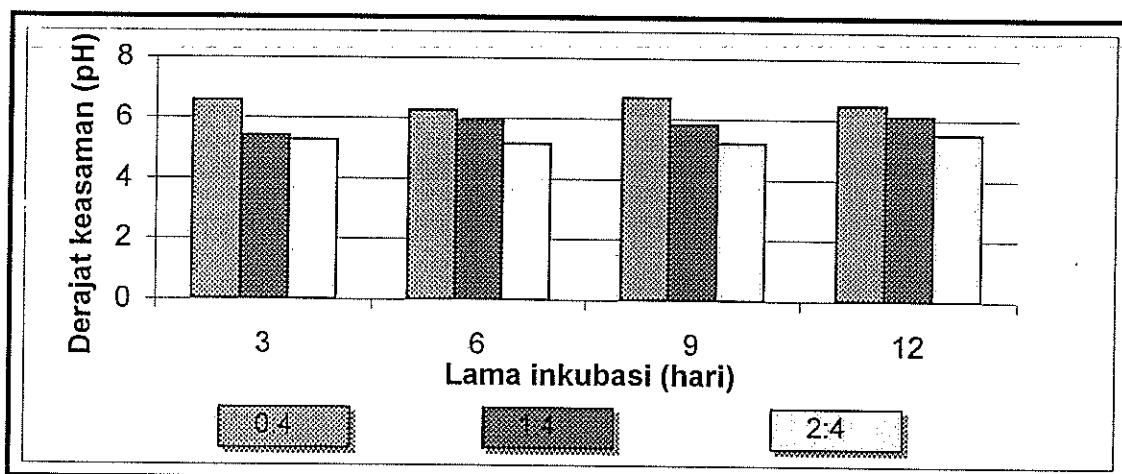
Derajat keasaman (pH) medium fermentasi merupakan salah satu faktor yang berpengaruh terhadap produksi enzim selulase. Pemanfaatan pH selama fermentasi dapat memberikan gambaran tentang proses biokimia yang terjadi selama fermentasi serta dapat dijadikan parameter untuk mengendalikan proses fermentasi. Pengaturan pH yang optimum memungkinkan reaksi berjalan optimum dan memperkecil kemungkinan kontaminasi oleh mikroorganisme lain.

Derasat keasaman (pH) harus dipertahankan dalam keadaan optimum karena pH sangat berhubungan dengan mekanisme pelepasan enzim ekstraseluler dari sel ke dalam media fermentasi. Salah satu kelemahan fermentasi pada medium padat adalah pengaturan pH yang relatif sulit dilakukan. Untuk menjaga pH pada kondisi optimum selama fermentasi berlangsung maka ditambahkan fosfat dalam media. Hasil pengukuran pH filtrat media dari ketiga kultur kapang selama fermentasi disajikan pada Tabel 6 sedangkan dalam bentuk diagram dapat dilihat pada Gambar 10.

Tabel 6. Hasil Pengukuran pH Selama Fermentasi *Trichoderma viride*

| Lama Inkubasi (Hari) | Perbandingan media (larutan nutrisi : substrat) mg/ml filtrat | | |
|-------------------------|--|-------|-------|
| | 0 : 4 | 1 : 4 | 2 : 4 |
| 3 | 6,56 | 5,40 | 5,25 |
| 6 | 6,25 | 5,90 | 5,15 |
| 9 | 6,70 | 5,80 | 5,20 |
| 12 | 6,45 | 6,10 | 5,50 |

Dari Tabel 6 terlihat bahwa pH berkisar antara 5,15 sampai 6,70. Kisaran pH ini masih merupakan kisaran pH yang baik untuk perumbuhan kapang tetapi kurang baik untuk produksi enzim selulase. Pertumbuhan kapang membutuhkan pH yang lebih tinggi dibanding produksi enzim, pada umumnya untuk pertumbuhan kapang membutuhkan pH di atas 4,0 sedangkan untuk produksi enzim dibutuhkan pH di bawah 4,0.



Gambar 10. Pengukuran pH Selama Fermentasi

Dari Gambar 10 pH tertinggi diperoleh pada kombinasi antara kombinasi perlakuan yang tidak diberi penambahan nutrisi dan lama inkubasi 9 hari (A1B3).

Berdasarkan analisa sidik ragam (Lampiran 8a) menunjukkan bahwa pemberian nutrisi tambahan, lama inkubasi dan interaksi antara keduanya berpengaruh nyata terhadap pH akhir filtrat enzim yang dihasilkan.

Uji lanjut Duncan (Lampiran 8b) pengaruh pemberian nutrisi tambahan terhadap pH pada taraf signifikansi 5 persen menunjukkan hasil yang berbeda nyata. Uji lanjut Duncan (Lampiran 8c) pengaruh inkubasi menunjukkan bahwa pada lama inkubasi 3 dan 6 hari berbeda nyata dengan lama inkubasi 9 dan 12 hari.

Kombinasi perlakuan pemberian nutrisi 2:4 dan lama inkubasi 12 hari (A3B4) dengan nilai pH 5,5 merupakan nilai pH optimum bagi produksi enzim selulase oleh *Trichoderma viride*. (Lampiran 8d).

5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Serbuk limbah agar-agar kertas yang digunakan sebagai media tumbuh kapang *Trichoderma viride* mempunyai kadar air 7,63 %, kadar abu 15,30 %, protein 15,53 %, lemak 0,19 %, karbohidrat (*by difference*) 61,35 %, selulosa 16,03 %, hemiselulosa 25,23 %, lignin 3,10% dan serat kasar 11,56 %.

Hasil uji aktivitas total enzim selulase (FP-ase) tertinggi diperoleh pada kombinasi perlakuan pemberian nutrisi tambahan dengan perbandingan 2 : 4 terhadap substrat dengan lama inkubasi 12 hari yaitu sebesar 0,3865 Unit/ml filtrat biakan. Uji sidik ragam perlakuan penambahan nutrisi, lama inkubasi, dan interaksi antara keduanya menunjukkan hasil yang berbeda nyata.

Hasil uji aktivitas enzim CMC-ase tertinggi diperoleh pada kombinasi perlakuan pemberian nutrisi tambahan dengan perbandingan 2 : 4 terhadap substrat dengan lama inkubasi 12 hari yaitu sebesar 0,9510 Unit/ml filtrat biakan. Uji sidik ragam perlakuan penambahan nutrisi, lama inkubasi, dan interaksi antara keduanya menunjukkan hasil yang berbeda nyata.

Hasil uji gula pereduksi tertinggi diperoleh pada kombinasi perlakuan tanpa pemberian nutrisi tambahan dengan lama inkubasi 12 hari yaitu sebesar 0,1959 mg/ml filtrat biakan. Uji sidik ragam perlakuan penambahan nutrisi, lama inkubasi, dan interaksi antara keduanya menunjukkan hasil yang berbeda nyata.

Hasil uji protein terlarut tertinggi diperoleh pada kombinasi perlakuan pemberian nutrisi tambahan dengan perbandingan 1 : 4 terhadap substrat dengan lama inkubasi 12 hari yaitu sebesar 5,89 mg/ml filtrat biakan. Uji sidik ragam perlakuan penambahan nutrisi, lama inkubasi, dan interaksi antara keduanya menunjukkan hasil yang berbeda nyata.

Derajat keasaman (pH) optimum untuk produksi enzim selulase dari *Trichoderma viride* pada serbuk limbah agar-agar kertas adalah 5,5. Kondisi terbaik untuk produksi enzim selulase dari serbuk limbah agar-agar kertas dengan menggunakan kapang *Trichoderma viride* pada penelitian ini secara umum adalah pemberian nutrisi tambahan dengan perbandingan 2 : 4 dan lama inkubasi 12 hari dengan pH 5,5.

5.2 Saran

Aktivitas enzim selulase yang dihasilkan pada penelitian ini belum optimum sehingga disarankan untuk memperpanjang lama inkubasi dan penggunaan jenis kapang yang berbeda. Selain itu aktivitas enzim selulase yang dihasilkan masih berupa enzim kasar sehingga perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai pemurnian enzim selulase.

DAFTAR PUSTAKA

- Alexander, M. 1977. Introduction to Soil Microbiology. Second edition. John Wiley and Sons. Inc. New York.
- AOAC. 1984. Official Methods of Analysis The Association of Official Analytical Chemist. 14th ed. AOAC, Inc. Arlington. Virginia.
- Apriyantono, A., D. Fardiaz, N.L. Puspitasari, Sedarnawati, dan S. Budiyanto. 1989. Petunjuk Laboratorium Analisis Pangan. Penerbit Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Bastaman, S. 1989. Studies on degradation and extraction of chitin and chitosan from prawn cell (*Nephrops norregicus*). Thesis. The Department of Mechanical, Manufacturing, Aeronautical and Chemical Engineering, Faculty of Engineering The Queen's University of Belfast.
- Chahal, D.S. 1983. Growth characteristic of microorganism in solid state fermentation for upgrading of protein values of lignoselulosic and cellulase production. American Chemical Society. Washington.
- Chahal, D.S. 1985. Solid state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulase production. *Appl. Environ. J. Microbiol.*, **49** : 205-210.
- Chahal, D.S., Chahal, P.S., dan Andre, G. 1992. Cellulases production profile of *Trichoderma reesei* on different cellulosic substrat at various pH levels. *J. Fermentation and Bioeng.* **74**: 126-128.
- Chibata, I. 1978. Immobilized enzyme, Research and Development. John Wiley and Sons Inc., New York.
- Darwis, A.A., T. Bunasor, L. Hartato dan M. Alisyahbana. 1988. Studi Potensi Limbah Lignoselulotik di Indonesia. PAU. IPB.
- Darwis, A. A. dan T. C. Sunarti. 1992. Teknologi Mikrobiol. PAU-IPB. Bogor.
- Domsch, K. H., dan W. Gams. 1972. Fungi in Agricultural Soils. Longman Group Limited Publishing. London.
- Ekawati, I.G.A., 1993. Pemanfaatan bonggol pisang untuk produksi enzim selulase dari *Aspergillus niger* dan *Trichoderma reesei*. Tesis. Program Pasca Sarjana IPB. Bogor.
- Enari, T.M. 1983. Microbial cellulase. *Dalam Microbial Enzyme and Biotechnology*. Edited by W.M. Fogarty. Applied Science Publ. New York.
- Fardiaz, S. 1989. Mikrobiologi Pangan. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi. PAU-Pangan dan Gizi, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Frazier, W. C. dan D. C. Westhoff. 1977. Food Microbiology. 4th Edition. McGraw-Hill Book Publishing. Co. Ltd. New York.
- Frazier, W. C. dan D. C. Westhoff. 1983. Food Microbiology. McGraw-Hill Book. Publishing. Co. Ltd. New York.

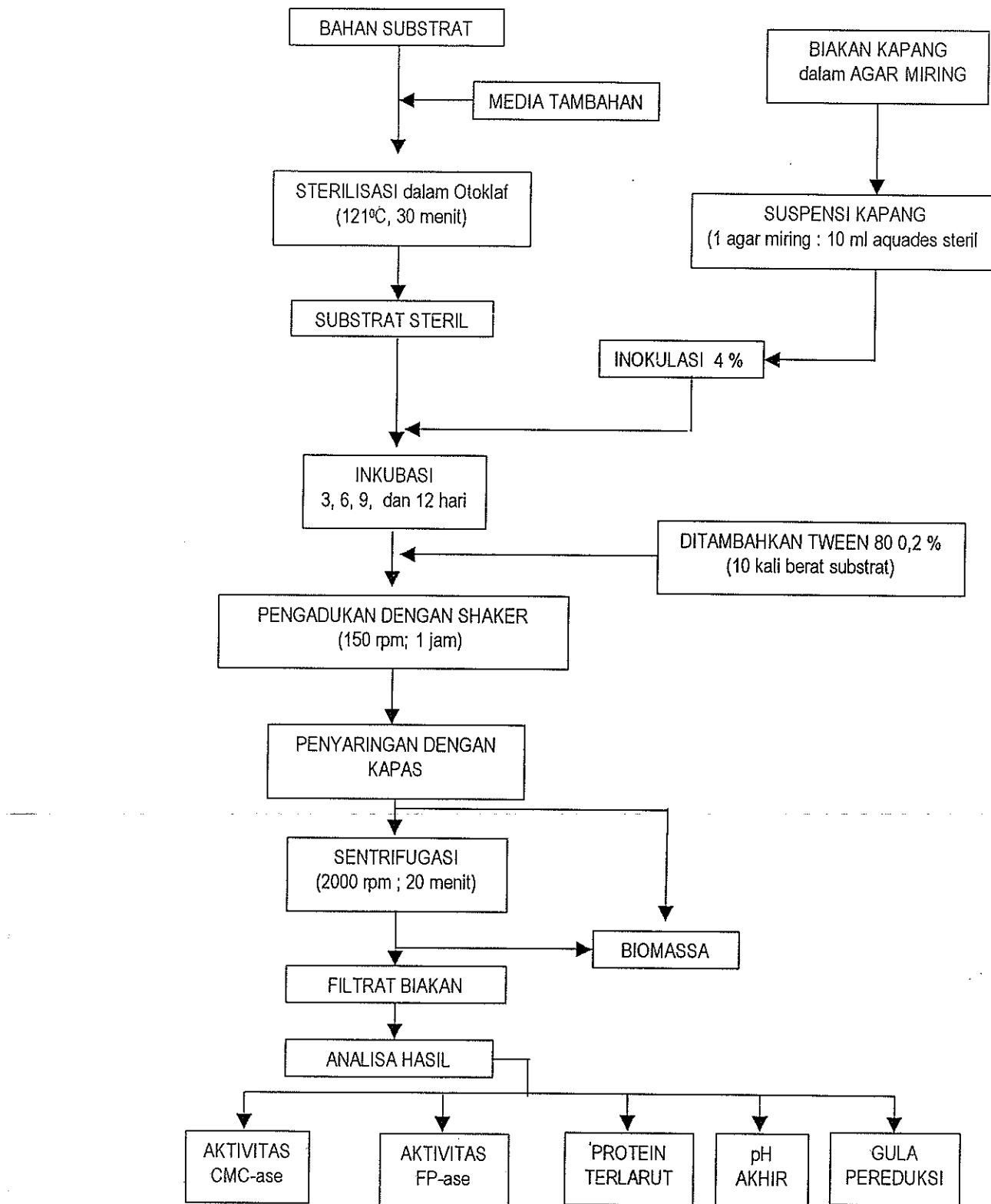
- Frost, G.M. dan D.M. Moss. 1987. Production of Enzymes by Fermentation. *Dalam J. of Biotech.* Vol. 73. VHC. Germany.
- Goering, G. M. dan D. M. Moss. 1987. Production of enzymes by fermentation. *Dalam J. of Biotech.* Vol. 73. VHC. Germany.
- Gong, C.S. dan G.T. Tsao. 1979. Cellulase and biosynthesis regulation *Dalam Advance in Applied Microbiology*. D. Pearlman (ed). Annual Reports on Fermentation Processes. Vol. 2. Academic Press. New York.
- Ghose, T.K. 1978. Microbial technology in division of energy and chemical from resource. *Dalam Advance in Applied Microbiology*. D. Pearlman (ed). Academic Press. New York.
- Hardjo, S., N. S. Indrasti dan T. Bantucut. 1989. Biokonversi Pemanfaatan Limbah Industri Pertanian. PAU-Pangan dan Gizi. IPB. Bogor.
- Hariyum, A. 1986. Pembuatan Protein Sel Tunggal. PT. Waca Ulama Pratama. Jakarta.
- Irawadi, T.T. 1991. Produksi enzim ekstraselular (selulase dan xilanase) dari *Neurorhophora sitophila* pada substrat limbah padat kelapa sawit. Desertasi Doktor, Program Pasca Sarjana. IPB. Bogor.
- Judoamidjojo, R.M., E. G. Sa'id dan L. Hartato. 1989. Biokonversi. PAU. IPB.
- Lee, B., A. L. Pometto, A. Demirci dan P. N. Hinz. 1998. Media evaluation for the production of microbial enzymes. *J. Agric. Food Chem.* 46 : 4775- 4778.
- Lichfield, J. H. 1984. Single-cell protein *Dalam Bioteknologi : Latar belakang dan beberapa penerapannya*. Edited by Sardjoko. 1991. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, dan R.J. Randall. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Kosaric, N., D. C. M. Ng. I. Russels dan G. S. Stewart. 1980. Ethanol production by fermentation : An alternative liquid fuel. *Dalam Advance in Microbiology*. D. Pearlman (ed). Academic Press. New York.
- Kulp, K. 1975. Carbohydrases. *Dalam Enzyme in Food Processing*. G. Reed (ed). Academic Press. New York.
- Mandels, M., dan D. Sternberg dan R.E. Andreotti. 1975. Effect of media composition and growth condition on production of cellulase and beta-glucosidase by a mixed fungal. *Dalam Symposium on Enzymatic Hydrolysis of Cellulose*. Edited by M. Bailey, T.M. Enari dan M. Linko SITRA. Helsinki. P. 81.
- Mandels, M. dan D. Sterberg. 1976. Recent advances in cellulase technology. *J. Ferment. Technol.* 54:267-287.
- Mandels, M., E. T. Reese dan L.A. Spano. 1976. Enzymatic conversion of cellulosic material. *Technology and Application Interscience*. Publishing. John Wiley and Sons. New York.
- Mandels, M. 1982. Cellulases. *Dalam Annual Report on fermentation Process*. 5 : 35-78.

- Miller, G. L. 1959. The use of nitrosalisol acid reagent for reducing sugar. *Anal. Chem.* 31 (3): 426-428.
- Muchtady, D., N.S. Palupi dan M. Astawan. 1992. Enzim dalam Industri Pangan. PAU-IPB, Bogor.
- Muldani, M. 1997. Penanganan bahan baku dan pengolahan agar-agar kertas di Desa Mancahagar, Kec. Pamengpeuk, Kab. Garut, Jawa Barat. Lap. Praktek Lapang. Program Studi Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB. Bogor.
- Murphy, H. 1994. Pemanfaatan limbah kulit pisang untuk produksi enzim selulase dari *Trichoderma viride*, *Aspergillus niger* dan *A. oryzae*. Skripsi. IPB-Bogor.
- Olga, F. 1986. Moulds and Filamentous Fungi in Technical Microbiology. Volume 22. Elsivier Science Publishing Company. Inc. New York.
- Pelczar, M. J. dan R.D. Reid. 1974. Microbiology. McGraw-Hill Book Co., New York.
- Pratiwi, E. A. 1994. Pemanfaatan limbah nenas (*Ananas comusus L. merr*) untuk produksi enzim selulase dari beberapa jenis mikroorganisme. Skripsi. Teknologi Pertanian. FATEKA. IPB. Bogor.
- Prescott, S. C. dan C. G. Dunns. 1981. Industrial Microbiology. The AVI Publishing Co. Inc., Wesport. Connecticut.
- Rao, S. 1975. Soil Microorganisms and Plant Growth. Oxford and IBH Publishing Co. New Delhi.
- Reese, E.T., R.G.H., Siu dan H.S. Levinson. 1950. The biological degradation of soluble celluloses derivative and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. *J. Bacteriol.* 59 : 485-486.
- Reese, E.T. 1977. History of the cellulose program at The U.S. Army Natick Development Center. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 6: 9-20.
- Reese, E.T. 1977. Degradation of polymeric carbohydrates by microbial enzyme. *Dalam Recent Advances in Phytochemistry*, Vol. 11. F.A. Loewus, dan V.C. Runeckles (eds). Plenum Press, New York.
- Riyanto, B., R. Suwandi, Taryono dan Uju. 1998. Modifikasi Proses Pembuatan Agar-agar Kertas. *Unpublished*.
- Rolz, J. 1979. Clasification of Wastes *Dalam* UNO Bioconversion of Organic Residues for Rural Communicaties. Guatemala.
- Said, E.G., 1987. Bio-Industrial. PAU-Bioteknologi. IPB-Bogor.

- Southgate, D. A. T. dan H. Englist. 1985. Dietary Fiber : Chemistry, Physical Properties and Analysis. *Dalam* Dietary Fiber, Fiber Depleted Food and Research. H. Trowel, D. Burkit, dan K. Heaton (eds.). Academic Press Inc. London.
- Steel, R.G.D. dan J. H. Torrie. 1991. Prinsip dan Prosedur Statistika. Terjemahan B. Soemantri. Penerbit PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Sternberg, D. 1976. Production of cellulase *Trichoderma viride*. *Dalam* Enzymatic conversion of cellulosic material : Technology and Application. Edited by E. L. Garden. J. Biotech. Bioeng. Symp. 6:36-40.
- Suhartono, M. T. 1988. Pengantar Biokimia. PAU. IPB. Bogor.
- Suhartono, M. T. 1989. Enzim dan Bioteknologi. PAU-Bioteknologi. IPB. Bogor.
- Sukara, E. 1993. Pendekatan Baru untuk Meningkatkan Nilai Tambah Ubi Kayu. Puslitbang – LIPI. Cibinong. Bogor. *Unpublished*.
- Sulaeman, A., Rimbawan, A. Faisal. 1997. Penuntun Praktikum Analisa Kimia Bahan Makanan. Jurusan Gizi Masyarakat dan Sumberdaya Keluarga. Fakultas Pertanian. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Suseno, S. H. 1995. Tinjauan umum pengolahan agar-agar kertas di Desa Jatimulya, Pameungpeuk, Garut, Jawa Barat. Lap. Praktek Lapang. Teknologi Hasil Perikanan. Fakultas Perikanan, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Suwandi, R., B. Riyanto, Taryono, dan Uju. 1998. Design dan Rancang Bangun Alat Pengering Semprot Mekanik Tepung Agar-agar. *Unpublished*.
- Tjokroadikoesoemo, P. S. 1986. HFS dan Industri Ubi Kayu Lainnya. PT. Gramedia. Jakarta.
- Tsao, G. T., M. C. Ladisch, T. A. Hsu, B. Dale, dan T. Chou. 1978. Fermentation substrates from cellulosic material. *Dalam* Production of Fermentation sugars from cellulosic materials. Edited by D. Pearlman. Annual Report on Fermentation Processes. Volume 2.
- Thenawidjaya, M. 1989. Enzim dan Bioteknologi. PAU-IPB. Bogor.
- Tjoroadikoesoemo, P. S. 1986. HFS dan Industri Ubi Kayu Lainnya. PT. Gramedia. Jakarta.
- Winarso, F.G. 1995. Enzim Pangan. PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Wood, T.M. dan Collin, S.A., 1987. Development of a medium for high cellulase, xylanase and beta-glukosidase production by mutan strain (NTG III/6) of the cellulolytic fungus *Penicillium pinophilum*. J. Enzyme Microb. Tech. Vol. 9 : 355-360.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Diagram Alir Proses Produksi Enzim Selulase (Pratiwi, 1994)



Lampiran 2. Komposisi Media Chahal yang Dimodifikasi (1985).

| Komponen | Jumlah (gram) |
|--|---------------|
| KH_2PO_4 | 14 |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 9,8 |
| Urea | 2,1 |
| CaCl_2 | 2,1 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 2,1 |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 35 mg |
| $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 10,92 mg |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 9,8 mg |
| $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 14 mg |
| Bakto pepton | 1,75 |

Lampiran 3. Proses Pembuatan Preaksi untuk Analisa

Protein dengan Metode Lowry *et al.*, (1951)

1. Preaksi A : 2 persen Na_2CO_3 anhidrat dalam 0,1N NaOH
2. Preaksi B : 0,5 persen $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dalam larutan 1 persen Na-K-tartrat
3. Preaksi C : campuran segar 50 ml preaksi A + preaksi B disebut
Larutan cooper alkalin
4. Preaksi D : preaksi Folin Ciocalteu, terdiri dari campuran:

10 g $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
25 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
700 ml air suling
50 ml asam phospat 85 persen
100 ml HCl pekat

Campuran tersebut di atas direfluks secara hati-hati selama 10 jam, kemudian ditambah 150 g LiSO_4 , 50 ml air suling dan beberapa tetes Brom. Campuran dididihkan 15 menit (tanpa kondensor) agar brom yang berlebihan dapat menguap dan setelah dingin larutan ini diencerkan sampai volumenya menjadi 1 liter, disaring dan ditentukan normalitas asamnya.

Aktivitas Enzim Selulase (Mendels *et al.*, 1976)

1. Larutan glukosa standar dalam buffer sitrat pH 4,8
2. Buffer sitrat

Sebanyak 210 g asam sitrat monohidrat ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) dilarutkan dalam 750 ml air suling dan ditambahkan NaOH lebih kurang 55 g sampai pH-nya mencapai 4,4, kemudian diencerkan sampai 1 liter dan diperkirakan pH-nya kembali. Jika perlu ditambahkan NaOH sampai mencapai pH 4,6, selanjutnya ditambahkan 0,1 g *merthiolat* sebagai bahan pengawet. Jika larutan diencerkan menjadi 0,05 M pH buffer tersebut akan menjadi 4,8.

3. CMC (carboxy methyl cellulose) 1 persen

Carboxymethyl cellulose sebanyak 10 g dilarutkan dalam 800 ml air panas (80-90°C) sambil dikocok secara kontinyu, kemudian ditambahkan 100 ml buffer sitrat 0,5 M pH 4,8, 10 ml

merthiolat 1 persen dan dijadikan volumenya 1 liter. Larutan ini disimpan dalam lemari pendingin. Sebelum digunakan CMC 1 persen ini dipanaskan pada suhu 50°C.

4. Perekksi DNS

Sebanyak 10,6 gram (3,5-dinitrosalicylic acid) dan 19,8 gram NaOH dilarutkan ke dalam 1.416 ml air suling, kemudian ditambahkan Na-K-tartarat sebanyak 306 gram, 7,6 ml phenol dan 8,3 gram Na-metabisulfit.

Campuran perekksi DNS di atas kemudian ditentukan keasamannya. Sebanyak 3 ml dari campuran perekksi DNS diambil, selanjutnya dititrasi dengan HCl 0,1 N menggunakan indikator phenolptalin. Titrasi yang digunakan hendaknya sebanyak 5 - 6 ml HCl. Bila masih kurang basa perlu ditambahkan NaOH (2,0 gram yang setara dengan 1 ml HCl 0,1 N).

Lampiran 4a. Analisa Sidik Ragam Aktivitas FP-ase (Unit/ml) Selama Fermentasi

| Sumber | db | JK | KT | F-hitung | F-tabel | |
|-----------|----|------------|------------|----------|---------|------|
| | | | | | 5% | 1% |
| Perlakuan | 11 | 0,14137333 | 0,01285212 | 31,77** | 2,75 | 4,16 |
| A | 2 | 0,01229233 | 0,00614617 | 15,19** | 3,89 | 6,93 |
| B | 3 | 0,09625767 | 0,03208589 | 79,32** | 3,49 | 5,95 |
| AB | 6 | 0,03282333 | 0,00547056 | 13,52** | 3,00 | 4,82 |
| Galat | 12 | 0,00485400 | 0,00040450 | | | |
| Total | 23 | 0,14622733 | | | | |

* Berbeda nyata

Keterangan : A = Pemberian nutrisi tambahan

B = Lama fermentasi (hari)

Lampiran 4b. Uji Lanjut Duncan Pengaruh Penambahan Nutrisi terhadap Aktivitas FP-ase Selama Fermentasi

| Perlakuan | Rata-rata (Unit/ml) | Signifikansi 5 % |
|-----------|---------------------|------------------|
| A1 | 0,20175 | B |
| A2 | 0,23875 | A |
| A3 | 0,25600 | A |

Huruf yang berbeda menunjukkan berbeda nyata

Keterangan : A1 = Nutrisi : Substrat (0:4)

A2 = Nutrisi : Substrat (1:4)

A3 = Nutrisi : Substrat (2:4)

Lampiran 4c. Uji Lanjut Duncan Pengaruh Lama Inkubasi terhadap Aktivitas FP-ase Selama Fermentasi

| Perlakuan | Rata-rata (Unit/ml) | Signifikansi 5 % |
|-----------|---------------------|------------------|
| B1 | 0,12800 | C |
| B2 | 0,23650 | B |
| B3 | 0,27233 | A |
| B4 | 0,29183 | A |

Huruf yang berbeda menunjukkan berbeda nyata

Keterangan : B1 = Lama Inkubasi 3 hari
 B2 = Lama Inkubasi 6 hari
 B3 = Lama Inkubasi 9 hari
 B4 = Lama Inkubasi 12 hari

Lampiran 4d. Uji Lanjut Duncan Pengaruh Interaksi antar Perlakuan terhadap Aktivitas FP-ase Selama Fermentasi

| Perlakuan | Rata-rata (Unit/ml) | Signifikansi 5 % |
|-----------|---------------------|------------------|
| A3B4 | 0,38650 | A |
| A2B4 | 0,31000 | B |
| A2B3 | 0,28700 | B C |
| A3B3 | 0,26750 | B C D |
| A1B3 | 0,26250 | D |
| A1B2 | 0,23950 | D |
| A2B2 | 0,23800 | D |
| A3B2 | 0,23200 | D |
| A1B4 | 0,17900 | E |
| A3B1 | 0,13800 | E F |
| A1B1 | 0,12600 | F |
| A2B1 | 0,12000 | F |

Keterangan : Huruf yang berbeda menunjukkan berbeda nyata

Lampiran 5a. Analisa Sidik Ragam Aktivitas CMC-ase (Unit/ml) Selama Fermentasi

| Sumber | db | JK | KT | F-hitung | F-tabel | |
|-----------|----|------------|------------|-----------|---------|------|
| | | | | | 5% | 1% |
| Perlakuan | 11 | 0,94589482 | 0,08599044 | 449,41** | 2,75 | 4,16 |
| A | 2 | 0,50309142 | 0,25155471 | 1314,66** | 3,89 | 6,93 |
| B | 3 | 0,33312002 | 0,11104001 | 580,33** | 3,49 | 5,95 |
| AB | 6 | 0,10968338 | 0,01828056 | 95,54** | 3,00 | 4,82 |
| Galat | 12 | 0,00229607 | 0,00019134 | | | |
| Total | 23 | 0,94819089 | | | | |

* Berbeda nyata

Keterangan : A = Pemberian nutrisi tambahan

B = Lama fermentasi (hari)

Lampiran 5b. Uji Lanjut Duncan Pengaruh Penambahan Nutrisi terhadap aktivitas CMC-ase Selama Fermentasi

| Pertakuan | Rata-rata (Unit/ml) | Signifikansi 5 % |
|-----------|---------------------|------------------|
| A1 | 0,441438 | C |
| A2 | 0,643488 | B |
| A3 | 0,795663 | A |

Huruf yang berbeda menunjukkan berbeda nyata

Keterangan : A1 = Nutrisi : Substrat (0:4)

A2 = Nutrisi : Substrat (1:4)

A3 = Nutrisi : Substrat (2:4)

Lampiran 5c. Uji Lanjut Duncan Pengaruh Lama Inkubasi terhadap Aktivitas CMC-ase Selama Fermentasi

| Perlakuan | Rata-rata (Unit/ml) | Signifikansi 5 % |
|-----------|---------------------|------------------|
| B1 | 0,420783 | C |
| B2 | 0,671283 | B |
| B3 | 0,693200 | A |
| B4 | 0,708850 | A |

Huruf yang berbeda menunjukkan berbeda nyata

Keterangan : B1 = Lama Inkubasi 3 hari
 B2 = Lama Inkubasi 6 hari
 B3 = Lama Inkubasi 9 hari
 B4 = Lama Inkubasi 12 hari

Lampiran 5d. Uji Lanjut Duncan Pengaruh Interaksi antar Perlakuan terhadap Aktivitas CMC-ase Selama Fermentasi

| Perlakuan | Rata-rata (Unit/ml) | Signifikansi 5 % |
|-----------|---------------------|------------------|
| A3B4 | 0,95095 | A |
| A3B3 | 0,89235 | B |
| A3B2 | 0,89165 | B |
| A2B4 | 0,74565 | C |
| A2B3 | 0,66770 | D |
| A2B2 | 0,65365 | D |
| A1B3 | 0,51955 | E |
| A1B2 | 0,46855 | F |
| A2B1 | 0,46695 | F |
| A3B1 | 0,44770 | F G |
| A1B4 | 0,42995 | G |
| A1B1 | 0,34770 | H |

Keterangan : Huruf yang berbeda menunjukkan berbeda nyata

Lampiran 6a. Analisa Sidik Ragam Gula Pereduksi (mg/ml) Selama Fermentasi

| Sumber | db | JK | KT | F-hitung | F-tabel | |
|-----------|----|------------|------------|----------|---------|------|
| | | | | | 5% | 1% |
| Perlakuan | 11 | 0,03845053 | 0,00349550 | 35,66** | 2,75 | 4,16 |
| A | 2 | 0,00115479 | 0,00057739 | 5,89* | 3,89 | 6,93 |
| B | 3 | 0,01399980 | 0,00466660 | 4,60* | 3,49 | 5,95 |
| AB | 6 | 0,02329595 | 0,00388266 | 3,60* | 3,00 | 4,82 |
| Galat | 12 | 0,00117641 | 0,00009803 | | | |
| Total | 23 | 0,03962695 | | | | |

* Berbeda nyata

Keterangan : A = Pemberian nutrisi tambahan

B = Lama fermentasi (hari)

Lampiran 6b. Uji Lanjut Duncan Pengaruh Penambahan Nutrisi terhadap Gula Pereduksi Selama Fermentasi

| Pertakuan | Rata-rata (mg/ml) | Signifikansi 5 % |
|-----------|-------------------|------------------|
| A1 | 0,166550 | B |
| A3 | 0,177713 | A |
| A2 | 0,183225 | A |

Huruf yang berbeda menunjukkan berbeda nyata

Keterangan : A1 = Nutrisi : Substrat (0:4)

A2 = Nutrisi : Substrat (1:4)

A3 = Nutrisi : Substrat (2:4)

Lampiran 6c. Uji Lanjut Duncan Pengaruh Lama Inkubasi terhadap Gula Pereduksi Selama Fermentasi

| Perlakuan | Rata-rata (Unit/ml) | Signifikasi 5 % |
|-----------|---------------------|-----------------|
| B1 | 0,139433 | C |
| B2 | 0,168617 | B |
| B4 | 0,195933 | A |
| B3 | 0,199333 | A |

Keterangan : Huruf yang berbeda menunjukkan berbeda nyata

Keterangan : B1 = Lama Inkubasi 3 hari
 B2 = Lama Inkubasi 6 hari
 B3 = Lama Inkubasi 9 hari
 B4 = Lama Inkubasi 12 hari

Lampiran 6d. Uji Lanjut Duncan Pengaruh Interaksi antar Perlakuan terhadap Gula Pereduksi Selama Fermentasi

| Perlakuan | Rata-rata (mg/ml) | Signifikasi 5 % |
|-----------|-------------------|-----------------|
| A1B4 | 0,245400 | A |
| A1B3 | 0,205950 | B |
| A2B3 | 0,197750 | B |
| A3B3 | 0,193400 | B C |
| A3B2 | 0,192950 | B C |
| A2B1 | 0,192400 | B C |
| A2B2 | 0,173700 | C D |
| A3B4 | 0,173350 | C D |
| A2B4 | 0,169050 | D E |
| A3B1 | 0,150250 | E F |
| A1B2 | 0,139200 | F |
| A1B1 | 0,075650 | G |

Keterangan : Huruf yang berbeda menunjukkan berbeda nyata

Lampiran 7a. Analisa Sidik Ragam Protein Terlarut (mg/ml) Selama Fermentasi

| Sumber | db | JK | KT | F-hitung | F-tabel | |
|-----------|----|--------------|--------------|-----------|---------|------|
| | | | | | 5% | 1% |
| Perlakuan | 11 | 5435,3100333 | 494,1190939 | 579,27** | 2,75 | 4,16 |
| A | 2 | 64,8595083 | 32,4297542 | 38,02** | 3,89 | 6,93 |
| B | 3 | 5320,1219000 | 1773,3743000 | 2078,96** | 3,49 | 5,95 |
| AB | 6 | 50,3276250 | 8,3879375 | 9,83** | 3,00 | 4,82 |
| Galat | 12 | 10,2361000 | 0,8530083 | | | |
| Total | 23 | 5445,5461333 | | | | |

* Berbeda nyata

Keterangan : A = Pemberian nutrisi tambahan

B = Lama fermentasi (hari)

Lampiran 7b. Uji Lanjut Duncan Pengaruh Penambahan Nutrisi terhadap Protein Terlarut Selama Fermentasi

| Perlakuan | Rata-rata (Unit/ml) | Signifikansi 5% |
|-----------|---------------------|-----------------|
| A1 | 36,3063 | B |
| A2 | 39,4075 | A |
| A3 | 40,0913 | A |

Huruf yang berbeda menunjukkan berbeda nyata

Keterangan : A1= Nutrisi : Substrat (0:4)

A2 = Nutrisi : Substrat (1:4)

A3 = Nutrisi : Substrat (2:4)

Lampiran 7c. Uji Lanjut Duncan Pengaruh Lama Inkubasi terhadap Protein Terlarut Selama Fermentasi

| Perlakuan | Rata-rata (Unit/ml) | Signifikansi 5 % |
|-----------|---------------------|------------------|
| B1 | 16,4417 | D |
| B2 | 35,7667 | C |
| B3 | 44,9467 | B |
| B4 | 57,2383 | A |

Keterangan : Huruf yang berbeda menunjukkan berbeda nyata

Keterangan : B1 = Lama Inkubasi 3 hari
 B2 = Lama Inkubasi 6 hari
 B3 = Lama Inkubasi 9 hari
 B4 = Lama Inkubasi 12 hari

Lampiran 7d. Uji Lanjut Duncan Pengaruh Interaksi antar Perlakuan terhadap Protein Terlarut Selama Fermentasi

| Perlakuan | Rata-rata (Unit/ml) | Signifikansi 5 % |
|-----------|---------------------|------------------|
| A2B4 | 58,9000 | A |
| A3B4 | 58,7050 | A |
| A1B4 | 54,1100 | B |
| A3B3 | 48,7300 | C |
| A2B3 | 45,5000 | D |
| A1B3 | 40,6100 | E |
| A3B2 | 37,4000 | F |
| A2B2 | 36,8900 | F |
| A1B2 | 33,3700 | G |
| A1B1 | 17,1350 | H |
| A2B1 | 16,3400 | H |
| A3B1 | 15,8500 | H |

Keterangan : Huruf yang berbeda menunjukkan berbeda nyata

Lampiran 8a. Analisa Sidik Ragam pH Selama Fermentasi

| Sumber | db | JK | KT | F-hitung | F-tabel | |
|-----------|----|------------|------------|----------|---------|------|
| | | | | | 5% | 1% |
| Perlakuan | 11 | 6,97458333 | 0,63405303 | 41,13** | 2,75 | 4,16 |
| A | 2 | 5,91583333 | 2,95791667 | 191,86** | 3,89 | 6,93 |
| B | 3 | 0,41791667 | 0,13930556 | 9,04** | 3,49 | 5,95 |
| AB | 6 | 0,64083333 | 0,10680556 | 6,93** | 3,00 | 4,82 |
| Galat | 12 | 0,18500000 | 0,01541667 | | | |
| Total | 23 | 7,15958333 | | | | |

* Berbeda nyata

Keterangan : A = Pemberian nutrisi tambahan

B = Lama fermentasi (hari)

Lampiran 8d. Uji Lanjut Duncan Pengaruh Penambahan Nutrisi terhadap pH Selama Fermentasi

| Pertakuan | Rata-rata | Signifikansi 5% |
|-----------|-----------|-----------------|
| A3 | 6,48750 | C |
| A2 | 5,80000 | B |
| A1 | 5,27500 | A |

Huruf yang berbeda menunjukkan berbeda nyata

Keterangan : A1 = Nutrisi : Substrat (0:4)

A2 = Nutrisi : Substrat (1:4)

A3 = Nutrisi : Substrat (2:4)

Lampiran 8c. Uji Lanjut Duncan Pengaruh Lama Inkubasi terhadap pH Selama Fermentasi

| Perlakuan | Rata-rata | Signifikansi 5 % |
|-----------|-----------|------------------|
| B2 | 6,05000 | B |
| B1 | 5,90000 | B |
| B3 | 5,73333 | A |
| B4 | 5,73333 | A |

Keterangan : Huruf yang berbeda menunjukkan berbeda nyata

Keterangan : B1 = Lama Inkubasi 3 hari
 B2 = Lama Inkubasi 6 hari
 B3 = Lama Inkubasi 9 hari
 B4 = Lama Inkubasi 12 hari

Lampiran 8d. Uji Lanjut Duncan Pengaruh Interaksi antar Perlakuan terhadap pH Selama Fermentasi

| Perlakuan | Rata-rata | Signifikansi 5 % |
|-----------|-----------|------------------|
| A1B3 | 6,7000 | A |
| A1B1 | 6,5500 | A |
| A1B4 | 6,4500 | A B |
| A1B2 | 6,2500 | B C |
| A2B4 | 6,1000 | C D |
| A2B2 | 5,9000 | D E |
| A2B3 | 5,8000 | E F |
| A3B4 | 5,6000 | F G |
| A2B1 | 5,4000 | G H |
| A3B1 | 5,2500 | H I |
| A3B3 | 5,2000 | H I |
| A3B2 | 5,0500 | I |

Keterangan : Huruf yang berbeda menunjukkan berbeda nyata