



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**STUDI AWAL PRODUKSI ENZIM SELULASE OLEH  
*Trichoderma sp.* STRAIN T004 DAN T051 MENGGUNAKAN  
SUBSTRAT PELEPAH SAWIT**

**SKRIPSI**

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana sains**

**IKA AGUSTINA  
0706263196**

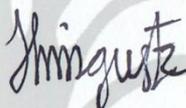
**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM STUDI KIMIA  
DEPOK  
JULI 2011**

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini merupakan hasil karya saya sendiri,  
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk  
telah saya nyatakan dengan benar

Nama : Ika Agustina

NPM : 0706263196

Tanda Tangan : 

Tanggal : 11 Juli 2011

## HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh:

Nama : Ika Agustina  
NPM : 0706263196  
Program Studi : Kimia S1 Reguler  
Judul Skripsi : Studi Awal Produksi Enzim Selulase oleh  
*Trichoderma sp.* Strain T004 dan T051  
Menggunakan Substrat Pelepah Sawit

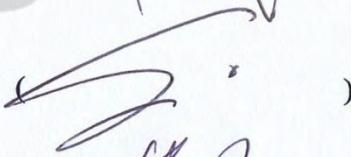
Telah berhasil dipertahankan dihadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia

### DEWAN PENGUJI

Pembimbing : Dra. Siswati Setiasih, Apt. M.Si (  )

Pembimbing : Dr. Yanni Sudiyani, M.Agr (  )

Penguji : Dr. Endang Saepudin, M.Si. (  )

Penguji : Drs. Sunardi, M.Si. (  )

Penguji : Drs. Sultan Badjri, M.Si. (  )

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 11 Juli 2011

## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, berkah dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir yang berjudul **Studi Awal Produksi Enzim Selulase oleh *Trichoderma sp.* Strain T004 dan T051 Menggunakan Substrat Pelepah Sawit** ini tepat pada waktunya. Tugas akhir ini disusun untuk memenuhi sebagian persyaratan akademis dalam meraih gelar Sarjana Sains di Program Studi S1 Kimia, Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

Dalam penyusunan tugas akhir ini, penulis banyak mendapatkan bantuan selama penelitian maupun dalam penyusunan tugas akhir serta bimbingan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Ibu Dra. Siswati Setiasih, Apt. M.Si dan Ibu Dr. Yanni Sudiyani, M.Agr, selaku dosen pembimbing, yang telah membimbing dan memberi pengarahan dalam penyusunan tugas akhir ini. Terima kasih atas segala bantuan serta diskusinya.
2. Ibu Dra. Tresye Utari, M.Si selaku pembimbing akademik, yang telah membantu dalam bidang akademis selama empat tahun ini.
3. Bapak Dr. Ridla Bakri, selaku Ketua Departemen Kimia, Universitas Indonesia.
4. Ibu Irni, Ibu Ai, Ibu Hani, Lisna dan Bapak Hendris atas bantuan dan masukannya selama bekerja di Laboratorium Teknologi Lingkungan P2K-LIPI PUSPIPTEK, Serpong.
5. Ibunda dan Ayahandaku tercinta atas motivasi, perhatian, kasih sayang, doa yang tak pernah putus, dan dukungan baik moril dan materil yang menjadi semangat bagi penulis sehingga dapat menyelesaikan tugas akhir ini.
6. Adikku tersayang atas bantuannya berupa tenaga dan moril, sehingga dapat meringankan penyusunan tugas akhir ini.
7. Ganeshia K. Pratiwi sebagai teman diskusi dan berbagi cerita penelitian selama perjalanan Depok-Serpong.

8. Ika Novianingsih dan Awaliatul Barkah sebagai teman yang selalu memberi info jadwal dan berbagi kisah di penelitian.
9. Kak Ita yang telah belapang hati mengizinkan untuk tidak mengikuti halaqah beberapa minggu.
10. Teman-teman angkatan 2007 yang selama empat tahun terakhir telah bersama melalui cobaan-cobaan dan indahnya Kimia UI.
11. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu yang telah membantu dalam penelitian dan penyusunan tugas akhir ini.

Dalam penulisan tugas akhir ini, disadari masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, sangat diharapkan saran dan kritik yang membangun demi kesempurnaan penulisan di masa yang akan datang. Akhir kata penulis berharap semoga tugas akhir ini bermanfaat bagi pengembangan ilmu.

Penulis  
2011

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI  
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

---

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Ika Agustina  
NPM : 0706263196  
Program Studi : SI Kimia  
Departemen : Kimia  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Jenis karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty-Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Studi Awal Produksi Enzim Selulase oleh *Trichoderma sp.* Strain T004 dan T051 Menggunakan Substrat Pelepah Sawit

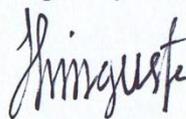
beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 11 Juli 2011

Yang menyatakan



( Ika Agustina )

## ABSTRAK

Nama : Ika Agustina  
Program Studi : Kimia  
Judul : Studi Awal Produksi Enzim Selulase oleh *Trichoderma sp.*  
Strain T004 dan T051 Menggunakan Substrat Pelepah Sawit

Pelepah sawit merupakan salah satu limbah lignoselulosa tanaman sawit yang jumlahnya cukup melimpah dan mengandung komponen lignin, selulosa, dan hemiselulosa yang dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku/substrat yang digunakan untuk pembuatan selulase, sehingga memiliki nilai ekonomi dan ramah lingkungan. Sebelum lignoselulosa digunakan sebagai substrat perlu dilakukan minimalisasi kadar ligninnya dengan menggunakan *pretreatment* kimia basa dengan menggunakan NaOH 2% dan juga digunakan pelepah sawit serbuk sebagai kontrol. Jamur yang digunakan adalah *Trichoderma sp.* strain T004 dan T051, jamur ini merupakan penghasil enzim selulase yang berfungsi menghidrolisis selulosa menjadi glukosa. Karakteristik enzim selulase berdasarkan mekanisme hidrolisis ada tiga jenis, yaitu endoglukanase, exoglukanase dan glukosidase. Hasil aktivitas enzim dengan menggunakan substrat pelepah sawit yang delignifikasi basa untuk jamur T004 lebih tinggi 59.79% dibandingkan dengan pelepah sawit tanpa delignifikasi, sedangkan untuk jamur T051 menghasilkan aktivitas 47.06% lebih tinggi dibandingkan pelepah sawit tanpa delignifikasi. Variasi substrat yang memberikan unit aktivitas optimum pada jamur T004 adalah dengan perbandingan sumber nitrogen dan glukosa tambahan sebesar 1:2 pada substrat uji aktivitas CMC 1% sebesar 0.1663 U/ml dan pada jamur T051 dengan perbandingan N:C=1:1 sebesar 0.1145 U/ml pada substrat uji aktivitas CMC 1%, keduanya pada substrat pelepah sawit hasil delignifikasi basa. Definisi satu unit aktivitas adalah 1  $\mu$ mol glukosa yang dihasilkan permenit pada pH 5 dan suhu 30°C.

Kata kunci:

Pelepah sawit, lignoselulosa, selulase, *Trichoderma sp.*, *pretreatment* kimia basa

xii+57 halaman : 30 gambar; 10 lampiran; 17 tabel

Daftar Pustaka : 45 (1967-2011)

## ABSTRACT

Name : Ika Agustina  
Study Program : Chemistry  
Title : Preliminary Study of Cellulase Enzyme Production by  
*Trichoderma sp.* Strains T004 and T051 Using palm Frond as  
Substrates

Palm frond is one of lignocellulosic waste oil plant which is quite abundant and contain components of lignin, cellulose and hemicellulose that can be used as raw materials / substrates used for the manufacture of cellulase, so it has economic value and environmental friendliness. Before the lignocellulose is used as the substrate is necessary to minimize the levels of lignin using alkaline chemical pretreatment using 2% NaOH and palm frond powder is also used as controls. Fungi used were *Trichoderma sp.* strains T004 and T051, this fungus is a producer of cellulase enzymes that hydrolyze cellulose into glucose. Characteristics of cellulase enzymes based on mechanism of hydrolyze, there are three types, namely endoglucanase, exoglucanase and glucosidase. The results of enzyme activity by using substrates that palm frond pretreatment base for strain T004 is 59.79% higher compared to palm midrib without delignification, while for T051 fungi produce 47.06% higher activity than the palm midrib without delignification. Variation of substrate to give optimum unit activity in the strain T004 is by comparison a nitrogen source and glucose supplement of 1:2 on the activity of the test substrate CMC 1% of 0.1663 U/mL and in strain T051 with a ratio N:C = 1:1 at 0.1145 U/mL in substrate activity assay CMC 1%, both on a substrate of alkaline delignification of palm frond. Definition of one unit of activity is 1  $\mu$ mol of glucose produced per minute at pH 5 and temperature of 30°C.

Keywords :

Frond palm, lignocellulose, cellulase, *Trichoderma sp.*, chemical base pretreatment

## DAFTAR ISI

## HALAMAN

LEMBAR JUDUL	
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN .....	iii
KATA PENGANTAR .....	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH.....	vi
ABSTRAK .....	vii
DAFTAR ISI .....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR TABEL .....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
<b>BAB 1 PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Perumusan Masalah .....	3
1.3 Hipotesis .....	4
1.3 Tujuan Penelitian .....	4
1.4 Batasan Masalah.....	4
1.5 Sistematika Penulisan .....	5
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>6</b>
2.1 Limbah Kelapa Sawit.....	6
2.2 <i>Pretreatment</i> .....	8
2.2.1 <i>Pretreatment</i> Fisik .....	9
2.2.2 <i>Pretreatment</i> Kimia .....	10
2.3 Komposisi Batang .....	11
2.3.1 Selulosa .....	12
2.3.2 Hemiselulosa.....	13
2.3.3 Lignin.....	14
2.4 Enzim.....	14
2.4.1 Jumlah dan Satuan Unit Enzim .....	15
2.4.2 Pengaruh [S], T dan pH.....	16
2.4.3 Faktor yang Mempengaruhi Efektivitas Katalitik Enzim..	16
2.4.4 Hidrolisis Enzimatik.....	18
2.4.4.1 Enzim Selulase .....	19
2.5 Kapang .....	20
2.5.1 <i>Trichoderma sp</i> .....	21
2.6 Isolasi Enzim .....	22
<b>BAB III METODE PENELITIAN.....</b>	<b>24</b>
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian .....	24
3.2 Alat .....	24
3.3 Bahan .....	24
3.3.1 Mikroorganisme.....	24
3.3.2 Bahan Kimia .....	25
3.4 Prosedur Kerja .....	25

3.4.1 Sterilisasi Alat .....	25
3.4.2 Preparasi Substrat Pelepah Sawit .....	26
3.4.2.1 Pengecilan Ukuran .....	26
3.4.2.2 <i>Pretreatment</i> Kimia .....	26
3.4.3 Pembuatan Buffer dan Pereaksi .....	27
3.4.3.1 Pembuatan Buffer Asetat .....	27
3.4.3.2 Pembuatan Pereaksi Uji Protein .....	27
3.4.3.3 Pembuatan Pereaksi Uji Gula Pereduksi .....	28
3.4.4 Pembuatan Medium.....	28
3.4.4.1 Pembuatan Medium Potato Dextrose Agar (PDA) ...	28
3.4.4.2 Pembuatan Medium Starter .....	28
3.4.4.3 Pembuatan Medium Produksi .....	29
3.4.5 Persiapan Inokulum <i>Trichoderma sp.</i> .....	30
3.4.6 Pembuatan Starter.....	30
3.4.7 Produksi Enzim Selulase Kasar .....	31
3.4.8 Ekstrak Enzim Selulase Kasar .....	31
3.4.8 Pengujian Kadar Protein .....	31
3.4.9 Pengujian Aktivitas Enzim .....	31
3.4.10 Pengujian Gula Pereduksi yang Terbentuk .....	33
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>34</b>
4.1 Peremajaan <i>Trichoderma sp.</i> .....	34
4.2 Pengaruh <i>Pretreatment</i> terhadap Aktivitas Enzim.....	34
4.3 Pengaruh Komposisi N dan C Tambahan pada Substrat Terhadap Waktu Fermentasi.....	37
4.4 Pengaruh Perbedaan Substrat Uji Aktivitas dan Waktu Inkubasi.....	40
4.5 Konsentrasi Glukosa Sisa Fermentasi.....	45
4.6 Kadar Protein .....	47
4.6.1 Aktivitas Spesifik .....	49
<b>BAB V PENUTUP .....</b>	<b>53</b>
5.1 Kesimpulan .....	53
5.2 Saran.....	53
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>54</b>

## DAFTAR GAMBAR

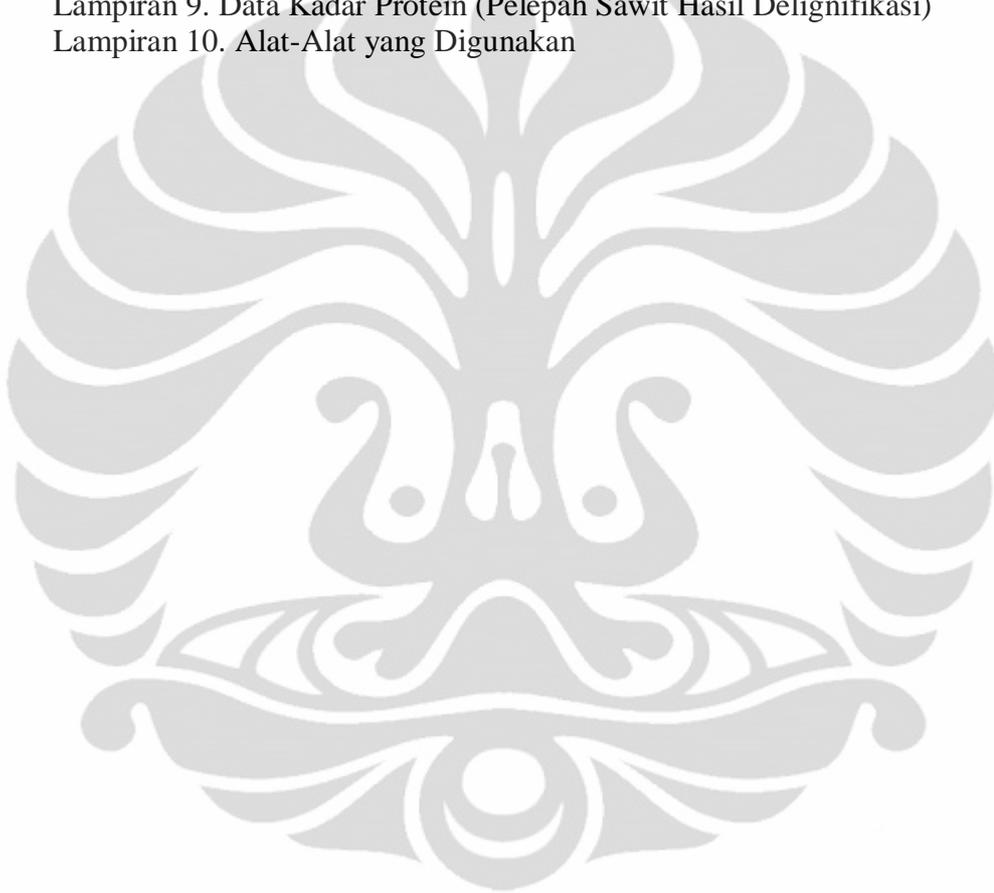
Gambar 2.1 Tanaman Kelapa Sawit.....	6
Gambar 2.2. Efek pretreatment pada bahan berlignoselulosa .....	10
Gambar 2.3 Keberadaan selulosa, hemiselulosa dan lignin pada dinding sel tanaman.....	11
Gambar 2.4 Struktur Selulosa .....	12
Gambar 2.5 Struktur Hemiselulosa.....	13
Gambar 2.6 Struktur Lignin.....	14
Gambar 2.7 Gambaran skematik faktor-faktor letak dan orientasi di dalam interaksi molekul substrat S dengan suatu gugus katalitik pada sisi aktif enzim E.....	16
Gambar 2.8 Dorongan penempatan sisi aktif enzim menjadi bentuk “tegang” oleh molekul substrat.....	17
Gambar 2.9 Gugus-gugus pemberi dan penerima proton.....	18
Gambar 2.9 Mekanisme Enzimatik Selulase .....	20
Gambar 2.10 Koloni Kapang .....	20
Gambar 2.11 Phialides and conidia of <i>Trichoderma harzianum</i> .....	22
Gambar 3.1. Struktur molekul avicel .....	32
Gambar 3.2. Struktur molekul CMC .....	32
Gambar 4.1 <i>Trichoderma sp.</i> .....	34
Gambar 4.2 Substrat Pelepah Sawit.....	35
Gambar 4.3 Grafik perbandingan penggunaan substrat dan jamur.....	36
Gambar 4.4 Aktivitas Unit Berdasarkan Waktu Fermentasi Pelepah Sawit Serbuk.....	38
Gambar 4.5 Aktivitas Unit Berdasarkan Waktu Fermentasi Pelepah Sawit Pretreatment Kimia.....	39
Gambar 4.6 Grafik Aktivitas Tertinggi Substrat Pelepah Sawit Serbuk .....	42
Gambar 4.7 Aktivitas Tertinggi <i>Pretreatment</i> Kimia.....	43
Gambar 4.8 Filtrat Enzim Kasar T004 N:C=2:1 <i>Pretreatment</i> kimia.....	44
Gambar 4.9 Filtrat Enzim Kasar (a) PS+N; (b) N:C=1:1; (c) N:C=1:2.....	44
Gambar 4.10 Grafik Kadar Glukosa Sisa, Substrat Pelepah Sawit Serbuk ..	46
Gambar 4.11 Grafik konsentrasi glukosa sisa pada <i>pretreatment</i> kimia .....	47
Gambar 4.12 Grafik kadar protein pada Pelepah Sawit Serbuk .....	48
Gambar 4.13 Grafik kadar protein pada <i>Pretreatment</i> kimia .....	49
Gambar 4.14 Aktivitas spesifik <i>pretreatment</i> fisik.....	51
Gambar 4.15 Aktivitas spesifik <i>pretreatment</i> Kimia.....	52

## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Limbah Tanaman Kelapa Sawit .....	7
Tabel 2.2. Kandungan hara pada limbah kelapa sawit.....	7
Tabel 2.3 Komposisi Serat Tandan kosong kelapa sawit.....	7
Tabel 2.4 Komposisi pelepah daun kelapa sawit .....	8
Tabel 3.1 Komposisi Larutan A dan Larutan B Pembuatan Buffer Asetat... 27	
Tabel 3.2 Komposisi bahan-bahan Tambahan.....	28
Tabel 3.3 Variasi Medium Produksi .....	29
Tabel 3.4 Komposisi Variasi Medium Produksi.....	30
Tabel 3.5 Komposisi Substrat dan Filtrat Enzim untuk Uji Aktivitas.....	32
Tabel 4.1 Unit Aktivitas Tertinggi untuk Substrat Pelepah Sawit kontrol dan <i>Treated</i> Basa .....	36
Tabel 4.2 Unit Aktivitas Optimum pada Substrat Pelepah Sawit Kontrol... 41	
Tabel 4.3 Aktivitas Optimum pada Substrat Pelepah Sawit <i>Treated</i> Basa... 42	
Tabel 4.4 Konsentrasi Glukosa Sisa Fermentasi pada Substrat Pelepah Sawit Kontrol.....	45
Tabel 4.5 Konsentrasi Glukosa Sisa Fermentasi pada Substrat Pelepah Sawit <i>Treated</i> Basa .....	46
Tabel 4.6 Kadar Protein pada Substrat Pelepah Sawit Kontrol.....	48
Tabel 4.7 Kadar Protein pada Substrat Pelepah Sawit <i>Treated</i> Basa.....	49
Tabel 4.8 Aktivitas Spesifik pada Substrat Pelepah Sawit Kontrol.....	50
Tabel 4.9 Aktivitas Spesifik pada Substrat Pelepah Sawit <i>Treated</i> Basa ...	51

## DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1. Bagan Kerja
- Lampiran 2. Data Standar Glukosa
- Lampiran 3. Data Standar Protein
- Lampiran 4. Data Uji Aktivitas (Pelepah Sawit Tidak Didelignifikasi)
- Lampiran 5. Data Uji Aktivitas (Pelepah Sawit Hasil Delignifikasi)
- Lampiran 6. Data Glukosa Sisa Fermentasi (Pelepah Sawit Tidak Didelignifikasi)
- Lampiran 7. Data Glukosa Sisa Fermentasi (Pelepah Sawit Hasil Delignifikasi)
- Lampiran 8. Data Kadar Protein (Pelepah Sawit tidak Didelignifikasi)
- Lampiran 9. Data Kadar Protein (Pelepah Sawit Hasil Delignifikasi)
- Lampiran 10. Alat-Alat yang Digunakan



# BAB I PENDAHULUAN

## 1.1 Latar Belakang

Energi merupakan salah satu permasalahan utama dunia pada abad ke-21. Sampai saat ini bahan bakar minyak masih menjadi konsumsi utama negara-negara dunia. Minyak bumi bisa menjadi senjata politik yang menakutkan karena sektor industri dunia sangat bergantung kepada pasokan minyak bumi (Chemiawan, 2007).

Penggunaan bahan bakar alternatif harus segera dilakukan terutama yang bersifat terbarukan dan ramah terhadap lingkungan. Penggunaan bahan bakar cair lebih sesuai untuk dikembangkan karena kebutuhan terhadap bahan bakar cair lebih tinggi dibandingkan yang berwujud gas atau padat. Salah satunya adalah Bioetanol. Bioetanol dengan karakteristiknya dapat mensubstitusi bensin. Indonesia perlu mengembangkan bioetanol karena: konsumsi energi meningkat terus, bahan bakar fosil akan habis, devisa (impor BBM), potensi penggunaan *biofuel*, potensi lahan, potensi sumber daya manusia (petani).

Perkembangan produksi bioetanol menggunakan teknologi fermentasi, dalam prosesnya tidak lepas dari adanya peranan mikroba dan penggunaan bahan dasar sebagai medium pertumbuhan mikroba. Produk-produk pertanian seperti jagung, gandum, umbi, singkong dan lain-lain dapat digunakan sebagai substansi yang kaya akan senyawa karbohidrat seperti selulosa atau medium pertumbuhan bagi mikroba penghasil enzim tertentu. Akan tetapi jika penggunaan produk pertanian masih terus dilakukan, maka akan terjadi persaingan dengan kebutuhan masyarakat akan produk bahan pangan, sehingga dibutuhkan alternatif lain sebagai solusi dari permasalahan ini.

Alternatif yang dapat dikembangkan saat ini adalah menggunakan limbah produk pertanian atau perkebunan sumber biomassa lignoselulosa yang belum dimanfaatkan secara optimal, seperti, jerami, tongkol jagung sisa pangkasan jagung, onggok, bagas tebu, sisa pangkasan tebu, dan sisa tanaman kelapa sawit.

Indonesia merupakan Negara dengan hasil produk kelapa sawit terbesar di dunia sehingga ketersediaan tanaman kelapa sawit juga melimpah.

Lignoselulosa ini dapat digunakan sebagai bahan baku, yang dapat di hidrolisis /degradasi oleh enzim selulase dan menghasilkan glukosa. Glukosa ini yang nantinya akan digunakan lebih lanjut untuk memproduksi bioetanol.

Enzim selulase bekerja dengan memecahkan ikatan  $\beta$ -1,4-glikosida. Enzim selulase ini diklasifikasikan dalam tiga kelompok berdasarkan mekanisme pemutusan ikatan  $\beta$ -1,4 glikosida, yaitu: *exo- $\beta$ -1,4-glucanase*, *endo- $\beta$ -1,4-glucanase* dan  *$\beta$ -1,4-glucosidase*. *Endoglucanase* menghidrolisis ikatan intramolekul  $\beta$ -1,4-glukosidik dari rantai selulosa secara acak untuk menghasilkan oligosakarida dan glukosa (Wood, 1985); *exoglucanase* memutus rantai selulosa pada ujung kedua rantai untuk melepaskan selobiosa larut atau glukosa dan  *$\beta$ -glucosidases* menghidrolisis selobiosa menjadi glukosa dalam rangka menghilangkan gangguan selobiosa.

Kendala yang terjadi adalah harga enzim selulase di pasaran mahal sehingga tidak efektif jika digunakan untuk skala besar. Selain itu, enzim selulase yang dijual dipasaran memiliki karakteristik yang tidak seragam, yaitu hanya dapat memutus di salah satu bagian rantai saja pada selulosa, sehingga kerja enzim tidak optimal. Untuk mendapatkan enzim selulase yang dapat meghidrolisis selulosa secara optimal, maka dilakukan produksi enzim selulase yang dimodifikasi.

Produksi enzim selulase ini menggunakan fungsi *Trichoderma sp* strain asli Indonesia. Dalam penelitian ini akan digunakan dua strain berbeda namun masih berasal dari Indonesia.

Enzim selulase yang terdapat pada *Trichoderma sp.* merupakan enzim induktif dan merupakan enzim ekstraseluler, jadi enzim akan terbentuk jika adanya ketersediaan substrat. Substrat untuk medium pertumbuhan jamur yang dipilih dalam penelitian ini adalah pelepah sawit.

Substrat yang digunakan sebagai medium pertumbuhan harus memiliki kandungan lignin seminimal mungkin, karena enzim selulase yang dihasilkan oleh

*Trichoderma sp.* sulit untuk mendegradasi lignin yang terikat kuat dengan selulosa, hemiselulosa dan polisakarida lainnya pada dinding sel tanaman.

Berdasarkan penelitian, kandungan lignin dari pelepah sawit lebih rendah daripada TKKS, sehingga lebih potensial untuk dimanfaatkan sebagai substrat dalam memproduksi enzim selulase (Sudiyani, et al., 2010).

Perlakuan yang dilakukan pada substrat pelepah sawit adalah dengan pengecilan ukuran dan *pretreatment* dengan penambahan larutan basa.

## 1.2 Perumusan Masalah

1. Apakah ada perbedaan aktivitas antara *Trichoderma sp.* T004 dengan T051 dengan menggunakan limbah pelepah sawit sebagai substrat pada medium pertumbuhan?
2. Apakah ada pengaruh signifikan, jika substrat pelepah sawit dilakukan *pretreatment* fisik (ukuran serbuk) dengan *pretreatment* kimia?
3. Apakah penambahan sumber nitrogen dan karbon pada berbagai variasi konsentrasi mempengaruhi aktivitas selulase?
4. Kapan waktu fermentasi yang memberikan aktivitas selulase tertinggi pada substrat yang sesuai?
5. Apakah perbedaan substrat pada uji aktivitas memberikan nilai unit aktivitas selulase yang berbeda juga?
6. Berapa lama waktu inkubasi pada uji aktivitas yang memberikan aktivitas optimum?

## 1.3 Hipotesis

1. Pelepah sawit dapat digunakan sebagai substrat pada medium pertumbuhan *Trichoderma sp.* sehingga dapat menghasilkan enzim selulase.
2. Perlakuan *pretreatment* kimia basa pada pelepah sawit dapat menghasilkan aktivitas yang lebih tinggi daripada pelepah sawit serbuk.

3. Penambahan sumber nitrogen (diammonium tartrat) dan karbon (glukosa) dapat mempengaruhi aktivitas selulase yang dihasilkan.

#### 1.4 Tujuan Penelitian

Menentukan aktivitas tertinggi yang dihasilkan pada proses fermentasi jamur *Trichoderma sp.* strain T004 dan T051 menggunakan substrat pelepah sawit pada medium produksi dengan variasi sumber C (glukosa) dan sumber N (diammonium tartrat) tambahan, serta waktu fermentasi yang dapat menghasilkan aktivitas tertinggi.

#### 1.5 Pembatasan Masalah

Pada penelitian ini, penulis membatasi permasalahan ke dalam ruang lingkup:

1. Penelitian hanya difokuskan pada produksi enzim selulase dengan substrat pelepah sawit serbuk dan *pretreatment* kimia basa sebagai medium pertumbuhan jamur T004 dan T051.
2. Sumber nitrogen yang digunakan adalah diammonium tartrat dan sumber karbon tambahan yang digunakan adalah glukosa.
3. Pengukuran unit aktivitas selulase kasar adalah dengan mengukur gula pereduksi yang terbentuk menggunakan metode Samogyi Nelson.
4. Uji aktivitas dilakukan dengan variasi substrat bahan selulosa yaitu FPU, avicel dan CMC 1%, pada pH 5 dan suhu 30<sup>0</sup>C dengan variasi waktu inkubasi 30 menit dan 60 menit.

## 1.6 Sistematika Penulisan

Makalah skripsi ini ditulis dengan sistematika sebagai berikut:

### **BAB I PENDAHULUAN**

Bab ini terdiri atas latar belakang, rumusan masalah, hipotesis, tujuan penelitian, batasan masalah, dan sistematika penulisan.

### **BAB II TINJAUAN PUSTAKA**

Bab ini menjelaskan berbagai informasi yang didapatkan dari berbagai pustaka mengenai limbah kelapa sawit, *pretreatment*, *pretreatment* fisik, *pretreatment* kimia, komposisi dinding sel tanaman, selulosa, hemiselulosa, lignin, enzim, enzim selulase, jamur *Trichoderma sp.*, isolasi enzim.

### **BAB III METODOLOGI PENELITIAN**

Bab ini menjelaskan berbagai informasi tentang tahapan-tahapan pelaksanaan penelitian, alat dan bahan yang digunakan, analisis produk, dan pengolahan data.

### **BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN**

Bab ini menjelaskan berbagai informasi tentang penyajian data penelitian yang diperoleh, analisis kecenderungan pada berbagai variasi variabel bebas, dan pembahasan mengenai fenomena yang terjadi dalam proses isolasi enzim lipase ekstrak kasar dan reaksi esterifikasi enzimatis.

### **BAB V PENUTUP**

Bab ini menjelaskan tentang kesimpulan yang dapat diambil berdasarkan percobaan yang dilakukan terkait dengan tujuan dari penelitian ini serta saran bagi penelitian selanjutnya

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Limbah Kelapa Sawit

Kelapa sawit (*Elaeis*) adalah tumbuhan industri penting penghasil minyak masak, minyak industri, maupun bahan bakar (biodiesel). Perkebunannya menghasilkan keuntungan besar sehingga banyak hutan dan perkebunan lama dikonversi menjadi perkebunan kelapa sawit. Indonesia, saat ini merupakan Negara dengan perkebunan kelapa sawit terbesar di dunia. Di Indonesia penyebarannya di daerah Aceh, pantai timur Sumatra, Jawa, Kalimantan dan Sulawesi.



[Sumber: Kamarul Azlan, 2008]

**Gambar 2.1. Tanaman kelapa sawit**

Semakin luasnya lahan pekebunan kelapa sawit juga menimbulkan dampak yang negatif, yaitu semakin banyaknya limbah kelapa sawit yang dihasilkan akibat proses produksi. Banyaknya limbah yang dihasilkan perhektar perkebunan ditunjukkan pada Tabel 2.1.

**Tabel 2.1. Limbah tanaman kelapa sawit**

No	Limbah Kelapa Sawit	Bobot kering (ton)/ha tanaman
1	Batang Sawit	74,48
2	Pelepah	14,47
3	Pangkasan	10,4
4	Serat Buah	1,63
5	Cangkang	0,94

[Sumber: Ditjen PPHP, 2006]

Limbah kelapa sawit dibagi menjadi dua jenis yaitu limbah padat dan limbah cair. Limbah padat terdiri dari Tandan Kosong, pelepah, cangkang dan lain-lain. Adapun kandungan hara ditunjukkan pada Tabel 2.2.

**Tabel 2.2. Kandungan hara pada limbah kelapa sawit**

No	Limbah Kelapa Sawit	Kandungan atas dasar % berat kering				
		N	P	K	Mg	Ca
1	Batang pohon	0,488	0,047	0,699	0,117	0,194
2	- Pelepah	2,38	0,157	1,116	0,287	0,568
	- Daun	0,373	0,066	0,837	0,161	0,295
3	Tandan Kosong	0,350	0,028	2,285	0,175	0,149
4	Serat Buah	0,320	0,080	0,470	0,020	0,110
5	Cangkang	0,330	0,010	0,090	0,020	0,020

[Sumber: Ditjen PPHP, 2006]

Selain komposisi unsur hara yang terkandung di dalamnya, dalam pemanfaatan limbah kelapa sawit juga harus diketahui komposisi kimia dari serat limbah kelapa sawit. Komposisi serat limbah padat kelapa sawit diperlihatkan pada Tabel 2.2 untuk TKKS dan Tabel 2.3 untuk pelepah sawit.

**Tabel 2.3. Komposisi serat tandan kosong kelapa sawit \*.**

Komposisi	%
Kadar air	8,56
Kadar Minyak	0,98
Lignin	25,83
Selulosa	33,25

Hemiselulosa	23,24
Ekstraktif dan lain-lain	4,19

\*analisa triplo

[Sumber: Sudiyani, et al., 2010]

**Tabel 2.4. Komposisi pelepah daun kelapa sawit \*.**

Komposisi	%
Kadar air	7,3
Kadar Minyak	-
Lignin	16,76
Selulosa	36,33
Hemiselulosa	30,34
Ekstraktif dan lain-lain	9,9

\*analisa triplo

[Sumber: Sudiyani, et al., 2010]

## 2.2 *Pretreatment*

*Pretreatment* adalah langkah pertama yang diperlukan untuk bahan lignoselulosa menjadi komponen-komponen utama, yaitu lignin, selulosa dan hemiselulosa (Silverstein, 2004).

Tujuan penting dari proses *pretreatment* adalah mengecilkan ukuran untuk meningkatkan area permukaan dari bahan lignoselulosa, membuat polisakarida menjadi lebih mudah dihidrolisis. Menurut Mc Millan (1994) seiring dengan peningkatan area permukaan pada bahan lignoselulosa, efektivitas *pretreatment* dan hidrolisis terkait dengan penghilangan hemiselulosa dan lignin dan pengurangan kristalin selulosa (Silverstein, 2004, p. 14).

Sejumlah *pretreatment* yang digunakan untuk materi lignoselulosa dapat di klasifikasikan menjadi: *pretreatment* fisik, fisik-kimia, kimia dan proses biologi (Silverstein, 2004).

*Pretreatment* dapat dikatakan proses untuk meminimalkan jumlah lignin di dalam bahan selulosa. Proses penghilangan lignin ini dapat dikatakan sebagai delignifikasi, namun kalimat delignifikasi tidak berlaku untuk *pretreatment* fisik, karena pada *pretreatment* fisik hanya terjadi pengecilan ukuran dan tidak terjadi penghilangan kandungan lignin di dalam bahan selulosa.

### 2.2.1 Pretreatment Fisik

Tujuan utama dari *pretreatment* adalah untuk meningkatkan area permukaan yang tersedia untuk enzim selulase selama hidrolisis, pengurangan ukuran merupakan bagian integral dari *pretreatment*. Pengecilan ukuran dapat dikombinasikan dengan pencacahan dan penggilingan. Setelah pencacahan ukuran bahan biasanya 10 sampai 30 mm dan 0,2-2 mm setelah penggilingan (Sun, 2002).

Proses ini membutuhkan energi yang relatif rendah, mulai dari 24.000 kJ / ton kering untuk jerami gandum dan 200.000 kJ / ton kering untuk kayu aspen. Namun, konsumsi energi meningkat secara eksponensial dengan penurunan ukuran partikel (Brown, 2003). Untuk hidrolisis enzimatik, pengurangan ukuran partikel diikuti dengan metode *pretreatment* tambahan untuk lebih meningkatkan hidrolisis. Enzim selulase digunakan selama hidrolisis enzimatik adalah protein dengan berat molekul besar mulai dari 30.000 sampai 60.000 dan dianggap ellipsoid dengan dimensi besar dan kecil dari 30 dan 200 Å. Biasanya, hanya 20% dari volume pori jaringan tanaman dapat diakses molekul-molekul besar. Jadi, tanpa *pretreatment* tambahan selain pengurangan ukuran, gula hasil dari hidrolisis enzimatik kurang dari 20% dari teoritis, sedangkan perlakuan lebih lanjut dapat lebih meningkatkan hasil sebesar 90% atau lebih tinggi (Brown, 2003).

### 2.2.2 Pretreatment Kimia

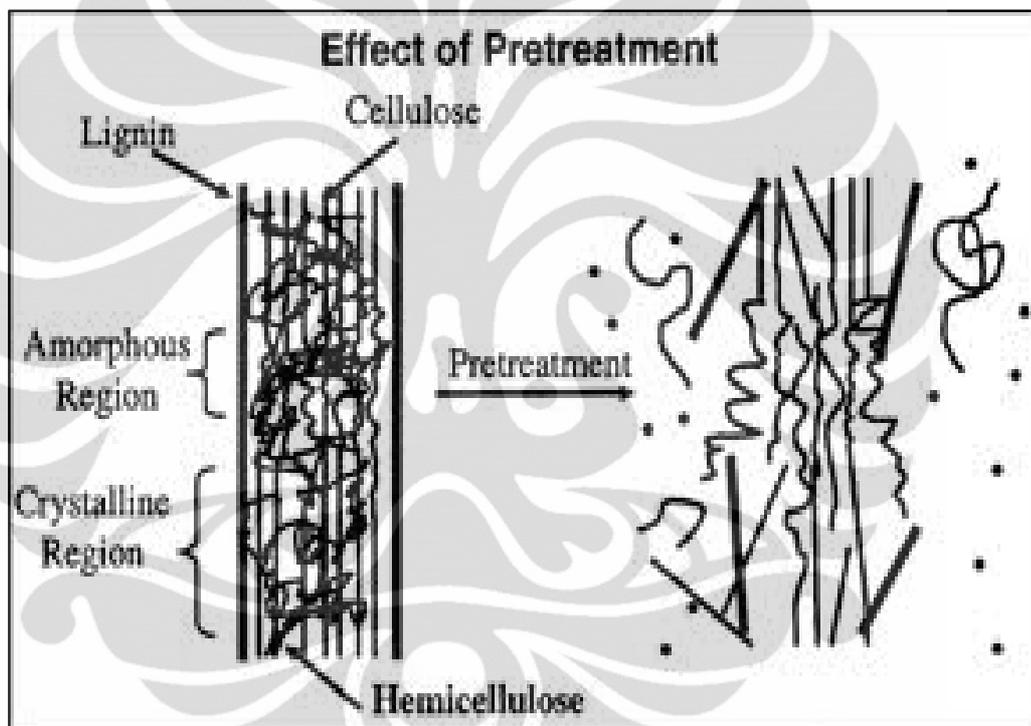
#### 2.2.2.1 Pretreatment Asam

*Pretreatment* asam dapat memanfaatkan larutan asam dengan konsentrasi encer atau pekat untuk meningkatkan hidrolisis dari selulosa (Silverstein, 2004). Penggunaan temperatur yang lebih tinggi dari 121<sup>0</sup>C pada prehidrolisis dengan asam encer sangat efektif dalam pencernaan enzimatik dari selulosa (Grohmann et al., 1986).

Varga et al., (2002) menggunakan asam sulfat dan asam klorida untuk *pretreatment* batang jagung (121<sup>0</sup>C, 1 jam). *Pretreatment* dengan menggunakan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5% atau HCl melarutkan 85% dari fraksi hemiselulosa, dan konversi enzimatik meningkat dua kali dibandingkan dengan yang tidak didelignifikasi.

### 2.2.2 Pretreatment Basa

Larutan basa dapat digunakan untuk *pretreatment* materi lignoselulosa. Efektivitas dari *pretreatment* bergantung pada kandungan lignin dalam materi tersebut (McMillan, 1994). Mekanisme *pretreatment* basa dipercaya seperti proses saponifikasi dari gugus ester intramolekuler pada ikat-silang xilan hemiselulosa dan komponen lain seperti lignin dan hemiselulosa. Setelah *pretreatment* basa, porositas materi meningkat akibat *swelling* oleh penghilangan ikat-silang (Tarkow and Feist, 1969).

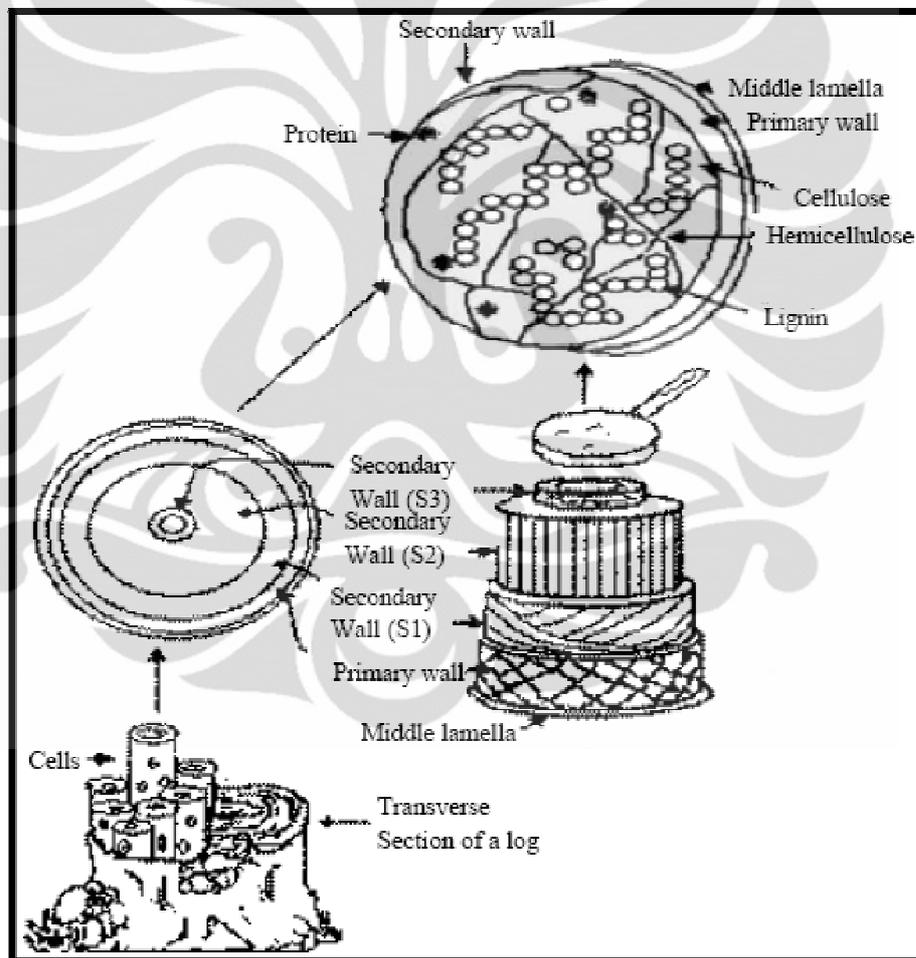


[Sumber: [www.google.co.id](http://www.google.co.id)]

**Gambar 2.2. Efek pretreatment pada bahan berlignoselulosa**

### 2.3 Komposisi Batang

Sejumlah karbohidrat penyusun tanaman adalah polisakarida struktural yang berfungsi sebagai pendukung, penguat dan pemberi bentuk tanaman. Menurut Brown (2003) materi struktural kompleks pada dinding tanaman, dikenal sebagai lignoselulosa, yaitu gabungan dari serat selulosa dalam ikat-silang matriks lignin-hemiselulosa. Tiga komponen utama dari materi lignoselulosa dalam batang ditunjukkan pada Gambar 2.3 yang terdiri dari selulosa, hemiselulosa, dan lignin, dengan materi lain seperti *ash*, protein dan ekstraktif.

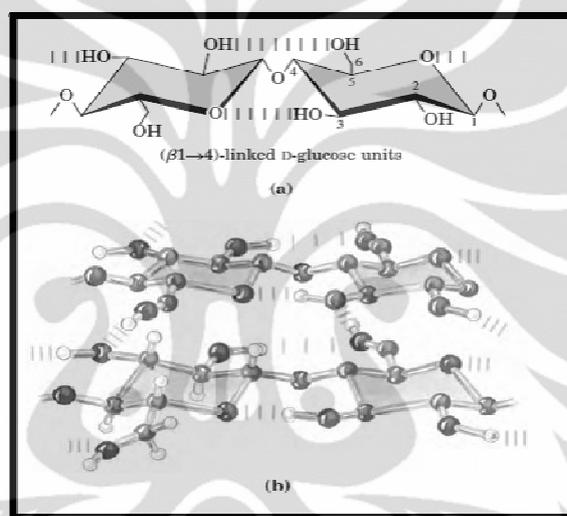


[Sumber: <http://scialert.net/abstract/?doi=biotech.2010.238.256>]

**Gambar 2.3. Keberadaan dari selulosa, hemiselulosa dan lignin pada dinding sel tanaman**

### 2.3.1 Selulosa

Selulosa merupakan homopolisakarida, suatu serat, bersifat keras/kaku dan tidak larut air, ditemukan pada dinding tanaman, khususnya di tangkai, akar, batang, dan semua bagian kayu dari tubuh tanaman. Molekul selulosa berbentuk linear, homopolisakarida tidak bercabang dan terdiri dari 10.000-15.000 unit D-glukosa. Residu dari selulosa memiliki konfigurasi  $\beta$ , yaitu ikatan glikosidik  $\beta 1 \rightarrow 4$ , seperti yang terlihat pada Gambar 2.4.



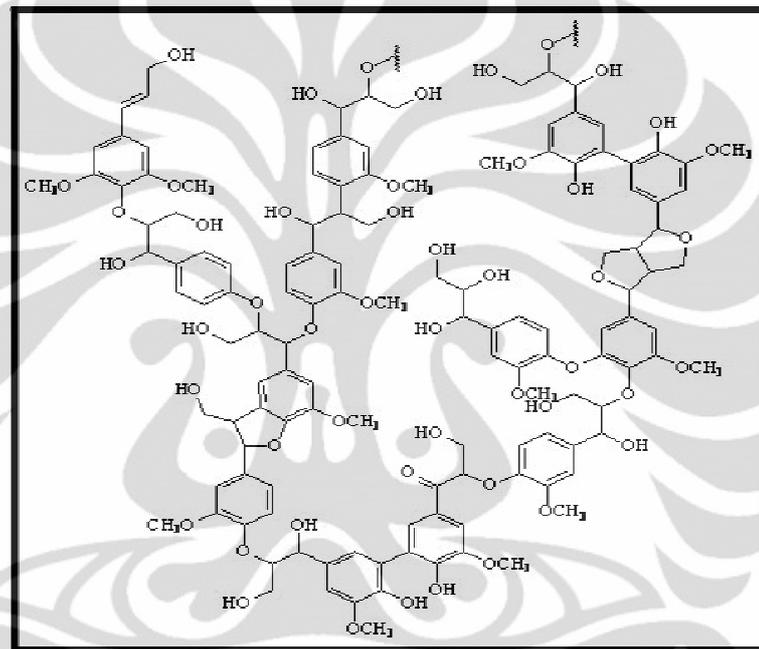
[Sumber: Lehninger, 2005]

**Gambar 2.4. Struktur selulosa (a) Struktur linier (b) Struktur tiga dimensi**

Ikatan hidrogen intramolekuler juga terbentuk antara dua unit glukosa pada rantai yang sama (Silverstein, 1984). Kombinasi energi ikatan pada intermolekuler dan intramolekuler ikatan hidrogen meningkatkan kekakuan dari selulosa dan membentuk struktur kristalin yang membuatnya tidak larut pada kebanyakan pelarut organik. Selulosa mikrofibril terikat dalam matriks polisakarida non-selulosa, terutama hemiselulosa dan substansi pektik (Sun, 2002), yang menyulitkan hidrolisis selulosa menjadi glukosa lebih jauh. Selulosa dalam bahan baku biomassa lignoselulosa merupakan sumber utama glukosa yang akan digunakan lebih lanjut pada fermentasi bioetanol (Silverstein, 2004).



gugus propil yang dapat menempel dengan unit-unit lainnya, yang digambarkan pada Gambar 2.6 (Klass, 1998). Ketika tumbuhan dewasa dan sel berhenti tumbuh, lamella tengah (semen antara dinding primer dari sel yang bersebelahan) dan dinding sekunder (di dalam dinding sel primer) memiliki kandungan lignin yang besar. Lignin memberikan kekuatan pada struktur sel melalui ikatan bersama-sama yang terjadi pada serat-serat dari polisakarida-polisakarida (Fan et al., 1987).



[Sumber: [www.research.uky.edu](http://www.research.uky.edu)]

**Gambar 2.6. Struktur lignin**

## 2.4 Enzim

Enzim merupakan unit fungsional dari metabolisme sel. Bekerja dengan urutan-urutan yang teratur, enzim mengkatalisis ratusan reaksi bertahap yang menguraikan molekul nutrien, reaksi yang menyimpan dan mengubah energi kimiawi, dan yang membuat makromolekul sel dari prekursor sederhana.

Semua enzim murni yang telah diamati sampai saat ini adalah protein dan aktivitas katalitiknya bergantung pada integritas strukturnya sebagai protein. Jika suatu enzim dididihkan dengan asam kuat atau diinkubasi dengan tripsin, yaitu

perlakuan yang memotong rantai polipeptida, aktivitas katalitiknya biasanya akan hancur, hal ini memperlihatkan bahwa struktur kerangka primer protein enzim dibutuhkan untuk aktivitasnya. Selanjutnya, jika kita mengubah berlipatnya rantai protein yang khas dari suatu protein enzim utuh oleh panas, oleh perlakuan pH yang jauh menyimpang dari keadaan normal, atau oleh perlakuan dengan senyawa perusak lainnya, aktivitas katalitik enzim juga akan lenyap. Jadi, struktur primer, sekunder dan tersier protein enzim penting bagi aktivitas katalitiknya.

Beberapa enzim hanya terdiri dari polipeptida dan tidak mengandung gugus kimiawi selain residu asam amino, contohnya adalah ribonuklease pankreas. Akan tetapi, enzim lain, memerlukan tambahan komponen kimia bagi aktivitasnya, komponen ini dinamakan kofaktor. Kofaktor mungkin suatu molekul anorganik seperti ion  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ , atau  $\text{Zn}^{2+}$ , atau mungkin juga suatu molekul organik kompleks yang disebut koenzim. Enzim yang strukturnya sempurna dan aktif mengkatalisis, bersama-sama dengan koenzim dan ion logam bersifat stabil sewaktu pemanasan, sedangkan bagian protein enzim, yang disebut apoenzim, terdenaturasi oleh pemanasan.

#### **2.4.1 Jumlah dan Satuan Unit Enzim**

Jumlah enzim dinyatakan dengan unit aktivitas enzim. Berdasarkan persetujuan internasional menyebutkan bahwa 1,0 unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah yang menyebabkan perubahan 1,0 mikromol ( $\mu\text{mol}=10^{-6}$  mol) substrat permenit pada kondisi tertentu (optimal).

Aktivitas spesifik adalah jumlah unit enzim per miligram protein. Aktivitas spesifik adalah suatu ukuran kemurnian enzim: nilainya meningkat selama pemurnian suatu enzim dan menjadi maksimum dan tetap (konstan) jika enzim sudah berada pada keadaan murni.

### 2.4.2 Pengaruh [S], T dan pH

Laju reaksi enzimatik dipengaruhi oleh kondisi reaksi. Enzim merupakan suatu protein yang aktivitasnya sangat dipengaruhi oleh struktur tiga dimensinya, perubahan bentuk karena denaturasi akan mempengaruhi aktivitas bahkan sampai menghilangkan aktivitasnya. Pengaruh-pengaruh terhadap aktivitas enzim antara lain: konsentrasi substrat [S], temperatur (T), dan pH.

Penambahan [S] akan meningkatkan laju reaksi sampai mencapai batas optimum yaitu dicapainya  $V_{max}$ . Temperatur semakin tinggi dapat merusak protein, menurunkan aktivitas setelah melampaui batas T optimal. Pada pH terlalu asam atau terlalu basa akan menyebabkan struktur tiga dimensinya terganggu akibat denaturasi, aktivitas juga menunjukkan batas optimal.

### 2.4.3 Faktor yang Mendukung Efisiensi Katalitik Enzim

Faktor yang pertama adalah letak dan orientasi. Enzim mungkin berikatan dengan molekul substrat, dengan cara sedemikian rupa sehingga ikatan yang akan dikatalisa bukan hanya terletak berdekatan dengan gugus katalitiknya, tetapi juga mengarah dengan tepat pada gugus tersebut.

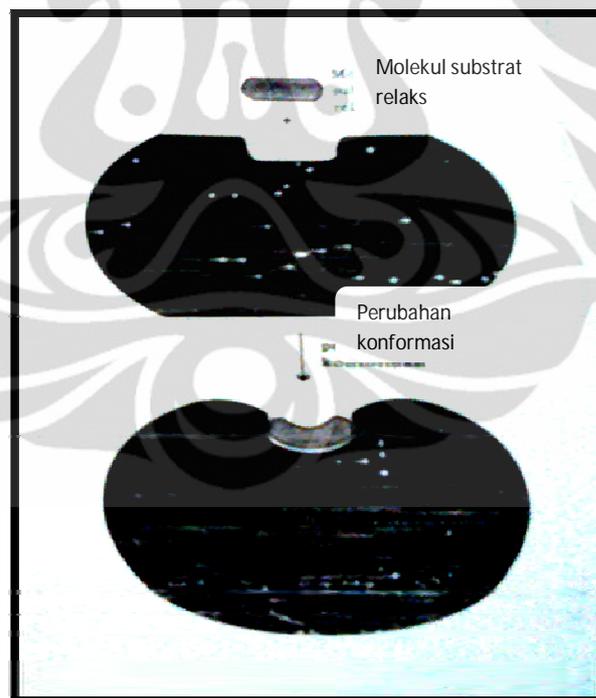


[Sumber: Lehninger, 1990]

**Gambar 2.7.** Gambaran skematik faktor-faktor letak dan orientasi di dalam interaksi molekul substrat S dengan suatu gugus katalitik pada sisi aktif enzim E.

Pada Gambar 2.7, gambar sebelah kanan menunjukkan letak dan orientasi antara enzim dan substrat yang menguntungkan, jadi akan meningkatkan dengan nyata kemungkinan masuknya kompleks ES ke tingkat transisi. Sedangkan pada Gambar 2.7 bagian tengah menunjukkan bahwa letak dari enzim dan substrat menguntungkan namun orientasi tidak menguntungkan, maka kemungkinan masuknya kompleks ES ke tingkat transisi tidak mungkin, sama seperti pada Gambar 2.7 sebelah kiri.

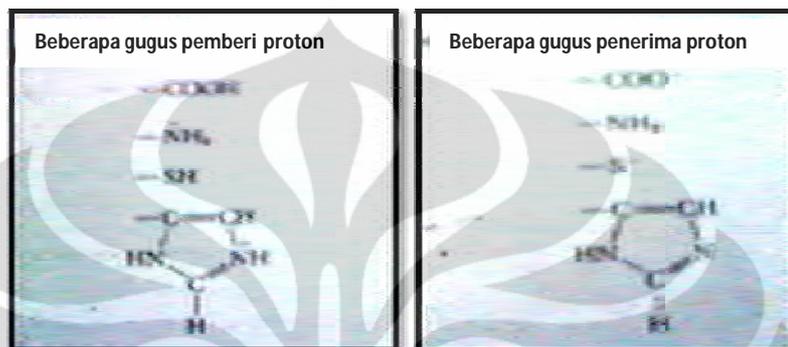
Selanjutnya adalah tegangan dan permukaan (dorongan perubahan yang tepat). Pengikatan substrat mungkin mendorong perubahan konformasi pada molekul enzim, yang menimbulkan tegangan pada struktur sisi aktif dan juga mengubah substrat yang terikat, sehingga membantu membawa kompleks ES menuju keadaan transisi. Perubahan ini disebut dorongan perubahan secara tepat, pada enzim oleh substrat. Peristiwa ini digambarkan pada Gambar 2.8.



[Sumber: Lehninger, 1990]

**Gambar 2.8. Dorongan penempatan sisi aktif enzim menjadi bentuk “tegang” oleh molekul substrat**

Katalisator umum Asam-Basa adalah salah satu faktor lainnya. Sisi aktif enzim dapat memberikan gugus R residu asam amino spesifik yang merupakan pemberi atau penerima proton yang baik. Gugus umum asam atau basa yang diperlihatkan pada Gambar 2.9 merupakan katalisator kuat bagi berbagai reaksi organik di dalam sistem cair.



[Sumber: Lehninger, 1990]

**Gambar 2.9. Gugus-gugus pemberi dan penerima proton**

Faktor yang terakhir adalah katalisator kovalen. Beberapa enzim bereaksi dengan substratnya, membentuk kompleks enzim-substrat yang berikatan kovalen dan sangat tidak stabil. Kompleks ini mengalami reaksi selanjutnya membentuk produk dengan segera dan lebih cepat, dibandingkan dengan reaksi yang tidak dikatalisa.

#### 2.4.4 Hidrolisis Enzimatis

Hidrolisis enzimatis merupakan cara kerja enzim dengan menggunakan proses hidrolisis. Hidrolisis enzimatis ini merupakan metode untuk mengkonversi selulosa menjadi glukosa dengan hasil yang tinggi tanpa mendegradasi produk gula.

Proses enzimatis hidrolisis dari selulosa terdiri dari beberapa langkah untuk memecah ikatan glikosida dengan menggunakan enzim selulase. Faktor-faktor yang mempengaruhi keefektifan hidrolisis dari selulosa diantaranya tipe dari substrat, kondisi reaksi seperti suhu dan pH, dan inhibitor produk akhir (Silverstein, 2004).

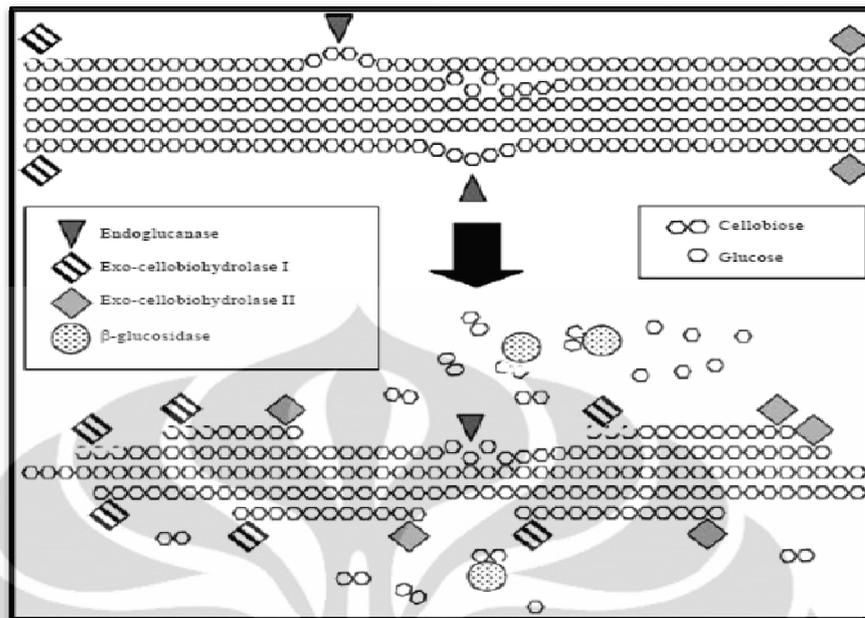
#### 2.4.4.1 Enzim Selulase

Selulase adalah nama bagi semua enzim yang memutuskan ikatan glikosidik  $\beta$ -1,4 di dalam selulosa, sedodekstrin, selobiosa, dan turunan selulosa lainnya. Selulase tidak dimiliki oleh manusia, karena itu manusia tidak dapat menguraikan selulosa. Tetapi hal ini dapat dilakukan oleh beberapa hewan seperti kambing, sapi, dan insekta seperti rayap karena dalam sistem pencernaannya mengandung bakteri dan protozoa yang menghasilkan enzim selulase yang akan menghidrolisis (mengurai) ikatan glikosidik  $\beta$ -1,4. Oleh karena reaksi yang ditimbulkan oleh selulase saat mengurai selulosa adalah hidrolisis, maka selulase diklasifikasikan ke dalam jenis enzim hidrolase.

Selulase dapat disintesis oleh jamur, bakteri dan tanaman, dengan fokus penelitian terbanyak adalah produksi selulase pada bakteri dan jamur, baik aerobik maupun anaerobik. Jamur aerobik mesofilik, *Trichoderma reesei* QM 6a dan mutannya telah dipelajari secara intensif sebagai sumber penghasil selulase (Phillippidis, 1996).

Selulase bukan merupakan enzim tunggal, tetapi terdiri dari tiga macam enzim, yaitu 1,4-  $\beta$ -D-glucan glucanohydrolases (endoglucanases) (EC 3.2.1.21), 1,4-  $\beta$ -D-glucan cellobiohydrolases and 1,4-  $\beta$ -D-glucan glucohydrolases (exoglucanases) (EC 3.2.1.91), and  $\beta$ -D-glucoside glucohydrolases ( $\beta$ -glucosidases) (EC 3.2.1.21) (Silverstein, 2004).

Mekanisme enzimatik hidrolisis selulosa melibatkan tindakan sinergis oleh endoglukanase, eksoglukanase atau cellobiohidrolase, dan  $\beta$ -glukosidase. *Endoglucanase* menghidrolisis ikatan intramolekul  $\beta$ -1,4-glucosidic dari rantai selulosa secara acak untuk menghasilkan rantai baru diakhir; *exoglucanase* memutus rantai selulosa pada ujung kedua rantai untuk melepaskan selobiosa larut atau glukosa; dan  $\beta$ -glucosidases menghidrolisis selobiosa menjadi glukosa untuk menghilangkan gangguan selobiosa (Atcha, 2009). Ketiga proses hidrolisis terjadi secara simultan seperti ditunjukkan pada Gambar 2.10.

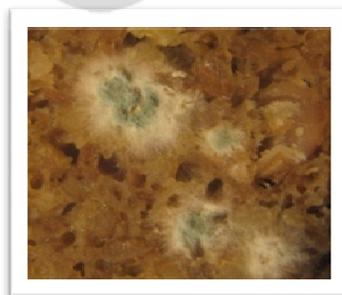


[Sumber: [Malherb and Cloete, 2003](#)]

**Gambar. 2.10. Mekanisme enzimatik selulase**

## 2.5 Kapang

Kapang (*mould/filamentous fungi*) merupakan mikroorganisme anggota Kingdom Fungi yang membentuk hifa (Carlile & Watkinson 1994). Carlile & Watkinson (1994) menyatakan bahwa jumlah spesies fungi yang telah teridentifikasi hingga tahun 1994 mencapai 70.000 spesies, dengan perkiraan penambahan 600 spesies setiap tahun. Dari jumlah tersebut, sekitar 10.000 spesies merupakan kapang. Habitat kapang sangat beragam, namun pada umumnya kapang dapat tumbuh pada substrat yang mengandung sumber karbon.



[Sumber: [www.wikipedia.com](http://www.wikipedia.com)]

**Gambar. 2.11. Empat koloni kapang tumbuh pada roti. Tampak hifa berwarna putih dan bagian dengan askus berwarna biru kelabu**

Kapang melakukan reproduksi dan penyebaran menggunakan spora. Spora kapang terdiri dari dua jenis, yaitu spora seksual dan spora aseksual (Carlile & Watkinson 1994). Spora aseksual memiliki ukuran yang kecil (diameter 1 – 10  $\mu\text{m}$ ) dan ringan, sehingga penyebarannya umumnya secara pasif menggunakan aliran udara (Carlile & Watkinson 1994).

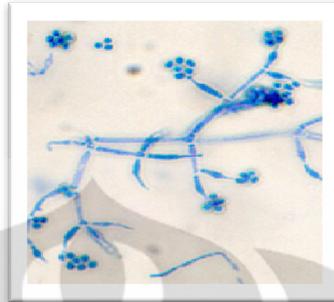
Jenis kapang yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Trichoderma sp.*, taksonomi dari kapang ini adalah:

Kingdom	: Fungi
Phylum	: Ascomycota
Class	: Sordariomycetes
Subclass	: Hypocreomycetidae
Order	: Hypocreales
Family	: Hypocreaceae
Genus	: <i>Trichoderma</i>
Species	: <i>Trichoderma sp.</i>

### 2.5.1 *Trichoderma sp.*

*Trichoderma* merupakan jamur inperfekti (tak sempurna) dari Subdivisi Deuteromycotina, Kelas Hyphomycetes, Ordo Moniliales. Konidiofor tegak, bercabang banyak, agak berbentuk kerucut, dapat membentuk klamidospora, pada umumnya koloni dalam biakan tumbuh dengan cepat, berwarna putih sampai hijau (Cook and Baker, 1989). Bentuk Sempurna dari jamur ini secara umum dikenal sebagai *Hypocreales* atau kadang-kadang *Eurotiales*, *Cladipitales* dan *Spheriales*. Spesies dalam satu kelompok yang sama dari *Trichoderma* dapat menunjukkan spesies yang berbeda pada *Hypocrea* sebagai anamorf. Hal ini dimungkinkan karena terdapat banyak perbedaan bentuk seksual dari *Trichoderma*, sebagai contoh misalnya pada *T. harzianum* dapat

menunjukkan enam perbedaan bentuk seksual yang masing-masing bentuk ini menunjukkan anamorf yang berbeda (Chet, 1987).



[Sumber: www.mycology.com]

**Gambar 2.12. Phialides and conidia of *Trichoderma harzianum*.**

Kapang *Trichoderma viride* juga digunakan untuk meningkatkan nilai manfaat jerami padi melalui fermentasi, karena jamur ini mempunyai sifat selulolitik dan mengeluarkan enzim selulase yang dapat merombak selulosa menjadi selubiosa hingga akhirnya menjadi glukosa.

Selulase yang dihasilkan oleh *Trichoderma viride* mengandung  $\text{exo-}\beta\text{-1,4-glucanase}$ ,  $\text{endo-}\beta\text{-1,4-glucanase}$  dan  $\beta\text{-1,4-glucosidase}$ . Kompleks selulase pada *Trichoderma viride* telah benar-benar dipelajari. Enzim ini dapat mengubah selulosa alami sama baiknya dengan selulosa turunan menjadi glukosa (King dan Nessel, 1969). Halliwell dan Griffin (1973) dan Wood dan McCrae (1972) melaporkan mengenai isolasi komponen  $C_1$  dari *Trichoderma koningii* (Worthington, 1988).

## 2.6 Isolasi Enzim

Dalam mengisolasi enzim dari suatu organisme harus dilihat terlebih dahulu karakteristik enzim tersebut berdasarkan fungsinya, yaitu enzim ekstraseluler atau enzim intraseluler. Pada enzim ekstraseluler isolasi enzim lebih mudah dilakukan dibandingkan enzim intraseluler, karena pada enzim intraseluler dibutuhkan suatu perlakuan untuk memecahkan dinding sel terlebih dahulu.

Isolasi enzim intraseluler merupakan suatu proses pelepasan enzim dari sel, sehingga harus dilakukan pemecahan dinding sel terlebih dahulu untuk

mendapatkan enzim yang diinginkan. Teknik yang digunakan untuk memecah dinding sel dibagi menjadi dua, yaitu cara fisik dan cara kimia. Cara fisik dapat dilakukan dengan: alat homogenizer (efektif untuk memecah dinding sel hewan dan tumbuhan, tapi tidak untuk sel mikroba karena dinding selnya lebih keras), pembekuan dan pencairan, kejutan osmosa (bakteri gram negative lebih rentan terhadap perubahan tekanan osmosa yang besar dibandingkan bakteri gram positif), sonifikasi (pemberian getaran di atas frekuensi batas pendengaran manusia  $> 20\text{kHz}$ , ultrasonic), dan agitasi dengan abrasi.

Cara kimia yang digunakan antara lain: penggunaan detergen (dapat merusak dinding sel), penggunaan enzim litik (umumnya yang digunakan adalah lisozim, cara kerjanya adalah dengan memutus ikatan  $\beta$ -1,4 glikosida dari polisakarida penyusun dinding sel), dan juga penggunaan alkali (cara ini berhasil pada enzim-enzim yang stabil pada pH tinggi).

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bidang Teknologi Lingkungan Pusat Penelitian dan Pengembangan Kimia (P2K-LIPI), PUSPIPTEK, Serpong. Pada bulan Februari – akhir Mei 2011.

#### **3.2 Alat-alat yang Digunakan**

Pada penelitian ini alat-alat yang digunakan adalah tabung reaksi, erlenmeyer, botol timbang, batang pengaduk, labu ukur, pipet tetes, pipet ukur, pipet mikro, spatula, pinset, jarum ose, *cork borer* (diameter =1cm), pembakar spritus, *magnetic stirrer*, beaker glass, gelas ukur, alat timbang analitis, pH meter, tabung *sentrifuge*, *sentrifuge*, *autoclave*, *vortex*, *wáterbath*, *shaker*, inkubator, *hotplate*, oven, serta instrumen yang digunakan untuk anáalisis adalah spektrofotometer UV/VIS Hitachi-U-2000. Beberapa alat yang digunakan dalam penelitian dapat dilihat pada lampiran 10.

#### **3.3 Bahan**

##### **3.3.1 Mikroorganisme**

Mikroorganisme yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Trichoderma sp* dengan 2 strain berbeda isolat lokal yang berasal dari Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI, Cibinong, dengan kode T004 dan T051. Biakan dipelihara dan diperbanyak pada médium *Potato Dextrose Agar* (PDA).

### 3.3.2 Bahan Kimia

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari P2K-LIPI PUSPIPTEK, Serpong. Bahan-bahan Kimia yang digunakan untuk peremajaan jamur dan produksi enzim antara lain: PDA (Difco), diamonium tartrat (Merck), glukosa (Merck),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Merck),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Merck), ekstrak yeast (Difco), pelepah sawit, dan akuades.

Bahan-bahan kimia yang digunakan dalam pembuatan buffer asetat antara lain: asam asetat glasial (Merck), natrium asetat (Merck), dan akuades.

Pada uji aktivitas selulase bahan-bahan yang digunakan terdiri dari: carboxymethyl cellulose (CMC) (BDH Laboratory Supply), Avicel (Merck), kertas saring Whatman No.1, dan buffer asetat pH 5.

Reagen yang digunakan pada pengujian kadar protein digunakan bahan-bahan sebagai berikut:  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (Merck), K-Na tartrat (Merck), NaOH (Merck),  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Merck), Folin-Ciocalteu (Merck), *bovine serum albumin* (BSA) (Merck) sebagai standar protein, dan akuades.

Glukosa yang terbentuk diukur dengan menggunakan metode Samogyi Nelson dengan bahan-bahan kimia yang digunakan antara lain:  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (Merck), K-Na tartrat (Merck),  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Merck),  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (Merck), ammonium molibdat (Merck), natrium arsenat (Wako Pure Chemical Industry),  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Merck), glukosa (Merck) sebagai standar, dan akuades.

## 3.4 Prosedur Kerja

### 3.4.1 Sterilisasi Alat

Alat-alat gelas yang akan digunakan untuk media pertumbuhan jamur dan yang digunakan untuk regenerasi jamur seperti, tabung reaksi, *cork borer* (diameter=1cm), spatula, pipet, jarum ose, erlenmeyer, disterilisasi terlebih dahulu dalam oven  $160^\circ\text{C}$  selama 2 jam.

Media untuk pertumbuhan *Trichoderma sp.* perlu dilakukan sterilisasi didalam *autoclave* 121<sup>0</sup>C selama 15 menit. Semua alat saat sterilisasi di bungkus dengan kertas.

### **3.4.2 Preparasi Substrat Pelepah Sawit**

#### **3.4.2.1 Preparasi sampel Pelepah Sawit (Tanpa Delignifikasi)**

Pelepah sawit yang masih kasar dihaluskan dengan menggunakan *blender*, lalu diayak menggunakan ayakan 25 *mess*. Sampel pelepah sawit disimpan pada suhu kamar, selanjutnya akan digunakan sebagai substrat medium pertumbuhan jamur *Trichoderma sp.* strain T004 dan T051. Pelepah sawit ukuran 25 *mess*, untuk penulisan selanjutnya akan disingkat dengan nama PSTH (Pelepah sawit tanpa hidrolisis).

#### **3.4.2.2 Preparasi Sampel Pelepah Sawit (Delignifikasi Basa)**

PSTH ditimbang, lalu ditambahkan NaOH 2% dengan perbandingan 1:10 (w/v), diaduk selama 2 jam, lalu campuran tersebut di masukkan ke dalam alat *autoclave* selama 1 jam, pada suhu 121<sup>0</sup>C. Campuran disaring dan endapannya dicuci dengan akuades hingga pH netral dengan cara di uji dengan menggunakan kertas indikator universal. pH dinyatakan netral ketika pH air cucian endapan sama dengan pH akuades. lalu dikeringkan dalam oven pada suhu 50<sup>0</sup>C. Sampel pelepah sawit disimpan pada suhu kamar dan selanjutnya akan digunakan sebagai substrat medium pertumbuhan jamur *Trichoderma sp.* strain T004 dan T051. Untuk penulisan selanjutnya, pelepah sawit hasil hidrolisis oleh NaOH 2% akan disingkat menjadi PSH (Pelepah sawit hidrolisat).

### 3.4.3 Pembuatan Buffer dan Pereaksi

#### 3.4.3.1 Pembuatan Buffer Asetat

A= 0,2 M larutan asam asetat (11,55 mL pada 1000 mL akuades)

B= 0,2 M larutan Sodium Asetat (16,4 gram  $C_2H_3O_2Na$  atau 27,2 gram  $C_2H_2O_2Na \cdot 3H_2O$  pada 1000 mL)

Komposisi larutan A dan larutan B yang digunakan untuk menghasilkan pH yang diinginkan ditunjukkan pada Tabel 3.1.

**Tabel 3.1. Komposisi larutan A dan larutan B pembuatan buffer asetat**

pH	A (mL)	B (mL)
3,6	46,3	3,7
3,8	44,0	6,0
4,0	41,0	9,0
4,2	36,8	13,2
4,4	30,5	19,5
4,6	25,5	24,5
4,8	20,0	30,0
5,0	14,8	35,2
5,2	10,5	39,5

#### 3.4.3.2 Pembuatan Pereaksi uji Protein (Metode Lowry)

Pengujian kadar protein menggunakan metode Lowry. Pereaksi yang digunakan terdiri dari: larutan A yang dibuat dari 0,5 gram  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  dan 1 gram K-Na tartrat. Keduanya dilarutkan dalam akuades sampai volume menjadi 100 mL. Larutan B dibuat dari 2 gram  $Na_2CO_3$  dan 0,4 gram NaOH yang dilarutkan dalam akuades sampai volume mencapai 100 mL. Larutan C terdiri atas larutan A dan B yang dicampurkan dengan perbandingan 1:50. Larutan D adalah pereaksi Follin Ciocalteu 1N. Larutan standar yang dipakai adalah BSA dengan konsentrasi 0,5 mg/mL. Lalu deret standar dibuat dengan konsentrasi 0; 0,008; 0,016; 0,024; 0,032; 0,04; 0,048; 0,056; 0,064; 0,072 mg/mL.

### 3.4.3.3 Pembuatan Pereaksi Uji Gula Pereduksi ( Metode Samogyi Nelson)

Pengujian terbentuknya gula pereduksi digunakan metode Samogyi Nelson. Pereaksi yang digunakan terdiri atas pereaksi tembaga alkali yang dibuat dari 4 gram  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 16 gram K-Na tartrat, 24 gram  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dan 180 gram  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Bahan-bahan tersebut dilarutkan dalam akuades sampai volume mencapai 1 L. Pereaksi arsenomolibdat dibuat dari 100 gram ammonium molibdat yang dilarutkan dalam 1800 mL akuades ditambah 84 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat, kemudian ditambahkan 12 gram Na-arsenat yang dilarutkan dalam 100 mL akuades. Campuran tersebut diinkubasi dalam inkubator pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 24 jam dan disimpan dalam botol berwarna gelap. Larutan standar gula pereduksi adalah larutan glukosa yang dibuat dengan deret konsentrasi 0; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,10; 0,12; 0,14; 0,16 mg/mL.

## 3.4.4 Pembuatan Medium

### 3.4.4.1 Pembuatan Medium Potato Dextrose Agar (PDA)

*Potato* ditimbang sebanyak 200 gram, dekstrosa 10 gram, dan agar sebanyak 15 gram. Semua bahan dilarutkan dalam 1 L aquades, dipanaskan sampai semua larut. Lalu disterilisasi dalam *autoclave*  $121^\circ\text{C}$  selama 15 menit.

### 3.4.4.2 Pembuatan Medium Starter

Jenis fermentasi yang digunakan dalam pembuatan medium starter adalah fermentasi padat. Menimbang dedak sebanyak 10 gram (ketebalan  $\pm 1$  cm, pada erlenmeyer 100 mL) lalu ditambahkan beberapa bahan dengan komposisi yang ditunjukkan pada Tabel 3.2 berikut:

**Tabel 3.2. Komposisi bahan-bahan tambahan**

Komponen	Komposisi per 100 mL
Diamonium tartrat	12,4 gram
<i>Yeast ekstrak</i>	3,4 gram

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,3 gram
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,09 gram
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3,3 gram

[Sumber: Syarifah, 2011]

Semua bahan dilarutkan dengan 100 mL akuades, kemudian ditambahkan ke substrat medium pertumbuhan sebanyak 5 ml. Selanjutnya, ditambahkan 5 ml akuades, lalu medium tersebut disterilkan dalam *autoclave* pada suhu  $121^\circ\text{C}$ , selama 15 menit. Medium didinginkan dan siap digunakan sebagai medium aktivasi untuk jamur *Trichoderma sp.* strain T004 dan T051.

#### 3.4.4.3 Pembuatan Medium Produksi

Proses fermentasi dilakukan dengan menggunakan medium produksi padat. Sampel pelepah sawit, baik yang dilakukan delignifikasi maupun tanpa delignifikasi, masing-masing ditimbang sebanyak 5 gram (ketebalan  $\pm 1$  cm pada Erlenmeyer 100 mL). Pada medium produksi dilakukan variasi seperti yang diperlihatkan pada Tabel 3.3 dengan komposisi bahan-bahan tambahan seperti yang ditunjukkan pada Tabel 3.4:

**Tabel 3.3. Variasi medium produksi**

No	Kode	Variasi
1	C	Pelepah sawit + sumber N (diammonium tartrat)
2	N:C=1:1	Pelepah sawit + sumber N + sumber karbon (glukosa) (N:C=1:1)
3	N:C=1:2	Pelepah sawit + sumber N + sumber karbon (N:C=1:2)
4	N:C=2:1	Pelepah sawit + sumber N + sumber karbon (N:C=2:1)

Tabel 3.4. Komposisi variasi medium produksi

Komponen ( per 100 mL)	Kontrol (C)	N:C = 1:1	N:C = 1:2	N:C = 2:1
Diammonium tartrat	12,4 gram	12,4 gram	12,4 gram	24,8 gram
<i>Yeast extract</i>	3,4 gram	3,4 gram	3,4 gram	3,4 gram
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,3 gram	1,3 gram	1,3 gram	1,3 gram
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,09 gram	0,09 gram	0,09 gram	0,09 gram
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3,3 gram	3,3 gram	3,3 gram	3,3 gram
Glukosa	-	12,4 gram	24,8 gram	12,4 gram

Bahan-bahan tersebut dilarutkan dalam 100 mL akuades, lalu dipipet 5 mL untuk ditambahkan ke substrat medium pertumbuhan. Selanjutnya ditambahkan 10 ml akuades untuk menjaga kelembaban medium, lalu dilakukan proses sterilisasi dengan memasukkan medium ke dalam *autoclave* selama 60 menit dengan suhu  $121^{\circ}\text{C}$  pada 1.21 atm. Medium didinginkan dan siap digunakan sebagai substrat medium pertumbuhan jamur T004 dan T051.

#### 3.4.5 Persiapan Inokulum *Trichoderma sp.*

Tujuan pembuatan inokulum bertujuan untuk mendapatkan biakan jamur *Trichoderma sp.* strain T004 dan T051 dengan umur yang diinginkan. Caranya adalah dengan menggosokkan biakan murni pada agar miring PDA, lalu dipindahkan ke dalam cawan petri secara aseptis. Biakan diinkubasi, selama 3 hari pada suhu  $30^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.4.6 Pembuatan Starter

Inokulum hasil peremajaan yang berusia 3 hari pada cawan petri di cetak dengan menggunakan *cork borer* diameter 1 cm. Tiga butir inokulum hasil cetakan diinokulasikan ke medium aktivasi, kemudian diinkubasi selama 3 hari pada suhu  $30^{\circ}\text{C}$ .

### 3.4.7 Produksi Enzim Selulase Kasar

Inokulum hasil aktivasi yang berumur 3 hari diinokulasikan sebanyak 10% biakan ke dalam medium produksi yang telah disiapkan pada berbagai variasi tambahan sumber nitrogen (diammonium tartrat) dan sumber karbon (glukosa), lalu diinkubasi pada suhu 30<sup>0</sup>C selama 10 hari. Pengambilan sampel dilakukan pada hari ke-1, 3, 5, 7, 8 dan 10 untuk dilakukan pengambilan ekstrak kasar enzim selulase yang dihasilkan.

### 3.4.8 Ekstrak Enzim Selulase Kasar

Untuk menghasilkan enzim selulase kasar, hasil fermentasi pada hari ke-1,3,5,7,8, dan 10 diekstrak dengan cara ditambahkan 100 mL akuades, kemudian di kocok menggunakan *shaker* selama 2 jam dengan kecepatan 124 rpm. Campuran tersebut disentrifugasi pada suhu 4<sup>0</sup>C dengan kecepatan 8000 rpm selama 15 menit. *Supernatant* dikumpulkan, kemudian dilakukan pengamatan warna, uji aktivitas, dan pengukuran kadar protein.

### 3.4.9 Pengujian Kadar Protein

Enzim selulase kasar diambil sebanyak 0,5 mL, lalu ditambahkan akuades sampai volume 4 mL, kemudian ditambahkan 5,5 mL larutan Lowry C, kemudian ditambahkan larutan Lowry D sebanyak 0,5 mL, lalu dihomogenkan dan didiamkan pada suhu kamar selama 30 menit. Selanjutnya, absorbansi diukur pada panjang gelombang 650 nm. Hasil pembacaan absorbansi kemudian dikonversikan ke persamaan linier standar protein yang ditunjukkan pada Lampiran 3.

### 3.4.10 Pengujian Aktivitas Enzim

Aktivitas enzim selulase yang terbentuk di uji dengan menggunakan substrat uji aktivitas dengan berbagai bahan selulosa, yaitu: CMC 1%, Avicel dan

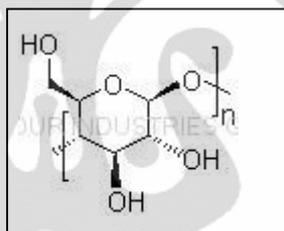
Filter Paper Unit (kertas saring *whatman* no. 1). Komposisi yang digunakan ditunjukkan pada Tabel 3.5 berikut:

**Tabel 3.5. Komposisi substrat dan filtrat enzim untuk uji aktivitas**

	FPU (Filter Paper Unit)	Avicel	CMC 1%
<b>Substrat</b>	50 mg	150 mg	0,5 mL
<b>Buffer Asetat (pH 5)</b>	1 mL	4 mL	0,45 mL
<b>Enzim</b>	0,5 mL	0,5 mL	0,05 mL

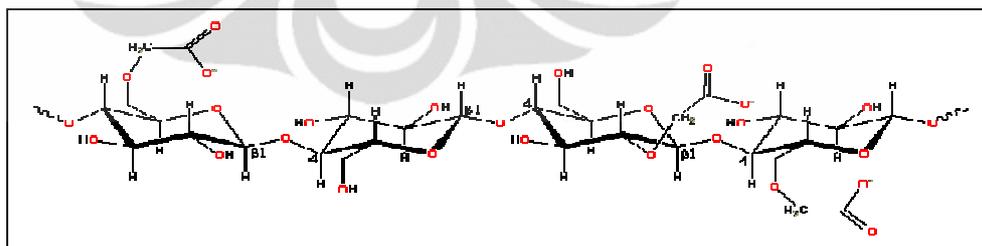
[Sumber : NREL, 1996]

Semua sampel diinkubasi pada suhu 30<sup>0</sup>C dengan variasi waktu inkubasi, yaitu 0, 30 dan 60 menit. Aktivitas enzim dihentikan dengan cara direndam dalam air mendidih selama ± 5 menit. Selanjutnya gula pereduksi yang terbentuk diuji dengan menggunakan metode Samogyi Nelson.



[Sumber: www.google.co.id]

**Gambar 3.1. Struktur molekul avicel**



[Sumber: www.google.co.id]

**Gambar 3.2. Struktur molekul CMC**

Rumus yang digunakan untuk menghitung aktivitas enzim berdasarkan NREL (1996) adalah sebagai berikut:

$$AE = \frac{(p_t - q_0)}{t} \times Fp$$

Keterangan:

AE = Aktivitas Enzim (U/mL)

$p_t$  = Konsentrasi glukosa pada waktu inkubasi t menit ( $\mu\text{mol/mL}$ )

$q_0$  = Konsentrasi glukosa pada waktu inkubasi 0 menit ( $\mu\text{mol/mL}$ )

t = Waktu inkubasi (menit)

Fp = Faktor pengenceran

Definisi untuk 1 unit aktivitas enzim adalah 1  $\mu\text{mol}$  glukosa yang dihasilkan permenit pada suhu 30<sup>0</sup>C, pH 5.

#### 3.4.11 Pengujian Gula Pereduksi yang Terbentuk

Gula pereduksi yang terbentuk pada uji aktivitas, selanjutnya di uji dengan menggunakan metode Samogyi Nelson.

Sampel yang berasal dari uji aktivitas dipipet sebanyak 1 mL, lalu ditambahkan pereaksi tembaga alkali sebanyak 1 mL. Campuran dididihkan selama 20 menit, kemudian didinginkan. Setelah campuran dingin, dilakukan penambahan pereaksi arsenomolibdat sebanyak 1 mL, kemudian diencerkan dengan 7 mL akuades, lalu campuran dihomogenkan. Setelah campuran homogen, absorbansi diukur pada panjang gelombang 520 nm. Hasil pembacaan absorbansi kemudian dikkonversikan ke persamaan linier standar glukosa, dapat dilihat pada Lampiran 2.

## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Peremajaan *Trichoderma sp.*

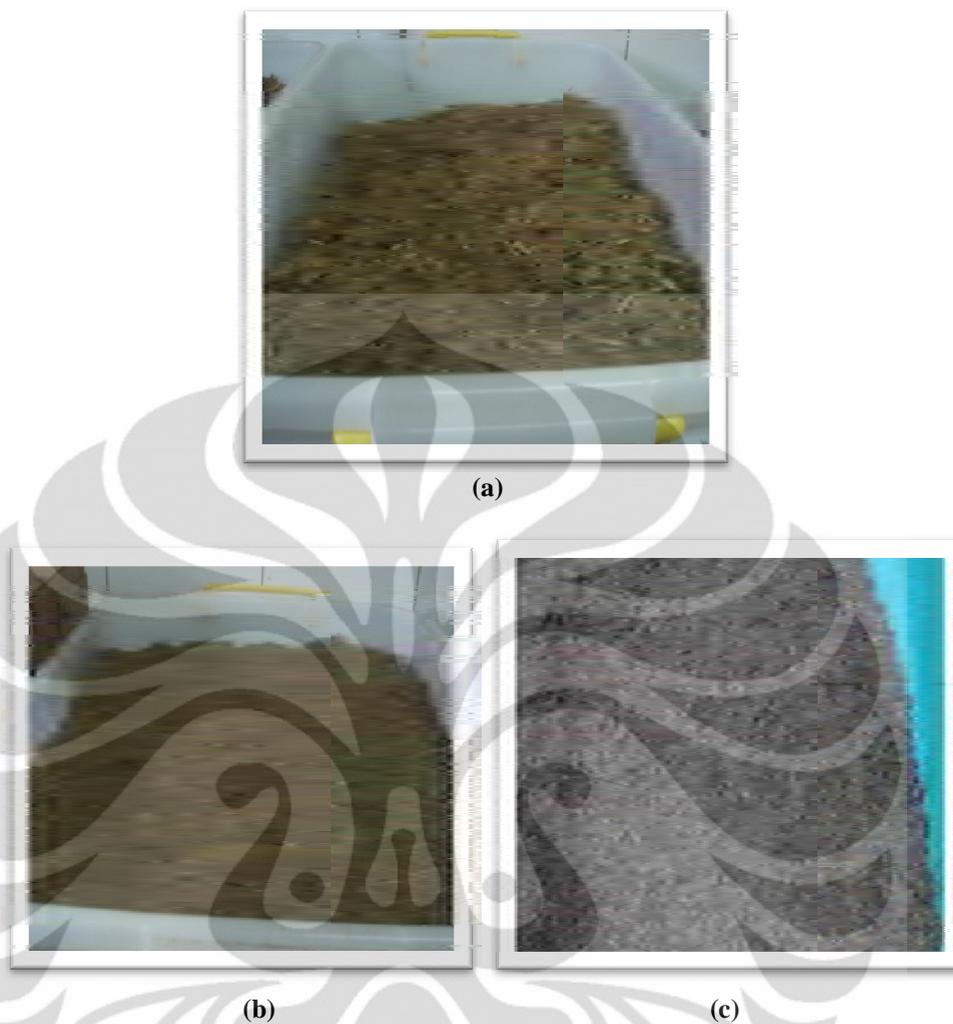
*Trichoderma sp.* dengan kode T004 dan T051 memiliki ciri-ciri yang berbeda pada warna dari konidia. Pada Gambar 4.1 (a), konidia T004 berwarna kuning, sedangkan T051, Gambar 4.1 (c) memiliki konidia yang berwarna putih. Waktu yang dibutuhkan untuk peremajaan selama tiga hari. Waktu ini dipilih karena dengan lama waktu tersebut, hifa telah memenuhi medium PDA pada cawan petri.



Gambar 4.1. *Trichoderma sp.*

### 4.2 Pengaruh *Pretreatment* terhadap Aktivitas Enzim

*Pretreatment* yang dilakukan untuk meminimalkan kadar lignin pada pelepah sawit adalah dengan menggunakan *pretreatment* kimia NaOH 2% dengan lama pengadukan 2 jam dan lama *autoclave* 1 jam dan sebagai pembanding digunakan pelepah sawit tanpa delignifikasi. Pada Gambar 4.2 diperlihatkan hasil pengecilan ukuran pelepah sawit (PSTH) dan hasil hidrolisis pelepah sawit menggunakan basa (PSH).



**Gambar 4.2. Substrat pelepah sawit (a) Pelepah sawit kasar; (b) Pelepah sawit tanpa hidrolisis (PTSH); (c) Pelepah sawit hidrolisat (PSH)**

Metode *pretreatment* yang digunakan untuk bahan lignoselulosa dapat diklasifikasikan menjadi *pretreatment* fisik, fisikokimia, kimia dan proses biologi (Silverstein, 2004).

Delignifikasi substrat dengan penggunaan larutan basa dipilih karena menurut Chen, et al., (2009), jika dibandingkan dengan *pretreatment* penggunaan larutan asam. *Pretreatment* basa dengan NaOH menghilangkan fraksi lignin lebih banyak dari biomassa karena kelarutan lignin dalam larutan alkali (Hamisan et al., 2009).

Data pada Tabel 4.1 menunjukkan bahwa penggunaan substrat PSTH kontrol menghasilkan unit aktivitas sebesar 0,0286 U/mL, sedangkan pada penggunaan substrat PSH kontrol menghasilkan aktivitas sebesar 0,0457 U/mL

dengan menggunakan jamur T004 dan FPU sebagai substrat uji aktivitas. Untuk jamur T051 menghasilkan unit aktivitas sebesar 0,0255 U/mL pada substrat PSTH dan 0,0375 U/mL pada substrat PSH dengan menggunakan FPU sebagai substrat uji aktivitas. Berdasarkan hasil ini menunjukkan bahwa penggunaan substrat PSH dapat meningkatkan hasil hidrolisis enzimatis sebesar 59,79% pada jamur T004 dan 47,06% pada penggunaan jamur T051.

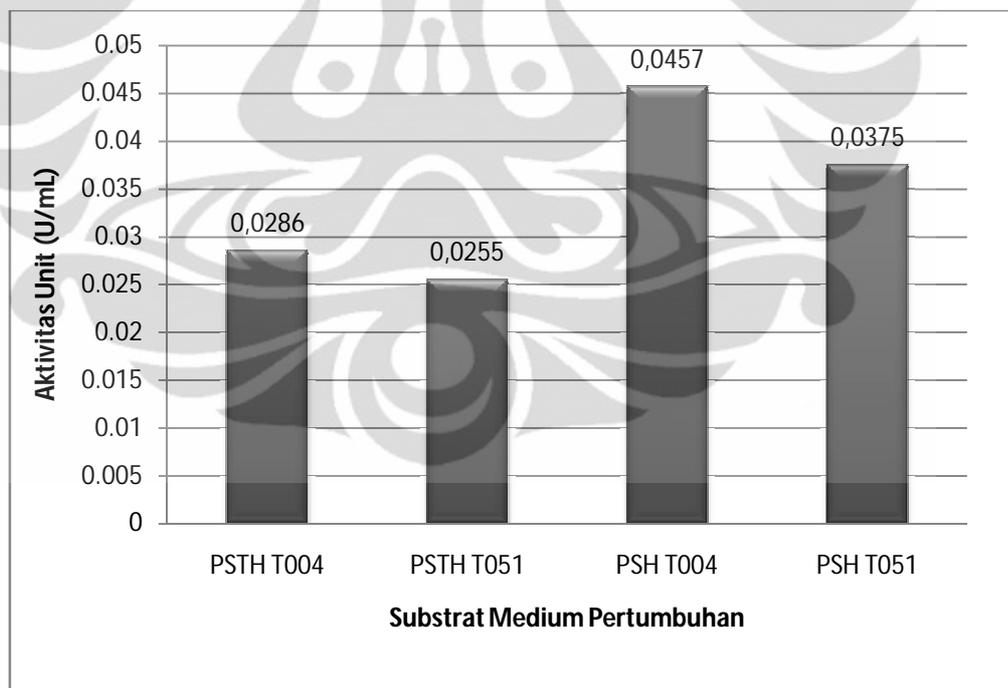
**Tabel 4.1. Unit aktivitas optimum untuk substrat PSTH dan PSH pada medium pertumbuhan jamur**

Substrat Uji Aktivitas	Unit Aktivitas (U/mL)			
	PSTH		PSH	
	T004	T051	T004	T051
FPU	0,0286	0,0255	0,0457	0,0375

Keterangan:

PSTH = Pelepah Sawit tanpa Hidrolisis

PSH = Pelepah Sawit dengan Hidrolisis Basa



**Gambar 4.3. Grafik perbandingan unit aktivitas antara penggunaan substrat PSTH kontrol dengan substrat PSH kontrol pada jamur T004 dan T051**

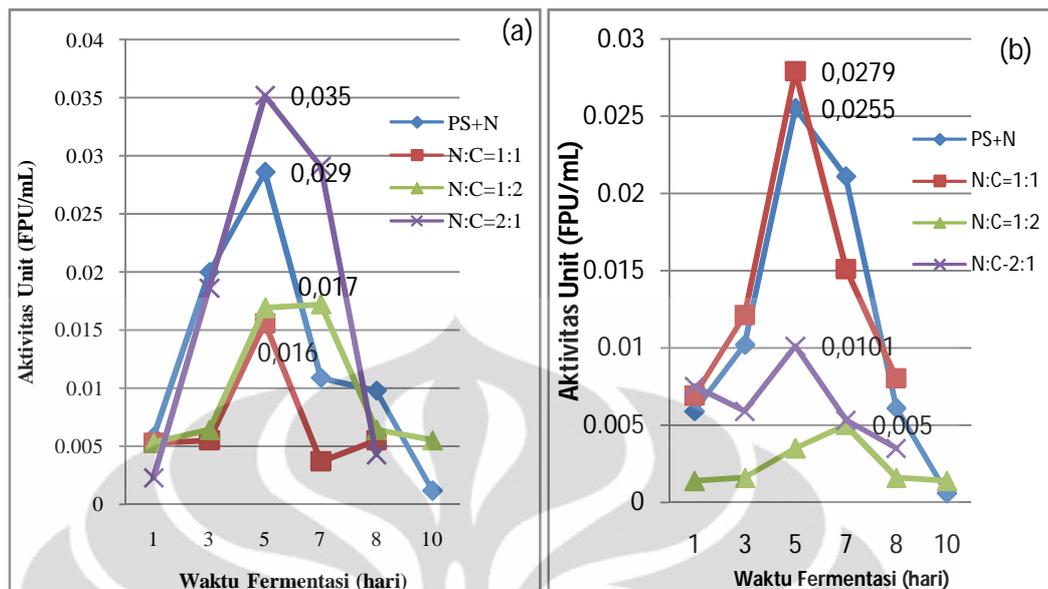
Grafik pada Gambar 4.3 menunjukkan unit aktivitas optimum terjadi pada penggunaan substrat PSH untuk kedua jenis jamur.

Menurut Sun, et al., (2008), dengan menggunakan *Trichoderma reesei* Rut C-30 untuk memproduksi selulase, penggunaan *pretreatment* basa pada batang jerami padi dan *non-pretreated* pada serbuk jerami padi sebagai substrat menghasilkan aktivitas selulase masing-masing sebesar 1,07 dan 0,71 FPU/mL (Moosavi et al., 2007, p. 112).

*Pretreatment* batang jagung oleh Varga et al. (2002) dengan NaOH 10% selama 60 menit pada suhu 121<sup>0</sup>C dalam *autoclave* menurunkan fraksi lignin lebih dari 95% dan meningkatkan konversi enzimatik sebesar 79.4% dibandingkan dengan yang tidak dilakukan *pretreatment*. Selain itu, dengan menggunakan NaOH (0.5% w/w) dan penambahan waktu reaksi menjadi 90 menit, menghasilkan konversi enzimatik sebesar 80.1%. (Silverstein, 2004).

#### **4.3 Pengaruh Penambahan Sumber C dan N pada Substrat terhadap Waktu Fermentasi**

Penambahan sumber nitrogen dan sumber karbon pada substrat PSTH dan substrat PSH dilakukan untuk mencari kondisi optimum medium pertumbuhan yang dapat menghasilkan aktivitas enzim selulase paling optimum. Sumber nitrogen yang digunakan adalah diammonium tartrat dan sumber karbon tambahan yang digunakan adalah glukosa dengan variasi perbandingan komposisi antara sumber N dan C sebesar 1:1, 1:2, dan 2:1. Kontrol yang digunakan adalah substrat pelepah sawit, baik PSTH maupun PSH yang ditambahkan sumber nitrogen. Data hasil pengukuran dapat dilihat pada Lampiran 4.

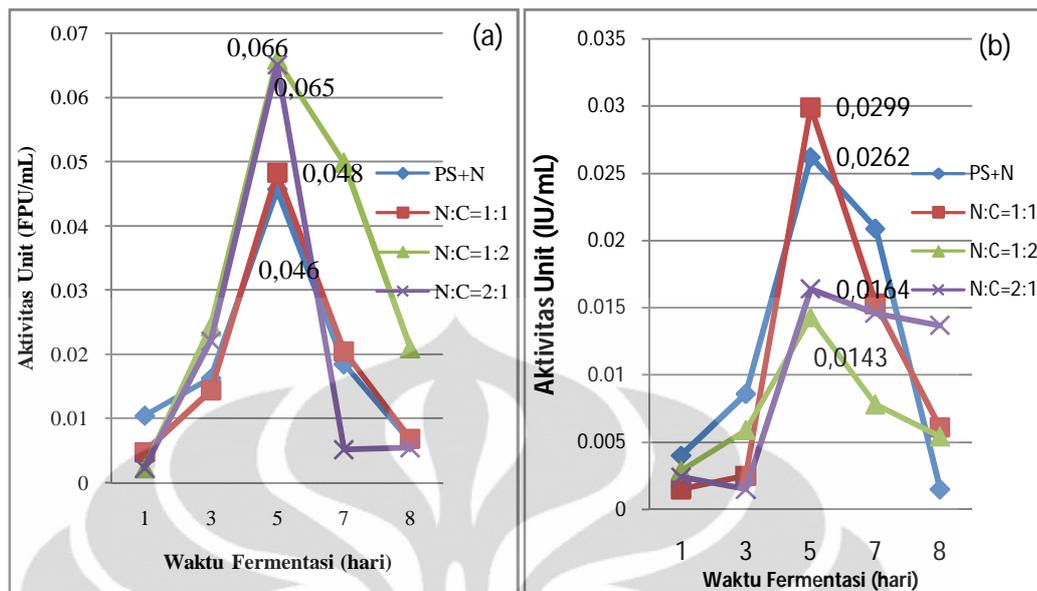


**Gambar 4.4. Grafik unit aktivitas berdasarkan waktu fermentasi pada substrat PSTH (a) T004 (b) T051**

Penggunaan substrat PSTH sebagai medium pertumbuhan jamur *Trichoderma sp.* secara umum menghasilkan aktivitas tertinggi pada waktu fermentasi hari ke-5 dengan menggunakan FPU sebagai substrat uji aktivitas, seperti yang terlihat pada Gambar 4.4.

Waktu fermentasi selama 5 hari terjadi pada substrat PSTH kontrol, N:C=1:1, dan N:C= 2:1. Pada PSTH kontrol, unit aktivitas enzim yang dihasilkan sebesar 0,029 FPU/mL untuk jamur T004 dan jamur T051 sebesar 0,026 FPU/mL, N:C=1:1 sebesar 0.016 FPU/mL untuk jamur T004 dan jamur T051 sebesar 0,028 FPU/mL, dan N:C=2:1 sebesar 0,035 FPU/mL pada jamur T004 dan 0,008 FPU/mL untuk jamur T051.

Namun, pada substrat PSTH dengan N:C=1:2 menyebabkan bertambahnya waktu fermentasi menjadi 7 hari, untuk menghasilkan unit aktivitas paling optimum pada jamur T004 sebesar 0,0172 FPU/mL dan T051 sebesar 0,008 FPU/mL, seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.4 (a) dan 4.4 (b).



**Gambar 4.5. Grafik unit aktivitas berdasarkan waktu fermentasi pada substrat PSH (a) T004 (b) T051**

Berdasarkan grafik pada Gambar 4.5 semua unit aktivitas optimum terjadi pada waktu fermentasi hari ke-5 untuk setiap variasi substrat PSH sebagai medium pertumbuhan jamur dan data hasil pengukuran dapat dilihat pada Lampiran 5.

Waktu fermentasi selama 7 hari merupakan waktu terlama untuk menghasilkan unit aktivitas optimum yang terjadi pada substrat PSTH dengan variasi N:C=1:2 pada penggunaan jamur T004 dan T051.

Menurut Buckle, et al. (1987), penambahan sumber karbon seperti glukosa dalam fermentasi dapat memacu pertumbuhan sel, namun apabila gula berlebihan dapat menghambat pertumbuhannya (Wasilah, 1997, p. 5). Hal ini menunjukkan bahwa penambahan sumber C (glukosa) dengan konsentrasi dua kali lebih tinggi dibandingkan sumber N (diammonium tartrat) pada substrat PSTH dapat menghambat pertumbuhan sel jamur. Namun, pada substrat PSH, penambahan sumber C dua kali konsentrasi sumber N menghasilkan unit aktivitas paling optimum diantara variasi N:C lainnya, yaitu sebesar 0,066 FPU/mL pada jamur T004.

Penurunan unit aktivitas mulai terjadi setelah hari ke-5 untuk semua substrat PSH dan PSTH pada berbagai variasi perbandingan N dan C, kecuali pada substrat PSTH dengan variasi perbandingan N:C=1:2. Menurut Hsieh et al. (1993), penurunan produksi selulase oleh *Trichoderma viride* dikarenakan kekosongan ketersediaan nutrisi dan akumulasi produk sampingan lain seperti protease dalam medium fermentasi (Malik et al., 2010, p.4245).

#### 4.4 Pengaruh Perbedaan Substrat Uji Aktivitas dan Waktu Inkubasi

Substrat yang digunakan untuk menguji unit aktivitas enzim selulase yang dihasilkan digunakan tiga substrat bahan selulosa yang berbeda, yaitu Avicel, CMC 1% (Carboxymethyl Cellulose), dan FPU (Filter Paper Unit).

Avicel merupakan selulosa mikrokristalin yang tidak larut dan digunakan untuk menguji aktivitas exoglucanase sehingga biasa disebut avicelase. Exoglucanase membagi ikatan alternatif dari gugus akhir non-pereduksi dari rantai selulosa menghasilkan selobiosa dan memungkinkan menghidrolisis selulosa kristalin seperti avicel atau serat kapas (Hoshino, 1997).

CMC merupakan bentuk selulosa yang larut dalam akuades dan digunakan untuk menguji *endoglucanase* sehingga sering disebut dengan CMCase. Menurut Wood (1985) *Endo  $\beta$ -glucanase* (1,4  $\beta$ -D-glucanhydrolase atau CMCase) menyerang secara acak pada ikatan glikosida internal dari rantai selulosa dan menghasilkan oligosakarida dan glukosa (Malik et al., 2010, p.4243).

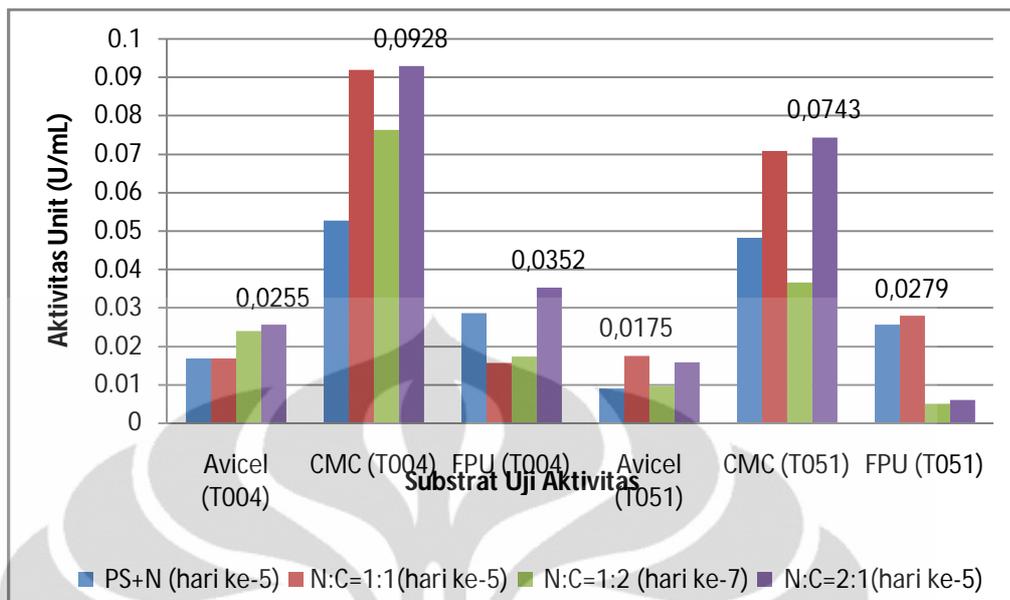
FPU (Filter Paper Unit) digunakan untuk sakarifikasi selulase dan lebih dikenal dengan sebutan FP-ase atau total aktivitas dari selulase (Ghose, 1987). Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai 1  $\mu$ mol glukosa yang terbentuk selama satu menit pada pH 5 dan temperatur 30<sup>0</sup> C.

Untuk mengetahui substrat yang menghasilkan unit aktivitas optimum, maka digunakan waktu fermentasi optimum pada substrat PSTH dan substrat PSH.

Tabel 4.2. Unit aktivitas optimum pada substrat PSTH

Substrat PSTH										
Substrat	Kontrol (C) (U/mL)					N:C=1:1 (U/mL)				
	hari	T004		T051		hari	T004		T051	
		30 menit	60 menit	30 menit	60 menit		30 menit	60 menit	30 menit	60 menit
Avicel	5	0,0167	0,0112	0,009	0,0049	5	0,0167	0,0049	0,0175	0,0052
CMC	5	0,0526	0,0526	0,0482	0,0356	5	0,0919	0,0364	0,0707	0,0333
FPU	5	0,0286	0,0149	0,0255	0,0173	5	0,0156	0,0126	0,0279	0,0091
Substrat	N:C=1:2 (U/mL)					N:C=2:1 (U/mL)				
	hari	T004		T051		hari	T004		T051	
		30 menit	60 menit	30 menit	60 menit		30 menit	60 menit	30 menit	60 menit
Avicel	7	0,0239	0,0138	0,0096	0,0056	5	0,0255	0,0135	0,0157	0,0082
CMC	7	0,0763	0,0319	0,0366	0,0166	5	0,0928	0,0605	0,0743	0,0251
FPU	7	0,0172	0,011	0,005	0,0079	5	0,0352	0,0194	0,0059	0,008

Berdasarkan Tabel 4.2 dan Tabel 4.3 unit aktivitas optimum pada sebagian besar variasi substrat PSTH ditunjukkan pada waktu inkubasi 30 menit, maka grafik pada Gambar 4.6 dan Gambar 4.7 hanya akan menunjukkan unit aktivitas pada waktu inkubasi 30 menit, untuk melihat perbedaan yang terjadi jika menggunakan substrat uji aktivitas yang berbeda.



**Gambar 4.6. Grafik unit aktivitas optimum substrat PSTH, waktu inkubasi 30 menit**

Grafik pada Gambar 4.6 menunjukkan bahwa unit aktivitas paling optimum untuk substrat PSTH pada jamur T004 ditunjukkan pada variasi substrat N:C=2:1 sebesar 0,0928 U/mL dengan substrat uji aktivitas adalah CMC 1% dan pada jamur T051, unit aktivitas optimum ditunjukkan pada variasi substrat N:C=2:1 sebesar 0,0743 U/mL dengan substrat uji aktivitas adalah CMC 1%.

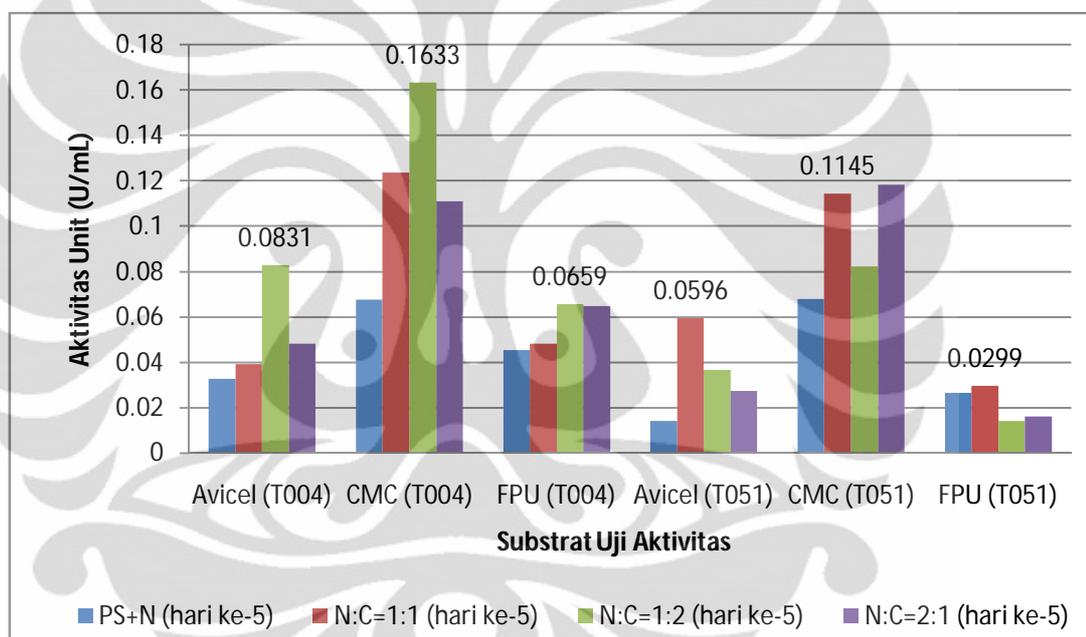
Pada substrat uji aktivitas avicel, unit aktivitas optimum untuk substrat fermentasi pelepah sawit serbuk pada T004 adalah pada penambahan N:C=2:1 sebesar 0,0255 U/mL dan T051 pada penambahan N:C=1:1 sebesar 0,0175 U/mL.

Unit aktivitas optimum pada substrat uji FPU memberikan nilai 0,0352 U/mL untuk jamur T004 dengan penambahan N:C=2:1, sedangkan pada jamur T051 aktivitas optimum terjadi pada penambahan N:C=1:1 sebesar 0,0279 U/mL.

**Tabel 4.3. Aktivitas optimum pada substrat PSH**

Substrat PSH										
Substrat	Kontrol (PS+N) (IU/ml)					PS+N+C (N:C=1:1) (IU/ml)				
	hari	T004		T051		hari	T004		T051	
		30 menit	60 menit	30 menit	60 menit		30 menit	60 menit	30 menit	60 menit
Avicel	5	0,0329	0,0171	0,0143	0,0073	5	0,0395	0,0105	0,0596	0,037

CMC	5	0,0677	0,0458	0,0682	0,0387	5	0,1238	0,0607	0,1145	0,0626
FPU	5	0,0457	0,0235	0,0266	0,0158	5	0,0483	0,0278	0,0299	0,0196
Substrat	PS+N+C (N:C=1:2) (IU/ml)					PS+N+C (N:C=2:1) (IU/ml)				
	hari	T004		T051		hari	T004		T051	
		30 menit	60 menit	30 menit	60 menit		30 menit	60 menit	30 menit	60 menit
Avicel	5	0,0831	0,0426	0,0369	0,0235	5	0,0485	0,022	0,0275	0,0155
CMC	5	0,1633	0,1006	0,0824	0,0644	5	0,1111	0,0487	0,1184	0,0738
FPU	5	0,0659	0,0342	0,0143	0,0114	5	0,0651	0,0371	0,0164	0,0093



**Gambar 4.7. Grafik unit aktivitas optimum pada substrat PSH, waktu inkubasi 30 menit**

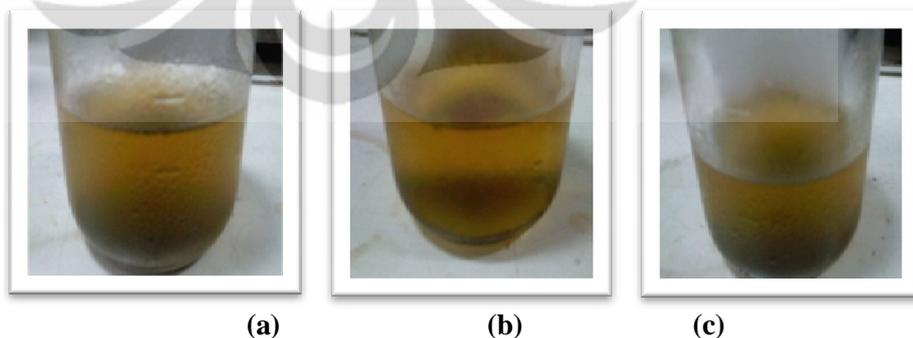
Menurut Gambar 4.7 substrat PSH yang digunakan sebagai medium pertumbuhan jamur T004, unit aktivitas paling optimum ditunjukkan pada variasi substrat N:C=1:2 sebesar 0,1633 U/mL, sedangkan untuk jamur T051 unit aktivitas paling optimum ditunjukkan pada variasi substrat N:C=1:1 sebesar 0,1145 U/mL, masing-masing terjadi pada substrat uji aktivitas CMC 1%. Pada Avicel unit aktivitas optimum pada T004 terjadi pada variasi substrat N:C=1:2 sebesar 0,0831 U/mL dan pada T051 sebesar 0,0596 U/mL pada variasi substrat N:C=1:1.

Substrat PSH dengan variasi N:C=1:2 yang digunakan sebagai medium pertumbuhan jamur T004 memberikan unit aktivitas paling optimum sebesar 0,0659 U/mL untuk substrat uji FPU dan 0,029 U/mL pada jamur T051 untuk substrat uji aktivitas yang sama.

Berdasarkan Gambar 4.6 dan Gambar 4.7 menunjukkan bahwa substrat uji aktivitas CMC 1% memberikan nilai unit aktivitas paling optimum. Pada percobaan ini juga menunjukkan bahwa penambahan sumber N dengan konsentrasi dua kali lebih tinggi pada substrat PSTH dapat meningkatkan aktivitas selulase yang dihasilkan. Sedangkan pada substrat PSH dengan variasi N:C=2:1 filtrat menjadi berwarna lebih kuning dan mengkilap daripada substrat variasi lainnya dan tidak menghasilkan aktivitas selulase yang paling optimum, seperti yang terlihat pada Gambar 4.8 dan Gambar 4.9.



**Gambar 4.8. Filtrat enzim kasar T004 N:C=2:1 pada substrat PSH**



**Gambar 4.9. Filtrat enzim kasar (a) PS+N; (b) N:C=1:1; (c) N:C=1:2 pada substrat PSH**

Menurut Mangat dan Mandahr (1998), menunjukkan bahwa sumber nitrogen dapat berpengaruh baik terhadap biosintesis selulase, oleh sebab itu penambahannya harus dengan konsentrasi yang tepat. Konsentrasi sumber nitrogen yang terlalu tinggi dapat menyebabkan vitrifikasi (medium terlihat kuning dan mengkilap) karena itu biasanya tidak stabil untuk mikroorganisme (Malik et al., 2010, p.4247).

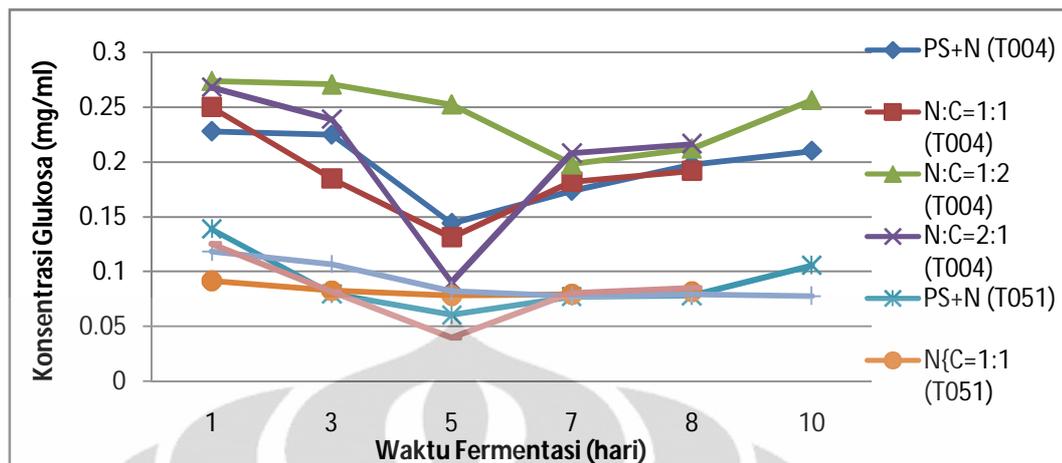
#### 4.5 Konsentrasi Glukosa Sisa Fermentasi

Konsentrasi Glukosa yang ditentukan dalam penelitian ini adalah konsentrasi glukosa sebelum dilakukan uji aktivitas atau pada 0 menit.

Konsentrasi gula pereduksi ditentukan menggunakan metode Samogyi Nelson. Gula pereduksi bila dipanaskan dengan larutan tembaga tartrat yang bersifat basa akan menghasilkan tembaga oksida ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ). Tembaga oksida ini yang akan bereaksi dengan larutan arsenomolibdat menghasilkan warna biru molybdenum.

**Tabel 4.4. Konsentrasi glukosa sisa fermentasi pada substrat PSTH**

Substrat PSTH Konsentrasi Glukosa (mg/mL)								
hari fermentasi	PS+N		N:C=1:1		N:C=1:2		N:C=2:1	
	T004	T051	T004	T051	T004	T051	T004	T051
1	0,2277	0,1388	0,2499	0,0916	0,2738	0,1183	0,2681	0,1252
3	0,2246	0,0797	0,1846	0,0825	0,2707	0,1068	0,239	0,0815
5	0,1440	0,0606	0,1313	0,0781	0,2525	0,0825	0,0906	0,0396
7	0,1735	0,0771	0,1819	0,0794	0,1981	0,0777	0,2079	0,0803
8	0,1975	0,0781	0,1917	0,0818	0,2123	0,0795	0,2166	0,0853
10	0,2098	0,1057	-	-	0,2567	0,0777	-	-



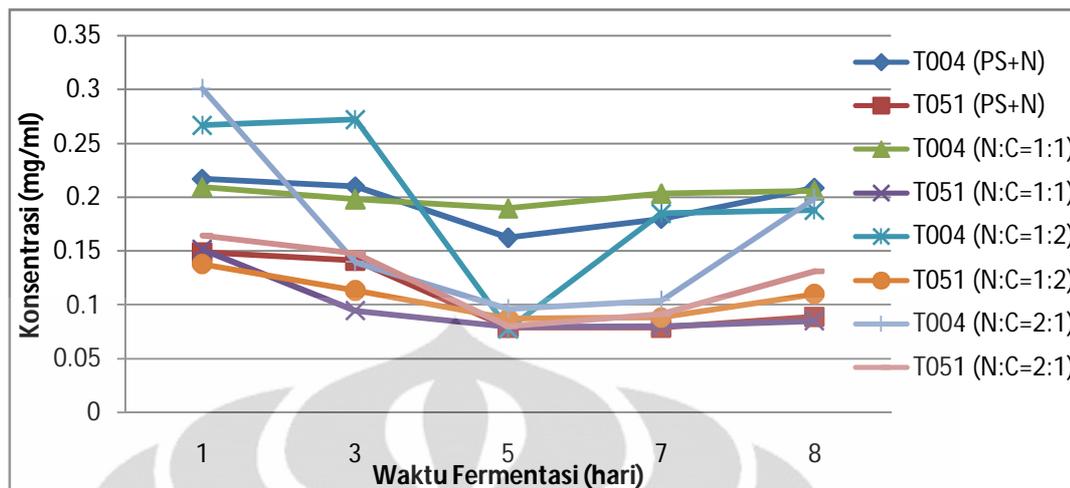
**Gambar 4.10. Grafik kadar glukosa sisa fermentasi, substrat PSH**

Tren konsentrasi glukosa sisa fermentasi yang digambarkan dalam grafik pada Gambar 4.10 untuk setiap substrat PSH menunjukkan suatu penurunan kadar glukosa hingga tercapai titik minimum, namun mulai meningkat kembali pada akhir waktu fermentasi. Titik minimum yang tercapai sesuai dengan waktu fermentasi yang dibutuhkan untuk mengasilkan aktivitas optimum dari enzim selulase.

Penurunan konsentrasi glukosa secara tajam terjadi pada substrat PSH dengan variasi N:C=2:1. Hasil ini menunjukkan hubungan dengan unit aktivitas optimum yang terjadi pada penambahan sumber nitrogen dua kali lebih tinggi dibandingkan sumber karbon. Sedangkan konsentrasi glukosa sisa fermentasi pada substrat PSH ditunjukkan pada Tabel 4.5.

**Tabel 4.5. Konsentrasi glukosa sisa fermentasi pada substrat PSH**

Substrat PSH								
Konsentrasi Glukosa (mg/mL)								
Waktu fermentasi	PS+N+C (N:C=1:1)		PS+N+C (N:C=1:1)		PS+N+C (N:C=1:2)		PS+N+C (N:C=2:1)	
	T004	T051	T004	T051	T004	T051	T004	T051
1	0,217	0,1488	0,2097	0,1515	0,2668	0,1379	0,3012	0,1646
3	0,2102	0,1409	0,1983	0,0944	0,2723	0,1135	0,1397	0,1477
5	0,1626	0,0789	0,1898	0,0798	0,0779	0,0874	0,0964	0,0801
7	0,1799	0,0791	0,2034	0,0805	0,1852	0,0883	0,1041	0,0913
8	0,2089	0,0888	0,2063	0,0854	0,188	0,1102	0,1993	0,1311



**Gambar 4.11. Grafik konsentrasi glukosa sisa fermentasi pada substrat PSH**

Seperti yang terjadi pada Gambar 4.10, penurunan konsentrasi glukosa juga terjadi pada substrat PSH seperti yang diperlihatkan pada Gambar 4.11, penurunan terjadi hingga batas minimum dan mulai meningkat kembali setelahnya.

Penurunan konsentrasi glukosa sisa fermentasi yang paling curam ditunjukkan pada substrat dengan variasi N:C=1:2. Hal ini sama dengan yang terjadi pada substrat PSH dan menunjukkan unit aktivitas yang paling optimum.

Penurunan konsentrasi glukosa sisa fermentasi terjadi karena mikroorganisme membutuhkan glukosa untuk metabolisme dan pertumbuhan selnya. Sedangkan kenaikan konsentrasi glukosa disebabkan karena mikroorganisme mengalami pertumbuhan yang diperlambat dan akan memasuki fase kematian (*death phase*), laju pertumbuhan akan menurun akibat semakin berkurangnya substrat dan nutrisi dan adanya akumulasi zat metabolit yang bersifat inhibitor (Wasilah, 1997, p. 10).

#### 4.6 Kadar Protein

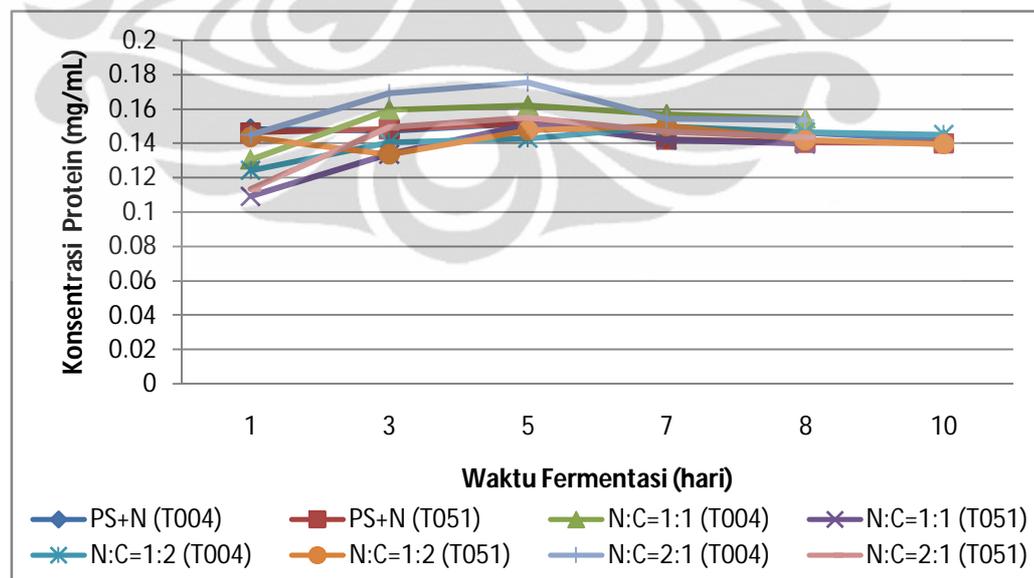
Kadar protein ditentukan dengan menggunakan metode Lowry. Metode Lowry merupakan pengembangan dari metode biuret. Metode ini melibatkan dua reaksi. Awalnya, kompleks Cu (II)-protein akan terbentuk, yang dalam keadaan

basa Cu (II) akan tereduksi menjadi Cu (I). kemudian ion  $\text{Cu}^+$  akan mereduksi reagen Folin-ciocalteu, kompleks phosphomolibdat-phosphotungstat, menghasilkan heteropolymolybdenum blue akibat reaksi oksidasi gugus aromatik (rantai samping asam amino) terkatalis Cu. Kekuatan warna biru yang dihasilkan terutama bergantung pada kandungan residu triptofan dan tirosinnya.

Konsentrasi protein yang dihasilkan selama fermentasi pada substrat PSTH diperlihatkan pada Tabel 4.6.

**Tabel 4.6. Kadar protein pada substrat PSTH**

Substrat PSTH								
Kadar Protein (mg/mL)								
hari	PS+N		N:C=1:1		N:C=1:2		N:C=2:1	
	T004	T051	T004	T051	T004	T051	T004	T051
1	0,1483	0,1464	0,1306	0,1092	0,1243	0,1435	0,1449	0,1135
3	0,1471	0,1481	0,1594	0,1337	0,1404	0,1335	0,169	0,1492
5	0,1516	0,1515	0,162	0,1507	0,1429	0,1476	0,1753	0,1548
7	0,1471	0,1423	0,1567	0,1417	0,1498	0,15	0,1541	0,1467
8	0,1461	0,1406	0,1544	0,1397	0,1463	0,1418	0,1535	0,1435
10	0,1421	0,1401	-	-	0,145	0,1395	-	-



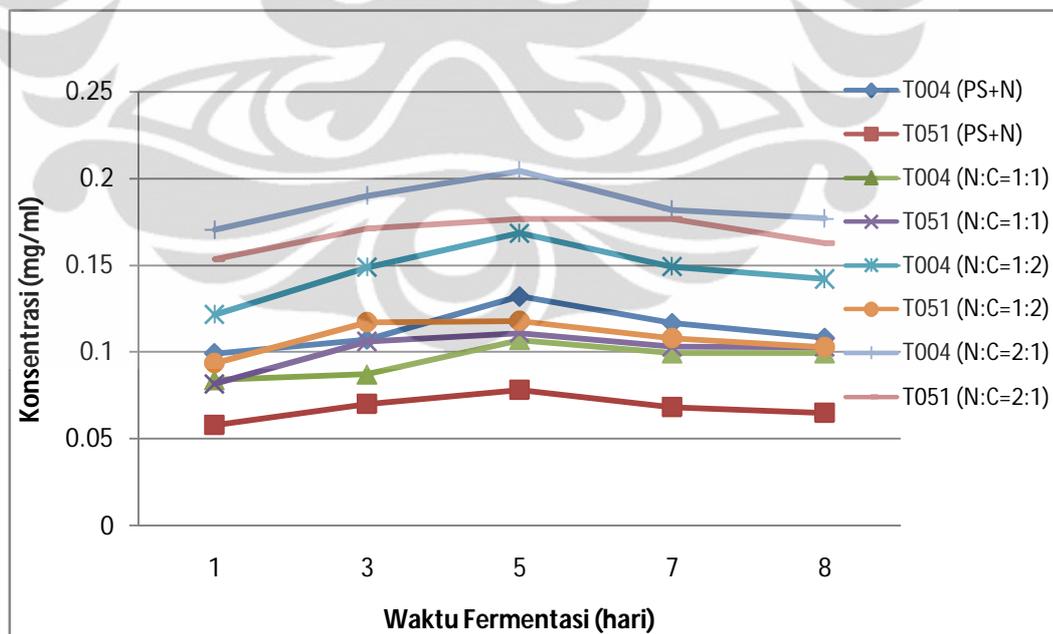
**Gambar 4.12. Grafik kadar protein pada substrat PSTH**

Tren yang dihasilkan dari grafik pada Gambar 4.12 menunjukkan bahwa terjadi peningkatan konsentrasi protein pada waktu fermentasi optimum dan kembali mengalami penurunan setelah waktu optimum.

Konsentrasi protein tertinggi pada substrat PSTH untuk jamur T004 sebesar 0,1751 mg/mL pada substrat N:C=2:1 waktu fermentasi hari ke-5. Untuk T051 konsentrasi protein tertinggi sebesar 0,1548 mg/mL pada substrat N:C=2:1 waktu fermentasi hari ke-5.

**Tabel 4.7. Kadar protein pada substrat PSH**

Kadar Protein (mg/mL)								
hari	PS+N		N:C=1:1		N:C=1:2		N:C=2:1	
	T004	T051	T004	T051	T004	T051	T004	T051
1	0,0993	0,0581	0,084	0,0818	0,1217	0,0938	0,1705	0,1535
3	0,1072	0,0703	0,0872	0,106	0,1489	0,1173	0,1901	0,1712
5	0,1322	0,0782	0,107	0,1109	0,1686	0,118	0,2044	0,1768
7	0,1167	0,0682	0,0995	0,1031	0,1493	0,108	0,1821	0,1768
8	0,1083	0,0649	0,0994	0,1029	0,1422	0,1029	0,177	0,1629



**Gambar 4.13. Grafik kadar protein pada substrat PSH**

Sedangkan pada substrat PSH untuk jamur T004 sebesar 0,0817 mg/mL pada substrat N:C=2:1 waktu fermentasi hari ke-5 dan T051 konsentrasi protein tertinggi terjadi pada substrat N:C=2:1 pada hari ke-5 sebesar 0,0707 mg/mL, seperti yang ditampilkan pada Gambar 4.13.

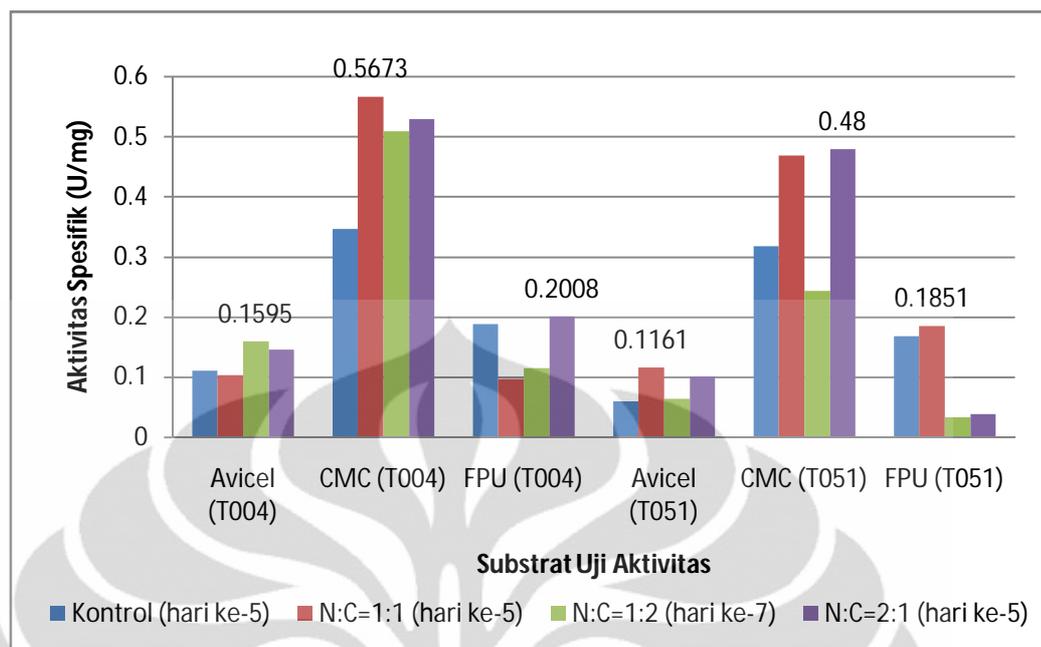
#### 4.6.1 Aktivitas Spesifik

Dengan menggunakan konsentrasi protein yang dihasilkan dapat ditentukan juga aktivitas spesifik dari enzim selulase yang dihasilkan. Aktivitas spesifik ini menunjukkan kadar kemurnian suatu enzim, semakin besar nilai yang dihasilkan, maka semakin besar pula kemurnian dari suatu enzim.

Konsentrasi protein yang digunakan untuk perhitungan aktivitas spesifik berdasarkan kadar protein pada substrat dengan kondisi yang menyebabkan unit aktivitas optimum pada masing-masing variasi. Aktivitas spesifik untuk substrat PSTH ditunjukkan pada Tabel 4.8.

**Tabel 4.8. Aktivitas spesifik pada substrat PSTH**

Substrat PSTH										
Substrat	hari	Kontrol (C) (U/mg)				hari	N:C=1:1 (U/mg)			
		T004		T051			T004		T051	
		30 menit	60 menit	30 menit	60 menit		30 menit	60 menit	30 menit	60 menit
Avicel	5	0,1102	0,0739	0,0594	0,0323	5	0,1031	0,0302	0,1161	0,0345
CMC	5	0,347	0,347	0,3182	0,235	5	0,5673	0,2247	0,4691	0,221
FPU	5	0,1887	0,0983	0,6086	0,1142	5	0,0963	0,0778	0,1851	0,0604
Substrat	hari	N:C=1:2 (U/mg)				hari	N:C=2:1 (U/mg)			
		T004		T051			T004		T051	
		30 menit	60 menit	30 menit	60 menit		30 menit	60 menit	30 menit	60 menit
Avicel	7	0,1595	0,0922	0,064	0,0373	5	0,1455	0,077	0,1014	0,053
CMC	7	0,5093	0,213	0,244	0,1107	5	0,5294	0,3451	0,48	0,1621
FPU	7	0,1148	0,0734	0,0333	0,0527	5	0,2008	0,1107	0,0381	0,0517



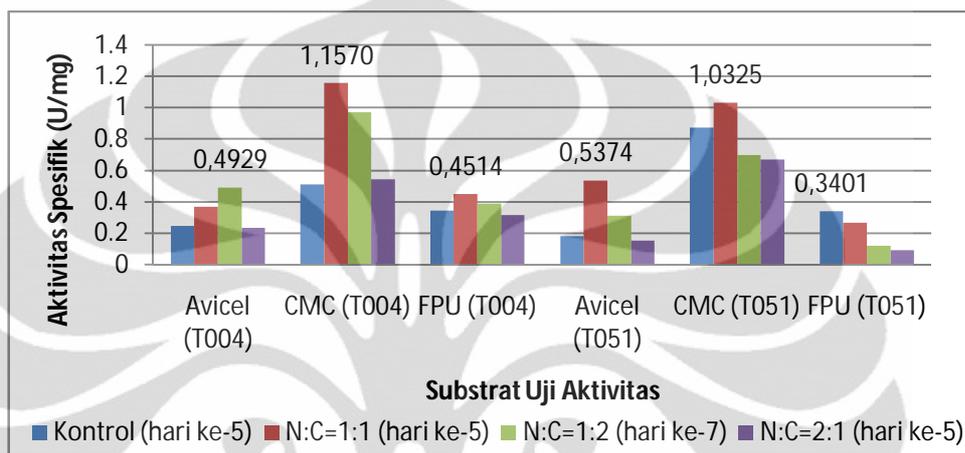
**Gambar 4.14. Grafik aktivitas spesifik pada substrat PSTH, waktu inkubasi 30 menit**

Aktivitas spesifik paling optimum pada substrat PSTH sebagai medium pertumbuhan jamur T004 seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.14 terjadi pada variasi substrat N:C=1:1 sebesar 0,5673 U/mg pada substrat uji aktivitas CMC 1% dan pada jamur T051 terjadi pada variasi substrat N:C=2:1 sebesar 0,48 U/mg pada substrat uji aktivitas CMC 1%. Unit aktivitas optimum terjadi pada N:C=2:1 sebesar 0,0928 U/mL dengan substrat uji aktivitas adalah CMC 1%. Sedangkan pada jamur T051, unit aktivitas optimum ditunjukkan pada substrat fermentasi N:C=2:1 sebesar 0.0743 U/mL dengan substrat uji aktivitas adalah CMC 1%.

**Tabel 4.9. Aktivitas spesifik pada substrat PSH**

Substrat PSH										
Subs trat	ha ri	Kontrol (PS+N) (IU/ml)				PS+N+C (N:C=1:1) (IU/ml)				
		T004		T051		ha ri	T004		T051	
		30 menit	60 menit	30 menit	60 menit		30 menit	60 menit	30 menit	60 menit
Avicel	5	0,2489	0,1293	0,1829	0,0934	5	0,3692	0,0981	0,5374	0,3336
CMC	5	0,5121	0,3464	0,8721	0,4949	5	1,157	0,5673	1,0325	0,5645
FPU	5	0,3457	0,1778	0,3402	0,202	5	0,4514	0,2598	0,2696	0,1767
Subs		PS+N+C (N:C=1:2) (IU/ml)				PS+N+C (N:C=2:1) (IU/ml)				

trat	ha ri	T004		T051		ha ri	T004		T051	
		30 menit	60 menit	30 menit	60 menit		30 menit	60 menit	30 menit	60 menit
Avicel	5	0,493	0,2527	0,3127	0,1992	5	0,2373	0,1076	0,1555	0,0877
CMC	5	0,969	0,5967	0,6983	0,5458	5	0,5435	0,2383	0,6697	0,4174
FPU	5	0,391	0,2028	0,1212	0,0966	5	0,3185	0,1815	0,0928	0,0526



**Gambar 4.15. Grafik aktivitas spesifik pada substrat PSH, waktu inkubasi 30 menit.**

Pada substrat PSH aktivitas spesifik paling optimum yang ditampilkan pada Gambar 4.15 untuk jamur T004 terjadi pada variasi substrat N:C=1:1 sebesar 1,157 U/mg pada substrat uji aktivitas CMC 1% dan pada jamur T051 sebesar 1,0325 U/mg pada variasi substrat N:C=1:1 pada substrat uji aktivitas CMC 1%. Sedangkan pada substrat PSH sebagai medium pertumbuhan jamur T004 unit aktivitas optimum ditunjukkan pada variasi substrat N:C=1:2 sebesar 0,1633 U/mL, sedangkan untuk jamur T051 unit aktivitas paling optimum ditunjukkan pada variasi substrat N:C=1:1 sebesar 0,1145 U/mL, masing-masing diuji menggunakan substrat uji aktivitas CMC 1%.

Berdasarkan hasil tersebut menunjukkan bahwa apabila unit aktivitas optimum tidak menunjukkan bahwa aktivitas spesifiknya juga akan optimum, karena unit aktivitas merupakan suatu ukuran jumlah enzim, sedangkan aktivitas spesifik merupakan ukuran kemurnian enzim dalam campuran protein.

## BAB V PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka diperoleh kesimpulan sebagai berikut:

1. *Trichoderma sp.* strain T004 mampu meningkatkan aktivitas hidrolisis selulosa sebesar 59,79% dengan menggunakan substrat pelepah sawit yang didelignifikasi (PSH) dibandingkan dengan substrat pelepah sawit tanpa delignifikasi (PSTH), sedangkan pada strain T051 mampu meningkatkan aktivitas hidrolisis selulosa sebesar 47.06%.
2. Aktivitas katalitik selulase tertinggi yang dihasilkan oleh jamur *Trichoderma sp.* strain T004 pada substrat pelepah sawit yang didelignifikasi (PSH) sebesar 0,1633 U/mL, sedangkan pada strain T051 sebesar 0,1145 U/mL.
3. Kondisi optimum untuk mendapatkan unit aktivitas tertinggi ditunjukkan pada substrat pelepah sawit yang didelignifikasi dengan penambahan sumber N dan sumber C pada perbandingan 1:2 untuk strain T004 dan 1:1 untuk strain T051, waktu fermentasi 5 hari. Pengujian unit aktivitas ini diperoleh dengan menggunakan substrat uji CMC 1% dengan waktu inkubasi selama 30 menit.

### 5.2 Saran

1. Untuk penelitian selanjutnya, perlu dilakukan delignifikasi pada substrat pelepah sawit dengan metode fisikokimia dan *pretreatment* proses biologi yaitu dengan menggunakan mikroorganisme.
2. Untuk penelitian selanjutnya, perlu digunakan variasi sumber karbon selain glukosa, seperti maltosa, sukrosa atau karbohidrat dan variasi sumber nitrogen lain, seperti urea, NH<sub>4</sub>Cl, dan (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
3. Untuk penelitian selanjutnya, perlu dilakukan isolasi, dan karakterisasi selulase yang dihasilkan.

### **DAFTAR REFERENSI**

- Alawiyah, Syarifah. 2011. *Screening of Novel Enzymes for Effective Saccharification of Alkali-Treated Rice Straw*, Thesis. Jepang. School of Agriculture Hokaido University.
- Al-Taweil, Hayyan Ismaeil. (2009). *Optimizing of Trichoderma viride Cultivation in Submerged State Fermentation*. American Journal of Applied Sciences, 1277-1281.
- Antagonisme Jamur Trichoderma sp Dalam Mengendalikan Jamur Patogen Phytophthora infestans Penyebab Penyakit Umbi Tanaman Kentang. Desember 13, 2010. [www.Mahasiswa Rantau.htm](http://www.Mahasiswa Rantau.htm).
- Atcha, Boonmee. (2009). *Screening of Rice Straw Degrading Microorganisms and Their Cellulase Activities*. Thailand. Khon Kaen University
- Brigham, J.S., et al. 1996. Hemicellulases: diversity and applications. In: Wyman, C.E (ed). *Handbook on Bioethanol: Production and Utilization*. Taylor & Francis, Washington, DC, pp. 119-141.
- Brown, R. 2003. *Biorenewable Resources: Engineering New Products from Agriculture*. Iowa State Press: Ames, IA.
- Carlile, M.J. & S.C. Watkinson. 1994. *The fungi*. Academic Press Ltd., London: xiii + 482 hlm.
- Cellulase. Januari 21, 2011. <http://en.wikipedia.org/wiki/Cellulase>
- Cellulase and Dairy Animal Feeding. Juli 14, 2010. <http://scialert.net/abstract/?doi=biotech.2010.238.256>
- Fan, L.T., Gharpuray, M.M., and Lee, Y.-H. 1987. *Cellulose hydrolysis*. Biotechnology Monographs, Springer-Verlag: New York.
- Ghose, T.K. 1987. *Measurement of Cellulase activities*. India: Biochemical Engineering Research Centre, Indian Institute of Technology. New Delhi
- Grohmann, K., Torget, R., and Himmel, M. 1985. Optimization of dilute acid pretreatment of biomass. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 15, 59-80.
- Hamisan, A.H. (2009). *Delignification of Oil Palm Fruit Bunch using Chemical and Microbial Pretreatment* Metode. Malaysia. Universiti Putra Malaysia.

- Han, Dong Pyu, et al. (1987). Isolation and Characterization of a Cellulase from *Cellulomonas* sp. ATCC 21399. Korea. Sogang University.
- Hoshino, et al. (1997). *Synergistic action of exo-type cellulases in the hydrolysis of cellulose with different crystallinities*. *J. Ferment. Bioeng.*, 84:300-306.
- Hudoyono, Sumi. 2004. *Hand Out Biokimia*. Depok: Departemen Kimia FMIPA Universitas Indonesia.
- Kapang dan Kesehatan. Juli 10, 2008. <http://www.forumsains.com/artikel/kapang-dan-kesehatan/>.
- Klass, D.L. 1998. *Biomass for Renewable Energy, Fuels, and Chemicals*. Academic Press: New York.
- Law, Kwei-Nam. (2007). *Strand of Oil Palm Empty-Fruit-Bunch (OPEFB)*. Malaysia. University Sains Malaysia
- Malherb, S. and T.E. Cloete, 2003. Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications: A review. *Environ. Sci. Biotechnol.*, 1: 105-114
- Malik, Shazia Kanwal. (2010). *Optimization of Process Parameters for The Biosynthesis of Cellulases by Trichoderma Viride*. *Pak. J. Bot.*, 42(6): 4243-4251.
- McMillan, J.D. 1994. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: Himmel, M.E., Baker, J.O., Overend, R.P. (Eds.), *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production*. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 292-324
- Membangun Industri Bioetanol Nasional Sebagai Pasokan Energi Berkelanjutan dalam Menghadapi Krisis Energi Global. Agustus 18, 2007. <http://mahasiswanegarawan.wordpress.com>
- Nasab, Moosavi, et al. (2007). *Cellulase Production by Trichoderma reesei using Sugar Beet Pulp*. Iran. Shiraz University.
- Nelson, L.David, et al. (2005). *Principle of Biochemistry, 4<sup>th</sup> ed*. New York: W.H. Freeman and Company.
- Okada, Gentaro. (1967). *Cellulase Components from Trichoderma viride*. Jepang. Kyoiku University.
- Philippidis, G. 1996. Cellulose bioconversion technology. In: Wyman, C.E (ed). *Handbook on Bioethanol: Production and Utilization*. Taylor & Francis, Washington, DC, pp. 253-285.

Philippidis, G. 1994. Cellulase production technology. In: Himmel, M.E., Baker, J.O., Overend, R.P. (Eds.), *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production*. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 292-324.

Plant Cell Wall. <http://www.ouline.com>

Potential Technological and Economic Utilization of the OASIS by products. Juli, 2008. [www.oasisnakhoil.htm](http://www.oasisnakhoil.htm)

Roos, Wernfer, et al. (1983). *Relationships Between Proton Extrusion and Fluxes of Ammonium Ions and Organic Acids in Penicillium cyclopium*. *Journal of General Microbiology* (1984), 130, 1007-1014.

Setiasih, Siswati. 2005. *Hand Out Bioteknologi*. Depok: Departemen Kimia FMIPA Universitas Indonesia.

Silverstein, Anne Rebecca. (2004). A comparison of Chemical Pretreatment Methods for Converting Cotton Stalks to Ethanol. USA. North Carolina University.

Subdit Pengelolaan Lingkungan Direktorat Pengolahan Hasil Pertanian. (2006). *Pedoman Pengelolaan Limbah Industri kelapa Sawit*. Jakarta: Departemen Pertanian Republik Indonesia.

Sudiyani, et al. (2010). *Alkali Pretreatment of Empty Fruit Bunch of Oil Palm for Ethanol*. *Jurnal Menara Perkebunan* 2010.

Sun, Y. 2002. Enzymatic Hydrolysis of Rye Straw and Bermudagrass for Ethanol Production, Ph.D. thesis: NC State University, Raleigh, NC.

Tarkow, H., and Feist, W.C. 1969. A mechanism for improving the digestibility of lignocellulosic materials with dilute alkali and liquid NH<sub>3</sub>. *Advance Chemistry Series 95*. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 197-218.

Teodor, Vintila, et al. (2006). *Production of cellulase by submerged and solid-state cultures and yeasts selection for conversion of lignocellulose to ethanol*. pp. 4275-4281.

Teodor, Vintila, et al. (2010). The Effect of Bioprocess Parameters on Cellulase Production with *Trichoderma viride* CMIT35. Faculty of Animal Science and Biotechnology.

Thenawijaya, Maggy. (1990). *Lehninger Dasar-Dasar Biokimia Jilid 1*. Jakarta: Erlangga.

*Trichoderma sp.* Mei 22, 2011. <http://Mycology Online Trichoderma sp.htm>

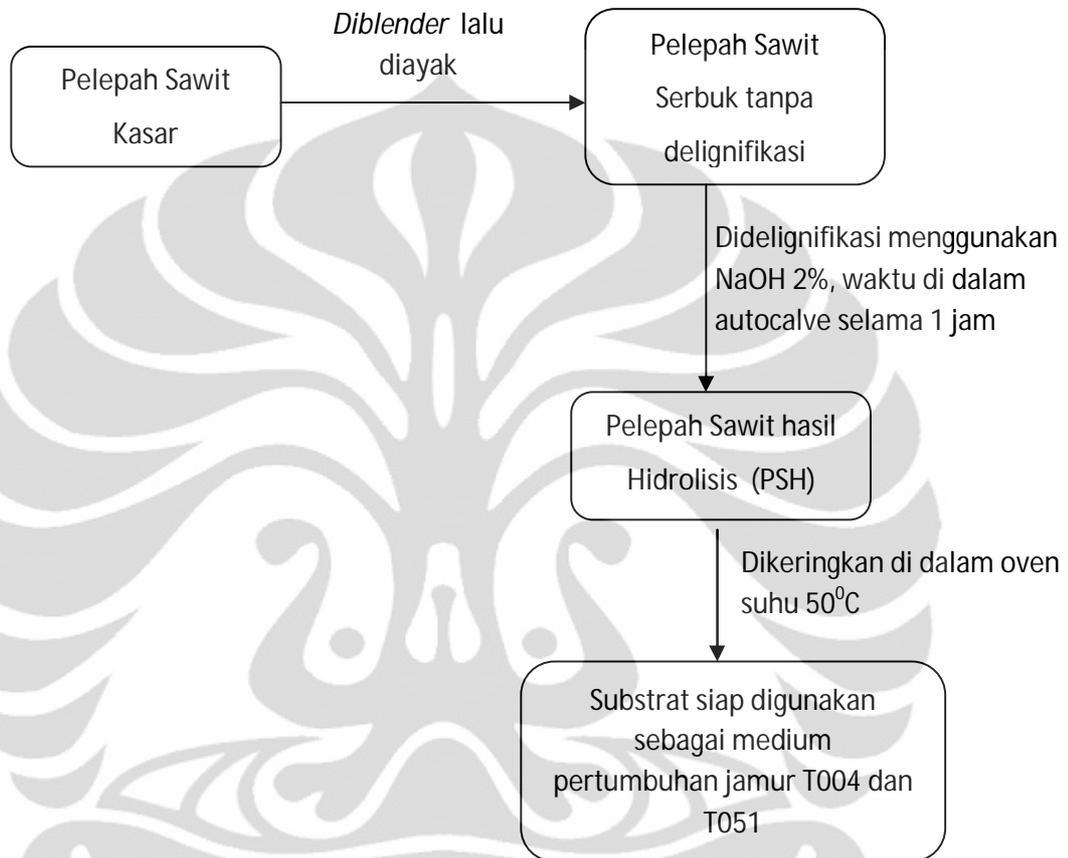
*Trichoderma viride* Sebagai Salah Satu Jamur yang Menguntungkan. Desember 27, 2010. [http://en.wikipedia.org/wiki/Trichoderma\\_viride](http://en.wikipedia.org/wiki/Trichoderma_viride).

- Varga, et al. 2002. Chemical pretreatments of corn stover for enhancing enzymatic digestibility. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 98-100, 73-87.
- Wasilah. (1997). *Produksi Enzim Xilanase Menggunakan Jamur Pelapuk Putih*. Serpong: Institut Teknologi Indonesia.
- Worthington, C.E. (1988) *Worthington Enzyme Manual* pp. 76-79. Worthington Biochemical Corporation, Freehold. NJ



Lampiran 1  
Bagan Kerja

I. Persiapan Substrat Medium Produksi



## II. Peremajaan Jamur *Trichoderma* sp.



Biakan murni T004

Biakan murni T051

Inokulasi 1 ose biakan murni



Inkubasi pada suhu 30°C dalam inkubator diam, selama 3 hari



## III. Pembuatan Starter



Dicetak menggunakan *cork borer* diameter 1 cm

Hasil cetakan

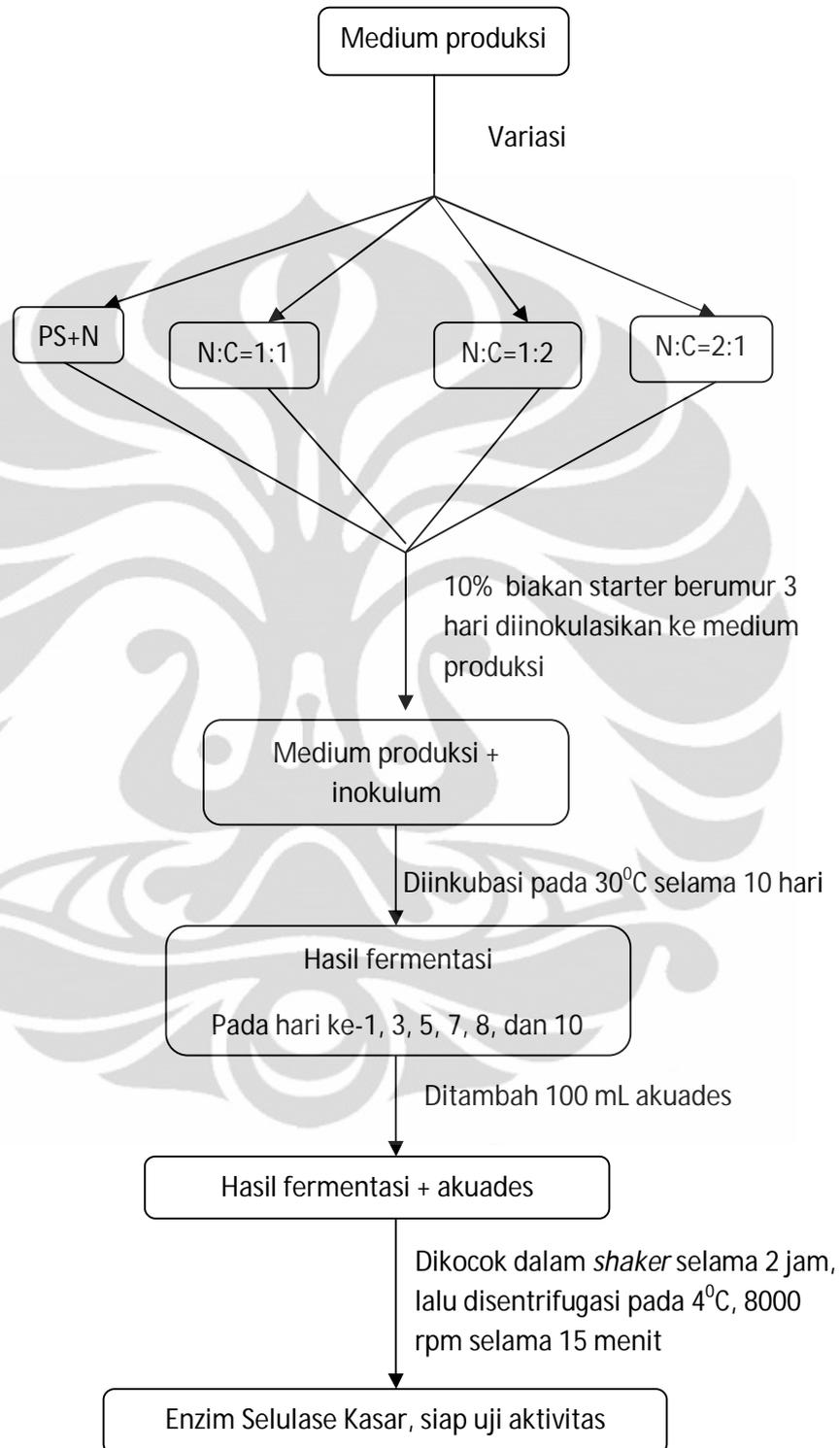
Diinokulasi 3 butir ke medium starter

Medium starter (dedak) + inokulum

Inkubasi pada 30°C selama 3 hari

Hasil aktivasi jamur T004 dan T051 (starter berumur 3 hari)

#### IV. Produksi Enzim Selulase Kasar



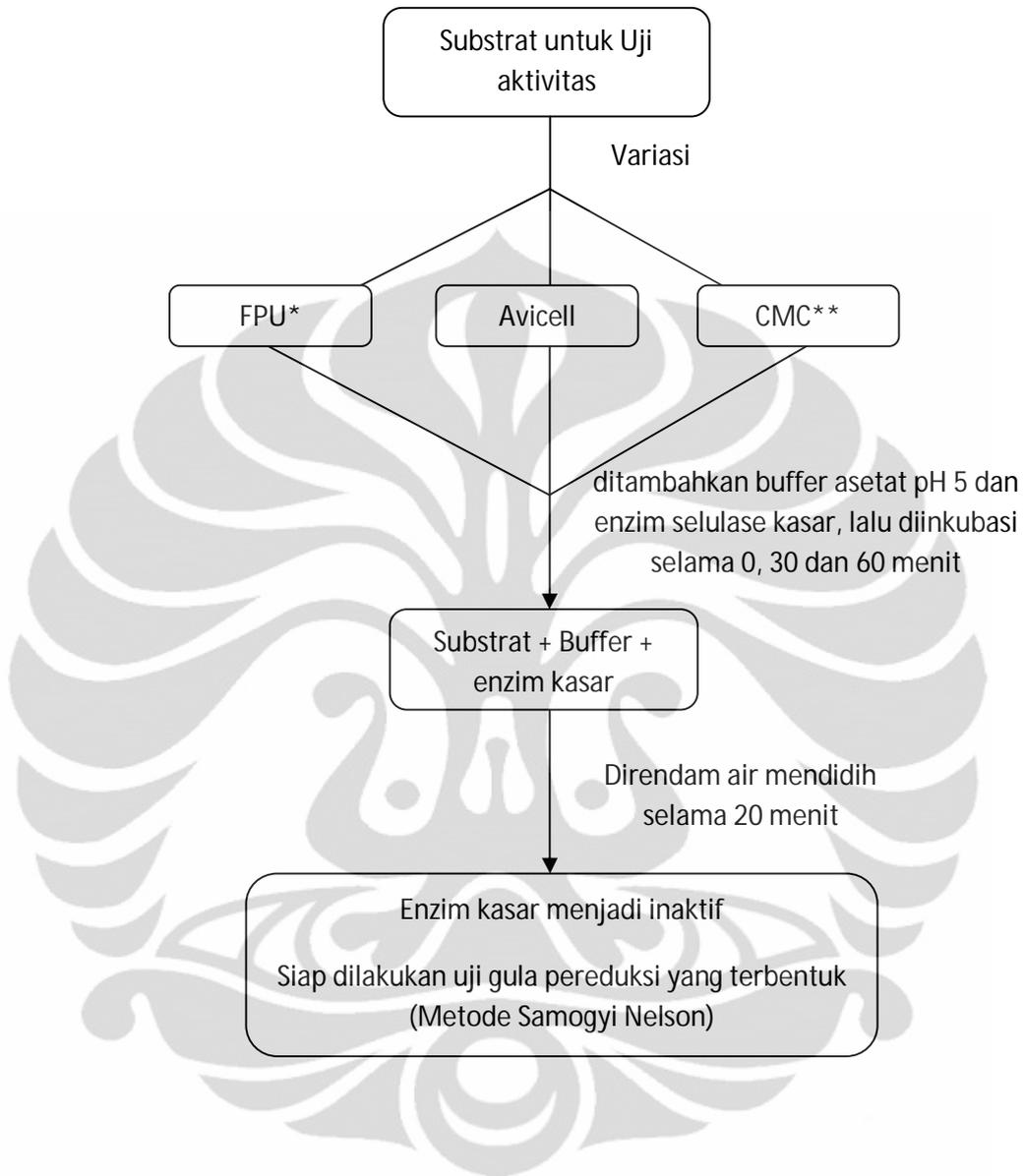
Keterangan:

PS = Pelepah Sawit

N = Sumber Nitrogen

C = Sumber C (glukosa)

## V. Uji Aktivitas Enzim Selulase Kasar

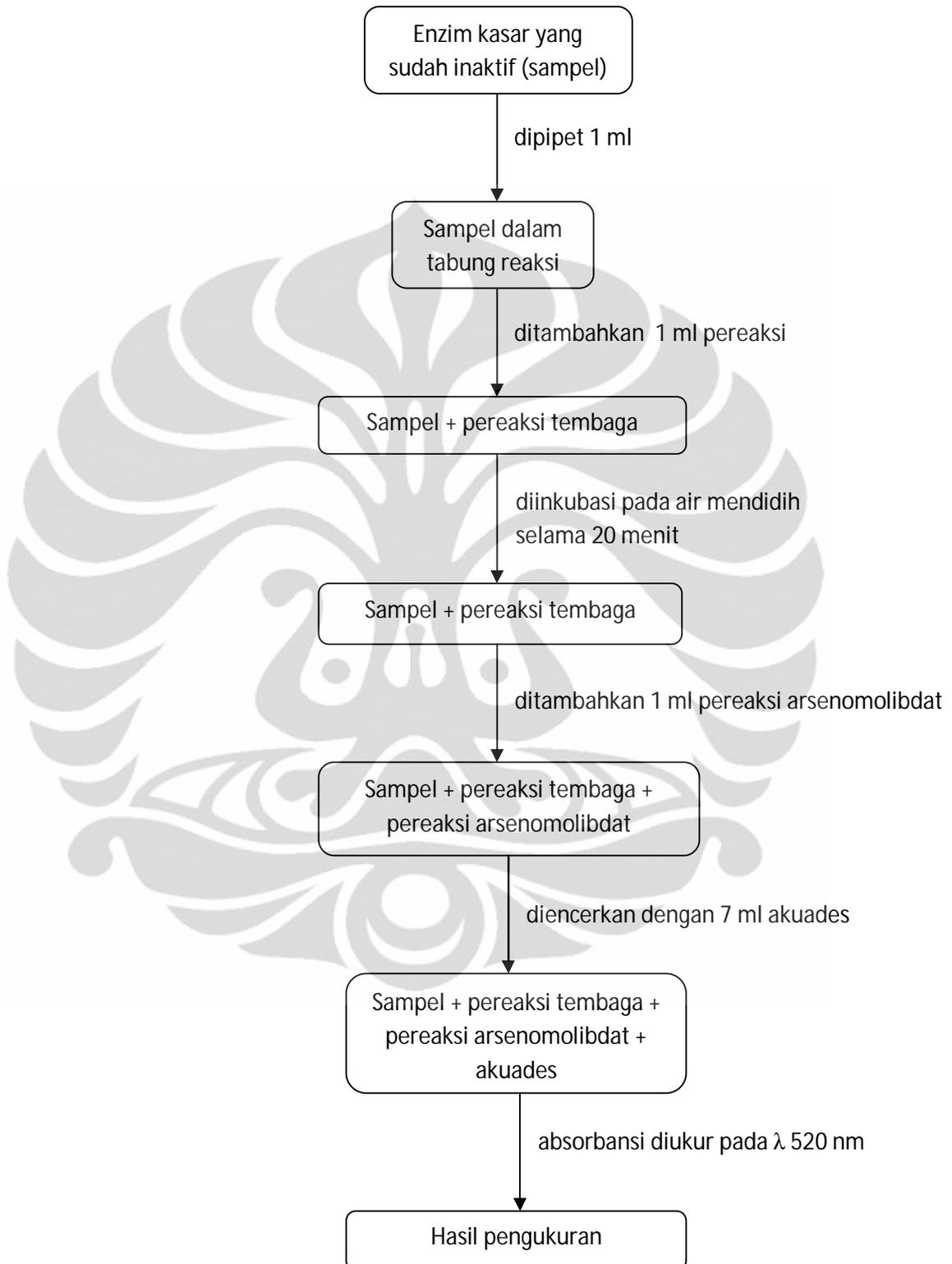


Keterangan:

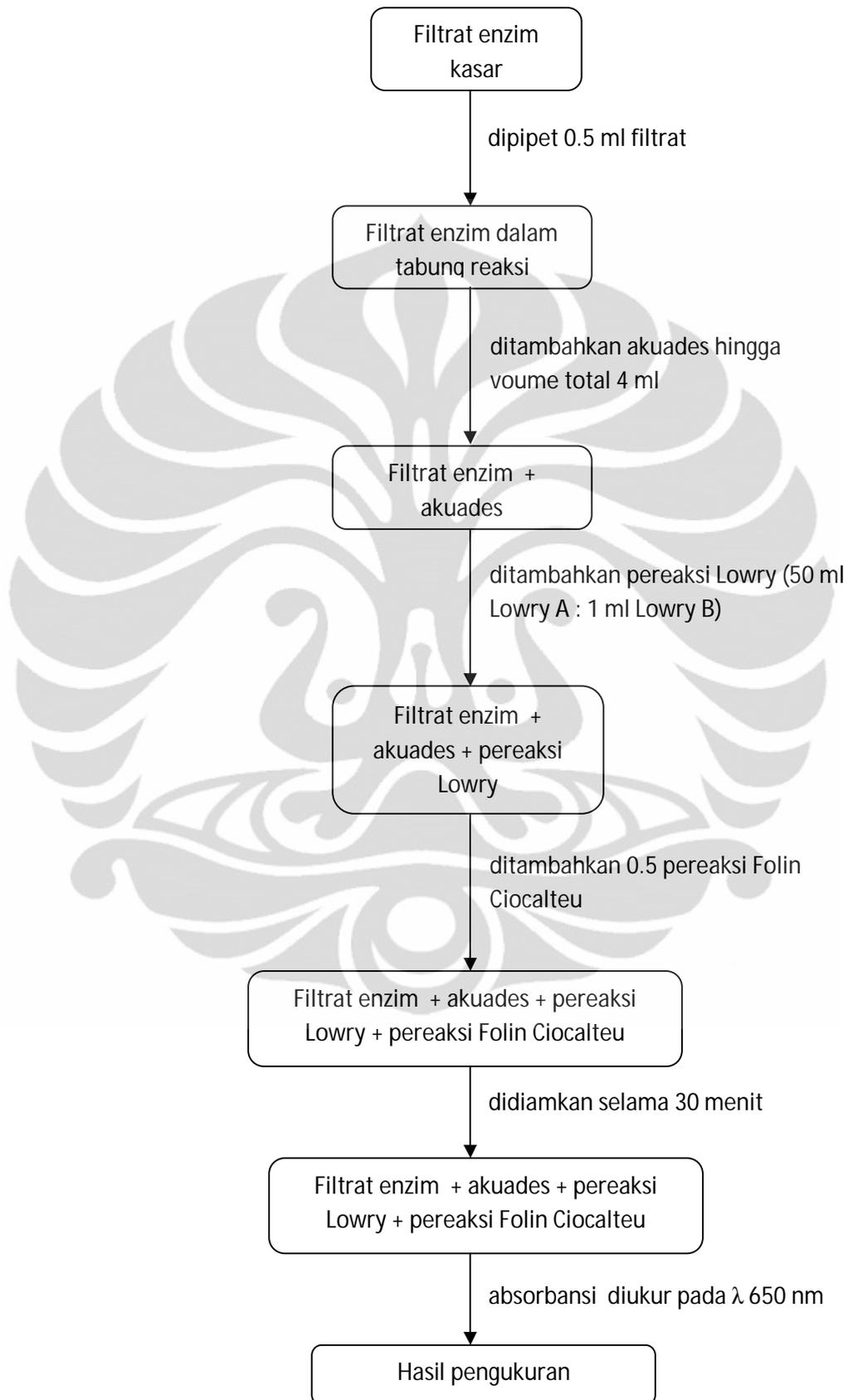
\*FPU = Filter Paper Unit

\*\* CMC = Carboxymethyl cellulose

## VI. Pengukuran Gula Pereduksi (Samogyi Nelson)



## VII. Pengukuran Kadar Protein

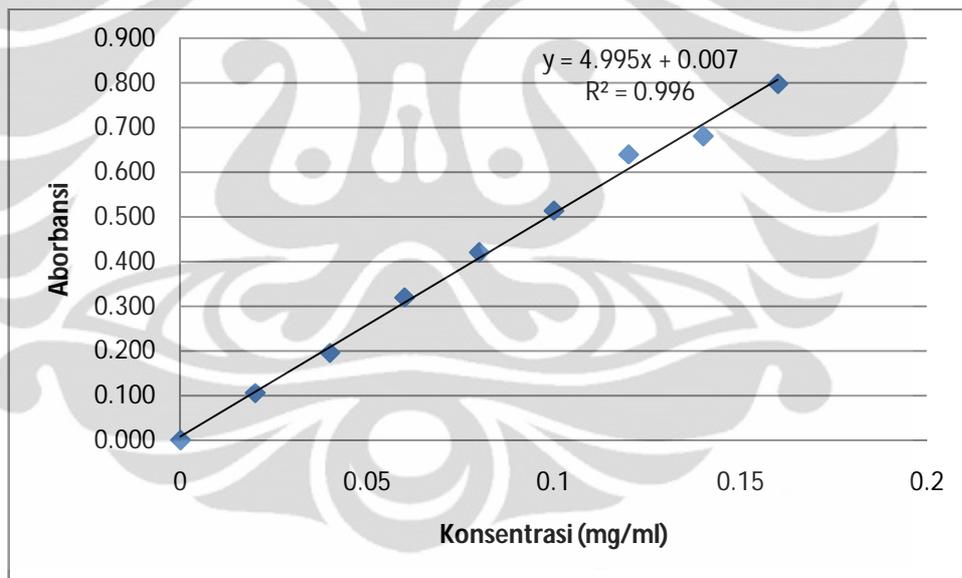


Lampiran 2.

Data Standar Glukosa

**Tabel L.2. Konsentrasi Standar Glukosa**

konsentrasi (mg/mL)(x)	Absorbansi $\lambda_{650}$ (y)
0	0.000
0.02	0.105
0.04	0.195
0.06	0.319
0.08	0.420
0.1	0.513
0.12	0.639
0.14	0.680
0.16	0.797



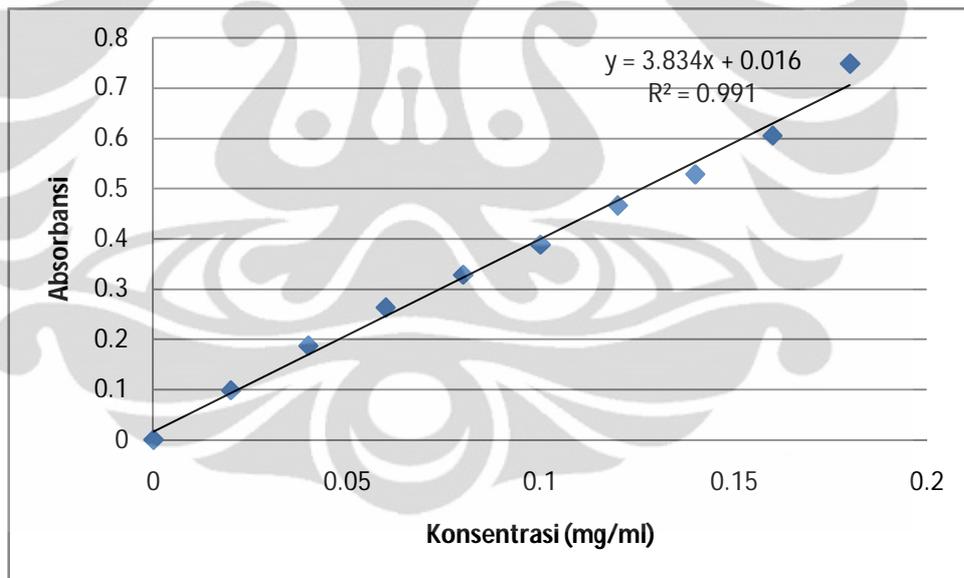
**Gambar L.2. Grafik Standar Glukosa**

Lampiran 3.

Standar Protein

**Tabel L.3. Konsentrasi Standar BSA**

Konsentrasi (mg/mL) (x)	Absorbansi $\lambda_{520}$ (y)
0	0
0.02	0.098
0.04	0.187
0.06	0.263
0.08	0.328
0.1	0.388
0.12	0.466
0.14	0.528
0.16	0.605
0.18	0.748



**Gambar L.3. Grafik Standar Protein (BSA)**

Lampiran 4.

Data Uji Aktivitas (Pelepah Sawit Tidak Didelignifikasi)

**Tabel L.4.1. Aktivitas unit PSTH + N (Kontrol)**

T004							T051					
PS+N							PS+N					
Waktu	Substrat						Substrat					
Fermentasi	Avicel		CMC		FPU		Avicel		CMC		FPU	
(hari)	30 menit	60 menit										
1	0.0058	0.0011	0.0185	0.0362	0.0058	0.0022	0.0054	0.0044	0.0134	0.0122	0.0059	0.0065
3	0.0085	0.005	0.0049	0.0258	0.02	0.0144	0.0023	0.005	0.0353	0.0191	0.0102	0.015
5	0.0167	0.0112	0.0526	0.0526	0.0286	0.0149	0.009	0.0049	0.0482	0.0356	0.0255	0.0173
7	0.0127	0.0074	0.037	0.0592	0.0109	0.0101	0.0009	0.0034	0.0448	0.0225	0.0211	0.0137
8	0.0067	0.0048	0.0297	0.0178	0.0098	0.0105	0.0024	0.003	0.0151	0.016	0.0061	0.0056
10	0.0029	0.0038	0.0144	0.0079	0.0012	0.005	0.0024	0.0032	0.0034	0.0051	0.0006	0.0018

**Tabel L.4.2. Aktivitas unit PSTH + N + C (N:C=1:1)**

T004							T051					
PS+N+C (N:C=1:1)							PS+N+C (N:C=1:1)					
Waktu	Substrat						Substrat					
Fermentasi	Avicel		CMC		FPU		Avicel		CMC		FPU	
(hari)	30 menit	60 menit	30 menit	60 menit	30 menit	60 menit	30 menit	60 menit	30 menit	60 menit	30 menit	60 menit
1	0.0094	0.0046	0.0327	0.0241	0.0053	0.0035	0.0107	0.0109	0.018	0.0171	0.0069	0.0074
3	0.003	0.0059	0.0521	0.0392	0.0055	0.0067	0.0035	0.0093	0.0755	0.0521	0.0121	0.006
5	0.0167	0.0049	0.0919	0.0364	0.0156	0.0126	<b>0.0175</b>	0.0052	<b>0.0707</b>	0.0333	<b>0.0279</b>	0.0091
7	0.0093	0.0084	0.0483	0.0119	0.0037	0.0039	0.0017	0.0008	0.0212	0.0169	0.0151	0.0092
8	0.001	0.0015	0.0068	0.0048	0.0055	0.0026	0.0038	0.0027	0.0117	0.0108	0.008	0.0056

Tabel L.4.3. Aktivitas unit PSTH + N + C (N:C=1:2)

T004							T051					
PS+N+C (N:C=1:2)							PS+N+C (N:C=1:2)					
Waktu	Substrat						Substrat					
Fermentasi	Avicel		CMC		FPU		Avicel		CMC		FPU	
(hari)	30 menit	60 menit	30 menit	60 menit	30 menit	60 menit	30 menit	60 menit	30 menit	60 menit	30 menit	60 menit
1	0.0071	0.0087	0.0261	0.0195	0.0053	0.0056	0.0006	0.0009	0.0141	0.0102	0.0014	0.006
3	0.0061	0.0063	0.0258	0.0324	0.0064	0.0048	0.0007	0.0015	0.0063	0.0104	0.0016	0.0082
5	0.0185	0.0093	0.0429	0.0507	0.0169	0.0165	0.0022	0.004	0.0263	0.0072	0.0035	0.004
7	0.0239	0.0138	0.0763	0.0319	0.0172	0.011	0.0096	0.0056	0.0366	0.0166	0.005	0.0079
8	0.0175	0.0127	0.0383	0.0267	0.0064	0.0079	0.0076	0.0049	0.0097	0.0768	0.0016	0.0041
10	0.0058	0.0056	0.0132	0.0087	0.0055	0.0055	0.0058	0.0032	0.0056	0.0082	0.0014	0.0018

Tabel L.4.4. Aktivitas unit PSTH + N + C (N:C=2:1)

T004							T051					
PS+N+C (N:C=2:1)							PS+N+C (N:C=2:1)					
Waktu	Substrat						Substrat					
Fermentasi	Avicel		CMC		FPU		Avicel		CMC		FPU	
(hari)	30 menit	60 menit	30 menit	60 menit	30 menit	60 menit	30 menit	60 menit	30 menit	60 menit	30 menit	60 menit
1	0.0093	0.0044	0.0275	0.0183	0.0023	0.0022	0.0132	0.0055	0.0054	0.0067	0.0075	0.0066
3	0.0253	0.0094	0.0273	0.0431	0.0186	0.0122	0.0133	0.0084	0.0246	0.0205	0.0059	0.0059
5	<b>0.0255</b>	0.0135	<b>0.0928</b>	0.0605	<b>0.0352</b>	0.0194	0.0157	0.0082	0.0743	0.0251	0.0101	0.008
7	0.018	0.0173	0.0229	0.0179	0.0291	0.0181	0.0049	0.012	0.0178	0.0236	0.0053	0.0071
8	0.0028	0.0021	0.0171	0.0143	0.0043	0.0057	0.0008	0.0019	0.0141	0.0136	0.0035	0.0038

Lampiran 5.

Data Uji Aktivitas (Pelepah Sawit Hasil Delignifikasi)

**Tabel L.5.1. Aktivitas unit PSH + N (Kontrol)**

T004							T051					
PS+N							PS+N					
Waktu Fermentasi (hari)	Substrat						Substrat					
	Avicel		CMC		FPU		Avicel		CMC		FPU	
	30 menit	60 menit										
1	0.0013	0.0008	0.0419	0.0302	0.0105	0.005	0.0037	0.0035	0.0268	0.0173	0.004	0.0015
3	0.011	0.0076	0.0146	0.019	0.0163	0.0022	0.0055	0.0034	0.0365	0.028	0.0086	0.0053
5	0.0329	0.0171	0.0677	0.0458	0.0457	0.0235	0.0143	0.0073	0.0682	0.0387	0.0299	0.0158
7	0.0083	0.037	0.0434	0.0283	0.0185	0.0138	0.0118	0.0065	0.0424	0.0363	0.0209	0.0124
8	0.0055	0.003	0.011	0.0104	0.0064	0.0098	0.0048	0.0044	0.0214	0.0229	0.0015	0.0068

**Tabel L.5.2. Aktivitas unit PSH + N + C (N:C=1:1)**

T004							T051					
PS+N+C (N:C=1:1)							PS+N+C (N:C=1:1)					
Waktu Fermentasi (hari)	Substrat						Substrat					
	Avicel		CMC		FPU		Avicel		CMC		FPU	
	30 menit	60 menit	30 menit	60 menit	30 menit	60 menit	30 menit	60 menit	30 menit	60 menit	30 menit	60 menit
1	0.0088	0.0042	0.0385	0.0395	0.0048	0.0042	0.0069	0.0055	0.0229	0.018	0.0015	0.0018
3	0.0089	0.0083	0.1067	0.048	0.0144	0.0128	0.0022	0.0034	0.0502	0.029	0.0025	0.0011
5	0.0395	0.0105	0.1238	0.0607	0.0483	0.0278	<b>0.0596</b>	0.037	<b>0.1145</b>	0.0626	<b>0.0262</b>	0.0196
7	0.0289	0.0158	0.0789	0.0443	0.0205	0.0169	0.0154	0.0122	0.0166	0.0356	0.0153	0.0095
8	0.0167	0.0199	0.0409	0.0295	0.0069	0.0051	0.0066	0.0094	0.0356	0.0305	0.0061	0.0036

**Tabel L.5.3. Aktivitas unit PSH + N + C (N:C=1:2)**

T004							T051					
PS+N+C (N:C=1:2)							PS+N+C (N:C=1:2)					
Waktu	Substrat						Substrat					
Fermentasi	Avicel		CMC		FPU		Avicel		CMC		FPU	
(hari)	30 menit	60 menit	30 menit	60 menit	30 menit	60 menit	30 menit	60 menit	30 menit	60 menit	30 menit	60 menit
1	0.0074	0.0059	0.0161	0.0192	0.0023	0.0025	0.0041	0.0033	0.0285	0.0309	0.0029	0.0025
3	0.0197	0.0137	0.0302	0.0244	0.0244	0.0121	0.0046	0.0023	0.0777	0.0736	0.0059	0.0041
5	<b>0.0831</b>	0.0426	<b>0.1633</b>	0.1006	<b>0.0659</b>	0.0342	0.0369	0.0235	0.0824	0.0644	0.0143	0.0114
7	0.0663	0.0364	0.0999	0.0595	0.0499	0.0256	0.009	0.0066	0.0534	0.021	0.0078	0.004
8	0.0524	0.0306	0.0063	0.0312	0.021	0.0175	0.005	0.0065	0.0358	0.0383	0.0054	0.0039

**Tabel L.5.4 Aktivitas unit PSH + N + C (N:C=2:1)**

T004							T051					
PS+N+C (N:C=2:1)							PS+N+C (N:C=2:1)					
Waktu	Substrat						Substrat					
Fermentasi	Avicel		CMC		FPU		Avicel		CMC		FPU	
(hari)	30 menit	60 menit	30 menit	60 menit	30 menit	60 menit	30 menit	60 menit	30 menit	60 menit	30 menit	60 menit
1	0.006	0.0053	0.0019	0.0058	0.0023	0.0027	0.0047	0.0039	0.0124	0.009	0.0024	0.002
3	0.0018	0.0034	0.0941	0.0368	0.0221	0.0129	0.0113	0.0079	0.0595	0.0607	0.0015	0.0026
5	0.0485	0.022	0.1111	0.0487	0.0651	0.0371	0.0275	0.0155	0.1184	0.0738	0.0164	0.0093
7	0.0117	0.0242	0.1101	0.0648	0.0052	0.0061	0.0166	0.0058	0.0848	0.0619	0.0146	0.0111
8	0.0087	0.0054	0.0814	0.0699	0.0055	0.004	0.0099	0.0106	0.0331	0.0256	0.0137	0.0097

Lampiran 6.

Data Glukosa Sisa Fermentasi (Pelepah Sawit Tidak Didelignifikasi)

**Tabel L.6.1 Glukosa sisa fermentasi PSTH + N**

PS+N									PS+N								
kode jamur	hari	konsentrasi (mg/ml)						rata-rata	kode jamur	hari	konsentrasi (mg/ml)						rata-rata
		FP	simplo	FP	duplo	FP	triplo				FP	simplo	FP	duplo	FP	triplo	
T004	1	2	0.2298	2	0.231	2	0.2222	0.22769	T051	1	2	0.1393	2	0.1381	2	0.1389	0.13881
T004	3	2	0.2226	2	0.2254	2	0.2258	0.22462	T051	3	2	0.0801	2	0.0793	2	0.0797	0.07968
T004	5	2	0.1401	2	0.153	2	0.1389	0.14401	T051	5	1	0.0609	1	0.0603	1	0.0607	0.06059
T004	7	1	0.1802	2	0.1702	2	0.1702	0.17351	T051	7	2	0.0773	2	0.0773	2	0.0769	0.07714
T004	8	2	0.1982	2	0.1974	2	0.197	0.19753	T051	8	2	0.0785	2	0.0781	2	0.0777	0.07808
T004	10	2	0.1986	2	0.215	2	0.2158	0.20981	T051	10	2	0.1061	2	0.1057	2	0.1053	0.10571

**Tabel L.6.2. Glukosa sisa fermentasi PSTH + N + C (N:C=1:1)**

N:C=1:1									N:C=1:1								
Kode Jamur	hari	konsentrasi (mg/ml)						rata-rata	kode jamur	hari	konsentrasi (mg/ml)						rata-rata
		FP	simplo	FP	duplo	FP	triplo				FP	simplo	FP	duplo	FP	triplo	
T004	1	2	0.2494	2	0.2498	2	0.2503	0.24985	T051	1	2	0.0921	2	0.0917	2	0.0909	0.09156
T004	3	2	0.1854	2	0.1838	2	0.1846	0.18458	T051	3	2	0.0825	2	0.0817	2	0.0833	0.08248
T004	5	2	0.1317	2	0.1309	2	0.1313	0.13133	T051	5	2	0.0773	2	0.0785	2	0.0785	0.07808
T004	7	2	0.1822	2	0.1814	2	0.1822	0.18192	T051	7	2	0.0793	2	0.0789	2	0.0801	0.07941
T004	8	2	0.1918	2	0.1914	2	0.1918	0.19166	T051	8	1	0.0815	1	0.0817	1	0.0821	0.08175

Tabel L.6.3. Glukosa sisa fermentasi PSTH + N + C (N:C=1:2)

N:C=1:2									N:C=1:2								
Kode jamur	hari	konsentrasi (mg/ml)						rata-rata	kode jamur	hari	konsentrasi (mg/ml)						rata-rata
		FP	simplo	FP	duplo	FP	triplo				FP	simplo	FP	duplo	FP	triplo	
T004	1	2	0.2739	2	0.2743	2	0.2735	0.27387	T051	1	2	0.1141	2	0.1209	2	0.1197	0.11825
T004	3	2	0.2699	2	0.2707	2	0.2715	0.27067	T051	3	2	0.1005	2	0.1077	2	0.1121	0.10677
T004	5	2	0.2519	2	0.2523	2	0.2535	0.25252	T051	5	2	0.0829	2	0.0825	2	0.0821	0.08248
T004	7	2	0.1986	2	0.1974	2	0.1982	0.19806	T051	7	2	0.0781	2	0.0777	2	0.0773	0.07768
T004	8	2	0.2122	2	0.2118	2	0.213	0.21235	T051	8	2	0.0797	2	0.0793	2	0.0797	0.07955
T004	10	2	0.2563	2	0.2571	2	0.2567	0.25666	T051	10	2	0.0781	2	0.0777	2	0.0773	0.07768

Tabel L.6.4. Glukosa sisa fermentasi PSTH + N + C (N:C=2:1)

N:C=2:1									N:C=2:1								
kode jamur	hari	konsentrasi (mg/ml)						rata-rata	kode jamur	hari	konsentrasi (mg/ml)						rata-rata
		FP	simplo	FP	duplo	FP	triplo				FP	simplo	FP	duplo	FP	triplo	
T004	1	2	0.2687	2	0.2679	2	0.2679	0.26813	T051	1	2	0.1249	2	0.1245	2	0.1261	0.12519
T004	3	2	0.2394	2	0.2382	2	0.239	0.23891	T051	3	2	0.0821	2	0.0817	2	0.0809	0.08155
T004	5	2	0.0901	2	0.0905	2	0.0913	0.09062	T051	5	1	0.0396	1	0.0394	1	0.0398	0.03964
T004	7	2	0.2094	2	0.2078	2	0.2066	0.20794	T051	7	2	0.0809	2	0.0805	2	0.0797	0.08035
T004	8	2	0.217	2	0.2162	2	0.2166	0.21662	T051	8	1	0.0855	1	0.0851	1	0.0853	0.08529

Lampiran 7.

Data Glukosa Sisa Fermentasi (Pelepah Sawit Hasil didelignifikasi)

**Tabel L.7.1. Glukosa sisa fermentasi PSH + N**

PS+N									PS+N								
kode jamur	hari	konsentrasi (mg/ml)						rata-rata	kode jamur	hari	konsentrasi (mg/ml)						rata-rata
		FP	simplo	FP	duplo	FP	triplo				FP	simplo	FP	duplo	FP	triplo	
T004	1	2	0.217	2	0.2174	2	0.2166	0.22769	T051	1	2	0.1489	2	0.1493	2	0.1481	0.1488
T004	3	2	0.2094	2	0.2102	2	0.211	0.22462	T051	3	2	0.1413	2	0.1405	2	0.1409	0.1409
T004	5	2	0.1626	2	0.1622	2	0.163	0.14401	T051	5	2	0.0789	2	0.0789	2	0.0789	0.0789
T004	7	2	0.1806	2	0.1794	2	0.1798	0.17351	T051	7	2	0.0793	2	0.0789	2	0.0793	0.0791
T004	8	2	0.2082	2	0.209	2	0.2094	0.19753	T051	8	2	0.0893	2	0.0889	2	0.0881	0.0888

**Tabel L.7.2. Glukosa sisa fermentasi PSH + N + C (N:C=1:1)**

N:C=1:1									N:C=1:1								
Kode Jamur	hari	konsentrasi (mg/ml)						rata-rata	kode jamur	hari	konsentrasi (mg/ml)						rata-rata
		FP	simplo	FP	duplo	FP	triplo				FP	simplo	FP	duplo	FP	triplo	
T004	1	2	0.2098	2	0.209	2	0.2102	0.2097	T051	1	2	0.1518	2	0.151	2	0.1518	0.1515
T004	3	2	0.199	2	0.1974	2	0.1986	0.1983	T051	3	2	0.0941	2	0.0937	2	0.0954	0.0944
T004	5	2	0.1902	2	0.1894	2	0.1898	0.1898	T051	5	2	0.0797	2	0.0793	2	0.0805	0.0798
T004	7	2	0.203	2	0.2034	2	0.2038	0.2034	T051	7	2	0.0797	2	0.0801	2	0.0816	0.0805
T004	8	2	0.2062	2	0.207	2	0.2058	0.2063	T051	8	2	0.0853	2	0.0849	2	0.086	0.0854

**Tabel L.7.3. Glukosa sisa fermentasi PSH + N + C (N:C=1:2)**

N:C=1:2									N:C=1:2								
Kode jamur	hari	konsentrasi (mg/ml)						rata-rata	kode jamur	hari	konsentrasi (mg/ml)						rata-rata
		FP	simplo	FP	duplo	FP	triplo				FP	simplo	FP	duplo	FP	triplo	
T004	1	2	0.2666	2	0.2663	2	0.2675	0.2668	T051	1	2	0.165	2	0.1662	2	0.0825	0.1379
T004	3	2	0.273	2	0.2715	2	0.2723	0.2723	T051	3	2	0.1361	2	0.1365	2	0.0679	0.1135
T004	5	2	0.078	2	0.0777	2	0.0781	0.0779	T051	5	2	0.1049	2	0.1045	2	0.0527	0.0874
T004	7	2	0.1849	2	0.1854	2	0.1854	0.1852	T051	7	2	0.1065	2	0.1057	2	0.0527	0.0883
T004	8	2	0.1873	2	0.1882	2	0.1886	0.188	T051	8	2	0.1317	2	0.1321	2	0.0667	0.1102

**Tabel L.7.4. Glukosa sisa fermentasi PSH + N + C (N:C=2:1)**

N:C=2:1									N:C=2:1								
kode jamur	hari	konsentrasi (mg/ml)						rata-rata	kode jamur	hari	konsentrasi (mg/ml)						rata-rata
		FP	simplo	FP	duplo	FP	triplo				FP	simplo	FP	duplo	FP	triplo	
T004	1	2	0.3007	2	0.3019	2	0.3011	0.3012	T051	1	2	0.1646	2	0.1654	2	0.1638	0.1646
T004	3	2	0.1401	2	0.1393	2	0.1397	0.1397	T051	3	2	0.1477	2	0.1481	2	0.1473	0.1477
T004	5	2	0.0965	2	0.0961	2	0.0965	0.0964	T051	5	2	0.0805	2	0.0801	2	0.0797	0.0801
T004	7	2	0.1041	2	0.1045	2	0.1037	0.1041	T051	7	2	0.0913	2	0.0909	2	0.0917	0.0913
T004	8	2	0.1994	2	0.199	2	0.1994	0.1993	T051	8	2	0.1317	2	0.1309	2	0.1305	0.1311

Lampiran 8.

Kadar Protein (Pelepah Sawit tidak Didelignifikasi)

**Tabel L.8.1. Kadar protein PSTH**

Pelepah Sawit +N					Pelepah Sawit +N					N:C=1:1					N:C=1:1				
T004					T051					T004					T051				
hari	Konsentrasi			rata-rata	hari	Konsentrasi			rata-rata	hari	Konsentrasi			rata-rata	hari	Konsentrasi			rata-rata
	Simplo	duplo	triplo			simplo	duplo	triplo			simplo	duplo	triplo			simplo	duplo	triplo	
1	0.1487	0.1484	0.1479	0.1483	1	0.1466	0.1461	0.1466	0.1464	1	0.1307	0.1309	0.1302	0.1306	1	0.1093	0.109	0.1093	0.1092
3	0.15	0.1492	0.1421	0.1471	3	0.1481	0.1479	0.1481	0.1481	3	0.1599	0.1596	0.1586	0.1594	3	0.1341	0.1338	0.1333	0.1337
5	0.1526	0.1497	0.1526	0.1516	5	0.1515	0.1513	0.1518	0.1515	5	0.1622	0.1617	0.162	0.162	5	0.1508	0.151	0.1502	0.1507
7	0.1453	0.145	0.151	0.1471	7	0.1424	0.1421	0.1424	0.1423	7	0.157	0.1562	0.1568	0.1567	7	0.1419	0.1414	0.1419	0.1417
8	0.1466	0.1461	0.1458	0.1461	8	0.1403	0.1408	0.1406	0.1406	8	0.1539	0.1544	0.1549	0.1544	8	0.1395	0.1403	0.1393	0.1397
10	0.1424	0.1421	0.1416	0.1421	10	0.1406	0.1401	0.1398	0.1401										

N:C=1:2					N:C=1:2					N:C=2:1					N:C=2:1				
T004					T051					T004					T051				
hari	Konsentrasi			rata-rata															
	Simplo	duplo	triplo			simplo	duplo	triplo			simplo	duplo	triplo			simplo	duplo	triplo	
1	0.1669	0.1667	0.0394	0.1243	1	0.1421	0.1429	0.1453	0.1435	1	0.1445	0.1453	0.145	0.1449	1	0.1135	0.1132	0.1137	0.1135
3	0.1883	0.1878	0.0449	0.1404	3	0.1317	0.1343	0.1346	0.1335	3	0.1628	0.1622	0.1821	0.169	3	0.1495	0.1489	0.1492	0.1492
5	0.1912	0.192	0.0457	0.1429	5	0.1479	0.1458	0.1492	0.1476	5	0.181	0.1818	0.163	0.1753	5	0.1549	0.1547	0.1549	0.1548
7	0.2008	0.2003	0.0482	0.1498	7	0.1453	0.1526	0.1521	0.15	7	0.0618	0.0616	0.0614	0.0616	7	0.0585	0.0586	0.0588	0.0587
8	0.1959	0.1961	0.0469	0.1463	8	0.057	0.0566	0.0565	0.0567	8	0.0615	0.0613	0.0612	0.0614	8	0.0576	0.0574	0.0573	0.0574
10	0.1943	0.1941	0.0465	0.145	10	0.0559	0.0556	0.0558	0.0558										

Lampiran 9.

Kadar Protein (Pelepah Sawit Hasil Didelignifikasi)

**Tabel L.8.1. Kadar protein PSH**

Pelepah Sawit +N					Pelepah Sawit +N					N:C=1:1					N:C=1:1				
T004					T051					T004					T051				
hari	Konsentrasi			rata-rata	hari	Konsentrasi			rata-rata	hari	Konsentrasi			rata-rata	hari	Konsentrasi			rata-rata
	Simplo	duplo	triplo			simplo	duplo	triplo			simplo	duplo	triplo			simplo	duplo	triplo	
1	0.0994	0.0991	0.0994	0.0993	1	0.0788	0.0793	0.0164	0.0581	1	0.1132	0.1135	0.0254	0.084	1	0.0816	0.0819	0.0819	0.0818
3	0.1072	0.1069	0.1075	0.1072	3	0.0952	0.0949	0.0207	0.0703	3	0.1174	0.1179	0.0264	0.0872	3	0.1064	0.1059	0.1056	0.106
5	0.1395	0.1283	0.1286	0.1322	5	0.1056	0.1056	0.0234	0.0782	5	0.1437	0.144	0.0333	0.107	5	0.1119	0.1103	0.1106	0.1109
7	0.1168	0.1166	0.1166	0.1167	7	0.0921	0.0926	0.0198	0.0682	7	0.1338	0.1341	0.0307	0.0995	7	0.1033	0.103	0.103	0.1031
8	0.1085	0.1082	0.1082	0.1083	8	0.0876	0.0884	0.0187	0.0649	8	0.1338	0.1338	0.0307	0.0994	8	0.1028	0.1028	0.103	0.1029

N:C=1:2					N:C=1:2					N:C=2:1					N:C=2:1				
T004					T051					T004					T051				
hari	Konsentrasi			rata-rata															
	Simplo	duplo	triplo			simplo	duplo	triplo			simplo	duplo	triplo			simplo	duplo	triplo	
1	0.1213	0.1218	0.1221	0.1217	1	0.0934	0.0939	0.0942	0.0938	1	0.1706	0.1708	0.1701	0.1705	1	0.1531	0.1536	0.1539	0.1535
3	0.1487	0.1489	0.1492	0.1489	3	0.1174	0.1171	0.1174	0.1173	3	0.1904	0.1899	0.1901	0.1901	3	0.1716	0.1711	0.1708	0.1712
5	0.169	0.1682	0.1685	0.1686	5	0.1179	0.1182	0.1179	0.118	5	0.2042	0.2045	0.2045	0.2044	5	0.1771	0.1763	0.1768	0.1768
7	0.1487	0.1492	0.15	0.1493	7	0.108	0.1077	0.1082	0.108	7	0.1818	0.1823	0.1823	0.1821	7	0.1774	0.1768	0.1763	0.1768
8	0.1421	0.1419	0.1427	0.1422	8	0.1025	0.103	0.103	0.1029	8	0.1774	0.1766	0.1771	0.177	8	0.163	0.1628	0.163	0.1629

Lampiran 10.

Gambar Alat-Alat yang Digunakan



*Hotplate*



*Magnetic Stirrer*



*Vortex*



*Autoclave*



*Laminar Flow*



*Inkubator*



*Shaker*



*Ultra Sentrifuge*



*Waterbath*



*Spektrofotometer UV/VIS  
Hitachi U-2000*



*Cork borer  
(Diameter=1cm)*