



**BIODEGRADASI BATANG TEMBAKAU MENGGUNAKAN**

*Trichoderma viride*

**SKRIPSI**

Oleh

**Faranita Lutfia Normasari**

**NIM 131710101029**

**PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN**

**FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN**

**UNIVERSITAS JEMBER**

**2020**



**BIODEGRADASI BATANG TEMBAKAU MENGGUNAKAN**

*Trichoderma viride*

**SKRIPSI**

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan studi pada Program Studi Teknologi Hasil Pertanian (S-1) dan mencapai gelar Sarjana Teknologi Pertanian

oleh

**Faranita Lutfia Normasari**

**NIM 131710101029**

**PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN**

**FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN**

**UNIVERSITAS JEMBER**

**2020**

## PERSEMBAHAN

Sembah sujud serta syukur kepada Allah SWT, Maha Pemberi Karunia dan Ilmu yang dengan kuasa-Nya memberikan dan menipkan ilmu yang penuh dengan karunia dan barokah kepada hamba-Nya. Atas kuasa-Nya juga memberi kemudahan dalam menyelesaikan skripsi ini.

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Ibu dan Ayah sebagai tanda bakti, sayang, dan rasa terimakasih yang tak terhingga.
2. Pembimbing, dosen, dan semua guruku tersayang sejak TK hingga perguruan tinggi yang senantiasa selalu berusaha menyalurkan semua ilmunya.
3. Almamater tercinta Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember.
4. *Prefectural University of Hiroshima*, Jepang yang telah banyak berbagi ilmu.

**MOTO**

“Dialah Allah Yang Maha Esa lagi Maha Mengalahkan”

[Q.S. Az-Zumar: 4]

Jangan Pernah Menyerah

“Berpikirlah positif, tidak peduli seberapa keras kehidupanmu”

[Ali bin Abi Thalib]



**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

nama : Faranita Lutfia Normasari

NIM : 131710101029

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “**Biodegradasi Batang Tembakau Menggunakan *Trichoderma viride***” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan saya buat dengan sebenar-benarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 04 Maret 2020

Yang menyatakan,

Faranita Lutfia Normasari

NIM. 131710101029

**SKRIPSI**

**BIODEGRADASI BATANG TEMBAKAU MENGGUNAKAN**

*Trichoderma viride*

Oleh

Faranita Lutfia Normasari

NIM. 131710101056

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : Andrew Setiawan R., S. TP., M. Si

Dosen Pembimbing Anggota : Dr. Ir. Jayus

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “Biodegradasi Batang Tembakau Menggunakan *Trichoderma viride*” karya Faranita Lutfia Normasari, NIM 131710101029 telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Rabu, 04 Maret 2020

tempat : Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember

Pembimbing,

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Anggota,

Andrew Setiawan R., S. TP, M.Si  
NIP. 198204222005011002

Dr. Ir. Jayus  
NIP. 196805161992031004

Tim Penguji,

Dosen Penguji Utama,

Dosen Penguji Anggota,

Ir. Giyanto, M.Sc  
NIP. 196607181993031013

Dr. Maria Belgis, S.TP., M.P  
NIDN. 760016850

Mengesahkan  
Dekan,

Dr. Siswoyo Soekarno, S.TP, M. Eng  
NIP 196809231994031009

## RINGKASAN

**Biodegradasi Batang Tembakau Menggunakan *Trichoderma viride***; Faranita Lutfia Normasari; 131710101029; 2020; 66 Halaman; Program Studi Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

Tembakau merupakan bahan baku industri rokok. Daun tembakau menjadi bagian utama pembuatan rokok, sehingga bagian lain dari tanaman tembakau menjadi limbah. Salah satu limbahnya adalah batang tembakau, dimana belum diolah secara optimal. Batang tembakau mengandung komponen lignoselulosa yang cukup tinggi, sehingga berpotensi sebagai biomassa untuk produksi bioetanol. Sebelum dijadikan biomassa yang berpotensi, perlu dilakukan proses degradasi untuk membebaskan selulosa dan hemiselulosa. Degradasi senyawa lignoselulosa secara mikrobiologis lebih aman, rendah biaya, dan ramah lingkungan. Kelemahan metode ini adalah rendahnya efisiensi waktu serta terbatasnya mikroba yang mampu menghasilkan enzim lignoselulolitik untuk mendegradasi lignin, selulosa, dan hemiselulosa. *Trichoderma viride* telah terbukti menunjukkan kemampuan menghasilkan enzim lignoselulolitik, yang dapat menggabungkan proses degradasi dengan hidrolisis sehingga meningkatkan efisiensi waktu. Tujuan penelitian ini yaitu, untuk mengetahui kemampuan dan waktu terbaik *Trichoderma viride* dalam mendegradasi lignoselulosa batang tembakau serta mengetahui kadar gula reduksi setelah batang tembakau di degradasi, dimana gula reduksi berperan penting pada proses pembuatan bioetanol selanjutnya.

Penelitian dilaksanakan dalam empat tahap yaitu, preparasi bahan baku, persiapan starter, biodegradasi, dan analisis. Hasil pengamatan proses biodegradasi (fermentasi) bubuk batang tembakau dilakukan selama 14 hari oleh *Trichoderma viride* pada suhu 30°C. Selama fermentasi dilakukan pengamatan aktivitas selulase, aktivitas xilanase, dan kadar gula reduksi secara periodik setiap



2 hari. Pengamatan lignoselulosa dilakukan pada hari ke-6 hingga hari ke-14 secara periodik setiap 2 hari. Pengamatan kadar lignoselulosa dan kadar gula reduksi juga dilakukan pada bahan baku bubuk batang tembakau sebagai kontrol.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa, biodegradasi batang tembakau hingga hari ke-14 oleh *Trichoderma viride* telah mampu mendegradasi selulosa dan hemiselulosa menjadi gula reduksi. Hal tersebut terbukti dari perubahan kadar lignoselulosa (hemiselulosa, selulosa, dan lignin) menjadi 23,557%; 33,960%; dan 21,873% dari nilai kadar lignoselulosa (hemiselulosa, selulosa, dan lignin) awal sebesar 24,597%; 36,023%; dan 21,910%. Selama 14 hari kadar gula reduksi hasil hidrolisis hemiselulosa dan selulosa oleh *T. viride* sebesar 1,496 mg/mL dengan aktivitas selulase dan xilanase tertinggi masing-masing sebesar 1,709 mU/mL dan 1,379 mU/mL. Hari ke-14 merupakan waktu terbaik dalam proses biodegradasi lignin serta hidrolisis hemiselulosa dan selulosa menjadi gula reduksi.

## SUMMARY

**Biodegradation of Tobacco Stalk using *Trichoderma viride***; Faranita Lutfia Normasari; 131710101029; 2020; 66 pages; Department of Agricultural Products Technology Faculty of Agricultural Technology Jember University.

Tobacco was the raw material for the cigarette industry. Tobacco leaves become the main part in the making of cigarettes, so the other parts of tobacco plants become wastes. One of the wastes were tobacco stalks, which had not been optimally processed. Tobacco stalks contain quite high lignocellulose content, so it was recommended to be used as biomass for bioethanol production. Before biomass was made into potential commodities such as bioethanol, it needs to be processed by degradation methods to free cellulose and hemicellulose. The degradation methods of lignocellulose by microbiology was safer, cheaper, and environmentally friendly than other method. The weakness of this method were the low time efficiency and also the limited microbes that were able to produce lignocellulolytic enzymes to degrade lignin, cellulose, and hemicellulose. *Trichoderma viride* has shown the ability to produce lignocellulolytic enzymes, which can facilitate the degradation and hydrolysis process thereby increasing time efficiency. The purpose of this research was to study the ability and the best time of *Trichoderma viride* to degrade tobacco stalks lignocellulose components and determine the level of reducing sugars after the tobacco stalks have been degraded, because reducing sugars were needed in the next bioethanol manufacturing process.

The research was conducted in four stages, namely the preparation of the raw materials, preparation of cultures, biodegradation, and analysis. The results of the observation of tobacco stalk powder biodegradation (fermentation) by *Trichoderma viride* at a temperature of 30°C was conducted for 14 days. During fermentation, cellulase activity, xylanase activity, and reducing sugar levels were observed periodically, every 2 days. Lignocellulosic observation was carried out

on the 6<sup>th</sup> day until the 14<sup>th</sup> day periodically, every 2 days. Observations of lignocellulose levels and reducing sugar levels were also carried out on the raw material of tobacco stalk powder as a control.

The results showed that, biodegradation of tobacco stalks up to the 14<sup>th</sup> day by *Trichoderma viride* was able to degrade cellulose and hemicellulose into reducing sugars. This was evident from changes in lignocellulose (hemicellulose, cellulose, and lignin) initial contents at 24.597%; 36,023%; and 21,910% to lignocellulose contents after 14 days at 23.557%; 33,960%; and 21,873%. For 14 days the reduced sugar levels of hemicellulose and cellulose hydrolysis by *T. viride* were 1.496 mg/mL with the highest cellulase and xylanase activity respectively at 1.709 mU/mL and 1.379 mU / mL. The 14<sup>th</sup> day was the best time in the process of lignin biodegradation and hydrolysis of hemicellulose and cellulose into reducing sugars.

## PRAKATA

Puji syukur atas kehadiat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penyusun dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Biodegradasi Batang Tembakau Menggunakan *Trichoderma viride*”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan Strata Satu (S1) pada Program Studi Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penyusun mengucapkan terimakasih kepada:

1. Dr. Siswoyo Soekarno, S.TP, M.Eng selaku Dekan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember;
2. Dr. Ir. Jayus selaku Koordinator Program Studi Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember;
3. Andrew Setiawan R., S. TP., M. Si selaku Dosen Pembimbing Akademik;
4. Andrew Setiawan R., S. TP., M. Si selaku Dosen Pembimbing Utama yang telah meluangkan waktu untuk memberikan bimbingan dan pengarahan selama penyusunan skripsi;
5. Dr. Ir. Jayus selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah memberikan bimbingan dan pengarahan demi penyelesaian penyusunan skripsi;
6. Ir. Giyarto, M.Sc dan Dr. Maria Belgis S.TP., M.P selaku tim penguji, atas saran dan evaluasi demi perbaikan penyusunan skripsi;
7. Ibu dan Ayah yang selalu memberi dukungan, doa, dan kasih sayangnya yang tak terhingga. Adikku Tiara yang selalu memberi semangat dan penampung air mata. Keluargaku yang juga secara tidak langsung memberikan semangat dan doa;
8. Sahabatku Vila, Uwa, dan Lita yang selalu memberi semangat dan nasihat serta menjadi tempat berkeluh kesah. Teman-teman THP B yang selalu ada saat senang dan sedih selama lebih dari 4 tahun. Semua teman FTP angkatan 2013 Super yang selalu memberikan bantuan saat dibutuhkan. Empat

sekawan PUH yang bersama saat senang, sedih, dan galau. Elsa dan Weni yang sangat baik;

9. Profesor Hiroyuki Harada dan Profesor Morinaga dari *Prefectural University of Hiroshima*, Jepang yang telah banyak berbagi ilmu;
10. Teman-teman selama di *Prefectural University of Hiroshima*, Jepang yang tak lelah memberikan bantuan dan hiburan;
11. Keluarga besar UK-PSM Symphony Choir Fakultas Teknologi Pertanian yang telah mengajarkan banyak hal dan memberikan pengalaman berharga selama masa pembelajaran di dunia kampus;
12. Semua pihak yang telah membantu penyusun dalam menyelesaikan skripsi ini baik secara langsung maupun tidak langsung.

Penyusun juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Penyusun berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi pembacanya.

Jember, 04 Maret 2020

Penulis

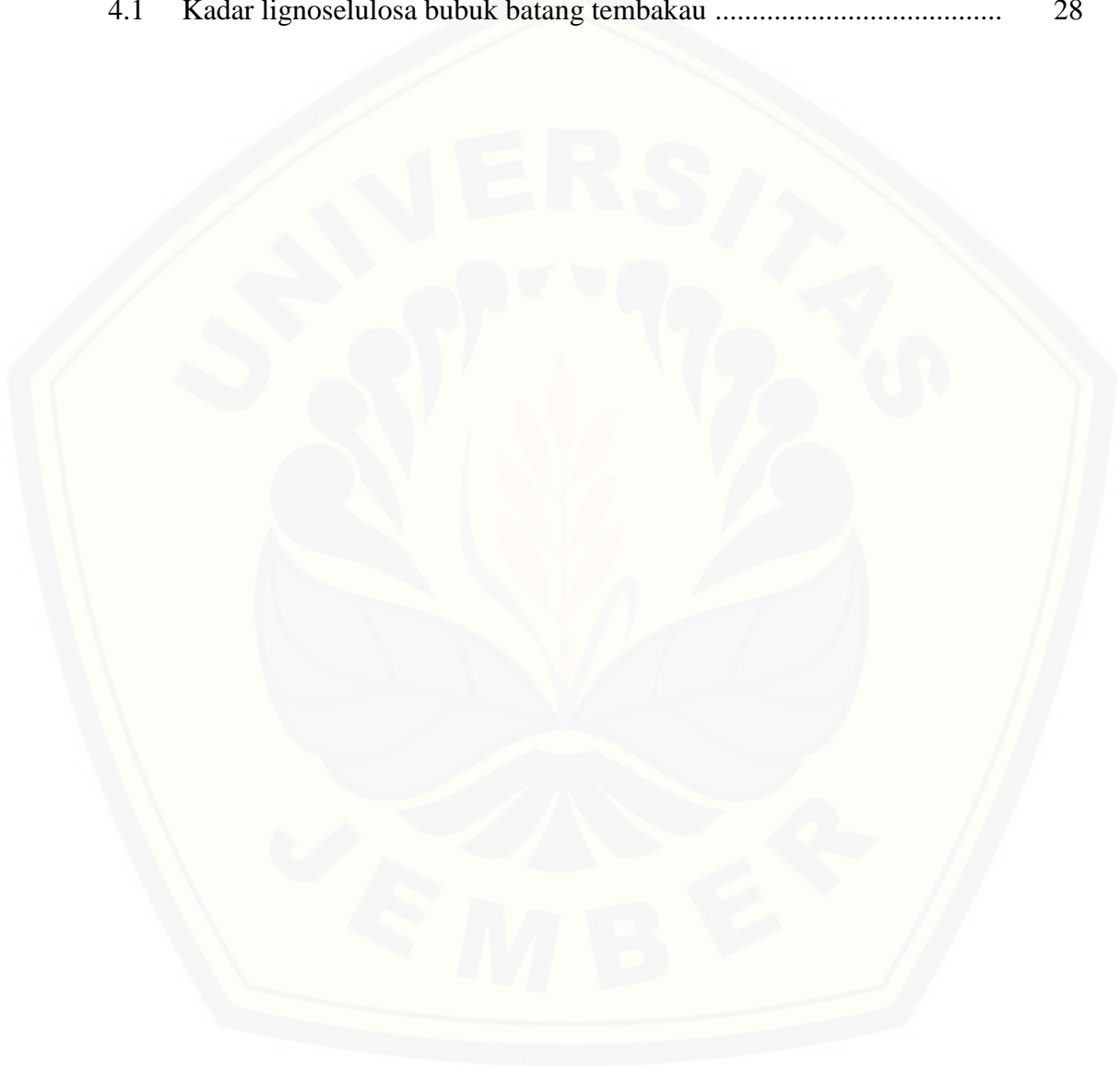
DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL .....	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN .....	iii
HALAMAN MOTO .....	iv
HALAMAN PERNYATAAN.....	v
HALAMAN PEMBIMBING .....	vi
HALAMAN PENGESAHAN.....	vii
RINGKASAN .....	viii
SUMMARY .....	x
PRAKATA .....	xii
DAFTAR ISI.....	xiv
DAFTAR TABEL .....	xvi
DAFTAR GAMBAR.....	xvii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xviii
<b>BAB 1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Latar Belakang.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Perumusan Masalah .....</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Tujuan Penelitian.....</b>	<b>4</b>
<b>1.4 Manfaat Penelitian.....</b>	<b>4</b>
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>5</b>
<b>2.1 Batang Tembakau.....</b>	<b>5</b>
<b>2.2 Komponen Penyusun Lignoselulosa.....</b>	<b>6</b>
2.2.1 Selulosa .....	7
2.2.2 Hemiselulosa .....	8
2.2.3 Lignin .....	9
<b>2.3 Teknik Degradasi Lignin.....</b>	<b>11</b>
<b>2.4 Karakteristik <i>Trichoderma viride</i> .....</b>	<b>15</b>
<b>2.5 <i>Solid State Fermentation</i> (Fermentasi Padat) .....</b>	<b>17</b>
<b>2.6 Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim .....</b>	<b>18</b>
2.6.1 Enzim Selulase .....	18
2.6.2 Enzim Xilanase.....	18
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN.....</b>	<b>19</b>
<b>3.1 Tempat dan Waktu.....</b>	<b>19</b>
<b>3.2 Alat dan Bahan.....</b>	<b>19</b>
3.2.1 Bahan Penelitian.....	19

3.2.2 Alat Penelitian .....	19
<b>3.3 Pelaksanaan Penelitian.....</b>	<b>20</b>
3.3.1 Rancangan Percobaan.....	20
3.3.2 Rancangan Penelitian .....	20
<b>3.4 Parameter Pengamatan.....</b>	<b>23</b>
3.4.1 Kadar Lignoselulosa .....	23
3.4.2 Aktivitas Selulase .....	23
3.4.3 Aktivitas Xilanase .....	23
3.4.4 Kadar Gula Reduksi .....	23
<b>3.5 Prosedur Parameter Pengamatan.....</b>	<b>23</b>
3.5.1 Penentuan Kadar Lignoselulosa.....	23
3.5.2 Penentuan Aktivitas Selulase dan Xilanase.....	24
3.5.3 Penentuan Kadar Gula Reduksi.....	25
<b>3.6 Analisis Data.....</b>	<b>27</b>
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>28</b>
<b>4.1 Kadar Lignoselulosa Bubuk Batang Tembakau.....</b>	<b>28</b>
<b>4.2 Aktivitas Selulase <i>Trichoderma viride</i> .....</b>	<b>30</b>
<b>4.3 Aktivitas Xilanase <i>Trichoderma viride</i> .....</b>	<b>32</b>
<b>4.4 Kadar Gula Reduksi Setelah Fermentasi Selama 14 Hari dengan <i>Trichoderma viride</i> .....</b>	<b>35</b>
<b>BAB 5. PENUTUP.....</b>	<b>37</b>
<b>5.1 Kesimpulan.....</b>	<b>37</b>
<b>5.2 Saran .....</b>	<b>37</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>38</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>51</b>

**DAFTAR TABEL**

	Halaman
2.1 Berbagai metode delignifikasi biomassa .....	12
4.1 Kadar lignoselulosa bubuk batang tembakau .....	28



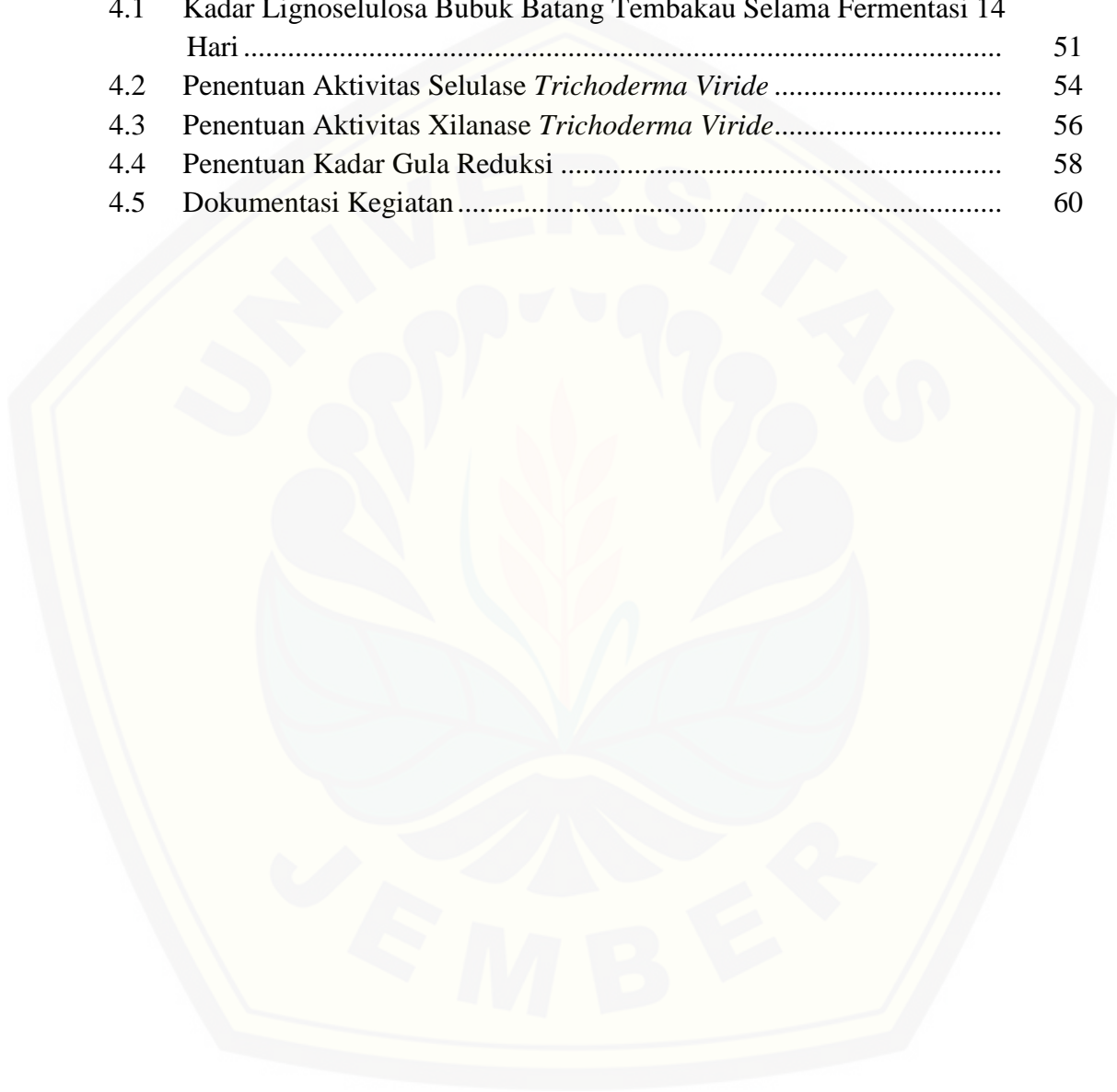


DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Struktur kimia selulosa .....	8
2.2 Struktur unit-unit penyusun hemiselulosa .....	9
2.3 Struktur kimia lignin .....	10
2.4 Perubahan struktur mikro akibat degradasi (delignifikasi) .....	11
3.1 Diagram alir rancangan penelitian .....	20
3.2 Diagram alir preparasi bahan baku bubuk batang tembakau .....	21
3.3 Diagram alir persiapan starter <i>Trichoderma viride</i> termodifikasi .....	22
3.4 Diagram alir proses degradasi termodifikasi .....	23
4.1 Aktifitas selulase <i>Trichoderma viride</i> pada fermentasi dalam media bubuk batang tembakau selama 14 hari.....	31
4.2 Aktifitas xilanase <i>Trichoderma viride</i> pada fermentasi dalam media bubuk batang tembakau selama 14 hari.....	33
4.3 Kadar glukosa media setelah fermentasi oleh <i>Trichoderma viride</i> selama 14 hari.....	35

**DAFTAR LAMPIRAN**

	Halaman
4.1 Kadar Lignoselulosa Bubuk Batang Tembakau Selama Fermentasi 14 Hari .....	51
4.2 Penentuan Aktivitas Selulase <i>Trichoderma Viride</i> .....	54
4.3 Penentuan Aktivitas Xilanase <i>Trichoderma Viride</i> .....	56
4.4 Penentuan Kadar Gula Reduksi .....	58
4.5 Dokumentasi Kegiatan .....	60



## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Agroindustri tembakau memiliki dampak yang dapat menguntungkan, tetapi juga merugikan. Secara ekonomi, industri tembakau berpotensi menjadi sumber pendapatan bagi banyak penduduk. Namun, menurut aspek kesehatan, tembakau menjadi salah satu sumber pemicu berbagai penyakit akibat merokok. Salah satu pengaruh positif perkebunan tembakau adalah daun tembakau yang menjadi sumber utama produsen rokok di Indonesia. Purwono dkk. (2011) menyampaikan bahwa, daun tembakau telah digunakan untuk memproduksi sekitar 180 triliun rokok, sehingga menjadi sumber perekonomian yang besar di Indonesia. Pengaruh negatif dari perkebunan tembakau ini adalah limbah yang dihasilkan, salah satunya batang tembakau. Penanganan limbah batang tembakau oleh petani masih sederhana antara lain, dengan dibiarkan diperkebunan atau dibakar. Batang tembakau yang dibiarkan saja ditanah perkebunan dapat menyebabkan polusi pada air tanah, karena nikotin yang terkandung di dalamnya dapat dengan mudah masuk ke tanah. Komposisi rata-rata nikotin pada batang tembakau adalah 3.800 mg/kg, sedangkan limbah yang mengandung nikotin akan dianggap toksik apabila konsentrasinya melebihi 500 mg/kg berat kering (Su dkk., 2016; Cyplik dkk., 2009). Penanganan limbah dengan pembakaran akan menyebabkan nikotin batang tembakau terbebas ke udara dan menyebabkan polusi udara (Fransiska dkk., 2015).

Seiring dengan perkembangan teknologi, penanganan limbah tembakau juga semakin bervariasi. Penanganan limbah yang bervariasi tersebut menyebabkan limbah tembakau menjadi memiliki nilai ekonomi yang tinggi dan menjadi topik yang cukup sering diteliti. Limbah batang tembakau dapat diolah antara lain, sebagai pestisida, dengan senyawa aktif nikotin dan briket batang tembakau (Purwono dkk., 2011), serta *polybag* batang tembakau (Litbang Jember, 2017). Metode pengolahan batang tembakau yang digunakan sebelumnya masih belum dapat mengoptimasi penanganan limbah batang tembakau. Batang tembakau

mengandung senyawa selulosa yang tinggi. Senyawa tersebut bila didegradasi akan menghasilkan senyawa turunan yang memiliki potensi lebih besar. Menurut Jumino (2013) batang tembakau kering memiliki komposisi selulosa yang relatif tinggi yaitu 35-40%. Penelitian oleh Bragatto dkk. (2016) menunjukkan bahwa komposisi batang tembakau kering mengandung, selulosa 42,1%; hemiselulosa 20,3%; dan lignin 20,8%. Kandungan lignoselulosa tersebut dapat digunakan sebagai bahan baku pembuatan bioetanol. Proses pemanfaatan senyawa lignoselulosa menjadi bioetanol terdiri dari 4 tahap yaitu, *pretreatment/degradasi*, hidrolisis, fermentasi, dan purifikasi (Mosier dkk., 2005). Biomassa dari batang tembakau yang dirubah menjadi bioetanol dapat disebut sebagai bahan bakar yang ramah lingkungan, karena biomassa merupakan limbah agrikultur. Biomassa dari perspektif sumber daya energi adalah semua bahan organik (terbarukan) serta limbah darinya yang dapat digunakan sebagai sumber energi terbarukan, baik dibakar secara langsung atau dikonversi menjadi bentuk energi lain, dan menjadi pengganti bahan bakar dari fosil (*U.S. Energy Information Administration, 2018; Energy Efficiency and Renewable Energy, 2020*).

Proses *pretreatment/degradasi* merupakan salah satu tahapan yang penting dilakukan untuk memecah matrik batang tembakau agar biomassa dari batang tembakau dapat dimanfaatkan menjadi bahan baku bioetanol. Karena di dalam matrik biomassa, selulosa dan hemiselulosa berada dalam kungkungan dan saling terikat dengan lignin. Degradasi menyebabkan selulosa dan hemiselulosa yang terikat dengan lignin menjadi terbebas dan dapat diurai secara enzimatik menjadi unit heksosa maupun pentosa yang kemudian dapat difermentasi menjadi etanol (Zheng dkk., 2009). Degradasi dapat dikelompokkan menjadi mekanis, kimia, fisikokimia, dan biologis. Ketiga jenis metode awal yang disebutkan lebih efisien dalam prosesnya, namun tidak ramah lingkungan, membutuhkan energi serta biaya yang besar (*high cost*). Degradasi biologis (biodegradasi) lebih ramah lingkungan dan biayanya rendah (*low cost*), namun metode ini masih jarang digunakan karena kurang efisien dan butuh waktu lama. Penelitian ini difokuskan pada biodegradasi lignoselulosa batang tembakau yang diharapkan dapat digunakan sebagai bahan baku industri. Apabila proses degradasi dapat

digabungkan dengan proses hidrolisis selulosa dan hemiselulosa, maka proses menjadi lebih efisien dan cepat. Hasil penelitian oleh Ghorbani dkk. (2015) dan Neethu dkk. (2012), *Trichoderma viride* digunakan untuk degradasi limbah biomassa jerami padi dan menunjukkan adanya aktivitas LiP (Lignin Peroksidase), MnP (Mangan Peroksidase), dan lakase yang berperan pada proses degradasi lignoselulosa. Selain itu, menurut Ujiie dkk. (1991) dan Volk (2004) *T. viride* juga mampu menghasilkan kompleks enzim selulase (endoselulase dan eksoselulase) yang mampu menghidrolisis selulosa kristal serta enzim endo-1,4- $\beta$ -xilanase yang mampu mendegradasi xilan. Aktifnya kelima enzim tersebut menunjukkan adanya aktivitas enzim lignoselulotik serta kemungkinan untuk meningkatkan efisiensi waktu proses pembuatan bioetanol dengan metode degradasi biologis. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh penggunaan *Trichoderma viride* sebagai salah satu metode degradasi batang tembakau dengan rancangan rangkaian waktu untuk mengetahui waktu fermentasi terbaik. Biodegradasi batang tembakau dilakukan dengan memanfaatkan *Trichoderma viride*.

## 1.2 Perumusan Masalah

Degradasi diperlukan untuk mengoptimalkan pemanfaatan batang tembakau sebagai substrat produksi bioetanol, karena proses degradasi memecah senyawa lignin dalam batang tembakau yang mengikat selulosa dan hemiselulosa. Upaya degradasi lignoselulosa dapat dilakukan secara fisik, kimia, maupun biologis. Pada umumnya degradasi lignoselulosa menggunakan cara fisik akan membutuhkan energi serta biaya yang tinggi dan degradasi lignoselulosa menggunakan bahan kimia dapat berdampak buruk bagi lingkungan, sehingga diperlukan alternatif lain untuk proses degradasi. Alternatif lain untuk mendegradasi lignoselulosa adalah secara biologis, dengan menggunakan kapang. Namun, karena rendahnya efisiensi waktu dan enzim yang tidak sesuai, metode ini masih jarang diaplikasikan pada degradasi batang tembakau. Salah satu cara meningkatkan efisiensi waktu metode ini adalah dengan menggabungkan proses degradasi lignin dengan hidrolisis selulosa dan hemiselulosa, hasil tersebut dapat

dicapai dengan enzim lignoselulolitik. Salah satu kapang yang menunjukkan kemampuan menghasilkan enzim lignoselulolitik adalah *Trichoderma viride*. Pengamatan peningkatan efisien waktu proses degradasi lignoselulosa dengan *T. viride* dilakukan dengan membandingkan rancangan rangkaian waktu dan mencari hasil degradasi lignoselulosa terbaik.

### 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. untuk mengetahui kemampuan *Trichoderma viride* dalam mendegradasi lignoselulosa batang tembakau,
2. untuk mengetahui waktu terbaik *Trichoderma viride* dalam mendegradasi lignoselulosa batang tembakau, dan
3. untuk mengetahui kadar gula reduksi setelah batang tembakau di degradasi oleh *Trichoderma viride*.

### 1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat sebagai berikut:

1. meningkatkan penggunaan limbah batang tembakau menjadi produk yang bermanfaat, dan
2. mengurangi potensi batang tembakau sebagai sumber pencemaran lingkungan.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Batang Tembakau

Berdasarkan morfologinya tembakau terdiri atas dua bagian yaitu, vegetatif dan generatif. Akar, batang, dan daun termasuk bagian vegetatif, sedangkan bagian generatif terdiri atas bunga dan buah (Tim Penulis PS, 1993). Batang tembakau berbentuk tegak dengan tinggi sekitar 250 cm dan diameter batang 5 cm. Pada bagian bawah batang terdapat akar tunggang yang panjangnya sekitar 50-75 cm dan mempunyai banyak akar serabut dan bulu akar. Bagian terpenting dari tanaman tembakau adalah daun karena bagian inilah yang nantinya akan dipanen. Daun tembakau berbentuk bulat panjang, ujungnya meruncing, tepinya licin dan bertulang sirip. Satu tanaman biasanya memiliki sekitar 24 helai daun. Ukuran daun cukup bervariasi menurut keadaan tempat tumbuh dan jenis tembakau yang ditanam. Bunga tembakau termasuk bunga majemuk yang berbentuk malai. Kelopak bunga yang berlekuk dan mahkota bunga berbentuk seperti terompet. Bakal buah terletak di atas dasar bunga dan mempunyai ruang yang membesar serta kepala putik terletak pada tabung bunga berdekatan dengan kepala sarinya.

Batang tembakau merupakan salah satu limbah agrikultur dari perkebunan tembakau. Batang tembakau berbentuk agak bulat, lunak tetapi kuat, biasanya memiliki sedikit cabang atau bahkan tidak bercabang sama sekali, serta makin ke ujung makin kecil. Pada setiap ruas batang selain ditumbuhi daun juga tumbuh tunas ketiak daun. Batangnya berwarna hijau dan hampir seluruhnya ditumbuhi bulu-bulu halus berwarna putih. Komposisi rata-rata nikotin pada batang tembakau adalah 3.800 mg/kg (Hanum, 2008; Cyplik dkk., 2009; dan Su dkk., 2016). Menurut Jumino (2013), batang tembakau kering memiliki komposisi selulosa yang relatif tinggi yaitu 35-40%. Penelitian oleh Bragatto dkk. (2016) menunjukkan komposisi batang tembakau kering yaitu, selulosa 42,1 %, hemiselulosa 20,3 %, dan lignin 20,8 %. Fungsi dari batang tembakau adalah tempat tumbuh daun dan organ lainnya, tempat jalan pengangkutan zat hara dari

akar ke daun, dan sebagai jalan menyalurkan zat hasil asimilasi ke seluruh bagian tanaman (Hanum, 2008). Beberapa pemanfaatan batang tembakau saat ini diantaranya, pestisida (kandungan nikotin pada batang tembakau), briket batang tembakau (Purwono dkk., 2011), *polybag* batang tembakau (Litbang Jember, 2017), bahan *soundproofing* (Fransiska dkk., 2015), pewarna alami batik (Palupi dkk., 2018), bioetanol (Handayani dkk., 2018).

Batang tembakau termasuk sebagai biomassa dari jenis limbah agrikultur (Donev dkk., 2020). Karena berdasarkan pengertian dari perpespektif sumber daya energi, biomassa merupakan istilah umum untuk sumber daya terbarukan (baik dibakar secara langsung atau dikonversi menjadi bentuk energi lain) yang berasal dari hewan dan tumbuhan (bahan organik terbarukan) serta limbah yang berasal darinya, dimana ia terkumpul dalam jangka waktu tertentu (tidak termasuk sumber energi fosil dan mampu menjadi pengganti bahan bakar fosil) (*The Japan Institute of Energy*, 2008, *U.S. Energy Information Administration*, 2018; *Energy Efficiency and Renewable Energy*, 2020). Biomassa batang tembakau dapat dimanfaatkan menjadi bioenergi berupa biofuel (mis. etanol dan biodisel) (*National Renewable Energy Laboratory*, 2020; Su dkk., 2016). Karena kandungan lignoselulosa batang tembakau maka perlu dilakukan proses degradasi. Proses degradasi ini berfungsi untuk membuka struktur lignoselulosa agar dapat diakses oleh enzim (Neves dkk., 2007). Beberapa Teknik degradasi batang tembakau yang sudah ada diantaranya, penggunaan bahan kimia HCL 8% (Handayani dkk., 2018), penggunaan jamur pelapuk putih (Su dkk, 2016).

## 2.2 Komponen Penyusun Lignoselulosa

Perez dkk. (2002) menyatakan bahwa, biomassa lignoselulosa merupakan biomassa yang berasal dari tanaman dengan komponen utama selulosa, hemiselulosa, dan lignin yang dihasilkan dari proses fotosintesis. Komposisi unsur ini dapat bervariasi sesuai spesies tanaman. Selain itu, komposisi di dalam suatu tanaman juga bervariasi tergantung pada usia dan tingkat pertumbuhannya. Hal ini diperkuat oleh Raven dkk. (1992), dimana lignoselulosa merupakan jenis biomassa yang dapat dikatakan terdiri dari tiga senyawa utama yaitu, selulosa,

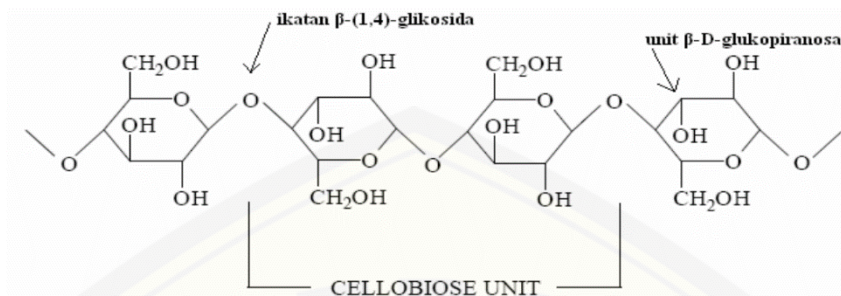


hemiselulosa, dan lignin. Faulon dkk. (1994) juga mengungkapkan selain tiga senyawa tersebut, lignoselulosa juga mengandung air serta protein dan senyawa lain dalam kadar rendah. Senyawa dengan kadar rendah tersebut tidak terlalu berpengaruh dalam pembentukan struktur tumbuhan. Pada susunan kompleks senyawa lignoselulosa, selulosa tetap dalam bentuk kristal berserat dan menjadi inti dari susunan. Hemiselulosa terletak diantara mikro- dan makrofibril selulosa, sedangkan lignin berfungsi sebagai penyangga dari matriks dimana selulosa dan hemiselulosa tertanam. Menurut Kirk-Otmer (2001) karena selulosa merupakan inti dari susunan matriks, maka sebagian besar lignin terdapat pada area *interfibrous* dan sebagian kecil terdapat di permukaan sel.

### 2.2.1 Struktur Kimia Selulosa

Selulosa adalah polimer glukosa yang berbentuk rantai linier dan dihubungkan oleh ikatan  $\beta$ -1,4 glikosidik. Struktur yang linier menyebabkan selulosa bersifat kristalin dan tidak mudah larut. Bangun dasar selulosa berupa suatu selobiosa yaitu dimer dari glukosa. Rantai panjang selulosa terhubung secara bersama melalui ikatan hidrogen (Perez dkk., 2002). Selulosa mengandung sekitar 50-90% bagian berkristal dan sisanya bagian amorf (Aziz dkk., 2002). Menurut Sun dan Cheng (2002) ikatan intramolekul terjadi antara monomer glukosa dalam satu rantai selulosa yang sama, sedangkan ikatan intermolekul terjadi antara monomer glukosa dari dua rantai selulosa yang berdekatan. Selulosa tidak mudah didegradasi secara kimia maupun mekanis. Tarmansyah (2007) juga mengungkapkan, berdasarkan derajat polimerisasi (DP) dan kelarutan dalam senyawa natrium hidroksida (NaOH) 17,5%, selulosa dapat dibedakan atas tiga jenis yaitu: Selulosa  $\alpha$  (*Alpha Cellulose*) yaitu selulosa berantai panjang, tidak larut dalam larutan NaOH 17,5% atau larutan basa kuat dengan DP 600-1500. Selulosa  $\alpha$  dipakai sebagai penduga dan atau penentu tingkat kemurnian selulosa. Selulosa  $\beta$  (*Betha Cellulose*) adalah selulosa berantai pendek, larut dalam larutan NaOH 17,5% atau basa kuat dengan DP 15-90, dapat mengendap bila dinetralkan. Selulosa  $\gamma$  (*Gamma Cellulose*) sama dengan selulosa  $\beta$ , tetapi DP nya kurang dari 15. Biasanya di alam selulosa berasosiasi dengan polisakarida lain seperti hemiselulosa atau lignin membentuk kerangka utama dinding sel tumbuhan

(Holtzapple dkk., 2003). Berikut ini adalah struktur kimia selulosa yang disajikan pada Gambar 2.1.



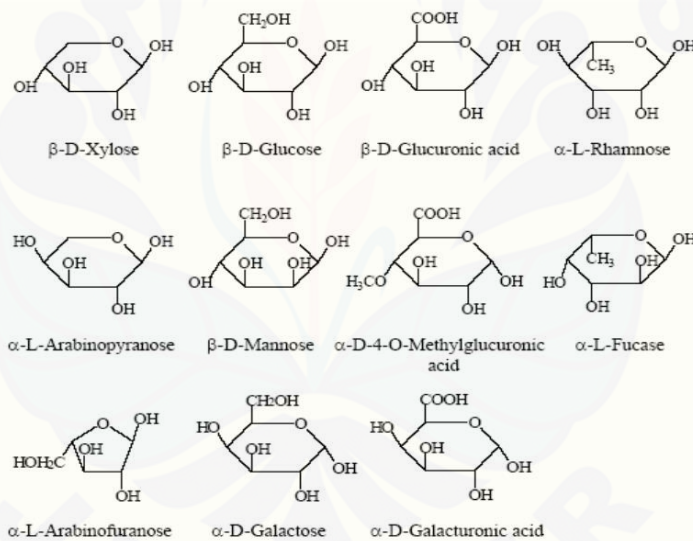
Gambar 2.1 Struktur kimia selulosa (Ibrahim, 1998)

Kebanyakan selulosa berasosiasi dengan lignin, sehingga sering disebut sebagai lignoselulosa. Selulosa, hemiselulosa, dan lignin dihasilkan dari proses fotosintesis. Molekul selulosa dalam tumbuhan tersusun dalam bentuk fibril yang terdiri atas beberapa molekul paralel yang dihubungkan oleh ikatan glikosidik sehingga sulit diuraikan (Fitriani, 2003). Komponen-komponen tersebut dapat diuraikan oleh aktifitas mikroorganisme. Beberapa mikroorganisme mampu menghidrolisis selulosa untuk digunakan sebagai sumber energi, seperti bakteri dan fungi (Sukumaran dkk., 2005). Hidrolisis sempurna selulosa menghasilkan monomer selulosa yaitu glukosa, sedangkan hidrolisis tak sempurna menghasilkan disakarida dari selulosa yang disebut selobiosa dan selo-oligosakarida. Selulosa dapat dikonversi menjadi produk-produk bernilai ekonomi yang lebih tinggi seperti glukosa, etanol, dan pakan ternak dengan jalan menghidrolisis selulosa dengan bantuan selulase sebagai biokatalisator atau dengan hidrolisis secara asam/basa (Perez dkk., 2002).

### 2.2.2 Struktur Kimia Hemiselulosa

Hemiselulosa merupakan suatu polisakarida lain yang terdapat dalam tanaman dan tergolong senyawa organik. Hemiselulosa bersifat nonkristalin dan tidak bersifat serat, mudah mengembang karena itu hemiselulosa sangat berpengaruh terhadap terbentuknya jalinan antara serat pada saat pembentukan lembaran, lebih mudah larut dalam pelarut alkali dan lebih mudah dihidrolisis dengan asam menjadi komponen monomernya yang terdiri dari D-glukosa, D-

manosa, D-galaktosa, D-silosa dan L-arabinosa (Simanjuntak, 2007). Komponen terbesar hemiselulosa sel tanaman yaitu xilan, merupakan jenis polisakarida paling melimpah ke-2 di alam setelah selulosa (Kubata dkk., 1994; Subramaniyan dan Prema, 2002). Deobald dan Crawford (2002) juga menyatakan bahwa, hemiselulosa merupakan rantai polimer bercabang dan memiliki struktur yang sangat kompleks karena tersusun dari jenis gula yang beragam dan tersusun atas berbagai intermonomerik. Hemiselulosa memiliki rantai polimer yang pendek dan tak berbentuk. Karena struktur ini sebagian besar hemiselulosa dapat larut dalam air. Rantai utama hemiselulosa dapat berupa homopolimer (umumnya terdiri dari satu jenis gula yang berulang) atau dapat juga berupa heteropolimer (campuran beberapa jenis gula) (Ibrahim, 1998). Struktur unit-unit penyusun hemiselulosa dapat dilihat pada Gambar 2.2.



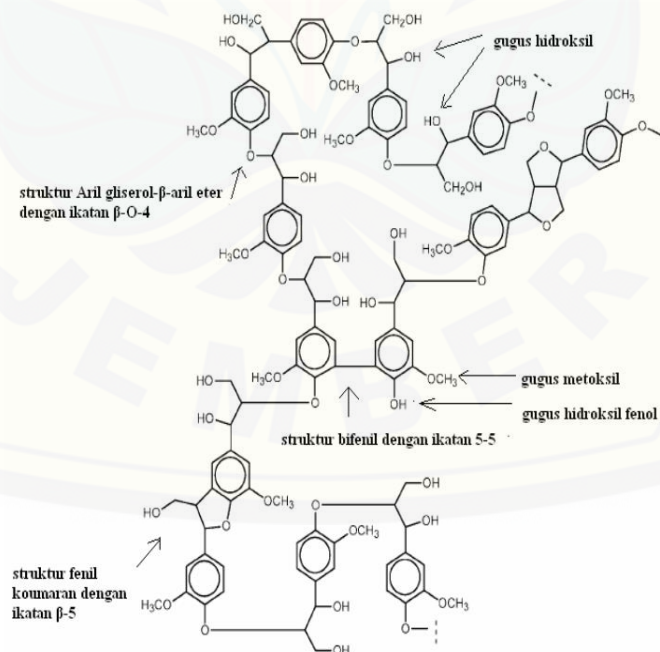
Gambar 2.2 Struktur unit-unit penyusun hemiselulosa (Ibrahim, 1998)

### 2.2.3 Struktur Kimia Lignin

Lignin merupakan polimer alami yang paling kompleks, dimana senyawa ini berbentuk polimer tiga dimensi amorf dengan fenilpropana sebagai senyawa penyusun dominan (Harmsen dkk., 2010). Lignin tersusun atas jaringan polimer enolik yang berfungsi merekatkan serat selulosa dan hemiselulosa, sehingga menjadi sangat kuat (Sun dan Cheng, 2002). Judoamidjojo dkk. (1989) juga menyatakan bahwa, dengan adanya ikatan arilalkil dan eter, lignin menjadi tahan

terhadap hidrolisis. Pada pembagian tanaman menjadi dua kategori yaitu, *hardwood* (angiosperma) dan *softwood* (gymnosperma) terdapat perbedaan pada susunan lignin. Setelah diidentifikasi, lignin pada *softwood* tersusun oleh lebih dari 90% *coniferyl alcohol* dan sisanya sebagian besar adalah unit *p-coumaryl alcohol*. Sebaliknya, lignin pada *hardwood* tersusun dari berbagai variasi unit jenis *coniferyl* dan *sinapyl alcohol* (Kirk-Otmer, 2001).

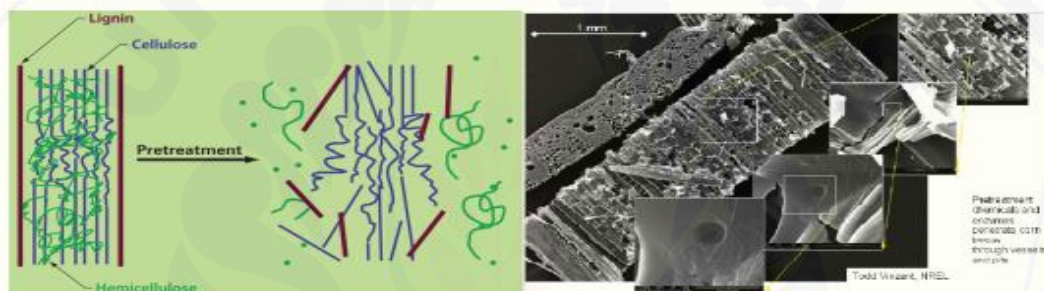
Lignin pada kayu berfungsi sebagai jaringan tiga dimensi tak larut, dimana dia berperan penting dalam kekokohan dan perkembangan sel. Hal tersebut berpengaruh pada pengangkutan/distribusi air, nutrisi, dan metabolisme sel tanaman. Lignin juga berfungsi sebagai pengikat antar sel, dimana akan menciptakan material komposit yang memiliki kemampuan luar biasa untuk tahan terhadap benturan, tekanan, dan pembengkokan. Pelarut yang dapat melarutkan lignin antara lain, dioksan, aseton, piridin, dan dimetil sulfoksida. Selain itu, pada suhu tinggi terjadi pelunakan termal lignin, dimana dapat mempercepat reaksi depolimerisasi bersifat asam atau basa (O'Connor dkk., 2007). Struktur kimia lignin dapat dilihat pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Struktur kimia lignin (Perez dkk., 2002)

### 2.3 Teknik Degradasi Lignin

Salah satu rintangan utama dalam produksi bioetanol dengan bahan baku biomassa adalah karakteristik substrat yang tidak mendukung hidrolisis selulosa. Karakteristik ini kemudian dimodifikasi agar hidrolisis dapat berlangsung dengan efisien (Huang dkk., 2011). Oleh karena itu, degradasi berdampak besar pada seluruh operasi dan biasanya merupakan bagian paling mahal (Joshi dkk., 2011). Degradasi bertujuan untuk memecah ikatan lignin (delignifikasi), menghilangkan kandungan lignin dan hemiselulosa, merusak struktur kristal dari selulosa serta meningkatkan porositas bahan (Prawitwong dkk., 2012). Berdasarkan Neves dkk. (2007) degradasi umumnya berguna untuk membuka struktur lignoselulosa agar dapat diakses enzim seperti dalam Gambar 2.4.



Gambar 2.4 Perubahan struktur mikro akibat degradasi (delignifikasi) (Houghton dkk., 2006)

Degradasi dapat dilakukan dengan metode fisika, kimia, biologi, atau pun kombinasi dari metode-metode tersebut (Sari dkk., 2019). Rusaknya struktur kristal selulosa akan mempermudah terurainya selulosa menjadi glukosa. Selain itu, hemiselulosa turut terurai menjadi senyawa gula sederhana: glukosa, galaktosa, manosa, heksosa, pentosa, xilosa dan arabinosa. Selanjutnya senyawa-senyawa gula sederhana tersebut yang akan difermentasi oleh mikroorganisme menghasilkan etanol. Berikut ini adalah tabel beberapa perlakuan degradasi (delignifikasi) yang ditunjukkan oleh Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Berbagai metode delignifikasi biomassa

Metode Perlakuan	Penjelasan	Sumber
Delignifikasi asam: asam encer dan asam pekat	Menghidrolisa hemiselulosa dan merusak struktur kristal selulosa, tapi menghasilkan produk samping inhibitor, dan memerlukan peralatan tahan korosi. Biasanya menggunakan H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , tetapi asam fosfat dikatakan menghasilkan lebih sedikit produk samping beracun dan dapat digunakan pada reaktor baja antikorosi. Jenis asam encer memberi <i>yield</i> rendah sedangkan jenis asam pekat menghasilkan produk samping, mendegradasi selulosa dan memerlukan biaya daur ulang mahal.	Eshtiaghi dkk., 2012 Merina dan Trihadiningrum, 2011 Satyanagalakshmi dkk., 2011 Sornvoraweat dan Kongkiattikajorn, 2010 Sassner dkk., 2008
Delignifikasi alkali/basa	Memisahkan lignin dan sebagian hemiselulosa, dan meningkatkan reaktivitas selulosa. Biasanya menggunakan NaOH, Ca(OH) <sub>2</sub> , urea atau Ammonia (SAA, ARP). NaOH juga meningkatkan derajat polimerisasi dan kristalinitas selulosa. Ammonia juga mengembangkan substrat yang tersisa.	Eshtiaghi dkk., 2012 Aswathy dkk., 2010 Taherzadeh dan Karimi, 2008 Hamelinck dkk., 2005 Teymouri dkk., 2005
Delignifikasi dengan agen pengoksida: hidrogen per-oksida, asam per-asetat	<i>Yield</i> setinggi 98% berhasil dicapai.	Saha dan Cotta, 2007 Teixeira dkk., 1999 Gould, 1984

Tabel 2.1 Berbagai metode delignifikasi biomassa

Metode Perlakuan	Penjelasan	Sumber
Delignifikasi dengan pelarut organik	Melarutkan lignin dan sebagian hemiselulosa tapi memerlukan peralatan dengan tekanan tinggi. Pelarut organik yang sudah digunakan misalnya metanol, etanol, aseton, etilen glikol, trietilen glikol, dan alkohol tetrahidrofurfuril.	Yamashita dkk., 2010 Pan dkk., 2005
<i>Steam explosion, ammonia fiber expansion/explosion, acid catalyzed steam explosion</i>	Bahan dipanaskan pada suhu dan tekanan tinggi kemudian didekompresi ke tekanan atmosfer secara tiba-tiba. Masih belum praktis karena butuh energi besar dan peralatan mahal.	Huang dkk., 2011 Hamelinck dkk., 2003
<i>Liquid Hot Water (LHW)</i>	Menghidrolisa hemiselulosa menggunakan air bersuhu tinggi (160-190°C) dan tekanan tinggi ( $\pm 30$ bar).	Eshtiaghi dkk., 2012 Kim dkk., 2009 Perez dkk., 2007 Hamelinck dan Faaij, 2006
Delignifikasi cairan ionik	Berbagai cairan ionik yang ada dapat diatur untuk melarutkan selulosa, ataupun lignin. Substrat dilarutkan dalam cairan ionik dan dipanaskan kemudian dipresipitasi dengan antisolven. Proses ini merupakan teknologi baru dan lebih cocok untuk biomassa berkayu.	Muhammad dkk., 2011 Sathitsuksanoh dkk., 2012 Guragain dkk., 2011 Lee dkk., 2009 Kilpelainen dkk., 2007 Kosan dkk., 2008
Delignifikasi mikrobial	Jamur pelapuk putih, jamur pelapuk coklat, & jamur pelapuk lunak telah banyak digunakan untuk depolimerisasi substrat lignoselulosa tanpa banyak produk samping inhibitor.	Chandel dkk., 2011 Zhong dkk., 2011 Sanchez dan Cardona, 2007

Tabel 2.1 Berbagai metode delignifikasi biomassa

Metode Perlakuan	Penjelasan	Sumber
Penggilingan ekstruksi	Tanpa mempengaruhi lignin dan hemiselulosa, meningkatkan aksesibilitas dan merubah kristalinitas selulosa. Merupakan salah satu metode paling efektif tetapi kurang cocok diterapkan di industri. Penggilingan dilakukan dalam hampir semua proses di laboratorium.	Harun dkk., 2011 Merina dan Trihadiningrum, 2011 Satyanagalakshmi dkk., 2011

Pada Tabel 2.1 di atas salah satu metode yang disebutkan adalah delignifikasi secara mikrobial dengan menggunakan jamur pelapuk putih, jamur pelapuk coklat, dan jamur pelapuk lunak. Mikroba memiliki dua tipe sistem kerja enzim ekstraseluler, yaitu sistem hidrolitik dengan cara menghasilkan enzim hidrolase yang bekerja merombak selulosa dan hemiselulosa, dan sistem oksidatif dan sekresi lignase ekstraseluler dengan cara depolimerisasi lignin (Perez dkk., 2002). Mikroorganisme memproduksi enzim ekstraseluler untuk depolimerisasi senyawa berukuran besar menjadi lebih kecil dan mudah larut dalam air (substrat bagi mikroba). Pada saat itu mikroba mentransfer substrat tersebut ke dalam sel melalui membran sitoplasma untuk menyelesaikan proses dekomposisi bahan organik. Aktivitas enzim selulase menurunkan jumlah selulosa sekitar 25% selama sekitar tiga minggu (Saraswati dkk., 2010).

Jamur di alam merupakan perombak lignin paling efisien dan berperan penting dalam siklus karbon. Spesies jamur perombak lignin dikelompokkan atas dasar warna saat fermentasi substrat menjadi jamur pelapuk lunak (*soft rot*), jamur pelapuk coklat (*brown rot*), dan jamur pelapuk putih (*white rot*). Jamur pelapuk lunak mampu melepas rantai samping metil (R-O-CH<sub>3</sub>) serta membuka cincin aromatik, namun tidak mampu merombak struktur lignin secara sempurna. Jamur pelapuk coklat adalah jamur mayoritas perombak kayu, dimana walaupun tidak memiliki enzim pembuka cincin tetapi mampu langsung merombak semua selulosa dan hemiselulosa. Perombakan lignin oleh jamur jenis ini adalah dengan cara demetilasi dan melepaskan rantai samping metil yang kemudian



menghasilkan fenol hidroksilat. Oksidasi struktur aromatik lignin inilah yang menghasilkan karakter warna coklat. Pemisahan polisakarida dari lignin terjadi secara oksidasi non enzimatis melalui pembentukan radikal hidroksil (OH). Reaksi ini menjadikan jamur pelapuk coklat mampu merombak struktur kayu tanpa merusak struktur lignin. Terakhir adalah jamur pelapuk putih yang paling aktif dalam merombak lignin. Ada ribuan spesies jamur pelapuk putih yang telah diketahui utamanya berasal dari kelompok basidiomisetes dan askomisetes. Jamur pelapuk putih memproduksi enzim lignolitik yang mampu bekerja mengoksidasi pelepasan unit fenilpropanoid, demetilasi, mengubah gugus aldehid (R-CHO) menjadi gugus karboksil (R-COOH), dan membuka cincin 19 aromatik, sehingga secara sempurna merombak lignin menjadi CO<sub>2</sub> dan H<sub>2</sub>O. Jamur pelapuk putih menghasilkan tiga kelas enzim ekstraseluler perombak lignin yaitu lakase pengoksidasi fenol, peroksidase lignin, dan oksidase mangan (Hatakka, 2001).

Enzim lignoselulolitik terdiri dari sekumpulan enzim yang terbagi dalam dua kategori, yaitu hidrolitik dan oksidatif. Enzim hidrolitik mendegradasi selulosa dan hemiselulosa dan setiap enzim bekerja terhadap substrat yang spesifik. Enzim oksidatif merupakan enzim non-spesifik dan bekerja melalui mediator bukan protein yang berperan dalam degradasi lignin. Enzim pendegradasi lignin tersebut secara umum terdiri dari dua kelompok utama, yaitu *laccase* (Lac) dan *peroxidase* (*lignin peroxidase* (LiP) dan *manganese peroxidase* (MnP)). Ketiga enzim ini bertanggung jawab terhadap pemecahan awal polimer lignin dan menghasilkan 40 produk dengan berat molekul rendah pada kapang pelapuk putih, contoh jamur pelapuk putih yakni jamur *Phanaerochaete chrysosporium* (Perez dkk., 2002).

#### **2.4 Karakteristik *Trichoderma viride***

*Trichoderma viride* termasuk kedalam golongan *Trichoderma spp.* Taksonomi *T. viride* bergantung pada apakah fungi tersebut merupakan bentuk aseksual (teleomorf) atau seksual (anamorf) (Harman, 2006). Berdasarkan penampakan fisiknya hifa pada *T. viride* berbentuk pipih, bersekat, dan bercabang-cabang membentuk anyaman yang disebut miselium. Miselium

tersebut dapat tumbuh dengan cepat dan memproduksi berjuta-juta spora, karena sifatnya inilah *T. viride* dikatakan memiliki daya kompetisi yang tinggi (Alexopoulos dan Mims, 1979).

*Trichoderma viride* merupakan salah satu jamur pelapuk lunak yang mampu memproduksi kompleks enzim selulase yaitu, endoselulase dan eksoselulase (Eaton dan Hale, 1993). Namun, *Trichoderma spp.* juga tidak bisa langsung diklasifikasikan sebagai jamur pelapuk lunak, karena belum secara tegas dikonfirmasi menyebabkan rongga pada dinding sel sekunder kayu lunak (Daniel, 2016). Keunggulan kapang *T. viride* dalam menghasilkan enzim selulase lengkaplah yang dibutuhkan untuk menghidrolisis selulosa kristal (Volk, 2004). Selobiohidrolase adalah enzim yang mempunyai afinitas terhadap selulosa tingkat tinggi yang mampu memecah selulosa kristal, sedangkan endoglukanase bekerja pada selulosa amorf (Coughlan, 1989). *T. viride* selain menghasilkan enzim selulase, juga dapat menghasilkan enzim endo-1,4- $\beta$ -xilanase yang mampu mendegradasi xilan (Ujiie dkk., 1991). Hasil penelitian Neethu dkk. (2012) terdapat strain *T. viride* yang menunjukkan aktivitas lignoselulolitik. Hal ini menunjukkan *T. viride* juga memiliki kemampuan untuk mendegradasi lignoselulosa. Pada penelitian oleh Karimi dkk., (2017) *Trichoderma viride* menunjukkan kemampuannya dalam mendegradasi lignin dengan batang padi sebagai medianya. *T. viride* merupakan jenis yang paling banyak dijumpai diantara genusnya dan mempunyai kelimpahan yang tinggi pada tanah dan bahan yang mengalami dekomposisi (Barnett dan Hunter, 1987).

*Trichoderma viride* dapat tumbuh optimal apabila memenuhi beberapa kriteria yang telah diteliti sebelumnya. pH 4 merupakan pH optimal untuk *T. viride* tumbuh dan untuk memproduksi enzim selulase pH optimum mendekati pH 3. Selama memproduksi enzim, pH dipertahankan pada kondisi 3-4. Apabila pH dibawah 2 maka akan terjadi inaktivasi enzim. Suhu optimum untuk pertumbuhannya yaitu, antara 32-35°C. Pada produksi enzim suhu optimum antara 25-28°C. Enzim selulase yang dihasilkan oleh *T. viride* aktif dengan optimum pada kondisi pH 4 dan akan tetap stabil antara pH 3-7 dengan suhu optimum 50°C, aktivitasnya akan menurun pada suhu lebih dari 50°C (Arnata, 2009).

## 2.5 *Solid State Fermentation* (Fermentasi Padat)

Pada umumnya proses fermentasi dapat dilakukan dengan dua jenis cara yaitu, dengan metode kultur permukaan dan kultur terendam. Medium kultur permukaan dapat berupa medium padat, semi padat, atau cair. Pada kultur terendam (*submerged*) metodenya dilakukan pada medium cair menggunakan bioreaktor yang dapat berupa labu beraerasi, labu yang digoyang dengan *shaker* atau *fermentor* (Rahman, 1992). Berdasarkan beberapa penelitian *solid state fermentation* (fermentasi padat) memiliki beberapa keunggulan dibandingkan dengan *submerged fermentation* (fermentasi terendam).

Potensi dari *solid state fermentation* (fermentasi padat) sangatlah besar untuk produksi enzim. Biomassa dari hasil perkebunan dan pertanian merupakan salah satu media terbaik pada proses *solid state fermentation*, dimana proses aerasi terfasilitasi melalui ruang antara media (Soccol dkk., 1994). Selain itu, hilangnya fase cair dan rendahnya kandungan air menyebabkan terjadinya penurunan penggunaan ruang pada fermentor saat proses, menurunkan potensi kontaminasi bakteri, menurunkan biaya produksi, dan lebih mudah dalam aplikasinya (Roussos dkk., 1991 dan Tengerdy, 1998). Selain itu, perlu dipertimbangkan penyediaan kandungan air serta pengaturan  $A_w$  (*water activity*) yang tepat untuk produksi enzim, karena  $A_w$  akan berbeda tergantung pada jenis mikroba yang digunakan. Selain itu, juga perlu dipertimbangkan kesulitan untuk pengontrolan pH selama fermentasi (Pandey dkk., 2001). Pada penelitian oleh Krishna (1999) produksi selulase oleh *Bacillus subtilis* pada limbah batang buah pisang pada *solid state fermentation* 12 kali lebih tinggi daripada *submerged fermentation*. Pada penelitian lain oleh Neagu dkk. (2012) mengenai perbandingan antara *submerged fermentation* dan *solid state fermentation* menggunakan *Trichoderma reesei* untuk memproduksi selulase didapatkan hasil, bahwa produksi selulase tertinggi didapatkan pada *solid state fermentation*.

## 2.6 Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim

### 2.6.1 Enzim Selulase

Enzim selulase merupakan kumpulan dari beberapa enzim yang bekerja untuk hidrolisis selulosa. Mikroorganisme tertentu dapat menghasilkan partikel yang dinamakan selulosom. Partikel inilah yang akan terdisintegrasikan menjadi enzim, yang secara sinergis mendegradasi selulosa (Belitz dkk, 2008). Enzim selulase merupakan salah satu kelompok enzim yang diproduksi mikroorganisme dalam degradasi material sel tumbuhan. Enzim ini termasuk dalam famili glikosil hidrolase. Enzim selulase berperan dalam hidrolisis selulosa dengan memecah ikatan  $\beta$ -1,4-D-glikosida untuk menghasilkan oligosakarida maupun glukosa. Berdasarkan aktivitasnya terhadap berbagai substrat, selulase diklasifikasikan menjadi tiga tipe, yaitu endoglukanase (*endo- $\beta$ -1,4-glucanase*, EC 3.2.1.4),  $\beta$ -glukosidase ( *$\beta$ -D-glucoside glucohydrolase*, EC 3.2.1.21) dan selobiohidrolase atau eksoglukanase (*exo- $\beta$ -1,4-glucanase*, EC 3.2.1.91) (Zhang dkk., 2006). Berdasarkan penelitian oleh Monterqrit (2007) mengenai “Isolasi dan Karakterisasi Selulase dari *Trichoderma viride* dan *Rhizopus Spp.* dengan Substrat Jerami Padi” pH dan suhu optimum selulase adalah pH 5 dan suhu 60°C, sedangkan stabilitas pH dan suhu selulase pada pH 3-7 dan suhu 30-80°C.

### 2.6.2 Enzim Xilanase

Enzim xilanase adalah kelompok enzim yang mampu memecah xilan menjadi senyawa lebih sederhana baik berupa xilooligosakarida maupun xilosa. Xilanase dapat diklasifikasikan berdasarkan substrat yang dihidrolisis, yaitu  $\beta$ -xilosidase dan endoxilanase. Xilanase pada umumnya merupakan protein kecil yang memiliki berat molekul antara 15.000-30.000 dalton serta aktif pada suhu 55°C dengan pH 9. Xilanase akan lebih stabil pada suhu 60°C dan pH netral (Richana, 2002). Pada penelitian “Karakterisasi Enzim Xilanase Hasil Isolasi dari *Trichoderma viride* yang Diamobilkan pada Matriks Pasir Laut Teraktivasi HCl” oleh Adiningtyas (2016), kondisi optimum xilanase adalah pada pH 6 dan suhu 50°C.

## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian dilaksanakan di *Environmental Science Laboratory, Prefectural University of Hiroshima*, Jepang, serta Laboratorium Kimia dan Biokimia Pangan dan Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember. Waktu penelitian dilaksanakan mulai bulan Agustus 2017 sampai Februari 2019.

### 3.2 Alat dan Bahan

#### 3.2.1 Bahan Penelitian

Bahan baku dalam penelitian ini yaitu, batang tembakau kering yang diperoleh dari PTPN 10 Penelitian Tembakau Jember. Bahan kimia yang digunakan meliputi, aquades, PDA (*Potato Dextrosa Agar*) (Merck),  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (Merck),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Merck), glukosa (Merck), xilosa (Merck), selulosa (Merck), xilan (Merck), larutan Somogy-Nelson (Merck),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Merck),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (Merck),  $\text{H}_2\text{SO}_4$  72% (Merck). Kultur mikroorganisme yang digunakan adalah kapang *Trichoderma viride* yang diperoleh dari Laboratorium *Prefectural University of Hiroshima*, Jepang.

#### 3.2.2 Alat Penelitian

Peralatan penelitian yang digunakan yaitu, alat gelas (*glassware*) (pirex), oven (Scientific Series 2000), *blender* (National), ayakan Tyler 60 mesh, *Laminar Air Flow* (Microtech Model V3), *magnetic stirrer* (Rexim RSH-1DN), spektrofotometer (Genesys 10 UV), *Autoklav Sturdy* (SA – 300VL), inkubator (Scientific Series 2000), *shaker incubator* (Wise Cube®), *refrigerated macrocentrifuge* (Model-2-16 kl), *hot plate*, digital pH meter, tanur, neraca analitik, dan pengering vakum.

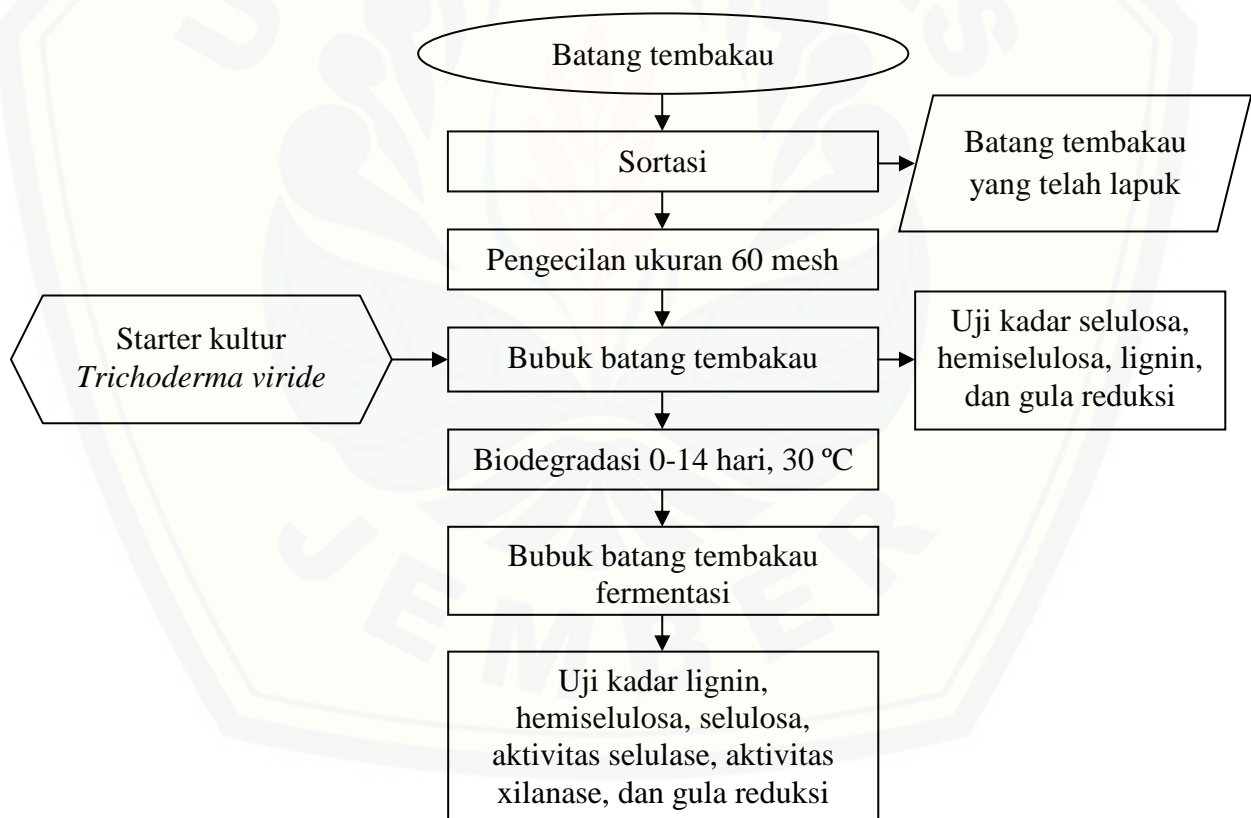
### 3.3 Pelaksanaan Penelitian

#### 3.3.1 Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan pada penelitian ini adalah rancangan acak lengkap faktor tunggal yaitu lama inkubasi. Rangkaian waktu inkubasi antara lain: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, dan 14 hari, dimana hari ke-0 sebagai kontrol. Setiap perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali. Data yang diperoleh disajikan dalam bentuk tabel, grafik, serta narasi secara deskriptif.

#### 3.3.2 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang terdiri dari empat tahap yaitu, preparasi bahan baku, persiapan strater, biodegradasi, dan analisis. Diagram alir rancangan penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1.

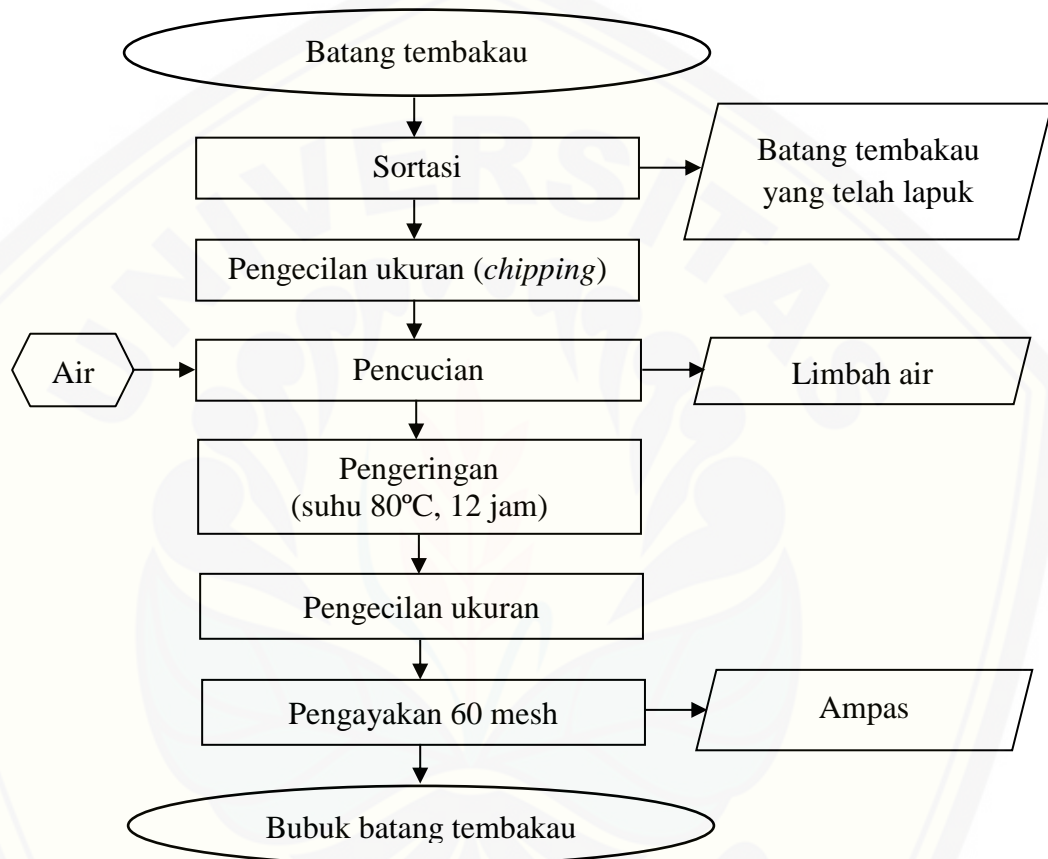


Gambar 3.1 Diagram alir rancangan penelitian

#### a. Preparasi Bahan Baku

Bahan baku yang digunakan dalam penelitian ini adalah batang tembakau dari PTPN 10 Penelitian Tembakau Jember. Sortasi batang tembakau, dipilih yang

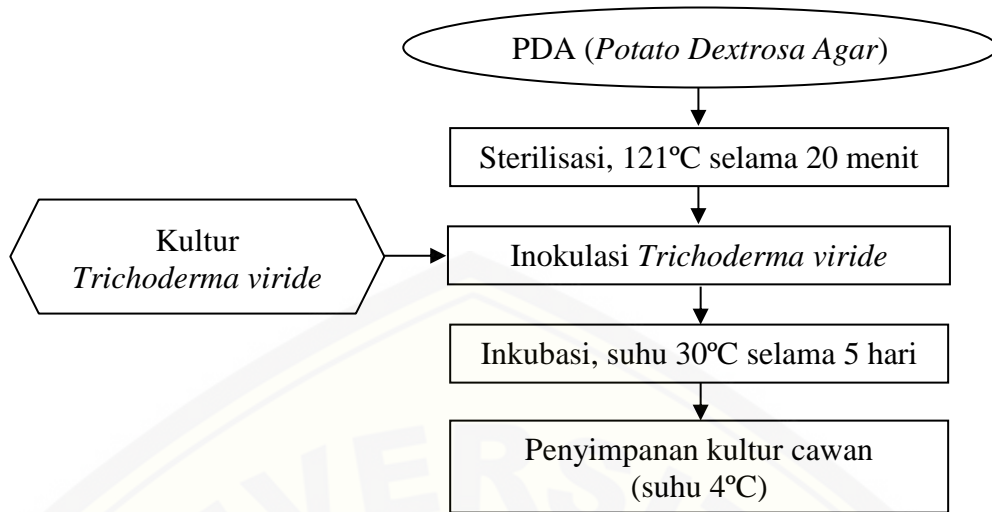
tidak lapuk. Batang tembakau yang telah disortasi mengalami pengecilan ukuran berbentuk *chip* berukuran 1-5 cm. *Chip* batang tembakau dicuci lalu dikeringkan pada suhu 80°C selama 12 jam, kemudian dibubukkan. Setelahnya, bubuk batang tembakau diayak dengan ukuran ayakan 60 mesh. Diagram alir preparasi bahan baku bubuk batang tembakau dapat dilihat pada Gambar 3.2.



Gambar 3.2 Diagram alir preparasi bahan baku bubuk batang tembakau

#### b. Persiapan Starter

Kultur *Trichoderma viride* dari *Prefectural University of Hiroshima*, Jepang yang akan digunakan sebagai inokula dibiakkan pada PDA (*Potato Dextrose Agar*) yang telah di sterilisasi pada suhu 121°C selama 15-20 menit. Selanjutnya dilakukan penanaman kultur pada PDA yang telah steril, lalu inkubasi selama 5 hari pada suhu 30°C. Apabila tidak langsung digunakan, cawan kultur *T. viride* disimpan pada suhu 4°C. Diagram alir proses persiapan starter dapat dilihat pada Gambar 3.3.

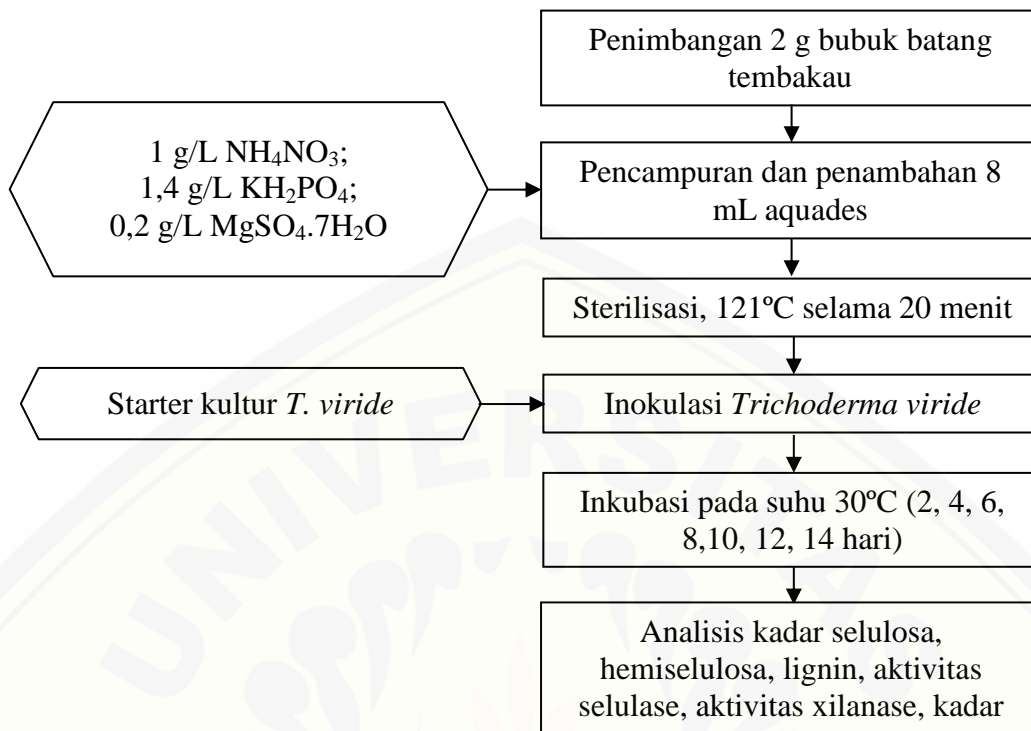


Gambar 3.3 Diagram alir persiapan starter *T. viride* termodifikasi (Karimi dkk., 2017)

#### c. Biodegradasi

Proses degradasi menggunakan *Trichoderma viride* dilakukan dengan fermentasi pada media padat atau *solid state fermentation* yang terkomposisi dari 2 g bubuk batang tembakau dan 8 mL aquades. Kemudian dilakukan penambahan nutrisi pada media yaitu,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , dan  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  dengan konsentrasi masing-masing adalah 1 g/L; 1,4 g/L dan 0,2 g/L serta dilakukan pengaturan pH menjadi 4. Tahap selanjutnya adalah sterilisasi substrat dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit. Setelah sterilisasi, substrat yang telah dingin di inokulasi dengan 1 *plug* (diamater = 10 mm) agar dari PDA pembiakkan kultur cawan *T. viride*, lalu di inkubasi pada suhu 30°C selama 2, 4, 6, 8, 10, 12 dan 14 hari. Diagram alir proses degradasi termodifikasi dapat dilihat pada Gambar 3.4.





Gambar 3.4 Diagram alir proses degradasi termodifikasi (Su dkk., 2016)

### 3.4 Parameter Pengamatan

Parameter yang diamati pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

- 3.4.1 Kadar Lignoselulosa (Datta, 1981)
- 3.4.2 Aktivitas Selulase (Metode Somogy-Nelson; Kitamura dan Nakatani, 2012)
- 3.4.3 Aktivitas Xilanase (Metode Somogy-Nelson; Kitamura dan Nakatani, 2012)
- 3.4.4 Kadar Gula Reduksi (Metode Somogy-Nelson; Kitamura dan Nakatani, 2012)

### 3.5 Prosedur Parameter Pengamatan

#### 3.5.1 Penentuan Kadar Lignoselulosa

Analisis lignoselulosa dilakukan menggunakan metode Chesson yang dikembangkan oleh Datta (1981). Adapun metodenya yaitu, disiapkan satu g sampel kering (a g) ditambahkan 150 mL H<sub>2</sub>O. Direfluk dengan *waterbath* pada suhu 100°C selama 2 jam. Hasilnya disaring, residu dikeringkan dengan oven sampai konstan kemudian ditimbang (b g). Residu yang telah dikeringkan

ditambah 150 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M dan direfluk pada suhu 100°C selama 2 jam. Hasilnya disaring sampai netral dan dikeringkan kemudian di timbang (c g). Residu sampel yang telah dikeringkan ditambah 10 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% (v/v) dan direndam pada suhu kamar selama 4 jam. Kemudian diencerkan menjadi 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, dan direfluk pada suhu 100°C selama 2 jam. Residu disaring dan dinetralkan, kemudian dikeringkan dan ditimbang (d g), selanjutnya residu yang telah kering diabu dan ditimbang (e g).

$$\text{Hemiselulosa (\%)} = \frac{b-c}{a} \times 100\%$$

$$\text{Selulosa (\%)} = \frac{c-d}{a} \times 100\%$$

$$\text{Lignin (\%)} = \frac{d-e}{a} \times 100\%$$

### 3.5.2 Penentuan Aktivitas Selulase dan Xilanase

#### a. Pembuatan Buffer

Buffer yang digunakan adalah buffer sodium fosfat (pH 6, 25°C). Buffer dibuat dari bahan kimia Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O dan NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O. 1,79 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 1 M ditara dengan aquades hingga 50 mL. 0,78 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 1 M ditara dengan aquades hingga 50 mL. Kemudian 6 mL Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 0,1 M dicampur dengan 44 mL NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0,1 M.

#### b. Pembuatan Kurva Standar

Kurva standar diperoleh dengan cara membuat seri konsentrasi glukosa dan xilosa. 1 mL larutan dari masing-masing konsentrasi glukosa atau xilosa dimasukkan dalam tabung reaksi terpisah dengan tutup. Kemudian ditambahkan 1 mL reagen Somogy dan dicampur, setelah tercampur tabung reaksi berisi larutan glukosa dan somogy dipanaskan dalam air mendidih (100°C) selama 20 menit. Setelah 20 menit tabung reaksi didinginkan selama ± 5 menit. Larutan yang telah dingin kemudian ditambahkan 1 mL reagen Nelson dan dicampur, lalu dibiarkan bereaksi selama ± 30 menit. Larutan kemudian ditara hingga 25 mL (setelah ± 30 menit) dengan aquades. Setiap tabung yang berisi larutan dari masing-masing konsentrasi glukosa kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 500 nm. Data yang didapat kemudian dibuat menjadi kurva standar.

### c. Penentuan Aktivitas Selulase dan Xilanase

Sampel yang berupa padatan dilarutkan terlebih dahulu dengan menambahkan 20 mL aquades steril, lalu diaduk dengan spatula kaca steril. Setelahnya, dilakukan sentrifuse pada 5000 rpm selama 5-10 menit. Filtrat hasil sentrifuse pertama kemudian diambil dan dilakukan sentrifuse kedua pada 5000 rpm selama 3 menit. Filtrat hasil sentrifuse kedua yang digunakan sebagai sampel (larutan enzim). Kemudian 1 mL larutan enzim direbus dalam air bersuhu 100°C selama  $\pm 5$  menit, sedangkan 1 mL lainnya tidak direbus. Masing-masing larutan kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi bertutup. Lalu menimbang 1% (0,01 g) bubuk selulosa atau xilan dan ditambahkan pada masing-masing larutan. Lalu ditambahkan pula 1 mL buffer sodium fosfat pada masing-masing larutan dan divortex. Larutan kemudian diinkubasi pada *shaker incubator* selama 2 jam 30 menit pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi, larutan disentrifuse dan diambil supernatannya. 1 mL larutan sampel kemudian diambil dan dimasukkan dalam tabung reaksi bertutup. Kemudian ditambahkan 1 mL reagen Somogy dan dicampur, setelah tercampur tabung reaksi berisi larutan sampel dan somogy dipanaskan dalam air mendidih (100°C) selama 20 menit. Setelah 20 menit tabung reaksi didinginkan selama  $\pm 5$  menit. Larutan yang telah dingin kemudian ditambahkan 1 mL reagen Nelson dan dicampur, lalu dibiarkan bereaksi selama  $\pm 30$  menit. Larutan kemudian ditera hingga 25 mL (setelah  $\pm 30$  menit) dengan aquades. Tabung reaksi berisi sampel kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 500 nm. Apabila hasil absorbansi lebih tinggi daripada kurva standar, maka larutan sampel dapat diencerkan. Setelahnya, data yang didapat dimasukkan pada kurva standar glukosa. Satu unit sama dengan pelepasan 1  $\mu$  mol glukosa atau xilosa per menit.

### 3.5.3 Penentuan Kadar Gula Reduksi

Penentuan kadar gula reduksi dilakukan mengacu kepada metode yang Somogy-Nelson modifikasi oleh Kitamura dan Nakatani (2012), adapun metode yang dilakukan yaitu sebagai berikut.

a. Pembuatan Kurva Standar

Kurva standar diperoleh dengan cara membuat seri konsentrasi glukosa. 1 mL larutan dari masing-masing konsentrasi glukosa dimasukkan dalam tabung reaksi terpisah dengan tutup. Kemudian ditambahkan 1 mL reagen Somogy dan dicampur, setelah tercampur tabung reaksi berisi larutan glukosa dan somogy dipanaskan dalam air mendidih (100°C) selama 20 menit. Setelah 20 menit tabung reaksi didinginkan selama  $\pm 5$  menit. Larutan yang telah dingin kemudian ditambahkan 1 mL reagen Nelson dan dicampur, lalu dibiarkan bereaksi selama  $\pm 30$  menit. Larutan kemudian ditera hingga 25 mL (setelah  $\pm 30$  menit) dengan aquades. Setiap tabung yang berisi larutan dari masing-masing konsentrasi glukosa kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 500 nm. Data yang didapat kemudian dibuat menjadi kurva standar.

b. Penentuan Gula Reduksi

Sampel yang berupa padatan dilarutkan terlebih dahulu dengan menambahkan 20 mL aquades steril, lalu diaduk dengan spatula kaca steril. Setelahnya, dilakukan sentrifuse pada 5000 rpm selama 5-10 menit. Filtrat hasil sentrifuse pertama kemudian diambil dan dilakukan sentrifuse kedua pada 5000 rpm selama 3 menit. Filtrat hasil sentrifuse kedua yang digunakan sebagai sampel. 1 mL larutan sampel kemudian diambil dan dimasukkan dalam tabung reaksi bertutup. Kemudian ditambahkan 1 mL reagen Somogy dan dicampur, setelah tercampur tabung reaksi berisi larutan sampel dan somogy dipanaskan dalam air mendidih (100°C) selama 20 menit. Setelah 20 menit tabung reaksi didinginkan selama  $\pm 5$  menit. Larutan yang telah dingin kemudian ditambahkan 1 mL reagen Nelson dan dicampur, lalu dibiarkan bereaksi selama  $\pm 30$  menit. Larutan kemudian ditera hingga 25 mL (setelah  $\pm 30$  menit) dengan aquades. Tabung reaksi berisi sampel kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 500 nm. Apabila hasil absorbansi lebih tinggi daripada kurva standar, maka larutan sampel dapat diencerkan. Setelahnya, data yang didapat dimasukkan pada kurva standar glukosa.

### 3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh dilakukan perhitungan menggunakan rumus yang telah tersedia kemudian dimasukkan pada aplikasi *microsoft excel* dan disusun yang disajikan dalam bentuk ilustrasi tabel, grafik, serta narasi secara deskriptif.



## BAB 5. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian degradasi batang tembakau menggunakan *Trichoderma viride* selama 14 hari dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. *T. viride* mampu mendegradasi selulosa dan hemiselulosa pada substrat, ditunjukkan dengan adanya aktivitas enzim selulase dan xilanase serta adanya penurunan kadar selulosa dan hemiselulosa. Tetapi, belum mampu mendegradasi lignin terlihat dengan rendahnya penurunan kadar lignin hingga hari ke-14,
2. kadar lignoselulosa terendah adalah pada hari ke-14 dengan nilai selulosa, hemiselulosa, dan lignin sebesar 23,557%; 33,960%; dan 21,873%. Aktivitas selulase dan xilanase tertinggi adalah pada hari ke-14 masing-masing bernilai 1,709 mU/mL dan 1,379 mU/mL, dan
3. nilai kadar gula reduksi tertinggi pada hari ke-14 sebesar 1,496 mg/mL.

### 5.2 Saran

Untuk meningkatkan efisiensi degradasi perlu dilakukan optimasi degradasi lignin. Optimasi yang dapat dilakukan diantaranya adalah kombinasi dengan mikroba lain, seperti jamur pelapuk putih (mis. *Phanaerocahete cryosporium*). Perlu dilakukan pengontrolan serta penggunaan pH dan suhu optimum mikroba, serta perhitungan populasi *Trichoderma viride* untuk memperkuat bahwa telah terjadi biodegradasi secara optimal.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Adiningtyas, N. 2016. Karakterisasi Enzim Xilanase Hasil Isolasi dari *Trichoderma viride* yang Diamobilkan pada Matriks Pasir Laut Teraktivasi HCl. *Tesis*. Malang: Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Malang Universitas Brawijaya.
- Alexopoulos, C. J. dan C. W. Mims. 1979. *Introductory Mycology*. London: Champman and Hall.
- Anindyawati, T. 2009. *Potensi Selulase dalam Mendegradasi Lignoselulosa Limbah Pertanian untuk Pupuk Organik*. Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI Jl. Raya Bogor Km. 46 Cibinong 16911.
- Aribowo, S. S., P. R. Sarjono, dan N. S. Mulyani. 2012. Aktivitas *Trichoderma viride* Fnc6013 dalam menghidrolisis kulit pisang raja (*Musa paradisiaca L. var. Sapientum*) dengan variasi waktu fermentasi. *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*, 15(2):53-57.
- Arnata, I. W. 2009. Pengembangan Alternatif Teknologi Bioproses Pembuatan Bioetanol dari Ubi Kayu Menggunakan *Trichoderma viride*, *Aspergillus niger* dan *Saccharomyces cerevisiae*. *Tesis*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Aswathy, U., R. K. Sukumaran, G. L. Devi, K. Rajasree, R. R. Singhanian, dan A. Pandey. 2010. Bio-ethanol from water hyacinth biomass: an evaluation of enzymatic saccharification strategy. *Bioresour. Technol.* 101:925–930.
- Aziz, A. A., M. Husin, dan A. Mokhtar. 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.
- Barnet, H. L. dan B. B. Hunter. 1987. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. Ed ke-4. New York: MacMillan Publishing Company.
- Belitz, H.D., W. Grosch, dan P. Schieberle. 2008. *Food Chemistry*. Ed ke-4. Berlin: Springer-Verlag.

- Bragatto, J., D. D. d Nascimento, L. F. Boaretto, F. Segato, dan C. A. Labate. 2016. Tobacco stalk as promising feedstock for second generation ethanol production. *Bioenergia em revista: diálogos*, 6(2):47-61, Jul./Dez. 2016.
- Brijwani, K., H. S. Oberoi, dan P. V. Vadlani. 2010. Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. *Process Biochem*, 45:120–128.
- Chandel, A. K., G. Chandrasekhar, K. Radhika, R. Ravinder, dan P. Ravindra. 2011. Bioconversion of pentose sugars into ethanol: A review and future directions. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 6(1): 8-20.
- Coughlan, M. P. 1989. *Enzyme System for Lignocellulose Degradation*. London & New York: Elsevier Applied Science.
- Cyplik A., P., Olejnik A., Cyplik P., Dach J., dan Czarnecki Z. 2009. The kinetics of nicotine degradation, enzyme activities and genotoxic potential in the characterization of tobacco waste composting. *Bioresource Technology*, 100(21):5037-44.
- Daniel, G. 2016. *Fungal Degradation of Wood Cell Walls*. Dalam *Secondary Xylem Biology: Origins, Functions, and Applications*. Editor: Kim, Y. S., R. Funada, dan A. P. Singh. Amerika: Academic Press.
- Datta, R. 1981. Acidogenic fermentation of lignocellulose acid yield and conversion of components. *Biotechno*. Dioeng 23:2167-2170.
- Deobald, M. P. dan D. Crawford. 2002. *Lignocellulose Biodegradation*. Di dalam: Hurst, Crawford, Kudsan, McInerney, dan Stetzenbach. Ed Manual of Environmental Microbiologys. Ed ke-2. Washington: ASM Press.
- Donev, J. M. K. C., Suarez, L. V., Stenhouse, K., Sheardown, A., Jenden, J., dan Hanania, J. 2020. Biomass. <https://energyeducation.ca/encyclopedia/Biomass> [Diakses pada 05 April 2020].



- Eaton, R. A. dan M. D. C. Hale. 1993. *Wood: Decay, Pests and Protection*. London: Chapman and Hall.
- Energy Efficiency and Renewable Energy. 2020. Bioenergy Basics. <https://www.energy.gov/eere/bioenergy/bioenergy-basics> [Diakses pada 04 April 2020].
- Eshtiaghi, M. N., N. Yoswathana, J. Kuldiloke, dan A. G. Ebadi. 2012. Preliminary study for bioconversion of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) to bioethanol. *African Journal of Biotechnology*, 11(21):4921-4928.
- Faulon, J., G.A. Carlson. 1994. A three-dimensional model for lignocellulose from gymno-spermous wood. *Organic Geochemistry*, 21:1169-1179.
- Fitriani, E. 2003. Aktivitas Enzim Karboksimetil Selulase *Bacillus pumilus* Galur 55 Pada Berbagai Suhu Inkubasi. *Skripsi*. Bogor: Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor.
- Fransiska, W. A., Hardiansyah, O. K. Sari, D. Nugroho, Safda R. R. D. W. S, dan D. F. Al Riza. 2015. Pengolahan Serat Batang tembakau sebagai Soundproofing Material: Alternatif Penanggulangan Limbah Batang Tembakau. *Prosiding Seminar Nasional PERTETA 2015*, Makassar, Sulawesi Selatan, 5-7 Agustus 2015.
- Ghorbani, F., M. Karimi, D. Biria, H. R. Kariminia, dan A. Jeihanipour. 2015. Enhancement of fungal delignification of rice straw by *trichoderma viride* sp. to improve its saccharification. *Biochemical Engineering Journal*, 101:77-84.
- Gould, J. M. 1984. Alkaline peroxide delignification of agricultural residues to enhance enzymatic saccharification. *Biotechnology and Bioengineering*, 26(1):46-52.
- Goyal, M., K. L. Kalra, V. K. Sareen, dan G. Soni. 2008. Xylanase production with xylan rich lignocellulasic waste by a local soil isolate of *Trichoderma viride*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(3):535-541.

- Guragain, Y. N., J. De Coninck, F. Husson, A. Durrand, dan S. K. Rakshit. 2011. Comparison of some new pretreatment methods for second generation bioethanol production from wheat straw and water hyacinth. *Bioresour. Technol.*, 102(6):4416-4424.
- Hamelinck, C. N., A. P. C Faaij, H. den Uil, dan H. Boerrigter. 2003. *System Analysis of Biomass Derived FT Liquids; Technical Options, Process Optimisation and Development Potential*. Utrecht, Netherlands: Utrecht University Department of Science Technology and Society.
- Hamelinck, C. N., G. van Hooijdonk, dan A.P.C. Faaij. 2005. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass and Bioenergy*, 28:384–410.
- Hamelinck, C. N. dan A. P. C. Faaij. 2006. Production of advanced biofuels. *International Sugar Journal*, 108(1287).
- Handayani, S. S., Tarnanda, R., Rahayu, Bq. A., dan Amrullah. 2018. Proses degradasi lignin pada limbah batang tembakau sebagai persiapan produksi bioetanol. *J. Pijar MIPA*, 13(2):140-146.
- Hanum, C. 2008. *Teknik Budaya Tanaman*. Jilid 3. Jakarta: Departemen Pendidikan Nasional.
- Harman, G. E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma spp.* *Phytopathology*, 96(2):190-194.
- Harmsen, P. F. H., W. J. J. Huijgen, L. M. Bermúdez López, dan R. R. C. Bakker. 2010. *Literature Review of Physical and Chemical Pretreatment Processes for Lignocellulosic Biomass*. Belanda: Energy Research Centre of The Netherlands, ECN-E--10-013.
- Harun, M. Y., A. B. D. Radiah, Z. Z. Abidin, dan R. Yunus. 2011. Effect of physical pretreatment on dilute acid hydrolysis of water hyacinth (*Aichhornia crassipes*). *Bioresour. Technol.*, 102:5193-5199.

- Hatakka, A. 2001. *Biodegradation of lignin*. In: Steinbüchel A. Ed: Biopolymers. Vol 1: Lignin, Humic Substances and Coal. Germany: Wiley VCH.
- Holtzapfel, M. T. 2003. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Amerika: Academic Press.
- Houghton, J., S. Weatherwax, dan J. Ferrell. 2006. Breaking the biological barriers to cellulosic ethanol (a joint research agenda). *A research roadmap resulting from the biomass to biofuels workshop sponsored by the office of science and office of energy efficiency and renewable energy, US Dept of Energy*. Dec. 7-9, 2005 Rockville, Maryland.
- Howard, R.L., E. Abotsi, E. L. J. van. Rensburg, dan S. Howard. 2003. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology* 2(12):602-619.
- Huang, H., X. Guo, D. Li, M. Liu, J. Wu, dan H. Ren. 2011. Identification of crucial yeast inhibitors in bio-ethanol and improvement of fermentation at high pH and high total solids. *Bioresour. Technol.*, 102(16):7486-7493.
- Ibrahim, M. 1998. *Clean Fractionation of Biomassa – Steam Explosion and Extraction*. Amerika: Faculty of The Virginia Polytechnic Institute and State University.
- Isroi, R. Milati, S. Syamsiah, C. Niklasson, M. N. Cahyanto, K. Lundquist, dan M. J. Taherzadeh. 2011. Biological treatment of lignocelulloses with white-rot fungi and its applications (review). *Bioresources*, 6(4):5224-5259.
- Joshi, B., M. R. Bhatt, D. Sharma, J. Joshi, R. Malla, dan L. Sreerama. 2011. Lignocellulosic ethanol production: current practices and recent developments (review). *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 6(8):172-182.
- Judoamidjojo, R. M., E. G. Sa'id, L. Hartoto. 1989. *Biokonversi*. Bogor: Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Dirjen Dikti, Pusat Antar Universitas Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor.

- Jumino, 2013. Konsep Pengolahan Batang Tembakau Menjadi Bubur Selulosa dan Uji Spesifikasinya Sebagai Bahan Kertas. *Skripsi*. Yogyakarta: Program Studi Agronomi Yogyakarta.
- Kilpelainen, I., H. Xie, A. King, M. Granstrom, S. Heikkinen, dan D. S. Argyropoulos. 2007. Dissolution of wood in ionic liquids. *J. Agric. Food Chem*, 55(22):9142-9148.
- Kim, Y., R. Hendrickson, N. S. Mosier, dan M. R. Ladisch. 2009. Liquid hot water pretreatment of cellulosic biomass. *Methods Mol Biol.*, 581:93-102.
- Kosan, B., C. Michels, dan F. Meister. 2008. Dissolution and forming of cellulose with ionic liquids. *Cellulose*, 15:59-66.
- Karimi, M., R. Esfandiar, dan D. Biria. 2017. Simultaneous delignification and saccharification of rice straw as a lignocellulosic biomass by immobilized trichoderma viride sp. to enhance enzymatic sugar production. *Renewable Energy*, 104:88-95.
- Kirk-Othmer. 2001. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. Amerika: John Wiley & Sons, Inc.
- Kitamura, N. dan S. Nakatani. 2012. *A Method for Quantitative Analysis of Sugar, Basic Course of Biotechnology*. Vol. 90. Jepang: Japan Society for Biotechnology.
- Kodri, B. D. Agro, dan R. Yulianingsih. 2013. Pemanfaatan enzim selulase dari trichoderma reseei dan aspergillus niger sebagai katalisator hidrolisis enzimatik jerami padi dengan pretreatment microwave. *Biopres Komoditas Tropis*, 1(1).
- Krishna, C. 1999. Production of bacterial cellulase by solid state bioprocessing of banana waste. *Bioresource Technology*, 69:231-239.
- Kubata, Suzuki, Horitsu, Kawal, dan Takamizawa. 1994. Purification and characterization of aeromonas caviae me-1 xylanases v, which produces

excusevely xylobiose from xylan. *Appl. Environ. Microbiol*, 60(2):531-535.

Lee, S. H., T. V. Doherti, dan J. S. Dordick. 2009. Ionic liquid-mediated selective extraction of lignin from wood leading to enhanced enzymatic cellulose hydrolysis. *Biotechnol Bioeng*, 102: 1368-1376.

Lembaga Penelitian Tembakau Jember. 2017. Olah Limbah Tembakau, Reduksi Penggunaan Plastik. <https://litbangjember.wordpress.com/2017/02/07/olah-limbah-tembakau-reduksi-penggunaan-plastik/> [Diakses pada 07 Oktober 2017].

Merina, F. dan Y. Trihadiningrum. 2011. Produksi Bioethanol dari Eceng Gondok (*Eichornia crassipes*) dengan *Zymomonas mobilis* dan *Saccharomyces cerevisiae*. Prosiding Semnas Manajemen Teknologi XIII, Vol. 5. Institut Teknologi Surabaya.

Monterqrit. 2007. Isolasi dan karakterisasi selulase dari trichoderma viride dan rhizopus spp dengan substrat jerami padi. *Jurnal Peternakan Indonesia*, 12(2):112-123.

Mosier, N., C. Wyman. 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 96(6): 673-686.

Muhammad, N., Z. Man, M. A. Bustam, M. I. A. Mutalib, C. D. Wilfred, dan S. Rafiq. 2011. Dissolution and delignification of bamboo biomass using amino acid-based ionic liquid. *Appl Biochem Biotechnol*, 165:1-12.

Murray, R. K., D. K. Granner, P. A. Mayes, V. W. Rodwell. 2003. *Harper's Illustrated Biochemistry*. Ed ke-26. San Fransisco: McGraw-Hill.

National Renewable Energy Laboratory. 2020. Biomass Energy Basics. <https://www.nrel.gov/research/re-biomass.html> [Diakes pada 05 April 2020].

- Neagu, D. A., J. Destain, P. Thonart, dan C. Socaciu. 2012. *Trichoderma reesei* cellulase produced by submerged versus solid state fermentations. *Bulletin UASVM Agriculture*, 69(2)/2012.
- Neethu, K., M. Rubeena, S. Sajith, S. Sreedevi, P. Priji, K. N. Unni, M. K. Sarath Josh, V. N. Jisha, S. Pradeep, dan S. Benjamin. 2012. A novel strain of trichoderma viride shows complete lignocellulolytic activities. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 3:1160-1166.
- Neves, M. A., T. Kimura, N. Shimizu, M. Nakajima. 2007. State of the art and future trends of bioethanol production. *Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology*, 1(1):1-14.
- O'Connor, R.P., R. Woodley, J.J. Kolstad, R. Kean, D.A. Glassner, B. Mastel, J.M. Ritzenthaler, H. John, J. Warwick, J.R. Hettenhaus & R.K. Brooks. 2007. *Process for Fractionating Lignocellulosic Biomass Into Liquid and Solid Products*. assignee U. S. A. Nature-works LLC, patent number WO 2007120210.
- Palupi, B., Rahmawati, I., dan Rizkiana, M.F. 2018. Pemberdayaan masyarakat agribisnis berbasis pemanfaatan sumber daya lokal limbah batang tembakau sebagai pewarna alami batik di Desa Tamansari. *Warta Pengabdian*, 12(4):398-408.
- Pan, X. J., C. Arato, N. Gilkes, D. Gregg D, W. Mabee, K. Pye, Z. Xiao, X. Zhang, dan J. Saddler. 2005. Biorefining of softwoods using ethanol organosolv pulping: Preliminary evaluation of process streams for manufacture of fuel-grade ethanol and co-products. *Biotechnol. Bioeng.*, 90:473-481.
- Pandey, A., C. Soccol, J. Rodriguez-Leon, dan P. Nigam. 2001. *Solid-State Fermentation in Biotechnology-Fundamentals and Applications*. New Delhi, India: Asiatech Publ. Inc.
- Pandey, S., M. Srivastava, M. Shahid, V. Kumar, A. Singh, S. Trivedi, dan Y. K. Srivastava. 2015. *Trichoderma* species cellulases produced by solid state fermentation. *J Data Mining Genomics Proteomics* 2015, 6:2.

- Pang, P. K., Darah I., L. Poppe, G. Szakacs, dan C. O. Ibrahim. 2006. Xylanase production by a local isolate, *Trichoderma* spp. FETL c3-2 via solid state fermentation using agricultural wastes as substrate. *Malaysian Journal of Microbiology*, 2(1):7-14.
- Perez, J. A., D. J. Munoz., D. L. T. Rubia, dan J. Martinez. 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *J International Microbiology*, 5(2):53-63.
- Perez, J. A., A. Gonzalez, J. M. Oliva, I. Ballesteros, dan P. Manzanares. 2007. Effect of process variables on liquid hot water pretreatment of wheat straw for bioconversion to fuel- ethanol in a batch reactor. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 82(10): 929-938.
- Prawitwong, P., A. Kosugi, T. Arai, L. Deng, K. C. Lee, D. Ibrahim, Y. Murata, O. Sulaiman, R. Hashim, K. Sudesh, W. A. Ibrahim, M. Saito, dan Y. Mori. 2012. Efficient ethanol production from separated parenchyma and vascular bundle of oil palm trunk. *Bioresour Technol*, 125:37-42.
- Purwono, S., B. Murachman, J. Wintoko, B. Simanjuntak, P. Sejati, N. Permatasari, dan D. Lidyawati. 2011. The effect of solvent for extraction for removing nicotine on the development of charcoal briquette from waste of tobacco stem. *Journal of Sustainable Energy & Environment*, 2:11-13.
- Rahman, A. 1992. *Teknologi Fermentasi*. Jakarta: Penerbit Arcan.
- Raven, P.H., R.F. Evert. 1992. *Biology of Plants*. Ed ke-6. Amerika: W.H. Freeman dan Worth Publishers.
- Richana, N. 2002. Produksi dan prospek enzim xilanase dalam pengembangan bioindustri di indonesia. *Buletin AgroBio*, 5(1):29-36.
- Roussos, S. A. Olmos, M. Raimbult, dan G. Saucedo-Castaneda. 1991. Strategies for large scale inoculum development for solid state fermentation system: Conidiospores of *Trichoderma harzianum*. *Biotechnology Techniques*, 5(6):415-420.

- Saha, B. dan M. A. Cotta. 2007. Enzymatic saccharification and fermentation of alkaline peroxide pretreated rice hull to ethanol. *Enzyme and Microbial Technology*, 41(4):528-532.
- Sanchez, O.O., dan C. A. Cardona. 2007. Trends of biotechnological production of fuel ethanol from different feedstock (review). *Bioresource Technology*: Artikel in Press.
- Saraswati, E., E. Santoso dan E. Yuniarti. 2010. Organisme Perombak Bahan Organik. <http://balittanah.litbang.pertanian.go.id/ind/dokumentasi/buku/pupuk/pupuk10.pdf> [Diakses pada 20 Februari 2020].
- Sari, I. P., L. K. Nuswantara, dan J. Achmadi. 2019. Pengaruh suplementasi karbohidrat mudah larut yang berbeda dalam pakan berbasis jerami padi amoniasi terhadap degradabilitas ruminal in vitro. *Jurnal Sain Peternakan Indonesia*, 14(2).
- Sassner, P., C. G. Martensson, M. Galbe, dan G. Zacchi. 2008. Steam pretreatment of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-impregnated Salix for the production of bioethanol. *Bioresour. Technol.*, 99:137-145.
- Sathitsuksanoh, N., A. George, dan H. P. Zhangy. 2012. New lignocellulose pretreatments using cellulose solvents: a review. *J. Chemistry Technol. Biotechnol.*, 88(2).
- Satyanagalakshmi, K., R. Sindhu, P. Binod, dan K. Usha. 2011. Bioethanol production from acid pretreated water hyacinth by separate hydrolysis and fermentation. *Journal of scientific and industrial research*, 70(2):156-161.
- Simanjuntak, M. 2007. Optimasi Formula Mikroenkapsulat Minyak Sawit Merah Menggunakan Maltodekstrin, Gelatin dan Carboxymethyl Cellulose dengan Proses Thin Layer Drying. *Skripsi*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Soccol, C., B. Marin, M. Raimbault, dan J. -M. Lebeault. 1994. Potential of solid state fermentation for production of L (+)-lactic acid by *Rhizopus oryzae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41(3):286-290.



- Sonika, P., M. Srivastava, M. Shahid, V. Kumar, A. Singh, S. Trivedi, dan Y. K. Srivastava. 2015. *Trichoderma* species cellulases produced by solid state fermentation. *J Data Mining Genomics Proteomics*, 6:2.
- Sornvoraweat, B. dan J. Kongkiattikajorn. 2010. Separated hydrolysis and fermentation of water hyacinth leaves for ethanol production. *วารสารวิจัย มช.*, 15(9): 794-802.
- Su, Y., H. Xian, S. Shi, C. Zhang, S. M. N. Manik, J. Mao, G. Zhang, W. Liao, Q. Wang, dan H. Liu. 2016. Biodegradation of lignin and nicotine with white rot fungi for the delignification and detoxification of tobacco stalk. *BMC Biotechnology*, 16:81.
- Subramaniyan, S. dan P. Prema. 2002. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. *Crit Rev Biotechnol*, 22(1):33-64.
- Sukumaran, R. K., R. R. Singhanian, dan A. Pandey. 2005. Microbial cellulases production, applications and challenges. *J. Sci. Ind. Res.*, 64:832-844.
- Sun, Y. dan J. Cheng. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic material for ethanol production (a review). *Biores. Technol.*, 83:1-11.
- Taherzadeh, M. J. dan K. Karimi. 2008. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 9(9):1621-1651.
- Tarmansyah, U. S. 2007. Pemanfaatan Serat Rami untuk Pembuatan Selulosa. *Buletin Balitbang Deptan, STT No. 2289 Volume 10 No.18 Litbang Pertahanan Indonesia, Jakarta Selatan.*
- Teixeira, L. C., J. C. Linden, dan H. A. Schroeder. 1999. Optimizing peracetic acid pretreatment conditions for improved simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) of sugar cane bagasse to ethanol fuel. *Renew. Energ.*, 16:1070-1073.

- Tengerdy, R. P. 1998. Solid substrate fermentation for enzyme production. *Advances in Biotechnology*, A Pandey (Ed): 13-16.
- Teymouri, F., L. Laureano-Perez, H. Alizadeh, dan B. E. Dale. 2005. Optimization of the ammonia fiber explosion (AFEX) treatment parameters for enzymatic hydrolysis of corn stover. *Bioresour. Technol.* 96:2014-2018.
- The Japan Institute of Energy. 2008. *Buku panduan Biomassa Asia, Pamduan untuk Produksi dan Pemanfaatan Biomassa*. Japan: kementerian Pertanian, Kehutanan, dan Perikanan Jepang.
- Tim Penulis PS. 1993. *Pembudidayaan, Pengolahan dan Pemasaran Tembakau*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- U.S. Energy Information Administration. 2018. Biomass: Renewable Energy from Plants and Animals. <https://www.eia.gov/energyexplained/biomass/> [Diakses pada 05 April 2020].
- Ujiie, M., C. Roy, dan M. Yaguchi. 1991. Low-molecular-weight xylanase from *Trichoderma viride*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(6): 1860-1862.
- Volk, T. J. 2004. *Tom Volk's Fungus of The Month for November 2004*. La Crosse: University of Wisconsin.
- Yamashita, Y., M. Shono, C. Sasaki, dan Y. Nakamura. 2010. Alkaline peroxide pretreatment for efficient enzymatic saccharification of bamboo. *Carbohydrate Polymers*, 79(4):914-920.
- Zhang, Y. H. P., M. E. Himmel, J. R. Mielenz. 2006. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotech Adv.*, 24(5):452-481.
- Zheng, Y., Z. Pan, dan R. Zhang. 2009. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. *Int J Agric & Biol Eng*, 2(3):51-68.

Zhong, W., Z. Zhang, W. Qiao, P. Fu, dan M. Liu. 2011. Comparison of chemical and biological pretreatment of corn straw for biogas production by anaerobic digestion. *Renewable energy*, 36:1875-1879.



## LAMPIRAN

**LAMPIRAN 4.1. KADAR LIGNOSELULOSA BUBUK BATANG  
TEBKAU SELAMA FERMENTASI 14 HARI**

## 4.1.1 Kadar Hemiselulosa Batang Tembakau

Hari	Kadar hemiselulosa (%)			Jumlah	Rata-rata	SD
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3			
0	24,720	24,200	24,870	73,790	24,597	0,352
6	23,960	23,750	24,550	72,260	24,087	0,481
8	23,730	23,520	24,350	71,600	23,867	0,432
10	23,800	23,610	24,010	71,420	23,807	0,200
12	23,740	23,250	24,100	71,090	23,697	0,427
14	23,540	23,330	23,800	70,670	23,557	0,235

## 4.1.2 Kadar Selulosa Batang Tembakau

Hari	Kadar selulosa (%)			Jumlah	Rata-rata	SD
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3			
0	36,070	36,380	35,620	108,070	36,023	0,382
6	36,000	35,880	35,510	107,390	35,797	0,255
8	35,630	35,910	35,380	106,920	35,640	0,265
10	35,000	35,680	34,890	105,570	35,190	0,428
12	34,260	34,180	33,650	102,090	34,030	0,332
14	33,790	34,320	33,770	101,880	33,960	0,312

## 4.1.3 Kadar Lignin Batang Tembakau

Hari	Kadar lignin (%)			Jumlah	Rata-rata	SD
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3			
0	21,880	22,060	21,790	65,730	21,910	0,137
6	21,880	22,050	21,790	65,720	21,907	0,132
8	21,880	22,050	21,780	65,710	21,903	0,137
10	21,880	22,040	21,780	65,700	21,900	0,131
12	21,850	22,040	21,790	65,680	21,893	0,131
14	21,880	22,050	21,750	65,680	21,893	0,150

## 4.1.4 Persentase Degradasi Hemiselulosa

Hari	Kadar Hemiselulosa (%)			Persentase Degradasi Hemiselulosa (%)			Jumlah	Rata-rata	SD
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3			
0	24,720	24,200	24,870	-	-	-	-	-	-
6	23,960	23,750	24,550	3,074	1,860	1,287	6,221	2,074	0,913
8	23,730	23,520	24,350	4,005	2,810	2,091	8,906	2,969	0,967
10	23,800	23,610	24,010	3,722	2,438	3,458	9,618	3,206	0,678
12	23,740	23,250	24,100	3,964	3,926	3,096	10,986	3,662	0,491
14	23,540	23,330	23,800	4,773	3,595	4,302	12,671	4,224	0,593

## 4.1.5 Persentase Degradasi Selulosa

Hari	Kadar Selulosa (%)			Persentase Degradasi Selulosa (%)			Jumlah	Rata-rata	SD
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3			
0	36,070	36,380	35,620	-	-	-	-	-	-
6	36,000	35,880	35,510	0,194	1,374	0,309	1,877	0,626	0,651
8	35,630	35,910	35,380	1,220	1,292	0,674	3,186	1,062	0,338
10	35,000	35,680	34,890	2,966	1,924	2,049	6,940	2,313	0,569
12	34,260	34,180	33,650	5,018	6,047	5,531	16,595	5,532	0,515
14	33,790	34,320	33,770	6,321	5,662	5,194	17,177	5,726	0,566

## 4.1.6 Persentase Degradasi Lignin

Hari	Kadar Lignin (%)			Persentase Degradasi Lignin (%)			Jumlah	Rata-rata	SD
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3			
0	21,880	22,060	21,790	-	-	-	-	-	-
6	21,880	22,050	21,790	0,000	0,045	0,000	0,045	0,015	0,026
8	21,880	22,050	21,780	0,000	0,045	0,046	0,091	0,030	0,026
10	21,880	22,040	21,780	0,000	0,091	0,046	0,137	0,046	0,045
12	21,850	22,040	21,790	0,137	0,091	0,000	0,228	0,076	0,070
14	21,880	22,050	21,750	0,000	0,045	0,184	0,229	0,076	0,096

Contoh perhitungan persentase degradasi lignoselulosa:

Nilai kadar selulosa kontrol hari ulangan 1 = 36,070%. Nilai kadar selulosa pada waktu fermentasi hari ke-8 ulangan 1 = 35,630%

$$\text{Persentase degradasi (\%)} = \frac{(\text{kadar lignoselulosa kontrol} - \text{kadar lignoselulosa setelah fermentasi})}{\text{kadar lignoselulosa kontrol}} \times 100\%$$

$$\text{Persentase degradasi selulosa (\%)} = \frac{(\text{kadar selulosa kontrol} - \text{kadar selulosa hari ke 8})}{\text{kadar selulosa kontrol}} \times 100\%$$

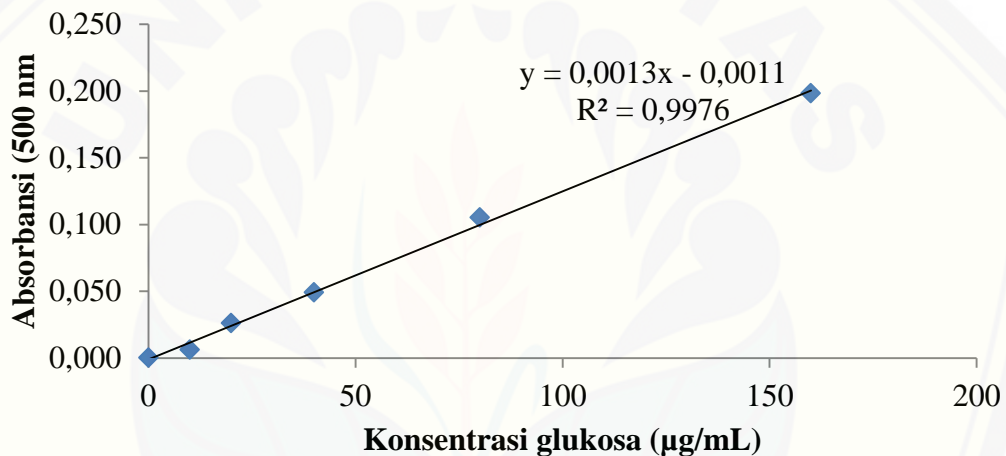
$$\begin{aligned} \text{Persentase degradasi selulosa (\%)} &= \frac{(36,070 - 35,630)}{36,070} \times 100\% \\ &= \frac{0,44}{36,070} \times 100\% \\ &= 1,220\% \end{aligned}$$

#### LAMPIRAN 4.2. PENENTUAN AKTIVITAS SELULASE *Trichoderma viride*

larutan glukosa standar = 0,1% = 0,1 g/100 mL = 1 mg/mL

volume pengambilan glukosa standar (mL)	H <sub>2</sub> O (mL)	konsentrasi glukosa (µg/mL)	Absorbansi
0	1	0	0
0,010	0,990	10	0,006
0,020	0,980	20	0,026
0,040	0,960	40	0,049
0,080	0,920	80	0,105
0,160	0,840	160	0,198

Kurva standar glukosa



##### 4.2.1 Hasil pengukuran aktivitas selulase (FP = 5)

Hari	Gula reduksi (µg/mL)			Aktivitas enzim (mU/mL)			Jumlah	Rata-rata	SD
	U1	U2	U3	U1	U2	U3			
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	6,923	6,154	7,692	0,256	0,228	0,285	0,769	0,256	0,028
4	9,231	8,462	9,615	0,342	0,313	0,356	1,011	0,337	0,022
6	11,154	10,769	11,538	0,413	0,399	0,427	1,239	0,413	0,014
8	14,615	15,385	16,538	0,541	0,570	0,613	1,724	0,575	0,036
10	28,462	27,308	28,846	1,054	1,011	1,068	3,134	1,045	0,030
12	42,692	42,308	43,462	1,581	1,567	1,610	4,758	1,586	0,022
14	46,538	45,000	46,923	1,724	1,667	1,738	5,128	1,709	0,038

Contoh perhitungan aktivitas selulase:

0,1 mL sampel diencerkan dengan aquades 0,4 mL hingga diperoleh faktor pengenceran 5. Kemudian dipipet 1 mL untuk dilakukan pengukuran kadar gula reduksi. Nilai gula reduksi pada waktu inkubasi 8 hari ulangan 1 = 11,923  $\mu\text{g/mL}$   
1 unit setara dengan pelepasan 1  $\mu\text{mol}$  glukosa per menit/mL

$$1 \text{ U/mL} = \frac{\text{kadar gula reduksi } (\mu\text{g/mL})}{180 \mu\text{g} \times 150 \text{ menit}}$$

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas selulase} &= \frac{11,923 \mu\text{g/mL}}{180 \mu\text{g} \times 150 \text{ menit}} \\ &= 0,000442 \text{ U/mL} \\ &= 0,442 \text{ mU/mL} \end{aligned}$$

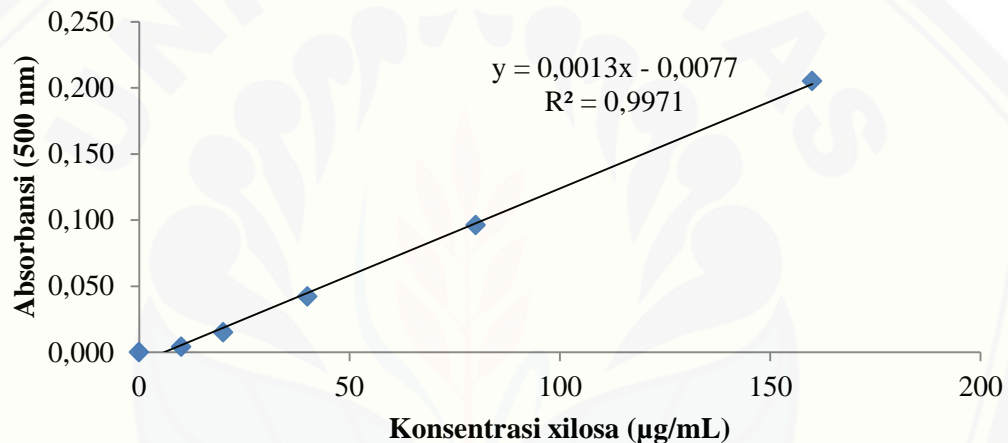


### LAMPIRAN 4.3. PENENTUAN AKTIVITAS XILANASE *Trichoderma viride*

larutan xilosa standar = 0,1% = 0,1 g/100 mL = 1 mg/mL

volume pengambilan glukosa standar (mL)	H <sub>2</sub> O (mL)	konsentrasi glukosa (µg/mL)	Absorbansi
0	1	0	0
0,010	0,990	10	0,004
0,020	0,980	20	0,015
0,040	0,960	40	0,042
0,080	0,920	80	0,096
0,160	0,840	160	0,205

Kurva standar xilosa



#### 4.3.1 Hasil pengukuran aktivitas xilanase (FP = 5)

Hari	Gula reduksi (µg/mL)			Aktivitas enzim (mU/mL)			Jumlah	Rata-rata	SD
	U1	U2	U3	U1	U2	U3			
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	6,423	6,038	6,808	0,285	0,268	0,303	0,856	0,285	0,017
4	14,115	13,346	15,269	0,627	0,593	0,679	1,899	0,633	0,043
6	22,577	21,808	23,346	1,003	0,969	1,038	3,010	1,003	0,034
8	27,577	27,192	28,731	1,226	1,209	1,277	3,711	1,237	0,036
10	29,115	28,346	29,500	1,294	1,260	1,311	3,865	1,288	0,026
12	29,885	28,731	30,269	1,328	1,277	1,345	3,950	1,317	0,036
14	31,038	30,654	31,423	1,379	1,362	1,397	4,138	1,379	0,017

Contoh perhitungan aktivitas xilanase:

0,1 mL sampel diencerkan dengan aquades 0,4 mL hingga diperoleh faktor pengenceran 5. Kemudian dipipet 1 mL untuk dilakukan pengukuran kadar gula reduksi. Nilai gula reduksi pada waktu inkubasi 8 hari ulangan 1 = 27,577  $\mu\text{g/mL}$  1 unit setara dengan pelepasan 1  $\mu\text{mol}$  xilosa per menit/mL

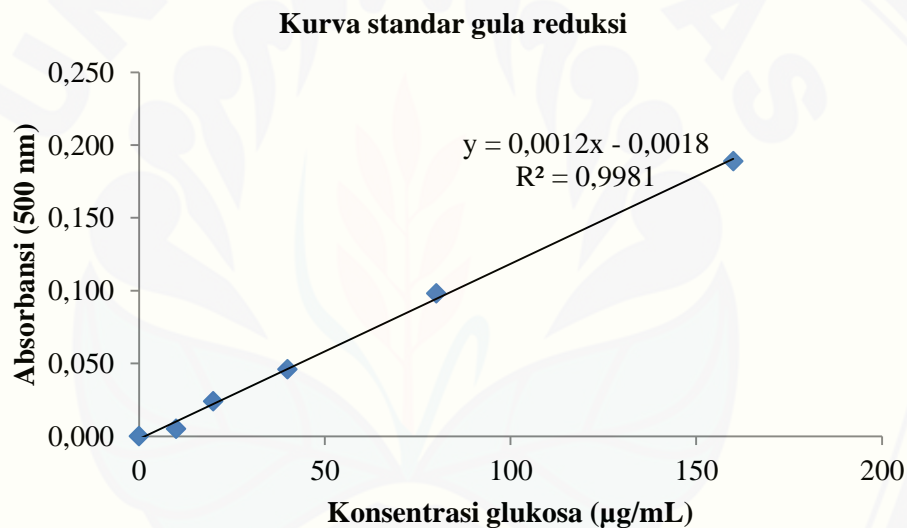
$$1 \text{ U/mL} = \frac{\text{kadar gula reduksi } (\mu\text{g/mL})}{180 \mu\text{g} \times 150 \text{ menit}}$$

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas selulase} &= \frac{27,577 \mu\text{g/mL}}{150 \mu\text{g} \times 150 \text{ menit}} \\ &= 0,001226 \text{ U/mL} \\ &= 1,226 \text{ mU/mL} \end{aligned}$$

**LAMPIRAN 4.4. PENENTUAN KADAR GULA REDUKSI**

larutan glukosa standar = 0,1% = 0,1 g/100 mL = 1 mg/mL

volume pengambilan glukosa standar (mL)	H <sub>2</sub> O (mL)	konsentrasi glukosa (µg/mL)	Absorbansi
0	1	0	0
0,010	0,990	10	0,005
0,020	0,980	20	0,024
0,040	0,960	40	0,046
0,080	0,920	80	0,098
0,160	0,840	160	0,189

**4.4.1 Hasil pengukuran kadar gula reduksi (FP = 10)**

Hari	Kadar gula reduksi (mg/mL)			Jumlah	Rata-rata	SD
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3			
0	0,232	0,223	0,240	0,695	0,232	0,008
2	0,365	0,348	0,390	1,103	0,368	0,021
4	0,423	0,407	0,432	1,262	0,421	0,013
6	0,440	0,432	0,473	1,345	0,448	0,022
8	0,615	0,623	0,648	1,887	0,629	0,017
10	0,890	0,848	0,898	2,637	0,879	0,027
12	1,415	1,382	1,440	4,237	1,412	0,029
14	1,498	1,473	1,515	4,487	1,496	0,021

Contoh perhitungan gula reduksi:

0,1 mL sampel diencerkan dengan aquades 0,9 mL hingga diperoleh faktor pengenceran 10. Kemudian dipipet 1 mL untuk dilakukan pengukuran kadar gula reduksi. Nilai absorbansi gula reduksi pada waktu inkubasi 8 hari ulangan 1 = 0,072

Kadar gula reduksi = x ; dimana  $x = \frac{(y+0,0018)}{0,0012}$

Absorbansi = y

$$x = \frac{0,072+0,0018}{0,0012}$$

$$= 0,0615 \text{ mg/mL}$$

Faktor Pengenceran (FP) = 10

$$\begin{aligned} \text{Sehingga kadar total gula terlarut (g/L supernatan)} &= 0,0615 \text{ mg/mL} \times \text{FP} \\ &= 0,0615 \text{ mg/mL} \times 10 \\ &= 0,615 \text{ mg/mL} \end{aligned}$$

## LAMPIRAN 4.5. DOKUMENTASI KEGIATAN

### 4.5.1 Proses pembuatan bubuk batang tembakau



Pengeringan batang tembakau yang telah dicuci



Chipping



Pengecilan ukuran



Pengayakan



Bubuk batang tembakau

#### 4.5.2 Proses peremajaan kultur kapang



Pembuatan media PDA



Sterilisasi media



Penuangan media dan inokulasi kultur kapang



Kultur kapang (*Trichoderma viride*)

### 4.5.3 Proses biodegradasi bubuk batang tembakau



Penimbangan bubuk tembakau dan penambahan aquades + nutrisi



Sterilisasi substrat



Inokulasi *Trichoderma viride*



Fermentasi selama 14 hari

**4.5.4 Analisis lignoselulosa**



Pengambilan sampel



Pemanasan pada *waterbath*



Penyaringan



Pengeringan



Hidrolisis oleh  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,5 M pada pendingin balik



Penyaringan





Hidrolisis pada pendingin balik



Penyaringan dan penetralan



Pengabuan

#### 4.5.5 Analisis aktivitas enzim



Supernatan sampel



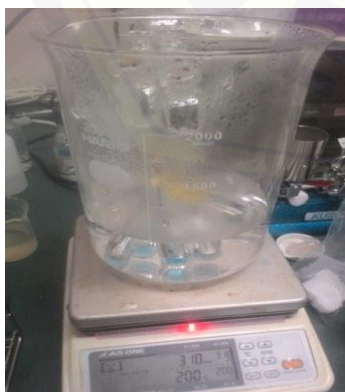
Penambahan selulosa/xilan dan buffer



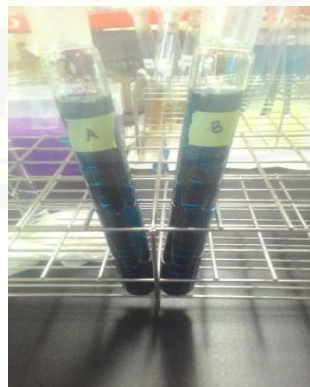
Fermentasi selama 14 hari



Penambahan reagen somogyi



Pemanasan



Penambahan reagen nelson



Pengukuran Absorbansi

#### 4.5.6 Analisis gula reduksi



Penambahan reagen somogyi



Pemanasan



Penambahan reagen nelson



Pengukuran absorbansi