



**HIDROLISIS TANDAN KOSONG KELAPA SAWIT (TKKS)
OLEH *Aspergillus* sp. (VTM1) DAN *Pestalotiopsis* sp. (VM9)
SEBAGAI MEDIA TUMBUH PST *Saccharomyces cerevisiae***

SKRIPSI

Oleh:

**Nurul Mahmuda
NIM 121810401008**

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2016**



**HIDROLISIS TANDAN KOSONG KELAPA SAWIT (TKKS)
OLEH *Aspergillus* sp. (VTM1) DAN *Pestalotiopsis* sp. (VM9)
SEBAGAI MEDIA TUMBUH PST *Saccharomyces cerevisiae***

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi Ilmu Biologi (S1) dan mencapai gelar Sarjana Sains

Oleh:

**Nurul Mahmuda
NIM 121810401008**

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2016**

PERSEMBAHAN

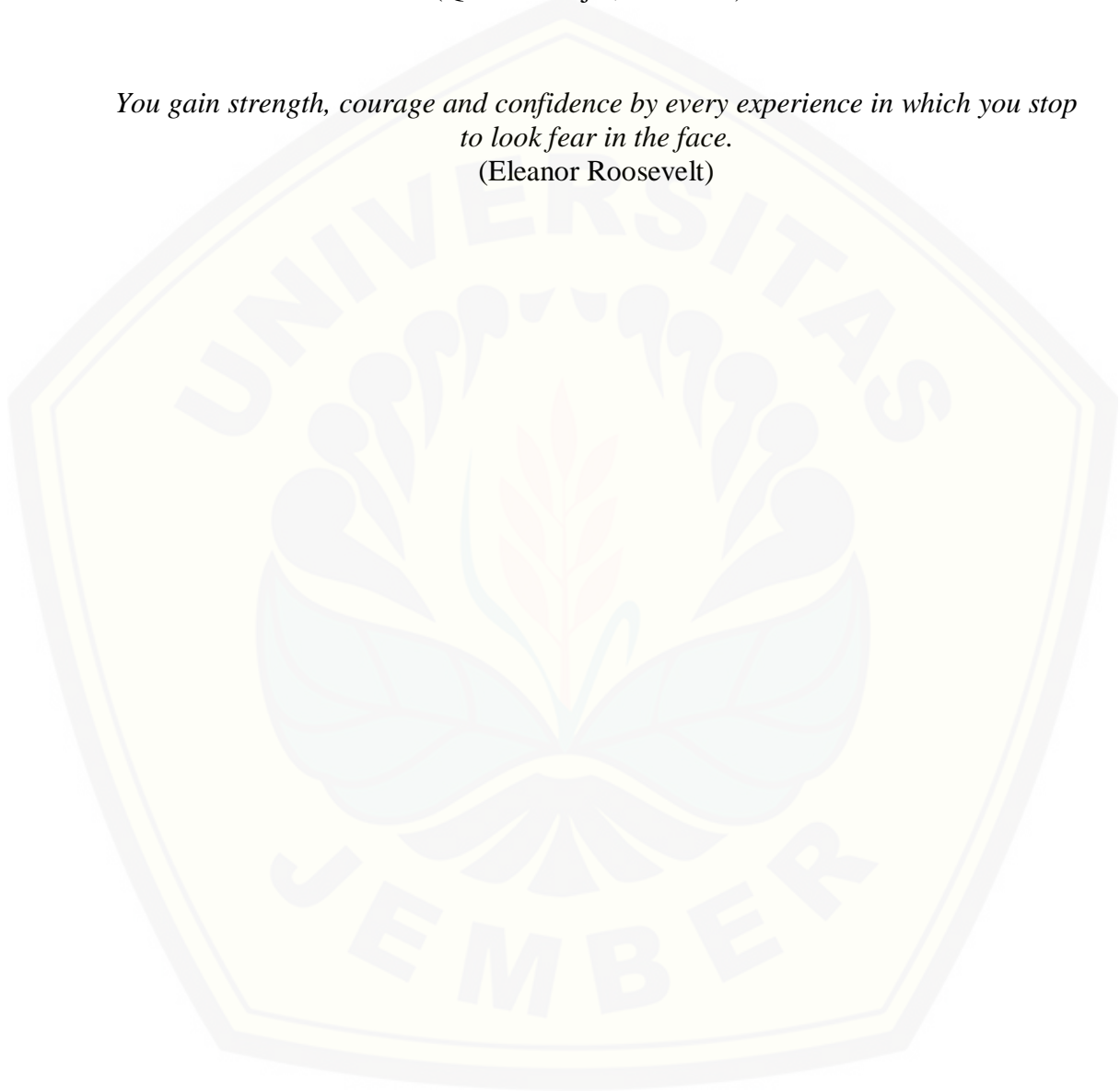
Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. kedua orang tua saya, Ibu Kemi dan Bapak Samidjo, atas segala dukungan dan doa yang terus terpanjat dalam setiap sujudnya;
2. kakak saya Idayati dan seluruh keluarga atas dukungan dan motivasinya;
3. guru-guru dan dosen-dosen sejak taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi, atas bimbingannya;
4. Almamater Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

MOTO

Dan bahwasanya seorang manusia tiada memperoleh selain apa yang telah diusahakannya. Dan bahwasanya usaha itu kelak akan diperlihatkan (kepadanya).
(Q.S. An-Najm, 53:39-40)^{*)}

You gain strength, courage and confidence by every experience in which you stop to look fear in the face.
(Eleanor Roosevelt)



^{*)} Departemen Agama Republik Indonesia. 2006. *Al-Qur'an dan Terjemahannya*. Surabaya: Pustaka Agung Harapan

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Nurul Mahmuda

NIM : 121810401008

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “ Hidrolisis Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS) Oleh *Aspergillus* sp. (VTM1) dan *Pestalotiopsis* sp. (VM9) Sebagai Media Tumbuh PST *Saccharomyces cerevisiae*” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Penelitian ini merupakan proyek penelitian yang dibiayai oleh Dr. Kahar Muzakhar, S. Si. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 23 Desember 2016

Yang menyatakan,

Nurul Mahmuda

NIM 121810401008

SKRIPSI

**HIDROLISIS TANDAN KOSONG KELAPA SAWIT (TKKS)
OLEH *Aspergillus* sp. (VTM1) DAN *Pestalotiopsis* sp. (VM9)
SEBAGAI MEDIA TUMBUH PST *Saccharomyces cerevisiae***

Oleh

Nurul Mahmuda

NIM 121810401008

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : Dr. Kahar Muzakhar, S. Si.

Dosen Pembimbing Anggota : Drs. Rudju Winarsa, M.Kes.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Hidrolisis Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS) Oleh *Aspergillus* sp. (VTM1) dan *Pestalotiopsis* sp. (VM9) Sebagai Media Tumbuh PST *Saccharomyces cerevisiae*” telah diuji dan disahkan pada :

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas
Jember

Tim Penguji:

Ketua,

Dr. Kahar Muzakhar, S.Si.
NIP 196805031994011001

Anggota II,

Drs. Siswanto, M.Si.
NIP 196012161993021001

Anggota I,

Drs. Rudju Winarsa, M.Kes.
NIP 19600816119890210001

Anggota III,

Fuad Bahrul Ulum, S.Si., M.Sc.
NIP. 198409262008121001

Mengesahkan
Dekan,

Drs. Sujito, Ph.D.
NIP 196102041987111001

RINGKASAN

Hidrolisis Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS) Oleh *Aspergillus* sp. (VTM1) Dan *Pestalotiopsis* sp. (VM9) Sebagai Media Tumbuh PST *Saccharomyces cerevisiae*; Nurul Mahmuda; 121810401008; 2016; 43 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Tandan kosong kelapa sawit (TKKS) adalah limbah yang belum banyak dimanfaatkan menjadi produk yang mempunyai nilai tambah. TKKS memiliki kandungan lignoselulosa yang cukup tinggi. Lignoselulosa mengandung tiga komponen penyusun utama, yaitu selulosa (30-50% berat), hemiselulosa (15-35% berat) dan lignin (13-30% berat). Tingginya kadar selulosa pada polisakarida tersebut dapat dihidrolisis menjadi gula sederhana.

Hidrolisis selulosa tersebut dapat dilakukan secara enzimatik dengan menggunakan kapang selulolitik. Dari 48 isolat kapang yang diuji aktivitas selulolitiknya, *Aspergillus* sp. merupakan kapang dengan aktivitas selulolitik tertinggi. *Pestalotiopsis* sp. merupakan salah satu dari lima jenis kapang yang ditemukan pada tandan kosong kelapa sawit dan memiliki efisiensi selulase yang lebih tinggi pada TKKS. Hidrolisis enzimatik dengan menggunakan dua jenis isolat ini diharapkan mampu menghasilkan gula reduksi maksimal melalui proses enzimatik keduanya. Sehingga, hasil gula dari hidrolisat dapat dimanfaatkan sebagai alternatif media pertumbuhan.

Protein sel tunggal (PST) masih menjadi salah satu pemenuhan kebutuhan protein yang tinggi. *Saccharomyces cerevisiae* merupakan PST yang sering dimanfaatkan dalam industri makanan dan minuman karena aman dikonsumsi. Ukurannya yang lebih besar dari mikroorganisme yang lain, sangat berkompeten untuk diproduksi skala besar. *S. cerevisiae* bersifat heterotrof, dapat tumbuh dalam karbohidrat sederhana seperti glukosa, sukrosa dan fruktosa sebagai sumber karbonnya (Nuraida *et al.*, 1996). Oleh karena itu, hidrolisat TKKS dengan

kandungan gula reduksinya diharapkan mampu digunakan sebagai media tumbuh alternatif dari *S. cerevisiae*.

Penelitian ini meliputi persiapan penelitian, hidrolisis TKKS oleh variasi perlakuan *Aspergillus* sp. (VTM1) dan *Pestalotiopsis* sp. (VM9), dan pertumbuhan *S. cerevisiae* pada hidrolisat TKKS dengan variasi konsentrasi dan waktu inkubasi. Hasil dari penelitian menunjukkan bahwa hidrolisis TKKS menggunakan perlakuan *Pestalotiopsis* sp. (VM9) dan *Aspergillus* sp. (VTM1) menghasilkan konsentrasi gula reduksi yaitu 54,835 µg/ml. Hasil tersebut merupakan konsentrasi gula reduksi tertinggi jika dibandingkan kontrol sebesar 27,009 µg/ml maupun perlakuan lainnya. Pertumbuhan sel *S. cerevisiae* paling tinggi yaitu pada konsentrasi 27,418 µg/ml sejumlah 33×10^6 sel/ml di jam ke-48 dan diikuti dengan penurunan gula reduksi sekitar 76%. Dengan demikian *S. cerevisiae* dapat tumbuh pada media hidrolisat TKKS.

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT, yang telah memberikan limpahan rahmat, nikmat serta hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyusun dan menyelesaikan skripsi yang berjudul “Hidrolisis Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS) Oleh *Aspergillus* sp. (VTM1) Dan *Pestalotiopsis* sp. (VM9) Sebagai Media Tumbuh PST *Saccharomyces cerevisiae*” Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu prasyarat dalam menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bimbingan, bantuan, dan dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Dr. Kahar Muzakhar, S.Si. selaku dosen pembimbing utama yang dengan penuh kesabaran telah meluangkan waktu, pikiran, saran serta motivasi dalam penyusunan skripsi ini;
2. Drs. Rudju Winarsa, M.Kes. selaku dosen pembimbing anggota yang telah memberikan bimbingan dan saran dalam penyusunan skripsi ini;
3. Drs. Siswanto, M.Si. dan Fuad Bahrul Ulum, S.Si., M.Sc. selaku dosen penguji yang telah memberikan banyak kritik dan saran yang sangat membangun dalam penyusunan skripsi ini;
4. Dra. Susantin Fajariyah, M.Si. selaku dosen pembimbing akademik yang dengan penuh kesabaran telah meluangkan waktu, memberikan motivasi dan semangat yang tiada hentinya selama penyusunan skripsi ini;
5. Bapak dan Ibu dosen, staff akademik, serta teknisi laboratorium Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember, atas segala ketulusan dan keikhlasannya dalam membantu selama masa perkuliahan hingga terselesaikannya skripsi ini;
6. Ibu Kemi, Bapak Samidjo dan saudari Idayati serta seluruh keluarga yang telah memberikan semangat dan doa serta dukungan hingga terselesaikannya skripsi ini;

7. Rekan penelitian Laboratorium Mikrobiologi Laila, Ifa, Vivta, Reza, Yuniar, Halimah, Anis, Syafiq, Sussy, Masruroh, Lisa, Nenny, Ika W, Putri Yulia, Qory dan kawan “Samin” Mukid, Bunga, Nyet, Dian serta sahabatku Dwi Puspitasari, Hidayatul Fitriyah, Romla dan Riska terima kasih atas segala semangat dan kebersamaannya;
8. Segenap teman-teman Biologi 2012 yang tergabung dalam BIOZVA, keluarga besar LPMM ALPHA dan PPMI kota Jember serta DPM FMIPA terimakasih atas keceriaan, motivasi dan dukungannya selama ini;
9. Serta semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 23 Desember 2016

Penulis

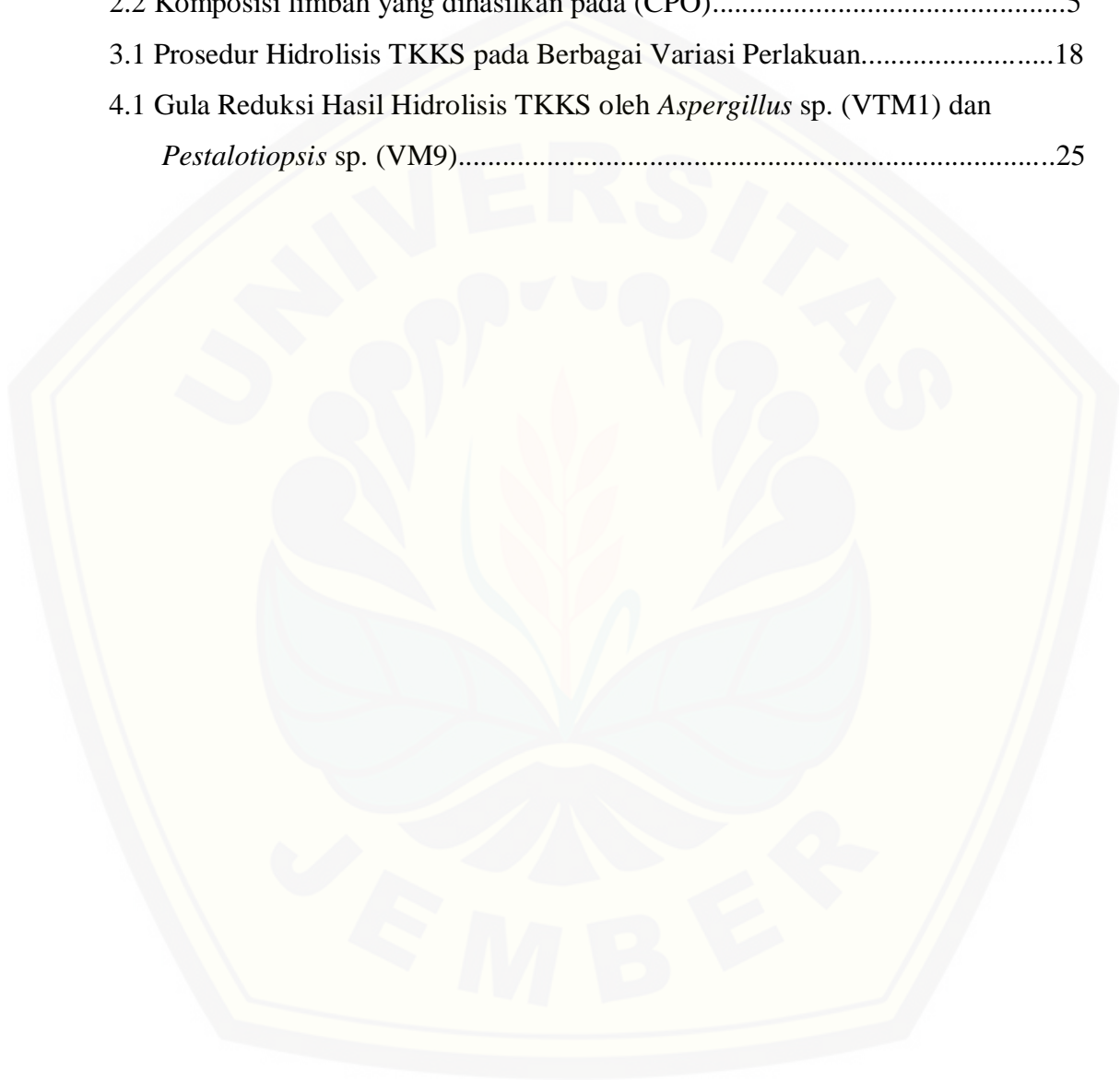
DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL.....	i
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	ii
HALAMAN MOTO.....	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN	v
HALAMAN PENGESAHAN	vi
RINGKASAN.....	vii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB 1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Batasan Penelitian.....	3
1.4 Tujuan	3
1.5 Manfaat	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS)	4
2.1.1 Selulosa	5
2.1.2 Hemiselulosa	6
2.1.3 Lignin	7
2.2 Hidrolisis menggunakan Enzim Ekstraseluler.....	7
2.2.1 <i>Aspergillus</i> sp.....	9
2.2.2 <i>Pestalotiopsis</i> sp.....	11
2.3 Protein Sel Tunggal <i>S. cerevisiae</i>	12

BAB 3. METODE PENELITIAN.....	14
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	14
3.2 Alat dan Bahan.....	14
3.3 Prosedur Penelitian.....	14
3.3.1 Persiapan Penelitian.....	15
3.3.2 Hidrolisis TKKS oleh <i>Aspergillus</i> sp. (VTM1) dan <i>Pestalotiopsis</i> sp. (VM9).....	18
3.3.3 Pertumbuhan <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pada Hidrolisat TKKS	19
3.4 Analisis Data	20
3.5 Tabulasi Data	20
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	22
4.1 Kepadatan Jumlah Spora <i>Aspergillus</i> sp. (VTM1) dan <i>Pestalotiopsis</i> sp. (VM9) pada Media Agar TKKS Alkali 1%.....	22
4.2 Optimasi Waktu Hidrolisis TKKS	23
4.2.1 Waktu Optimum Hidrolisis TKKS oleh <i>Aspergillus</i> sp.	23
4.2.2 Waktu Optimum Hidrolisis TKKS oleh <i>Pestalotiopsis</i> sp.	24
4.3 Hidrolisis Tandan Kosong Kelapa Sawit	25
4.4 Optimasi Pertumbuhan <i>S. cerevisiae</i> pada Hidrolisat TKKS	27
4.5 Pengukuran Sisa Gula Reduksi pada Media Tumbuh <i>S. cerevisiae</i>	29
BAB 5. PENUTUP	31
5.1 Kesimpulan.....	31
5.2 Saran.....	31
DAFTAR PUSTAKA.....	32
LAMPIRAN	32

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Komponen Tandan Kosong Kelapa Sawit.....	4
2.2 Komposisi limbah yang dihasilkan pada (CPO).....	5
3.1 Prosedur Hidrolisis TKKS pada Berbagai Variasi Perlakuan.....	18
4.1 Gula Reduksi Hasil Hidrolisis TKKS oleh <i>Aspergillus</i> sp. (VTM1) dan <i>Pestalotiopsis</i> sp. (VM9).....	25



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 a) Tandan Buah Segar b) Tandan Kosong Kelapa Sawit.....	4
2.2 Struktur Kimia Selulosa.....	6
2.3 Struktur Kimia Hemiselulosa.....	6
2.4 a) Morfologi koloni <i>Aspergillus</i> sp. b) Morfologi sel <i>Aspergillus</i> sp. perbesaran 1000x.....	10
2.5 a) Koloni <i>Pestalotiopsis</i> sp. b) Spora <i>Pestalotiopsis</i> sp. perbesaran 1000x.....	11
2.6 a) Koloni <i>Saccharomyces cerevisiae</i> b) Sel <i>Saccharomyces cerevisiae</i> perbesaran 1000x.....	12
4.1 Jumlah Spora <i>Aspergillus</i> sp. (VTM1) dan <i>Pestalotiopsis</i> sp. (VM9) pada Media Agar TKKS Alkali 1%.....	21
4.2 Optimasi Waktu Hidrolisis TKKS oleh <i>Aspergillus</i> sp. (VTM1).....	23
4.3 Optimasi Waktu Hidrolisis TKKS oleh <i>Pestalotiopsis</i> sp. (VM9).....	24
4.4 Pertumbuhan <i>S. cerevisiae</i> pada Hidrolisat TKKS dengan Variasi Konsentrasi dan Waktu.....	27
4.5 Sisa Konsumsi Gula Reduksi Hidrolisat TKKS oleh <i>S. cerevisiae</i>	29

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Komposisi Media	38
A.1 Komposisi Media Potato Dextrose Agar (PDA)	38
A.2 Komposisi Media Yeast Extract Pepton Dextrose Agar (YPDA)	38
A.3 Komposisi Media Yeast Extract Pepton Dextrose (YPD)	38
B. Komposisi Reagen Somogyi-Nelson	38
B.1 Komposisi Reagen Somogyi dalam 1 Liter	38
B.2 Komposisi Reagen Nelson dalam 1 Liter	39
C. Standart Glukosa	39
C.1 Nilai Absorbansi Standart Glukosa	39
C.2 Kurva Standart Glukosa	39
D. Pertumbuhan <i>Aspergillus</i> sp. (VTM1) dan <i>Pestalotiopsis</i> sp. (VM9)	40
D.1 Jumlah Spora <i>Aspergillus</i> sp.	40
D.2 Jumlah Spora <i>Pestalotiopsis</i> sp.	40
E. Hasil Optimasi Waktu Hidrolisis TKKS	40
E.1 Hasil Optimasi Waktu Hidrolisis oleh <i>Aspergillus</i> sp. (VTM1)	40
E.2 Hasil Optimasi Waktu Hidrolisis oleh <i>Pestalotiopsis</i> sp. (VM9)	41
F. Standart Populasi <i>S. cerevisiae</i>	41
F.1 Hasil Standart Populasi <i>S. cerevisiae</i>	41
F.2 Kurva Standart Populasi <i>S. cerevisiae</i>	41
G. Hasil Analisis Data Menggunakan Program Spss 15.0 For Windows	42
G.1 Descriptives	42
G.2 Uji ANOVA	42
G.3 Uji Duncan	42
G.4 Means Plots	42
H. Perbandingan Gula Reduksi	43
H.1 Gula Reduksi dengan 1x Panen	43
H.2 Gula Reduksi dengan 2x Panen	43

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Terdapat 470 pabrik pengolahan kelapa sawit Indonesia yang limbahnya mencapai 28,7 juta ton dalam bentuk cairan dan 15,2 juta ton limbah padat per tahun (Usmana *et al.*, 2012). Menurut Bantacut dan Pasaribu (2015) setiap pabrik kelapa sawit dengan kapasitas pengolahan 60 ton tandan/jam dapat membentuk hasil samping (biomasaa) berupa tandan kosong, serat, cangkang dan limbah cair masing-masing 14.265; 4.613; 1.959; dan 21.057 kg/jam. Selain itu, Subdit Pengelolaan Lingkungan (2006) juga mencatat pada tahun 2004 tandan kosong kelapa sawit (TKKS) merupakan limbah padat yang jumlahnya sudah cukup besar yaitu sekitar 6 juta ton. Sementara itu, TKKS belum banyak dimanfaatkan menjadi produk yang mempunyai nilai tambah (Novia *et al.*, 2011). TKKS yang jumlahnya 23% dari satu ton tandan buah segar (TBS) hanya dimanfaatkan sebagai mulsa atau kompos, sedangkan serat dan sebagian cangkang sawit biasanya digunakan sebagai bahan bakar boiler di pabrik (Goenadi *et al.*, 1998). Oleh karena itu, perlu dilakukan pemanfaatan TKKS untuk memberikan nilai tambah dan mengurangi jumlah limbah pabrik.

TKKS memiliki kandungan lignoselulosa sebesar 55-60 % berat kering (Rahmalia *et al.*, 2015). Namun lignoselulosa ini tidak dapat dimanfaatkan menjadi pangan maupun pakan tetapi keberadaannya cukup melimpah, murah dan terbarukan (Novia *et al.*, 2011). Lignoselulosa sendiri tersusun oleh 3 komponen utama yaitu selulosa (30-50% berat), hemiselulosa (15-35% berat) dan lignin (13-30% berat). Tingginya kadar selulosa pada polisakarida tersebut dapat dihidrolisis sehingga menghasilkan gula sederhana (Usmana *et al.*, 2012). Hidrolisis selulosa tersebut dapat dilakukan secara enzimatik dengan menggunakan kapang selulolitik (Anwar *et al.*, 2010).

Pada penelitian Tong dan Rajendra (1992) menyebutkan bahwa dari 48 isolat kapang yang diuji aktivitas selulolitiknya, *Aspergillus* sp. merupakan

kapang dengan aktivitas selulolitik tertinggi pada media *filter paper* dan substrat selulosa lainnya. Di samping itu, kapang dari genus *Pestalotiopsis* diketahui dapat menghasilkan enzim selulase yang memiliki aktivitas tinggi pada selulosa murni. Menurut Yuniar (2013) *Pestalotiopsis* sp. merupakan salah satu dari lima jenis kapang yang ditemukan pada tandan kosong kelapa sawit dan memiliki efisiensi selulase yang lebih tinggi pada TKKS. Hidrolisis enzimatis dengan menggunakan dua jenis isolat ini diharapkan mampu menghasilkan gula reduksi maksimal melalui proses enzimatis keduanya. Sehingga, hasil gula dari hidrolisat dapat dimanfaatkan sebagai alternatif media pertumbuhan.

Protein sel tunggal (PST) masih menjadi salah satu pemenuhan kebutuhan protein yang tinggi. *Saccharomyces cerevisiae* merupakan PST yang sering dimanfaatkan dalam industri makanan dan minuman karena aman dikonsumsi. Ukurannya yang lebih besar dari mikroorganisme yang lain, sangat berkompeten untuk diproduksi skala besar. *S. cerevisiae* bersifat heterotrof, dapat tumbuh dalam karbohidrat sederhana seperti glukosa, sukrosa dan fruktosa sebagai sumber karbonnya (Nuraida *et al.*, 1996). Oleh karena itu, hidrolisat TKKS dengan kandungan gula reduksinya diharapkan mampu digunakan sebagai media tumbuh alternatif dari *S. cerevisiae*.

1.2 Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah dari penelitian ini yaitu:

1. Apakah hidrolisis TKKS oleh *Aspergillus* sp. dan *Pestalotiopsis* sp. ataupun keduanya dapat meningkatkan konsentrasi gula reduksi?
2. Apakah hidrolisat TKKS dapat digunakan sebagai media tumbuh PST *S. cerevisiae*?
3. Berapa konsentrasi optimum hidrolisat dan waktu optimum pertumbuhan PST *S. cerevisiae*?

1.3 Batasan Penelitian

Batasan penelitian ini yaitu analisis gula reduksi dari masing-masing perlakuan dan pengukuran pertumbuhan *S. cerevisiae* pada hidrolisat TKKS dengan batasan konsentrasi dan waktu optimum pertumbuhan.

1.4 Tujuan

Berdasarkan rumusan masalah penelitian ini bertujuan untuk:

1. Meningkatkan konsentrasi gula reduksi hasil dari hidrolisis TKKS oleh *Aspergillus* sp. dan *Pestalotiopsis* sp. ataupun keduanya.
2. Menumbuhkan PST *S. cerevisiae* pada hidrolisat hasil hidrolisis TKKS oleh *Aspergillus* sp. dan *Pestalotiopsis* sp. ataupun keduanya.
3. Mengetahui konsentrasi optimum hidrolisat dan waktu optimum pertumbuhan *S. cerevisiae* pada hidrolisat TKKS.

1.5 Manfaat

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi bahwa TKKS memiliki nilai guna lebih sebagai media tumbuh PST *S. cerevisiae*.

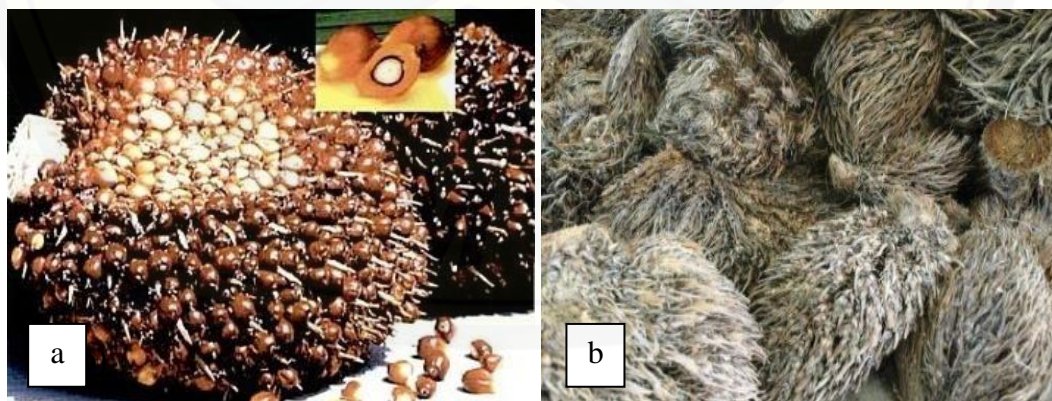
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS)

TKKS adalah salah satu produk sampingan berupa padatan dari industri pengolahan kelapa sawit. Ketersediaan TKKS cukup signifikan bila ditinjau berdasarkan rata-rata jumlah produksi TKKS terhadap total jumlah tandan buah segar (TBS) yang diproses (Darnoko dalam Yuniar, 2013). TKKS mempunyai karakteristik berukuran besar, didominasi bahan selulosa dan lignin, dan nilai C/N yang tinggi, sehingga secara alami TKKS merupakan bahan yang sulit didekomposisi (Sutanto, 2002).

Klasifikasi *Elaeis guineensis* Jacq. menurut Pahan (2008), adalah sebagai berikut:

Kindom	: Plantae
Divisi	: Embryophyta Siphonogama
Kelas	: Angiospermae
Ordo	: Monocotyledonae
Famili	: Arecaceae
Genus	: <i>Elaeis</i>
Spesies	: <i>Elaeis guineensis</i> Jacq.



Gambar 2.1 a) Tandan Buah Segar (TBS) (Pahan, 2008) dan b) Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS) (Novia *et al.*, 2011).

Tabel 2.1 Komponen Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS)

Komponen	% Berat
Selulosa	44,2
Hemiselulosa	33,5
Lignin	20,4

Sumber : (Aziz *et al.*, 2002).

Selulosa dan hemiselulosa yang terdapat dalam TKKS berpotensi untuk dimanfaatkan menjadi berbagai produk yang lebih berharga seperti asam-asam organik, pelarut etanol, aseton, butanol, PST, xanthan, zat antibiotika dan berbagai produk lainnya. Sementara lignin yang terkandung dalam TKKS perlu dihilangkan terlebih dahulu atau disebut dengan delignifikasi (Soraya *et al.*, 2012). Delignifikasi bertujuan untuk menghilangkan lignin, juga dapat mengurangi kristalinitas selulosa, dan meningkatkan porositas bahan. Perlakuan pendahuluan ini dapat dilakukan secara fisika, fisiko-kimia, kimia, biologis maupun kombinasi dari cara-cara tersebut (Kumar *et al.*, 2009).

Tabel 2.2 Komposisi limbah yang dihasilkan pada pengolahan minyak sawit (CPO) di salah satu pabrik di Kabupaten Kotawaringin Barat, Kalimantan Tengah.

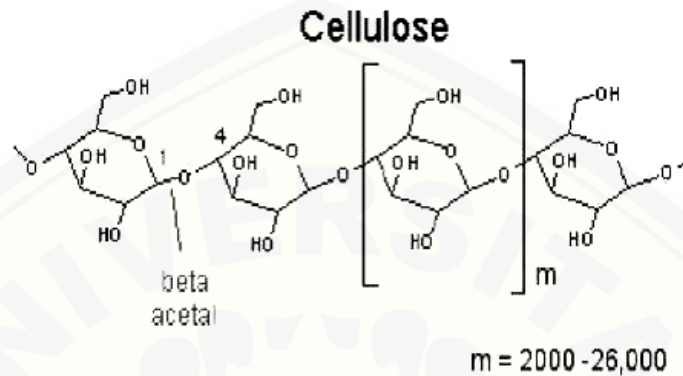
Diskripsi	Kisaran produksi	
	(%)	(t/hari)
Tandan buah segar	100	600 – 700
<i>Crude palm oil</i>	23	138 – 161
Limbah cair	8,50	51 - 59,50
Limbah padat		
Tandan Buah Kosong	16	96 – 112
Serat perasan buah	26	156 – 186
Bungkil inti sawit	4	24 – 28
Cangkang	6	36 – 42
Solid	3	18 – 21
Limbah Lain	50	81 - 94,40

Sumber : (Utomo, 2001)

2.1.1 Selulosa

Selulosa adalah polymer glukosa yang tidak bercabang. Bentuk polymer ini memungkinkan selulosa saling terikat membentuk serat yang sangat kuat. Panjang molekul selulosa ditentukan oleh jumlah unit glucan di dalam polymer,

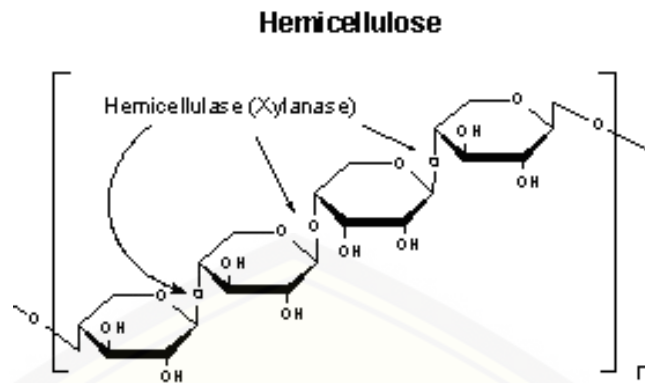
disebut dengan derajat polymerisasi. Derajat polymerase selulosa tergantung pada jenis tanaman dan umumnya dalam kisaran 2000 – 27000 unit glucan. Selulosa dapat dihidrolisis menjadi glukosa dengan menggunakan asam atau enzim. Selanjutnya glukosa yang dihasilkan dapat difermentasi menjadi etanol.



Gambar 2.2 Struktur Kimia Selulosa (Usmana *et al.*, 2012).

2.1.2 Hemiselulosa

Hemiselulosa mirip dengan selulosa yang merupakan polymer gula. Namun, berbeda dengan selulosa yang hanya tersusun dari glukosa, hemiselulosa tersusun dari bermacam macam jenis gula. Monomer gula penyusun hemiselulosa terdiri dari monomer gula berkarbon 5 (C-5) dan 6 (C-6), misalnya xylosa, mannose, glukosa, galaktosa, arabinosa, dan sejumlah kecil rhamnosa, asam glukoroat, asam metal glukoronat, dan asam galaturonat. Hemiselulosa lebih mudah dihidrolisis daripada selulosa, tetapi gula C-5 lebih sulit difermentasi menjadi etanol daripada gula C-6.



Gambar 2.3 Struktur Kimia Hemiselulosa (Usmana *et al.*, 2012).

2.1.3 Lignin

Lignin adalah salah satu komponen penyusun tanaman. Secara umum tanaman terbentuk dari selulosa, hemiselulosa, dan lignin. Komposisi bahan penyusun ini berbeda-beda bergantung pada jenis tanaman. Pada batang tanaman, lignin berfungsi sebagai bahan pengikat komponen penyusun lainnya, sehingga suatu pohon bisa berdiri tegak (Usmana *et al.*, 2012).

Lignin adalah molekul kompleks yang tersusun dari unit phenylpropane yang terikat di dalam struktur tiga dimensi. Lignin adalah material yang paling kuat di dalam biomassa. Lignin sangat resisten terhadap degradasi, baik secara biologi, enzimatik, maupun kimia. Karena kandungan karbon yang relatif tinggi dibandingkan dengan selulosa dan hemiselulosa, lignin memiliki kandungan energi yang tinggi (Usmana *et al.*, 2012).

2.2 Hidrolisis menggunakan Enzim Ekstraseluler

Hidrolisis secara umum diartikan sebagai pemecahan molekul kimia akibat reaksi air (Donald, 2008). Satu fragmen dari molekul yang ikatannya dipecah akan menerima ion H^+ sedangkan fragmen lainnya menerima ion OH^- (Gardgaud, 2011). Kandungan polisakarida pada TKKS seperti selulosa dan hemiselulosa dapat dipecah menjadi monomer gula penyusunnya melalui proses hidrolisis (Seftian *et al.*, 2012). Pada hidrolisis sempurna selulosa akan menghasilkan

glukosa, sedangkan hemiselulosa menghasilkan beberapa monomer gula pentose (C5) dan heksosa (C6).

Hidrolisis dapat dilakukan secara kimia atau enzimatik. Proses hidrolisis secara enzimatik dapat menggunakan enzim ekstraseluler kapang. Enzim-enzim tersebut bersifat spesifik dan hanya bereaksi pada substrat tertentu (Goldberg, 2007). Enzim selulase adalah enzim yang bisa mengurai selulosa menjadi glukosa (Seftian *et al.*, 2012). Enzim tersebut terdiri dari beberapa jenis dengan peranan yang berbeda. Enzim β -1,4-glukanase berperan dalam memecah ikatan β -1,4-glikosidik pada selulosa. Enzim tersebut dikelompokkan menjadi endo- β -1,4-glukanase yang berperan pada pemutusan selulosa pada bagian amorf dan ekso- β -1,4-glukanase (selobiohidrolase) yang berperan pada pemutusan ujung selulosa. Sementara β -glukosidase berperan dalam mengkonversi selobiosa hasil pemecahan rantai selulosa oleh β -1,4-glukanase menjadi glukosa (Sari *et al.*, 2014).

Hidrolisis enzimatik memiliki beberapa keuntungan dibandingkan hidrolisis asam, antara lain: tidak terjadi degradasi gula hasil hidrolisis, kondisi proses yang lebih rendah (suhu rendah), berpotensi memberikan hasil yang tinggi dan biaya pemeliharaan peralatan relatif rendah karena tidak ada bahan yang korosif. Beberapa kelemahan dari hidrolisis enzimatik antara lain adalah membutuhkan waktu yang lebih lama, dan kerja enzim dihambat oleh produk. Di sisi lain harga enzim saat ini lebih mahal daripada asam sulfat, namun demikian pengembangan terus dilakukan untuk menurunkan biaya dan meningkatkan efisiensi hidrolisis maupun fermentasi (Isroi, 2008).

Hambatan proses hidrolisis selulosa baik secara asam maupun enzimatik adalah adanya struktur kristalin dan lignin yang berfungsi sebagai pelindung selulosa (Judoamidjojo *et al.*, 1989). Hambatan tersebut dapat diatasi dengan pretreatment terhadap bahan yang akan dihidrolisis. Salah satu metode perlakuan pendahuluan secara kimia adalah perlakuan delignifikasi menggunakan NaOH. Larutan NaOH berfungsi untuk merusak struktur lignin, bagian kristalin dan amorf pada selulosa, memisahkan lignin dan hemiselulosa serta menyebabkan pengembangan struktur selulosa (Gunam *et al.*, 2010). Struktur kristalin dan

lignin merupakan pelindung dari selulosa yang nantinya dapat menghambat penetrasi dari enzim (Gunam *et al.*, 2011). Disamping itu juga perlu dilakukan pengaturan konsentrasi substrat. Substrat yang terlalu tinggi dapat menyebabkan media fermentasi menjadi agak pekat, sehingga menimbulkan masalah dalam sirkulasi udara, penurunan tingkat homogenitas dan penyebaran kapang (Hardjo *et al.*, 1989).

Produksi komersial selulase pada umumnya menggunakan kapang atau bakteri yang telah diisolasi. Meskipun banyak mikroorganisme yang dapat mendegradasi selulosa, hanya beberapa mikroorganisme yang memproduksi selulase dalam jumlah yang signifikan yang mampu menghidrolisa kristal selulosa. Kapang adalah mikroorganisme utama yang dapat memproduksi selulase, meskipun beberapa Bakteri dan Actinomycetes telah dilaporkan juga menghasilkan aktivitas selulase. Kapang berfilamen seperti *Aspergillus* adalah penghasil enzim selulase secara komersial. Kapang-kapang tersebut sangat efisien dalam memproduksi enzim selulase (Kumar *et al.*, 2009).

2.2.1 *Aspergillus* sp.

Mikroorganisme yang berkemampuan baik dalam menghasilkan enzim adalah *Aspergillus*. Beberapa jenis enzim yang penting penerapannya dalam bidang industri pertanian yang dapat dihasilkan oleh *Aspergillus* sp. adalah amilase, selulase (Frasier, 1981), dan amiloglukosidase (Blain, 1975). *Aspergillus* sp. digunakan secara komersil dalam produksi asam sitrat, asam glukonat dan pembuatan beberapa enzim seperti selulase, amilase, pektinase, dan amiloglukosidase. *Aspergillus* sp. memerlukan mineral $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , MgSO_4 , urea, $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, FeSO_4 , dan $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ untuk menghasilkan enzim selulase (Novia *et al.*, 2011).

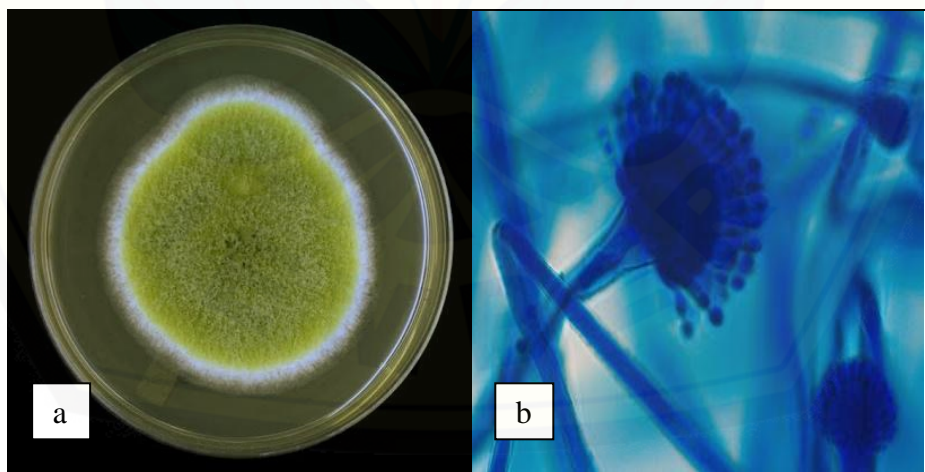
Aspergillus sp. mempunyai kepala pembawa konidia yang besar, padat, bulat dan berwarna hitam coklat atau ungu coklat. Kapang ini mempunyai bagian yang khas yaitu hifanya berseptat, spora yang bersifat aseksual dan tumbuh memanjang di atas stigma, mempunyai sifat aerobik, sehingga dalam pertumbuhannya memerlukan oksigen dalam jumlah yang cukup. *Aspergillus* sp.

mampu tumbuh optimum pada suhu 37 °C dan pada pH 6,5. Sedangkan suhu dan pH optimum bagi aktivitas selulase ialah 44 °C dan 4,5 (Tong dan Rajendra, 1992).

Klasifikasi *Aspergillus* sp. menurut Hardjo *et al.*, (1989) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Fungi
Filum : Amastigmycota
Kelas : Ascomycetes
Ordo : Eutiales
Famili : Eurotiaceae
Genus : *Aspergillus*
Spesies : *Aspergillus* sp.

Aspergillus sp. menghasilkan β -glukosidase tinggi akan tetapi endo- β -1, 4-glukanase dan ekso- β -1,4 glukanasenya rendah (Juhasz *et al.*, 2003). Oleh karena itu perlu adanya penambahan β -glukosidase dari luar untuk mempercepat konversi selobiosa menjadi glukosa dengan cara mengkombinasikan enzim dari kapang selulolitik lainnya (Safaria *et al.*, 2013).



Gambar 2.4 a) Morfologi koloni *Aspergillus* sp. b) Morfologi *Aspergillus* sp. perbesaran 1000x (Yuri, 2012).

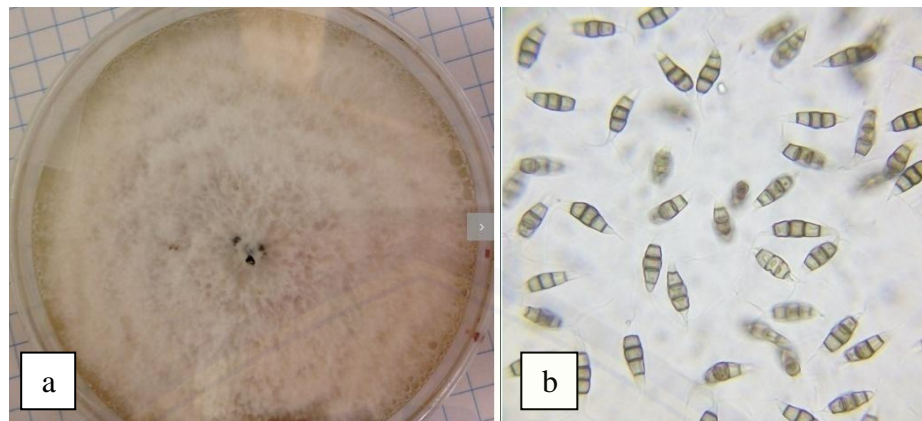
2.2.2 *Pestalotiopsis* sp.

Kapang dari genus *Pestalotiopsis* merupakan kapang yang bersifat endofitik atau parasitik pada tumbuhan dan mampu menghasilkan berbagai metabolit kimia. Morfologi telah digunakan sebagai pengklasifikasian genus, dengan karakter konidia untuk membedakan spesies dan genus yang berkerabat (Maharachchikumbura *et al.*, 2011).

Klasifikasi *Pestalotiopsis* sp. menurut National Center for Biotechnology Information (NCBI) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Fungi
Filum : Ascomycota
Kelas : Sordariomycetes
Ordo : Xylariomycetidae
Famili : Xylariales
Genus : Amphisphaeriaceae
Spesies : *Pestalotiopsis* sp.

Berdasarkan penelitian Arfi *et al.*, (2013) *Pestalotiopsis* sp. yang diisolasi dari *Rhizophora stylosa* menghasilkan 400 enzim lignoselulolitik yang sebagian besar terlibat dalam degradasi lignin. Dalam *Submerged Fermentation* (SMF) aktivitas selulase tertinggi *Pestalotiopsis* sp. pada hari ke-6 dan pH 7. Sedangkan dalam *Solid-state Fermentation* (SSF) aktivitas xilanase tertinggi pada hari ke-9 dan pH 9 (Maria *et al.*, 2005). Meskipun masih belum banyak diketahui kemampuan dari genus ini dalam menghasilkan enzim selulase, namun berdasarkan penelitian Yuniar (2013) membuktikan bahwa salah satu spesies dari genus *Pestalotiopsis* ini dapat menghasilkan enzim selulase yang memiliki aktivitas tinggi, baik pada *Carboxymethyl Cellulose* (CMC) yang merupakan selulosa murni serta TKKS yang terdiri dari bermacam komponen seperti selulosa, hemiselulosa, dan lignin.



Gambar 2.5 a) Koloni *Pestalotiopsis* sp. (Rossi, 2015) b) Spora *Pestalotiopsis* sp. 1000x (Shroomy, 2015).

2.3 Protein Sel Tunggal *S. cerevisiae*

PST adalah istilah yang digunakan untuk protein kasar atau murni yang berasal dari mikroorganisme, seperti bakteri, khamir, kapang, ganggang dan protozoa. Terdapat dua istilah yang digunakan untuk produk mikroba ini, yaitu Protein Sel Tunggal (PST) dan Microbial Biomass Product (MBP) atau Produk Biomassa Mikrobial (PBM). Apabila mikroba yang digunakan tetap berada dan bercampur dengan massa substratnya maka seluruhnya dinamakan PBM. Bila mikrobanya dipisahkan dari substratnya maka hasil panennya merupakan PST (Tannemaum dalam Muhiddin *et al.*, 2009).

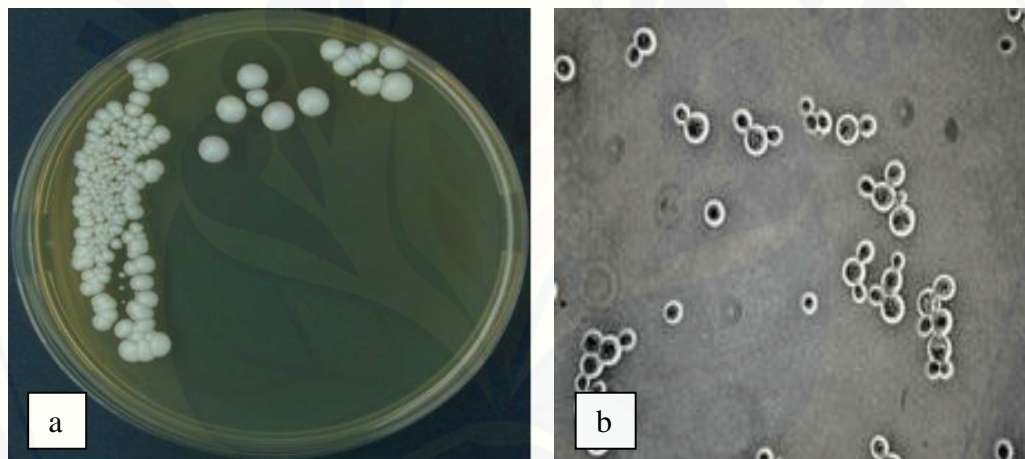
Klasifikasi *S. cerevisiae* menurut NCBI adalah sebagai berikut:

Kingdom : Fungi
Filum : Ascomycota
Kelas : Saccharomycetes
Ordo : Saccharomycetales
Famili : Saccharomycetaceae
Genus : Saccharomyces
Spesies : *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae merupakan khamir sejati tergolong eukariot yang secara morfologi hanya membentuk blastospora berbentuk bulat lonjong, silindris, oval atau bulat telur yang dipengaruhi oleh strainnya. Berkembangbiak melalui

“*budding cell*”. Reproduksiya dapat dipengaruhi oleh keadaan lingkungan serta jumlah nutrisi yang tersedia bagi pertumbuhan sel. Penampilan koloni berbentuk bulat, warna kuning muda, permukaan berkilau, licin, tekstur lunak dan memiliki sel bulat dengan askospora 1- 8 buah (Ahmad, 2005).

Khamir berkembang biak dalam gula sederhana seperti glukosa, maupun gula kompleks disakarida yaitu sukrosa (Marx, 1991). Khamir juga memerlukan oksigen, karbohidrat, dan nitrogen. Pada uji fermentasi gula, khamir ini mempunyai reaksi positif pada gula dekstrosa, galaktosa, sukrosa, maltosa, raffinosa, trehalosa, dan reaksi negatif pada gula laktosa (Lodder, 1970). Khamir *S. cerevisiae* dapat dimanfaatkan sebagai probiotik, prebiotik dan imunostimulan serta kegunaan lain dalam meningkatkan produksi ternak (Ahmad, 2005).



Gambar 2.6 a) Koloni *Saccharomyces cerevisiae* (Department of Veterinary Disease Biology, 2011) b) Sel *Saccharomyces cerevisiae* perbesaran 1000x (Viticulture and Enology, 2014).

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember. Waktu pelaksanaan penelitian dimulai pada bulan Januari 2016 sampai bulan November 2016.

3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian terdiri dari spektrofotometer Metash, *haemocytometer*, sentrifuge, neraca analitik, cawan petri, tabung reaksi, botol dan tutupnya, minipore, *filter glass*, kertas lakmus, rak tabung reaksi, jarum ose, labu erlenmeyer, pipet volume, spatula, gelas ukur, *Beaker glass*, autoklaf, *shaker*, microtube, inkubator, oven, lemari es, kantong teh kosong, nampan, mikro pipet, tip, pipet tetes, vortek, ayakan tepung, penangas air, *laminar air flow* (LAF), lampu bunsen, korek api, *marker*, mikroskop olympus, batang L, mortar dan alu serta kamera.

Bahan - bahan yang digunakan dalam penelitian adalah tandan kosong kelapa sawit (TKKS), isolat *Aspergillus* sp. (VTM1) dan isolat *Pestalotiopsis* sp. (VM9) serta isolat *S. cerevisiae* yang diperoleh dari Balai Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT) Tangerang Selatan, media *Potato Dextrose Agar* (PDA), media *Yeast Extract Peptone Dextrose* (YEPD), etanol, NaOH, asam asetat, akuades, garam fisiologis, alkohol 70%, kapas, kertas dorslag, kertas tisu, kertas label, kertas saring Whatman no 1 ukuran 1x6 cm, glukosa anhidrat, reagen *Somogyi* dan *Nelson*.

3.3 Prosedur Penelitian

Terdapat tiga tahapan utama dalam penelitian ini, yaitu persiapan bahan penelitian, fermentasi substrat TKKS menggunakan *Aspergillus* sp. (VTM1) dan *Pestalotiopsis* sp. (VM9) dan produksi PST *S. cerevisiae* pada media hasil hidrolisis TKKS.

3.3.1 Persiapan Penelitian

a. Pre-Kultur *Aspergillus* sp. (VTM1) dan *Pestalotiopsis* sp. (VM9).

Pre-Kultur *Aspergillus* sp. dan *Pestalotiopsis* sp. dilakukan dengan menginokulasikan 1 ose isolat ke dalam 10 ml media PDA padat dalam cawan petri secara *streak plate*, kemudian diinkubasi selama 72 jam pada suhu 30°C. Selanjutnya 1 ose isolat disubkultur pada 5 ml PDA miring pada tabung reaksi dan diinkubasi selama 72 jam pada suhu 30°C sebagai stok isolat kapang.

b. Pre-Kultur *Saccharomyces cerevisiae*

Pre-Kultur *S. cerevisiae* dilakukan dengan menginokulasikan 1 ose isolat ke dalam 10 mL media YEPD pada cawan petri dengan cara *streak plate* kemudian, diinkubasi selama 72 jam pada suhu 30°C. Selanjutnya 1 ose isolat disubkultur pada 5 ml YEPD miring pada tabung reaksi dan diinkubasi selama 72 jam pada suhu 30°C sebagai stok isolat khamir.

c. Pembuatan Substrat Alkali TKKS

TKKS dikeringkan kemudian dipotong kecil dan dihaluskan. Selanjutnya diayak dengan ayakan tepung hingga diperoleh bubuk halus TKKS. Sebanyak 200 gr bubuk TKKS ditambah 1000 ml akuades dan ditambah dengan 80 gram NaOH lalu distirer selama 24 jam. Ditambahkan asam asetat (CH_3COOH) hingga mendekati pH 7. Kemudian hidrolisat difiltrasi menggunakan kertas saring. Sisa ampas di elusi dengan akuades dan difiltrasi kembali. Total filtrat yang didapatkan kemudian disentrifuge pada 5000 rpm (revolutions per minute) selama 10 menit. Selanjutnya dilakukan ekstraksi menggunakan 97% dengan perbandingan alkohol 97%:supernatan=6:4 lalu disimpan di kulkas selama satu malam. Setelah itu disentrifugasi pada 8000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang dan pellet atau dicuci dengan etanol. Kemudian dikeringkan dalam inkubator bersuhu 50°C sampai kering lalu dihaluskan dengan mortar dan diayak.

d. Pembuatan Kurva Kepadatan Spora

Kapang ditumbuhkan pada media agar TKKS alkali 0,1%. Media agar TKKS alkali 0.1% dibuat dengan mencampur 0,1 gram ekstrak alkali dan 1,7 gram agar dalam 100 ml akuades diatas *hot plate* hingga larut. Media disterilisasi dan diinkubasi selama 3 hari. Satu ose isolat kapang umur 3 hari yang telah

diremajakan diinokulasikan pada media agar TKKS alkali 0,1% dan diinkubasi selama 7 hari ($T = 30^{\circ}\text{C}$). Setiap 24 jam dilakukan perhitungan spora dengan menambahkan 1 ml akuades pada tabung biakan dan dikerik menggunakan ose kemudian dituang ke dalam 9 ml akuades steril. Kemudian jumlah spora dihitung menggunakan *haemocytometer* dengan rumus:

$$s = \frac{n}{L \times h \times d} \times 10^3$$

Keterangan : s = jumlah spora

n = rata-rata jumlah spora

L = luas bidang pandang ($0,04 \text{ mm}^2$)

h = kedalaman bidang hitung (0,1 mm)

d = faktor pengenceran (10^{-1})

10^3 = volume suspensi yang diambil (μl)

e. Perhitungan Kadar Air TKKS

Sebanyak 3 gram TKKS kasar dimasukkan dalam kantong bertali (5x ulangan) dan direndam pada akuades selama 30 menit. Selanjutnya, TKKS digantung hingga airnya tidak menetes lalu ditimbang untuk mengetahui berat basahnya (A). Kemudian TKKS dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C selama 6 jam dan ditimbang. Kemudian dioven lagi pada suhu yang sama selama 6 jam dan ditimbang lagi hingga berat konstan untuk mengetahui berat keringnya (B). TKKS dikeluarkan dan kantong bertali ditimbang beratnya (C). Kadar air dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kadar air} = A - (B + C)$$

Setelah diketahui kadar airnya, selanjutnya digunakan untuk membuat TKKS jenuh air yaitu 50 gram TKKS dimasukkan ke Erlenmeyer 500 ml kemudian ditambahkan air sesuai kadar air yang telah dihitung. Media disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit.

f. Pembuatan Reagen *Somogyi* dan *Nelson*

Pembuatan reagen *Somogyi* menggunakan beberapa jenis larutan. Larutan A yang mengandung 24 gr Natrium Karbonat (Na_2CO_3), 12 gr Potassium Sodium Tetrat Tetrahidat ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) dan 240 ml akuades. Larutan B mengandung 40 ml Kupfer (II) Sulfat Pentahidrat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 16 gr Natrium

Hydrogen Carbonat (Na_2HCO_3) dan 60 ml akuades. Larutan A dan larutan B dihomogenkan sebagai larutan C. Larutan D mengandung 180 gr Natrium Sulfat (Na_2SO_4) dan 300 ml akuades kemudian dipanaskan hingga larut dan ditunggu hingga dingin. Larutan C dan larutan D dihomogenkan dan di fill up hingga volume 1 liter. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 7 hari dalam botol gelap.

Pembuatan reagen *Nelson* dilakukan dengan membuat larutan A yang mengandung 50 gr Ammonium Heptamolybdate Tetrahydrate ($(\text{NH}_4)\text{MO}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$), 46 ml Sulfuric Acid (H_2SO_4) dan 500 ml akuades. Larutan B mengandung 6 gr Sodium Arsenat ($\text{NaH}_4\text{SO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$) dan 25 ml akuades. Selanjutnya, larutan A dan B dicampur dan di *fill up* dengan akuades hingga volume 1 liter dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dalam botol gelap.

g. Pembuatan Kurva Standar Glukosa

Membuat larutan glukosa konsentrasi $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ dari 0,01 gr glukosa yang dilarutkan pada akuades 100 ml. Kemudian dilakukan pengenceran sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi $0\ \mu\text{g}/\text{ml}$, $20\ \mu\text{g}/\text{ml}$, $40\ \mu\text{g}/\text{ml}$, $60\ \mu\text{g}/\text{ml}$, $80\ \mu\text{g}/\text{ml}$, dan $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$. Masing masing seri pengenceran ditambahkan 0,5 ml reagen *Somogyi* lalu dipanaskan 15 menit dan dibiarkan dingin. Setelah itu, ditambahkan 0,5 ml reagen *Nelson* dan 2,5 ml akuades. Kemudian divortex dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 500 nm. Kurva standart dibuat dengan membuat grafik hubungan antara kadar glukosa dengan absorbansi.

h. Pembuatan Kurva Standart Populasi Yeast

Pembuatan media YEPD padat pada cawan petri untuk peremajaan isolat, YEPD cair pada erlenmeyer sebagai media pertumbuhan dan YEPD cair tanpa inokulum untuk seri pengenceran. Stok isolat *S. cerevisiae* diinokulasikan 1 ose pada media YEPD padat pada cawan petri dan diinkubasi selama 3 hari ($T= 30^\circ\text{C}$). Kemudian 1 ose koloni tunggal dari stok cawan petri diinokulasikan pada YEPD cair dan diinkubasi *shaker* selama 3 hari ($T= 30^\circ\text{C}$). Dilakukan seri pengenceran *S. cerevisiae* sebagai berikut:

Kontrol = $0\ \mu\text{L}$ suspensi yeast + $1000\ \mu\text{L}$ YEPD cair tanpa inokulum

Pengenceran 5x = $200\ \mu\text{L}$ suspensi yeast + $800\ \mu\text{L}$ YEPD cair tanpa inokulum

Pengenceran 4x = 400 μ L suspensi yeast + 600 μ L YEPD cair tanpa inokulum

Pengenceran 3x = 600 μ L suspensi yeast + 400 μ L YEPD cair tanpa inokulum

Pengenceran 2x = 800 μ L suspensi yeast + 200 μ L YEPD cair tanpa inokulum

Pengenceran 0x = 1000 μ L suspensi yeast + 0 μ L YEPD cair tanpa inokulum

Masing-masing seri pengenceran diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm (3x ulangan). Selanjutnya dilakukan penghitungan jumlah sel menggunakan *haemocytometer*. Dibuat Kurva standart yang menghubungkan populasi sel yeast dan absorbansi.

3.3.2 Hidrolisis TKKS oleh *Aspergillus* sp. (VTM1) dan *Pestalotiopsis* sp. (VM9)

a. Hidrolisis TKKS dan Panen Hidrolisat

Hidrolisis TKKS menggunakan 4 perlakuan kapang dengan 1 perlakuan kontrol. Tahapan kerja dari masing-masing perlakuan dapat dilihat pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Prosedur Hidrolisis TKKS pada Variasi Perlakuan

Tahapan Kerja	Perlakuan				
	Kontrol	VTM1	VM9	VTM1+VM9	VM9+VTM1
Isolat	-	VTM1	VM9	VTM1	VM9
Tahap 1	Inokulasi ke media TKKS jenuh air	Inokulasi ke media TKKS jenuh air	Inokulasi ke media TKKS jenuh air	Inokulasi ke media TKKS jenuh air	Inokulasi ke media TKKS jenuh air
Tahap 2	Inkubasi 4 hari (T= 37 °C)	Inkubasi 4 hari (T= 37 °C)	Inkubasi 4 hari (T= 37 °C)	Inkubasi 4 hari (T= 37 °C)	Inkubasi 4 hari (T= 37 °C)
Tahap 3	Panen	Panen	Panen	Sterilisasi autoklaf	Sterilisasi autoklaf
Tahap 4	-	-	-	Inokulasi VM9	Inokulasi VTM1
Tahap 5	-	-	-	Inkubasi 4 hari (T= 37 °C)	Inkubasi 4 hari (T= 37 °C)
Tahap 6	-	-	-	Panen	Panen

Pemanenan dilakukan dengan menggunakan akuades dengan perbandingan TKKS:akuades = 1:4. Sehingga akuades yang digunakan saat panen sejumlah 200 ml. Kemudian, dilakukan shaker selama 6 jam untuk menghomogenkan. Selanjutnya, dilakukan filtrasi dengan menggunakan saringan

kemudian disentrifuge 4000 rpm selama 10 menit untuk menghilangkan pellet yang masih tersisa. Dilakukan filtrasi menggunakan minipore hingga diperoleh hidrolisat TKKS.

b. Analisis Konsentrasi Gula Reduksi dengan metode *Somogyi* dan *Nelson*

Sebanyak 0,5 ml hidrolisat TKKS ditambahkan 0,5 ml reagen *Somogyi* yang berfungsi untuk menghentikan reaksi enzimatik dan kemudian dididihkan selama 15 menit. Setelah dingin, ditambahkan 0,5 ml reagen *Nelson* yang berfungsi untuk mengikat gula reduksi hasil hidrolisis substrat. Selanjutnya ditambahkan 2,5 ml akuades dan diukur nilai absorbansi menggunakan spektrofotometer Metash pada panjang gelombang 500 nm 3x ulangan.

3.3.3 Pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* pada Hidrolisat TKKS

a. Optimasi Pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* Berdasarkan Konsentrasi Hidrolisat dan Waktu Inkubasi

Variasi konsentrasi hidrolisat yang digunakan yaitu konsentrasi 54,835 µg/ml dan konsentrasi 27,418 µg/ml masing-masing 2x ulangan. Variasi waktu yang digunakan yaitu jam ke-0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48 dan 54. Selanjutnya sebanyak 1 ose isolat *S. cerevisiae* diinokulasikan pada variasi konsentrasi dan diinkubasi selama 54 jam. Setiap variasi waktu diambil suspensi sebanyak 500 µl sebagai stok. Stok dapat disimpan di *freezer* agar sel yeast tidak tumbuh. Dari stok tersebut diambil 100 µl dan ditambahkan 900 µl akuades untuk diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm. Jumlah sel *S. cerevisiae* dapat dihitung melalui rumus pada kurva standart populasi yeast dan absorbansi.

b. Analisis Konsentrasi Sisa Gula Reduksi dengan Metode *Somogyi* dan *Nelson*

Stok di *freezer* dicairkan dan disentrifuge untuk mengendapkan sel *S. cerevisiae*. Diambil 50 µl dari masing-masing stok tersebut dan ditambahkan 450 µl akuades steril. Ditambahkan 500 µl reagen *Somogyi* yang berfungsi untuk menghentikan reaksi enzimatik dan lalu dipanaskan selama 15 menit. Setelah dingin ditambahkan 500 µl reagen *Nelson* yang berfungsi mengikat gula reduksi hasil hidrolisis substrat dan ditambahkan 2,5 ml akuades. Kemudian divortex dan

diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 500 nm dengan 3x ulangan.

3.4 Analisis Data

Analisis data pada penelitian ini menggunakan program SPSS 15.0 for Windows. Data hasil penelitian diolah dengan rancangan acak lengkap dengan tiga faktor. Faktor A yaitu 5 hidrolisat dari perlakuan isolat yang berbeda, faktor B yaitu 2 macam konsentrasi hidrolisat dan faktor C yaitu 10 variasi waktu inkubasi. Data tersebut kemudian dianalisis menggunakan ANOVA. Apabila hasilnya signifikan maka dilanjutkan dengan analisis Duncan's Multiple Range Test (DMRT) untuk mengetahui perbedaan rata-rata setiap kelompok perlakuan.

3.5 Tabulasi Data

Berikut adalah tabulasi data dari hasil penelitian ini:

3.5.1 Analisis Gula Reduksi

No	Perlakuan	Gula Reduksi ($\mu\text{g/ml}$) Means \pm Std. Deviasi
1	Kontrol	
2	<i>Aspergillus</i> sp. (VTM1)	
3	<i>Pestalotiopsis</i> sp. (VM9)	
4	<i>Aspergillus</i> sp. (VTM1)+ <i>Pestalotiopsis</i> sp. (VM9)	
5	<i>Pestalotiopsis</i> sp. (VM9)+ <i>Aspergillus</i> sp. (VTM1)	

3.5.2 Pertumbuhan *S. cerevisiae* pada hidrolisat TKKS dengan variasi konsentrasi dan waktu inkubasi

Waktu (jam)	Jumlah sel/ml	
	Konsentrasi 54,835 $\mu\text{g/ml}$	Konsentrasi 27,418 $\mu\text{g/ml}$
0		
6		
12		
18		
24		
30		

36
42
48
54

3.5.3 Pengukuran Sisa Gula Reduksi pada Media Tumbuh *S. cerevisiae* dengan variasi waktu inkubasi

Waktu (Jam)	Sisa Gula Reduksi	
	Konsentrasi 54,835 $\mu\text{g/ml}$	Konsentrasi 27,418 $\mu\text{g/ml}$
0		
6		
12		
18		
24		
30		
36		
42		
48		
54		

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan analisis ANOVA, perlakuan hidrolisis menggunakan *Aspergillus* sp. (VTM1) dan *Pestalotiopsis* sp. (VM9) maupun keduanya memberikan pengaruh terhadap hasil gula reduksi. Gula reduksi tertinggi dihasilkan pada perlakuan kapang *Pestalotiopsis* sp. (VM9) + *Aspergillus* sp. (VTM1) yakni sebesar 54,835 µg/ml. Hasil uji Duncan menunjukkan perbedaan yang nyata antara kontrol dan perlakuan, antara perlakuan *Pestalotiopsis* sp. (VM9) dan *Aspergillus* sp. (VTM1) + *Pestalotiopsis* sp. (VM9) juga berbeda nyata namun antara perlakuan *Aspergillus* sp. (VTM1) dan *Pestalotiopsis* sp. (VM9) + *Aspergillus* sp. (VTM1) hasilnya tidak berbeda nyata. *S. cerevisiae* dapat tumbuh dalam hidrolisat TKKS dengan konsentrasi optimum pada konsentrasi 27,418 µg/ml dan waktu pertumbuhan optimum 48 jam. Jumlah sel *S. cerevisiae* pada konsentrasi dan waktu optimum tersebut sekitar 33×10^6 sel/ml. Pertumbuhan *S. cerevisiae* pada media sejalan dengan penurunan gula reduksi sekitar sekitar 76% pada media tumbuhnya.

5.2 Saran

Perlu mengetahui kemampuan masing-masing kapang dalam menghidrolisis biomassa serta koordinasi keduanya. Selain itu, faktor-faktor pertumbuhan mikroba harus terpenuhi untuk mencapai pertumbuhan optimumnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, R. Z. 2005. Pemanfaatan Khamir *Saccharomyces cerevisiae* untuk Ternak. *Jitv*, 15(1): 49–55.
- Anwar, N., Widjaja, A., dan Winardi, S. 2010. Peningkatan Unjuk Kerja Hidrolisis Enzimatik Jerami Padi Menggunakan Campuran Selulase Kasar dari *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger*. *Makara, Sains*, 14(2): 113–116.
- Ardhana, M. M., dan Fleet, G. H. 2003. The Microbial Ecology of Cocoa Bean Fermentations In Indonesia. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1–2): 87–99.
- Arfi, Y., Chevret, D., Henrissat, B., Berrin, Jean-Guy, Levasseur, A., A., dan Record, E. 2013. Characterization of Salt-Adapted Secreted Lignocellulolytic Enzymes from The Mangrove Fungus *Pestalotiopsis* sp. *Nature Communications*, 4: 1810.
- Arnata, I. W. 2009. Pengembangan Alternatif Teknologi Bioproses Pembuatan Bioetanol dari Ubi Kayu Menggunakan *Trichoderma viride*, *Aspergillus niger* dan *Saccharomyces cerevisiae*. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor.
- Aziz, A. A., Husin, M., dan Mokhtar, A. 2002. Preparation of Cellulose from Oil Palm Empty Fruit Bunches via Ethanol Digestion : Effect of Acid and Alkali Catalysts. *Journal of Oil Palm Research*, 14(1): 9–14.
- Bantacut, T dan Pasaribu, H. 2015. Aliran Tertutup Massa dan Potensi Mandiri Energi pada Produksi CPO. *Jurnal Teknologi Industri Pertanian*, 25(3): 215–226.
- Beaman, W. L. 2011. Effect of Cell Density and Growth Phase on Malolactic Fermentation by *Oenococcus oeni*. *Journal of Agriculture and Life Sciences*, 1–14.
- Blain, J. A. 1975. *Industrial Enzyme Production*. London: Edward Arnold.
- Budiman, A. dan Setyawan, S. 2009. Pengaruh Konsentrasi Substrat, Lama Inkubasi dan pH dalam Proses Isolasi Enzim Xylanase dengan Menggunakan Media Jerami Padi. *Jurnal Teknik Kimia*, 1-12.
- Budiyanto, A. 2002. *Mikrobiologi Terapan*. Malang : Universitas Muhammadiyah Malang.
- Charoenchai, C., Fleet, G.H., D., dan Henschke, P. A. 1998. Effects of Temperature, pH, and Sugar Concentration on the Growth Rates and Cell

Biomass of Wine Yeasts. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49(3): 283-288.

Department of Veterinary Disease Biology, 2011. *Saccharomyces cerevisiae*. http://atlas.sund.ku.dk/microatlas/veterinary/fungus/Saccharomyces_cerevisiae/ . Diakses pada 6 Januari 2016

Donald, C. 2008. *Intisari Kimia Farmasi. 2nd ed.* Jakarta: EGC.

Elevri, P.A dan Putra, S. R. 2006. Produksi Etanol Menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* yang Diamobilisasi dengan Agar Batang. *Akta Kimindo*, 1(2): 105–114.

Frasier, W. 1981. *Food Microbiology*. New York: Tata Mc Graw Hill Publ. Co. Ltd.

Gandjar, I. dan Sjamsuridzal, W. 2006. *Mikologi Dasar dan Terapan 1st ed.* Jakarta: Yayasan Obor Indonesia.

Gardgaud, M. 2011. *Encyclopedia of Astrobiologi*. Berlin Heidelberg: Springer.

Goenadi, Didik, H. Away, Y. Sukin, Y. (1998). *Teknologi Produksi Kompos Bioaktif Tandan Kosong Kelapa Sawit*. Bogor: Unit Penelitian Bioteknologi Perkebunan.

Goldberg, D. T. 2007. *AP Biology 2nd Ed.* United State America: Barron's Educational Series.

Gunam, I. B. W., Buda, K., dan Guna, I. M. Y. S. 2010. Pengaruh Perlakuan Delignifikasi dengan Larutan NaOH dan Konsentrasi Sustrat Jerami Padi terhadap Produksi Enzim Selulase dari *Aspergillus niger* NRRL A-II, 264. *Jurnal Biologi*, 14(1): 55–61.

Gunam, I. B., Wartini, N. M., Anggreni, A. A., dan Suparyana, P. Ma. 2011. Delignifikasi Ampas Tebu dengan Larutan Natrium Hidroksida Sebelum Proses Sakaraifikasi Secara Enzimatis Menggunakan Enzim Selulase Kasar dari *Aspergillus niger* FNU 6018. *LIPI Teknologi Indonesia*, 34, 24–32.

Hardjo, S., Indrasti, N.S., dan Bantacut, T. 1989. *Biokonversi. Pemanfaatan Limbah Industri Pertanian*. Bogor: PAU Pangan dan Gizi IPB.

Isroi. 2008. Potensi Biomassa Lignoselulosa di Indonesia Sebagai Bahan Baku Bioetanol: Tandan Kosong Kelapa Sawit. <http://isro.wordpress.com>. Diakses 13 September 2015.

Judoamidjojo, R.M., E. . S. dan L. H. 1989. *Biokonversi*. Bogor: PAU Bioteknologi IPB.

- Juhasz, T., Kozma, K., Szengyel, Z., dan Reczey, K. 2003. Production of β -Glucosidase in Mixed Culture of *Aspergillus niger* BKMF 1305 and *Trichoderma reesei* RUT C30. *Food Technology and Biotechnology*, 41(1): 49–53.
- Kumar, P., Barret, M. Diane., Dewiche, M.J., dan Stroeve, P. 2009. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 48(8): 3713–3729.
- Kuswardani, I dan Wijajaseputra. 1998. Produksi Protein Sel Tunggal *Phanrochaele chrysosporium* pada media limbah cair tahu yang diperkaya kajian optimasi waktu panen. *Prosiding Seminar Teknologi Pangan dan Gizi*. 604-613
- Lingkungan, S. P. 2006. Subdit Pengelolaan Lingkungan. http://bandatanang.files.wordpress.com/2008/10/pedoman_pengelolaan_limbh_kelapa_sawit1.pdf. Diakses pada 24 Agustus 2015.
- Lodder, J. 1970. *The Yeast: A Taxonomic Study Second Revised and Enlarged Edition*. Amsterdam: The Netherland, Northolland Publishing Co.
- Machfud, Said, E. G., dan K. 1989. *Fermentor*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Maharachchikumbura, S. S. N., Guo, L. D., Chukeatirote, E., Bahkali, A. H., dan Hyde, K. D. 2011. Pestalotiopsis-Morphology, Phylogeny, Biochemistry and Diversity. *Fungal Diversity*, 50:167-187.
- Mahreni dan, & Suhenry, S. 2011. Kinetika Pertumbuhan Sel *Sacharomyces cerevisiae* Dalam Media Tepung Kulit Pisang. *Seminar Rekayasa Kimia Dan Proses*, 1–6.
- Maria, G. L., Sridhar, K. R., and Raviraja, N. S. 2005. Antimicrobial and Enzyme Activity of Mangrove Endophytic Fungi of Southwest Coast of India. *Journal of Agricultural Technology*, 1:67–80.
- Marx, J. L. 1991. *Revolusi Bioteknologi. Terjemahan: Wilder Yatim. Edisi I, Cetakan 1*. Jakarta: Yayasan Obor Indonesia.
- Mazzoleni, S., Landi, C., Carteni, F., Alteriis, E.D., Giannino, F., Paciello, L., dan Parascandola, P. 2015. A Novel Process Based Model of Microbial Growth: Self-Inhibition in *Saccharomyces cerevisiae* Aerobic Fed-Batch Cultures. *Microbial Cell Factories*, 14 (1), 1-14.
- Muhiddin, N. H., Juli, Nurhayati., dan Aryntha, I. N. P. 2009. Peningkatan Kandungan Protein Kulit Ubi Kayu melalui Proses Fermentasi. *Jurnal Matematika & Sains*, 6(1): 1–12.

- Muzakhar, K. 1952. Growth Profiles And Ethanol Production Of Two Yeast Strains *Kluyveromyces marxianus* IFO-288 And *Kluyveromyces marxianus* IFO-617 During Fermentation Of Soybean Pulp Hydrolyzate Substrates. *Biosciences And Biotechnology*, 72–77.
- NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Diakses 23 Desember 2016
- Novia, Faizal, M., Ariko, M. F., dan Yogamina, D. H. 2011. Hidrolisis Enzimatik dan Fermentasi TKKS yang Didelignifikasi dengan Asam Sulfat dan NaOH untuk Memproduksi Etanol. In *Prosiding Seminar Nasional AVoER ke-3*, 26–27.
- Nuraida, L., Sihombing, S.H., and Fardiaz, S. 1996. Produksi Karotenoid pada Limbah Cair Tahu, Air Kelapa dan Onggok oleh Kapang *Neurospora* sp. *Buletin Teknologi Dan Industri Pangan*, 7(1): 67–74.
- Pahan, I. 2008. *Panduan Lengkap Kelapa Sawit*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Purwitasari, E., Pangastuti, A., D., dan Setyaningsih, R. 2004. Pengaruh Media Tumbuh terhadap Kadar Protein *Saccharomyces cerevisiae* dalam Pembuatan Protein Sel Tunggal. *Bioteknologi*, 1(2): 37–42.
- Putri, L. S. E. 2008. Konversi Pati Ganyong (*Canna edulis* Ker) menjadi Bioetanol melalui Hidrolisis Asan dan Fermentasi. *Biodiversitas, Journal of Biological Diversity*, 9(2): 112–116.
- Rahmalia, W., Yulistira, F., Ningrum, J., Qurbaniah, M., dan Ismadi, M. 2015. Pemanfaatan Potensi Tandan Kosong Kelapa Sawit (*Elais guineensis* Jacq) sebagai Bahan Dasar C-Aktif untuk Adsorpsi Logam Perak dalam Larutan, 1–10.
- Reese, E. T. dan Mandels, M. 1959. Use of Enzymes in Isolation and Analysis of Polysaccharides. *Applied Microbiology*, 7: 378–387.
- Rossi, R. 2015. A Quick Update on The Marls Mangrove Fungi. <https://appliedecology.cals.ncsu.edu/absci/2015/03/a-quick-update-on-the-marls-mangrove-fungi/>. Diakses pada 6 Januari 2016.
- Roukas, T. 1996. Continuous Ethanol Production From Nonsterilized Carob Pod Extract By Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* On Mineral Kissiris Using A Two-Reactor System. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 59(3): 299–307.
- Safaria, S., Idiawati, N., dan Zaharah, T. A. 2013. Efektivitas Campuran Enzim Selulase dari *Aspergillus niger* dan *Trichoderma reesei* dalam Menghidrolisis Substrat Sabut Kelapa. *JKK*, 2(1): 46–51.
- Salsabila, U., Mardiana, D., dan Indahyanti, E. 2013. Kinetika Reaksi Fermentasi

- Glukosa Hasil Hidrolisis Pati Biji Durian Menjadi Etanol. *Kimia Student Journal*, 2(1): 331–336.
- Sari, R. N., Utomo, B. S. B., dan Tambunan, A. H. 2014. Kondisi Optimum Produksi Bioetanol dari Rumpun Laut Coklat (*Sargassum duplicatum*) Menggunakan *Trichoderma viride* dan *Pichia angophorae*. *JPB Perikanan*, 9(2): 121–132.
- Seftian, D., Antonius, F., dan Faizal, M. 2012. Pembuatan Etanol dari Kulit Pisang Menggunakan Metode Hidrolisis Enzimatik dan Fermentasi. *Jurnal Teknik Kimia*, 18(1) 10–16.
- Shroomy. 2015. Pestalotiopsis sensu lato from Ganoderma. <https://www.shroomery.org/forums/showflat.php/Number/21592435>, Diakses pada 23 Desember 2016.
- Soraya, P. I., N. dan H. 2012. Produksi Glukosa dari Tandan Kosong Kelapa Sawit yang Didelignifikasi dengan Ozonolysis Pretreatment melalui Metode Hidrolisis Enzimatik. In *Prosiding Seminar Nasional AVoER ke-4*, 348–355.
- Sutanto, R. 2002. *Penerapan Pertanian Organik*. Yogyakarta: Kanisius.
- Tong, C. and, dan Rajendra, K. 1992. Effect of Carbon and Nitrogen Sources on the Growth and Production of Cellulase Enzymes of a Newly Isolated *Aspergillus* sp . *Pertanika*, 15(1): 45–50.
- Usmana, A. S., Rianda, S., dan N. 2012. Pengaruh Volume Enzim dan Waktu Fermentasi terhadap Kadar Etanol (Bahan Baku Tandan Kosong Kelapa Sawit dengan Pretreatment Alkali). *Jurnal Teknik Kimia*, 18(2): 17–25.
- Utomo, N. U. 2001. Potential of Oil Palm Solid Wastes as Local Feed Resource for Cattle in Central Kalimantan, Indonesia. Netherlands: MSc. Thesis, Wageningen University.
- Wachid, M. 2011. Potensi Bioethanol dari Limbah Kulit Ari Kedelai Limbah Produksi Tempe. *Gamma*, 6: 113–122.
- Viticulture and Enology, 2014. Microscopy for the Winery. <http://wineserver.ucdavis.edu/industry/enology/winemicro/microscopy.htm>. Diakses pada 23 Desember 2016.
- Wahono, S. K., Damayanti, E., Rosyida, V. T., D., dan Sadyastuti, E. I. 2011. Laju Pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* pada Proses Fermentasi Pembentukan Bioetanol dari Biji Sorgum (*Sorghum bicolor* L). *Seminar Rekayasa Kimia Dan Proses*, 1–6.
- Young, M.M. 1985. The Principles, Application and Regulation of Biotechnology in Industry, Agriculture and Medicine. *Comprehensive Biotechnology*, I:

189-213.

Yuliana, N. 2008. Kinetika Pertumbuhan Bakteri Asam Laktat Isolat T5 Yang Berasal Dari Tempoyak. *Jurnal Teknologi Industri Dan Hasil Pertanian*, 13(2): 108–116.

Yuniar, W. 2013. Skrining dan Identifikasi Kapang Selulolitik pada Proses Vermikomposting Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS). *Skripsi*. Universitas Jember.

Yuri, 2012. *Aspergillus flavus*.

<http://thunderhouse4-yuri.blogspot.co.id/2012/02/aspergillus-flavus.html>.

Diakses pada 23 Desember 2016.



LAMPIRAN

A. KOMPOSISI MEDIA

A.1 Komposisi Media *Potato Dextrose Agar (PDA)*

No.	Bahan	Jumlah
1	Kentang	20 gram
2	Dextrose	1 gram
3	Agar	1,7 gram
4	Akuades	1000 ml

A.2 Komposisi Media *Yeast Extract Pepton Dextrose Agar (YPDA)*

No.	Bahan	Jumlah
1	Yeast Ekstrak	10 gram
2	Pepton	20 gram
3	Glukosa	20 gram
4	Agar	15 gram
5	Akuades	1000 ml

A.3 Komposisi Media *Yeast Extract Pepton Dextrose (YPD)*

No.	Bahan	Jumlah
1	Yeast Ekstrak	2,5 gram
2	Pepton	5 gram
3	Glukosa	3 gram
4	Akuades	1000 ml

B. KOMPOSISI REAGEN *SOMOGYI-NELSON*

B.1 Komposisi Reagen Somogyi dalam 1 Liter

No.	Bahan	Rumus Kimia	Jumlah
1	Natrium Karbonat	Na_2CO_3	24 g
2	Potassium Sodium Tetrat Tetrahidrat	$\text{C}_4\text{H}_4\text{KnaO} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	12 g
3	Kupfer (II) Sulfat Pentahidrat	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 10%	40 ml
4	Natrium Hydrogen Carbonat	NaHCO_3	16 g
5	Natrium Sulfat	Na_2SO_4	180
6	Akuades		1000

B.2 Komposisi Reagen Nelson dalam 1 Liter

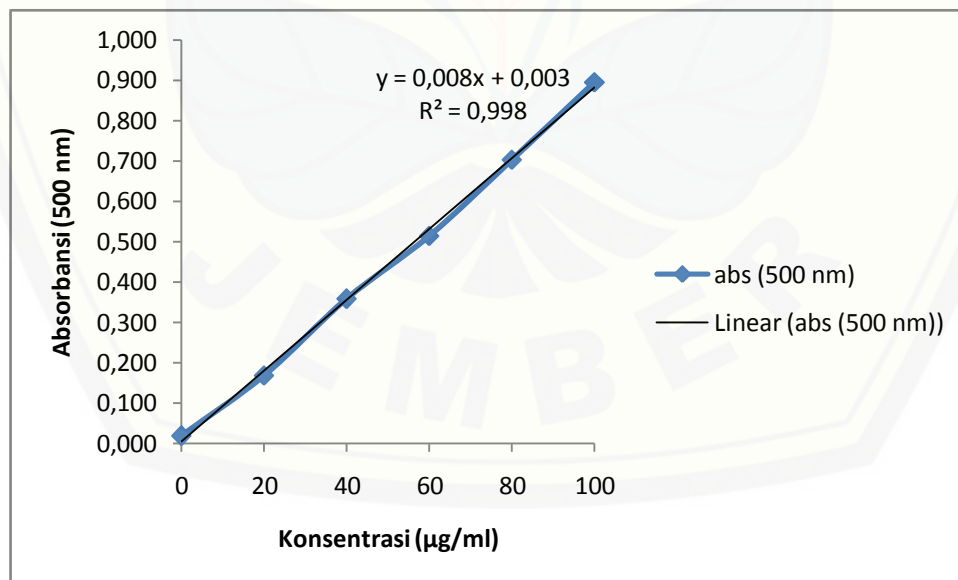
No.	Bahan	Rumus Kimia	Jumlah
1	Ammonium Heptamolybdate Tetrahydrate	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	50 g
2	Sulfuric Acid	H_2SO_4	46 ml
3	Sodium Arsenat	$\text{Na}_3\text{AsO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	6 g
4	Akuades		1000 ml

C. STANDART GLUKOSA

C.1 Nilai Absorbansi Standart Glukosa

No.	Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbansi (500 nm)
1	0	0,018
2	20	0,168
3	40	0,358
4	60	0,514
5	80	0,702
6	100	0,895

C.2 Kurva Standart Glukosa



D. PERTUMBUHAN *Aspergillus* sp. (VTM1) DAN *Pestalotiopsis* sp. (VM9)**D.1 Jumlah Spora *Aspergillus* sp. (VTM1)**

Hari	Jumlah spora/ml
1	$2,5 \times 10^5$
2	1×10^6
3	$2,5 \times 10^6$
4	7×10^6
5	$1,25 \times 10^7$
6	4×10^6
7	$3,75 \times 10^6$

D.2 Jumlah Spora *Pestalotiopsis* sp. (VM9)

Hari	Jumlah spora/ml
1	$7,5 \times 10^5$
2	$3,5 \times 10^6$
3	$8,5 \times 10^6$
4	$1,55 \times 10^7$
5	$1,05 \times 10^7$
6	$9,25 \times 10^6$
7	$8,25 \times 10^6$

E. HASIL OPTIMASI WAKTU HIDROLISIS TKKS**E.1 Hasil Optimasi Waktu Hidrolisis TKSS oleh *Aspergillus* sp. (VTM1)**

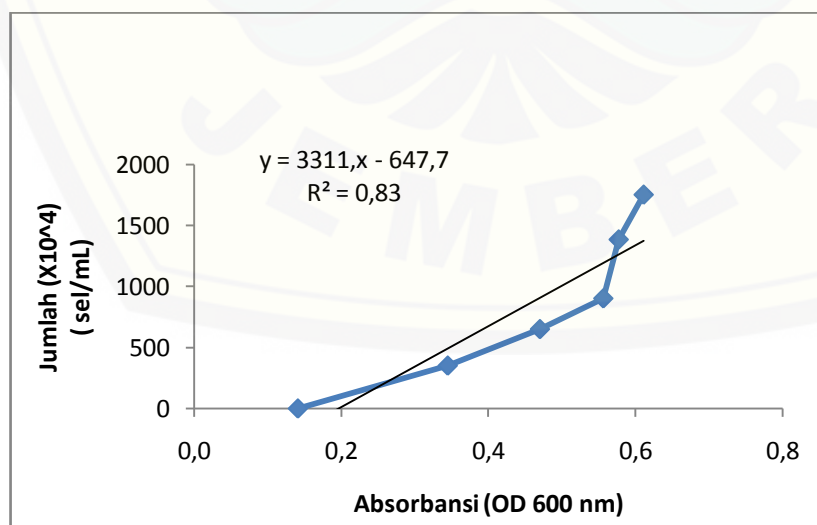
Waktu (Hari)	Gula reduksi ($\mu\text{g/ml}$)
0	0
1	0,953
2	1,205
3	1,214
4	1,218
5	1,174
6	1,152
7	1,240

E.2 Hasil Optimasi Waktu Hidrolisis TKSS oleh *Pestalotiopsis* sp. (VM9)

Waktu (Hari)	Gula reduksi ($\mu\text{g/ml}$)
1	1,227
2	1,126
3	1,205
4	1,311
5	1,426
6	1,360
7	1,369

F. STANDART POPULASI *S. cerevisiae* PADA HAEMOCYTOMETER DAN SPEKTROFOTOMETERF.1 Hasil Standart Populasi *S. cerevisiae* pada Haemocytometer dan Spektrofotometer

Konsentrasi	Absorbansi (600 nm)	Jumlah Sel/ml
Kontrol	0	0
5X	0,345	3550000
4X	0,470	6530000
3X	0,556	9056667
2X	0,577	13870000
0X	0,611	17553333

F.2 Kurva Standart Populasi *S. cerevisiae* pada Haemocytometer dan Spektrofotometer

G. HASIL ANALISIS DATA MENGGUNAKAN PROGRAM SPSS 15.0 FOR WINDOWS

G.1 Descriptives

No		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for		Minimum	Maximum
						Mean			
1	Kontrol	5	27,00880	,486206	,217438	26,40509	27,61251	26,522	27,565
2	VTM1	5	54,50440	6,628994	2,964576	46,27342	62,73538	46,609	60,783
3	VM9	5	35,54780	,736450	,329350	34,63338	36,46222	34,870	36,348
4	VTM1+VM9	5	48,52160	,822530	,367847	47,50029	49,54291	47,652	49,391
5	VM9+VTM1	5	54,83500	4,887132	2,185592	48,76682	60,90318	49,304	60,783
	Total	25	44,08352	11,759008	2,351802	39,22964	48,93740	26,522	60,783

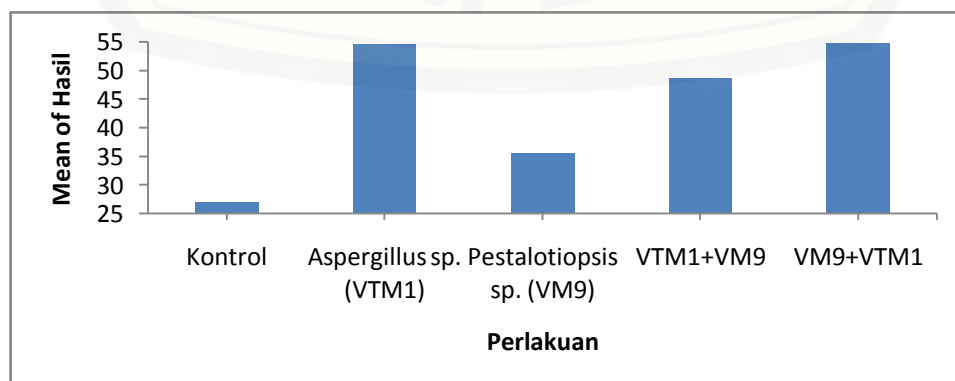
G.2 Uji ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3041,451	4	760,363	54,874	,000
Within Groups	277,132	20	13,857		
Total	3318,583	24			

G.3 Uji Duncan

Perlakuan	N	Subset for alpha = .05				
		1	2	3	4	1
Kontrol	5	27,00880				
VM9	5		35,54780			
VTM1 + VM9	5			48,52160		
VTM1	5				54,50440	
VM9 + VTM1	5					54,83500
Sig.		1,000	1,000	1,000		,890

G.4 Means Plots



H. PERBANDINGAN GULA REDUKSI

H.1 Gula Reduksi dengan 1x Panen

K (µg/ml)	1x Panen							
	VTM1		VM9		VTM1 + VM9		VM9 + VTM1	
	µg/ml	% kenaikan gula	µg/ml	% kenaikan gula	µg/ml	% kenaikan gula	µg/ml	% kenaikan gula
27,009	54,504	50	35,549	24	48,522	44	54,835	51

H.2 Gula Reduksi dengan 2x Panen

Kontrol (µg/ml)			2X Panen											
			VTM1 + VM9						VM9 + VTM1					
			G1 VTM1		G2 VM9		VTM1 + VM9		G1 VM9		G2 VTM1		VM9 + VTM1	
G1	G2	GI+G2	µg/ml	% kenaikan gula	µg/ml	% kenaikan gula	µg/ml	% kenaikan gula	µg/ml	% kenaikan gula	µg/ml	% kenaikan gula	µg/ml	% kenaikan gula
91,000	57,565	148,565	170,696	47	98,887	42	269,583	45	117,861	23	86,035	33	203,896	27