



**HIDROLISIS TANDAN KOSONG KELAPA SAWIT OLEH
ENZIM EKSTRASELULER *Trichoderma viride***

SKRIPSI

Oleh
Larasati
NIM 101810401006

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2015**



**HIDROLISIS TANDAN KOSONG KELAPA SAWIT OLEH
ENZIM EKSTRASELULER *Trichoderma viride***

SKRIPSI

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

Oleh
Larasati
NIM 101810401006

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2015**

PERSEMBAHAN

Dengan penuh rasa syukur, cinta, terima kasih dan bangga skripsi ini saya persembahkan kepada:

1. Allah SWT, tempat ku berlindung, bergantung, memohon dan berserah diri;
2. kedua orang tuaku tercinta yang selalu memberi kasih sayang, do'a yang tiada hentinya untukku dan pengorbanan baik moril maupun materil hingga saat ini;
3. kakakku dan adikku tersayang yang telah memberikan motivasi, semangat, do'a selama menempuh pendidikan;
4. guru-guruku yang terhormat sejak Taman Kanak-Kanak hingga Perguruan Tinggi yang telah mendidik dan memberikan banyak ilmu yang bermanfaat;
5. teman-teman dan sahabat-sahabatku Jurusan Biologi 2010 Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember;
6. Almamater tercinta, Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember yang kucintai dan kujunjung tinggi.

MOTO

Dan orang-orang yang bersungguh-sungguh, akan Kami tunjukkan kepada mereka jalan-jalan Kami. Dan sungguh, Allah beserta orang-orang yang berbuat baik.

(terjemahan Surat Al –‘Ankabut ayat 69)^{*)}

If the stone fall upon the egg, alas for the egg! If the egg fall upon the stone, alas for the egg!^{**)}

Jika anda tidak pernah mencoba, maka anda tidak akan pernah tahu
Jika anda tidak pernah kalah, maka anda tidak akan pernah belajar cara menang
Jika anda tidak pernah terpuruk, maka anda tidak akan tahu cara untuk bangkit
(Damayanti)

^{*)}Departemen Agama Republik Indonesia. 2008. *Al Quran dan Terjemahannya*. Depok: PAI-Qur'an Tajwid.

^{**)} Setiawan, W dan Budiman, A. 2004. *Kamus Lengkap Bahasa Inggris*. Bandung: Pustaka Grafika.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Larasati

NIM : 101810401006

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul **“Hidrolisis Tandan Kosong Kelapa Sawit oleh Enzim Ekstraseluler *Trichoderma viride*”** benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Penelitian ini dibiayai oleh Dr. Kahar Muzakhar, S.Si. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada unsur tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, Mei 2015

Yang Menyatakan,

Larasati

NIM. 101810401006

SKRIPSI

**HIDROLISIS TANDAN KOSONG KELAPA SAWIT OLEH
ENZIM EKSTRASELULER *Trichoderma viride***

Oleh

**Larasati
NIM 101810401006**

Pembimbing

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

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

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Hidrolisis Tandan Kosong Kelapa Sawit Oleh Enzim Ekstraseluler *Trichoderma viride*” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember pada:

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas
Jember.

Tim Penguji

Ketua,

Sekretaris,

Dr. Kahar Muzakhar, S.Si.
NIP 196805031994011001

Drs. Rudju Winarsa, M.Kes.
NIP 196008161989021001

Anggota I,

Anggota II,

Drs. Siswanto, M.Si.
NIP 196012161993021001

Dr.rer.nat. Kartika Senjarini, M.Si.
NIP 197509132000032001

Mengesahkan

Dekan,

Prof. Drs. Kusno, DEA., Ph.D.
NIP 196101081986021001

RINGKASAN

Hidrolisis Tandan Kosong Kelapa Sawit Oleh Enzim Ekstraseluler *Trichoderma viride*; Larasati; 101810401006; 2015; 38 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS) merupakan hasil limbah utama produksi kelapa sawit yang keberadaannya sangat berlimpah. Komponen utama yang terkandung dalam TKKS di antaranya selulosa 50%, hemiselulosa 25%, dan lignin 25%. Selain itu, terdapat beberapa kandungan hara di antaranya karbon 41%, nitrogen 0,87%, dan sulphur 0,07% yang mendukung TKKS dijadikan pupuk organik, namun nisbah C/N pada TKKS berkisar 65-100 yang menyebabkan dekomposisi TKKS sulit dilakukan. Selain karena nisbah C/N yang tinggi, dekomposisi TKKS juga sulit dilakukan karena kandungan lignoselulosa pada TKKS juga sangat tinggi. Lignoselulosa merupakan komponen polimer yang tersusun antara selulosa dan lignin. Proses dekomposisi pada TKKS sebenarnya dapat terjadi dengan sendirinya, namun membutuhkan waktu sekitar 6-12 bulan. Proses mempercepat dekomposisi dapat dilakukan dengan penambahan mikroba yang mampu mensekresi enzim ekstraseluler. *T. viride* merupakan salah satu jenis kapang yang mampu mensekresi enzim ekstraseluler seperti selulase, xilanase, glukonase, dan protease. Selain itu, *T. viride* mempunyai daya kompetitif yang tinggi karena pertumbuhannya yang sangat cepat. Penambahan *T. viride* tersebut diharapkan dapat mempercepat hidrolisis komponen-komponen dalam TKKS untuk proses mempercepat proses dekomposisi TKKS. Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui kemampuan enzim ekstraseluler yang dihasilkan oleh *T. viride* dalam menghidrolisis TKKS.

Penelitian ini dilaksanakan dalam empat tahap analisis yang berkesinambungan. Tahap pertama yaitu tahap persiapan bahan penelitian yang meliputi sub kultur *T. viride* strain B10 MCC-00136, pembuatan substrat alkali ekstrak TKKS, pembuatan

substrat TKKS jenuh air, dan pembuatan reagen Somogyi dan Nelson. Tahap kedua yaitu produksi *crude enzyme* meliputi pre-kultur isolat *T. viride* strain B10 MCC-00136 pada media TKKS agar miring 0,1%, penentuan kepadatan spora, optimasi produksi enzim ekstraseluler dari *T. viride* strain B10 MCC-00136 dan produksi enzim ekstraseluler dari *T. viride* strain B10 MCC-00136. Tahap ketiga yaitu penentuan stabilitas pH dan suhu, serta optimum pH dan suhu. Tahap keempat meliputi analisis kemampuan hidrolisis *crude enzyme* dari *T. viride* strain B10 MCC-00136 pada substrat alkali ekstrak TKKS 5%.

Hasil penelitian menunjukkan isolat *T. viride* strain B10 MCC-00136 yang ditumbuhkan pada media alkali ekstrak TKKS agar miring 0,1% dapat tumbuh dengan baik dan penghitungan spora didapatkan kepadatan spora yang sesuai untuk inokulum yaitu hari keempat dengan jumlah sel spora $5,5 \times 10^6$ sel spora/ml. Jumlah spora tersebut kemudian digunakan untuk optimasi produksi *crude enzyme T. viride* strain B10 MCC-00136 pada substrat TKKS jenuh air. Optimasi dilakukan selama 7 hari dan diketahui bahwa *crude enzyme* yang dihasilkan oleh *T. viride* strain B10 MCC-00136 mempunyai aktivitas tertinggi pada hari keenam dengan gula reduksi sebesar 72,8 $\mu\text{g/ml}$. Pada penentuan stabilitas dan optimum suhu dan pH diketahui bahwa *crude enzyme* dari *T. viride* strain B10 MCC-00136 mempunyai stabilitas pH antara pH 4 sampai 7 dan stabilitas suhu antara 35⁰C sampai 50⁰C serta optimum pada pH 7 dan optimum pada suhu 50⁰ C. Kemampuan analisis hidrolisis *crude enzyme* yang dihasilkan *T. viride* strain B10 MCC-00136 pada substrat TKKS 5% menunjukkan kemampuan *crude enzyme* dalam menghidrolisis komponen dalam TKKS dengan pembentukan gula reduksi tertinggi pada waktu inkubasi jam ke-12 yaitu sebesar 786,6 $\mu\text{g/ml}$ atau berkisar 1,6% komponen TKKS yang mampu di hidrolisis oleh *crude enzyme*.

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah Swt. atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Hidrolisis Tandan Kosong Kelapa Sawit Oleh Enzim Ekstraseluler *Trichoderma viride*”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

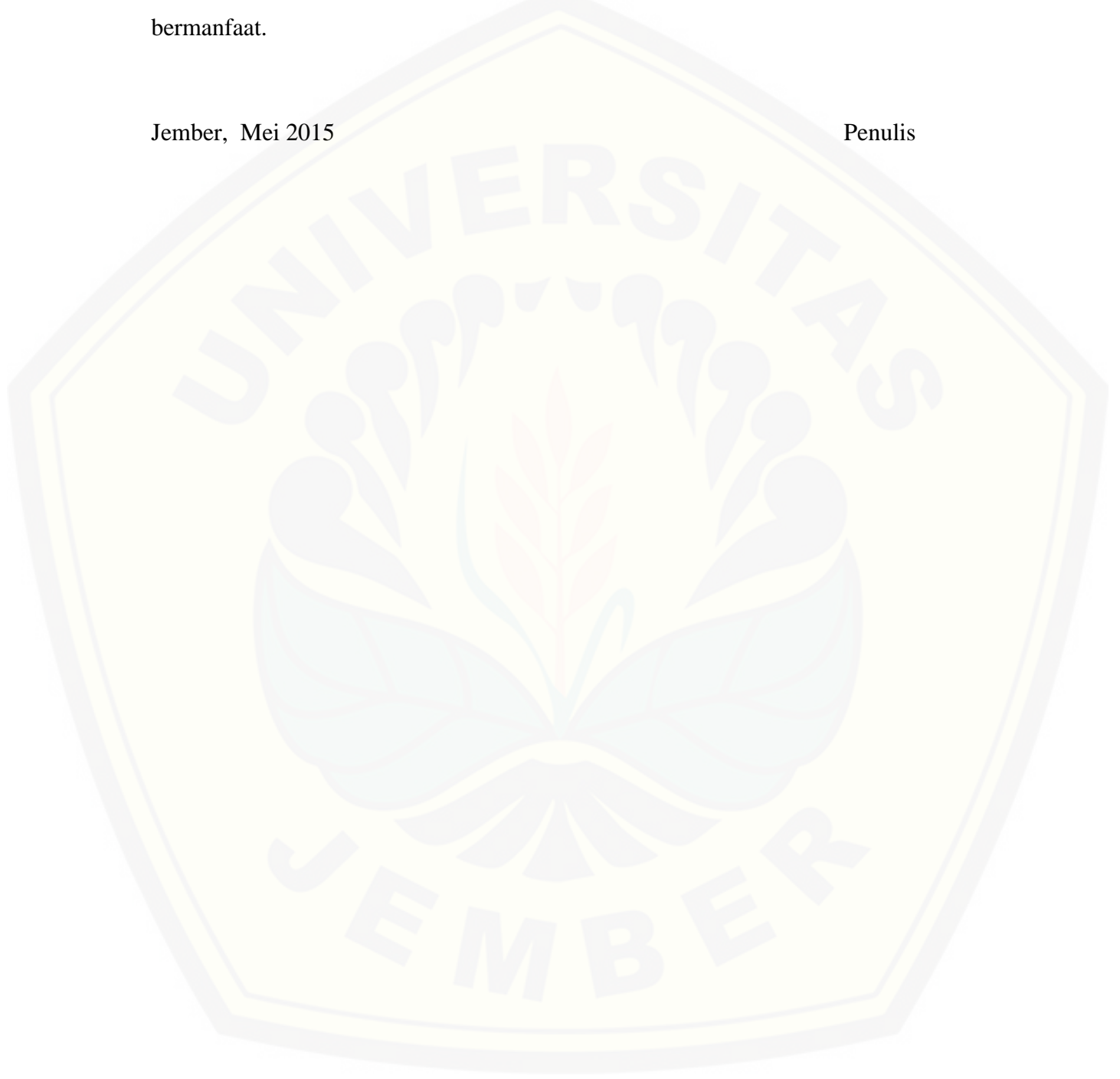
Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Dr. Kahar Muzakhar, S.Si., selaku Dosen Pembimbing Utama, dan Drs. Rudju Winarsa, M.Kes., selaku Dosen Pembimbing Anggota yang senantiasa memberikan bimbingan, arahan dan nasehat terbaik dalam penulisan skripsi ini;
2. Drs. Siswanto, M.Si., selaku Dosen Penguji I dan Dr. rer. nat Kartika Senjarini, M.Si., selaku Dosen Penguji II atas saran dan kritik yang sangat membangun demi kesempurnaan skripsi ini;
3. Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M.Agr.Sc., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing selama penulis menjadi mahasiswa;
4. Ir. Endang Soesetyaningsih dan Ulfatul Inayah selaku teknisi Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Botani yang telah membantu penulis selama penelitian;
5. Ibu, Ayah, Kakak, dan Adik, serta seluruh keluarga yang telah memberikan nasehat, dukungan moril dan materil serta doa yang tiada henti;
6. rekan kerjaku Citra, Latifah, Sri, Widya, Rosita, Syafiq, Atika, Anis, dan sahabatku Narita, Nindy, Dwi, Dini, Rohmatul, Annisa;
7. semua teman-teman di biologi khususnya angkatan 2010 atas kebersamaan, dukungan dan semangatnya selama ini serta semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

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

Jember, Mei 2015

Penulis



DAFTAR ISI

| | Halaman |
|---|----------------|
| HALAMAN JUDUL | i |
| HALAMAN PERSEMBAHAN | ii |
| HALAMAN MOTO..... | iii |
| HALAMAN PERNYATAAN..... | iv |
| HALAMAN PEMBIMBINGAN..... | v |
| HALAMAN PENGESAHAN..... | vi |
| RINGKASAN | vii |
| PRAKATA | ix |
| DAFTAR ISI | x |
| DAFTAR TABEL | xiii |
| DAFTAR GAMBAR..... | xiv |
| DAFTAR LAMPIRAN | xv |
| BAB I. PENDAHULUAN..... | 1 |
| 1.1 Latar Belakang | 1 |
| 1.2 Rumusan Masalah | 2 |
| 1.3 Batasan Masalah | 2 |
| 1.4 Tujuan | 3 |
| 1.5 Manfaat | 3 |
| BAB II. TINJAUAN PUSTAKA | 4 |
| 2.1 Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS) | 4 |
| 2.2 Kapang <i>Trichoderma viride</i> dan Enzim Ekstraseluler | 5 |
| 2.3 Hidrolisis Enzimatis Pada TKKS | 8 |
| BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN | 10 |
| 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian | 10 |
| 3.2 Alat Dan Bahan | 10 |
| 3.3 Prosedur Penelitian | 10 |

| | |
|--|-----------|
| 3.4 Tahapan dan Pelaksanaan Penelitian..... | 11 |
| 3.4.1 Tahapan Persiapan | 11 |
| 3.4.1.1 Stok Sub- Kulture <i>T. viride</i> | 11 |
| 3.4.1.2 Pembuatan Substrat Alkali Ekstrak TKKS | 11 |
| 3.4.1.3 Persiapan Substrat TKKS Jenuh Air..... | 12 |
| 3.4.1.4 Pembuatan Reagen <i>Somogyi</i> dan <i>Nelson</i> | 12 |
| 3.4.2 Produksi <i>Crude enzyme</i> | 13 |
| 3.4.2.1 Pre- Kultur Isolat <i>T. viride</i> | 13 |
| 3.4.2.2. Penentuan Kepadatan Sel Spora <i>T. viride</i> | 13 |
| 3.4.2.3 Optimasi Produksi <i>Crude enzyme</i> dari <i>T.viride</i> | 14 |
| 3.4.3 Uji Aktivitas <i>Crude enzyme</i> berdasarkan Analisis Gula Reduksi Metode Somogyi-Nelson | 15 |
| 3.4.3.1 Pembuatan Standart Glukosa | 15 |
| 3.4.3.2 Uji Aktivitas <i>Crude enzyme</i> | 15 |
| 3.4.4 Stabilitas dan Optimum pH dan Suhu <i>Crude enzyme</i> | 16 |
| 3.4.5 Analisis Kemampuan Hidrolisis <i>Crude enzyme</i> pada TKKS | 17 |
| BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN..... | 19 |
| 4.1 Kepadatan Sel Spora <i>T.viride</i> strain B10 MCC- 00136 | 19 |
| 4.2 Enzim Ekstraseluler <i>T. viride</i> strain B10 MCC- 00136 | 21 |
| 4.3 Stabilitas pH dan Optimum pH <i>Crude Enzyme</i> | 23 |
| 4.4 Stabilitas Suhu dan Optimum Suhu <i>Crude Enzyme</i> | 25 |
| 4.5 Kemampuan Hidrolisis <i>Crude Enzyme</i> pada Substrat TKKS | 27 |
| BAB 5. PENUTUP | 30 |
| 5.1 Kesimpulan | 30 |
| 5.2 Saran | 30 |
| DAFTAR PUSTAKA | 31 |
| LAMPIRAN..... | 36 |

DAFTAR TABEL

| | Halaman |
|---------------------------------|----------------|
| 2.1 Komponen kimiawi TKKS | 5 |



DAFTAR GAMBAR

| | Halaman |
|--|----------------|
| 2.1 Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS) | 4 |
| 2.2 Struktur mikroskopis <i>T.viride</i> | 6 |
| 4.1 Isolat <i>T.viride</i> pada media alkali ekstrak TKKS agar miring 0,1 % | 19 |
| 4.2 Kepadatan spora <i>T.viride</i> strain B10 MCC-00136 | 20 |
| 4.3 Aktivitas <i>crude enzyme</i> pada optimasi produksi berdasarkan analisis gula reduksi metode Somogyi-Nelson | 22 |
| 4.4 Aktivitas <i>crude enzyme</i> pada stabilitas pH dan Optimum pH | 24 |
| 4.5 Aktivitas <i>crude enzyme</i> pada stabilitas suhu dan Optimum suhu | 26 |
| 4.6 Kemampuan hidrolisis <i>crude enzyme</i> pada substrat TKKS 5% | 27 |

DAFTAR LAMPIRAN

| | Halaman |
|--|----------------|
| A. Komposisi Media | 36 |
| A.1 Komposisi Media Potato Dekstrosa Agar (PDA) | 36 |
| A.2 Komposisi Media Alkali Ekstrak TKKS Agar Miring 0,1% | 36 |
| A.3 Komposisi Media Produksi Enzim | 36 |
| A.4. Komposisi Susbrat Alkali Ekstrak TKKS 0,5% | 36 |
| A.5 Komposisi Substrat TKKS 5% | 37 |
| B. Komposisi Reagen Somogyi- Nelson | 37 |
| B.1 Komposisi Reagen Somogyi | 37 |
| B.2 Komposisi Reagen Nelson | 37 |
| C. Kurva Kalibrasi Glukosa | 38 |



BAB I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS) merupakan salah satu hasil limbah utama produksi kelapa sawit yang ketersediaannya sangat berlimpah yaitu sekitar 20 juta ton/tahun (Direktorat Jenderal Bina Produksi Perkebunan, 2012) yang pemanfaatannya belum optimal. Saat ini, pengolahan TKKS yang banyak dilakukan oleh pihak perkebunan adalah dengan cara dibakar, diolah menjadi mulsa, atau dibuang saja ke lingkungan. Pengolahan TKKS dengan cara dibakar akan berdampak negatif pada lingkungan karena dapat mencemari lingkungan sedangkan pengolahan TKKS menjadi mulsa membutuhkan biaya operasional yang tinggi (Moya and Torres R., 2012). TKKS sebenarnya dapat mengalami proses dekomposisi dengan sendirinya, namun membutuhkan waktu sekitar 6-12 bulan (Wahyuni, 2011). Hal tersebut dikarenakan tingginya komponen lignoselulosa pada TKKS yang dikenal sebagai komponen yang sulit didegradasi. Komponen utama yang terkandung dalam TKKS diantaranya yaitu selulosa 50%, hemiselulosa 25% dan lignin 25% (Alam *et al.*, 2009). Selain komponen utama tersebut, dalam TKKS juga terdapat beberapa kandungan hara diantaranya karbon 41%, nitrogen 0,87%, dan sulphur 0,07% yang mendukung TKKS ini dijadikan sebagai pupuk organik (Moya and Torres R., 2012), namun dengan rasio C/N sebesar 65-100 menyebabkan dekomposisi TKKS sulit dilakukan.

Proses dekomposisi pada TKKS dapat dibantu oleh mikroba yang mampu mensekresi enzim ekstraseluler untuk menghidrolisis polisakarida menjadi monomer gula sederhana sehingga dapat dimanfaatkan sebagai sumber karbon dan energi bagi mikroba. Beberapa golongan mikroba yang dapat menghasilkan produk enzim ekstraseluler diantaranya adalah kelompok fungi yaitu *Trichoderma*, *Penicillium*, dan

Aspergillus, dan kelompok bakteri antara lain *Bacillus* dan *Cellulomonas* (Sukumaran *et al.*, 2005). Di antara beberapa jenis kapang dan bakteri yang dapat menghasilkan enzim ekstraseluler, *T. viride* merupakan salah satu jenis kapang yang potensial untuk memproduksi beberapa macam enzim ekstraseluler seperti selulase, xilanase, glukonase, dan protease. Selain itu, *T. viride* memiliki karakteristik yaitu pertumbuhan yang lebih cepat dibandingkan kapang lain, produksi spora yang banyak, dan mampu memproduksi endoglukanase dan eksoglukanase sampai 80% (Kalsom *et al.*, 2006).

Beberapa penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa *T. viride* mampu menghasilkan enzim ekstraseluler di antaranya penelitian Gunam *et al.*, (2011) yang menggunakan *T. viride* sebagai penghasil enzim selulase untuk mendegradasi komponen selulosa pada ampas tebu melalui fermentasi cair. Irfan *et al.*, (2012), menggunakan *T. viride* untuk menghasilkan enzim endoglukanase pada berbagai medium seperti bagasse, bongkol jagung, tepung kedelai, dedak, sekam padi, dan tepung kedelai dengan metode *solid state fermentation*. Selain itu, Amira *et al.*, (2012), melakukan produksi selulase dan xilanase dengan *T. viride* pada TKKS dan POME. Oleh karena itu, berdasarkan uraian tersebut maka dilakukan suatu penelitian tentang hidrolisis TKKS oleh enzim ekstraseluler *T. viride*.

1.2 Rumusan Masalah

TKKS mengandung komponen selulosa, hemiselulosa, dan lignin yang tinggi sehingga sulit didekomposisi dalam waktu singkat. Proses dekomposisi dapat dibantu dengan penambahan mikroba. *T. viride* merupakan salah satu kapang yang dapat menghasilkan berbagai macam enzim ekstraseluler antara lain selulase, xilanase, dan glukonase. Oleh karena itu, apakah enzim ekstraseluler *T. viride* mampu membantu menghidrolisis komponen-komponen dalam TKKS.

1.3 Batasan Masalah

Ruang lingkup penelitian ini meliputi produktivitas enzim ekstraseluler. Optimasi aktivitas enzim yang dihasilkan *T. viride* dilakukan berdasarkan analisis gula reduksi metode Somogyi- Nelson, serta penentuan suhu, pH dan waktu inkubasi tertentu.

1.4 Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan enzim ekstraseluler yang dihasilkan oleh *T. viride* dalam menghidrolisis TKKS.

1.5 Manfaat

Penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai strategi untuk mempercepat proses dekomposisi TKKS dengan memanfaatkan kapang *T. viride*.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS)

Kelapa sawit (*Elais guineensis* Jacq), merupakan salah satu tanaman perkebunan yang bernilai ekonomis karena dapat menghasilkan minyak kelapa sawit. Kelapa sawit banyak ditanam pada daerah tropis seperti Afrika Barat dan Asia Tenggara. Pada proses pengolahan minyak kelapa sawit, akan dihasilkan limbah TKKS (Law *et al.*, 2007). Tingkat ketersediaan TKKS sangat berlimpah dan mengalami peningkatan tiap tahunnya. Pada tahun 2008, minyak kelapa sawit yang dihasilkan mencapai 17,37 juta ton/ tahun dan limbah TKKS yang dihasilkan mencapai 20 juta ton/tahun (Direktorat Jenderal Bina Produksi Perkebunan, 2012). Meningkatnya produksi kelapa sawit tiap tahunnya, maka akan berdampak pada peningkatan jumlah limbah yang dihasilkan. Menurut Moya and Torres (2012), setiap pengolahan 1 ton Tandan Buah Segar (TBS) akan dihasilkan 22- 23% atau sebanyak 220–230 kg TKKS.



Gambar 2.1 Tandan Kosong Kelapa Sawit

TKKS merupakan limbah kelapa sawit dengan komponen selulosa dan lignin, yang disebut dengan lignoselulosa (Alam *et al.*, 2009). Selain selulosa dan lignin,

TKKS juga mengandung komponen lain yaitu hemiselulosa. Komponen-komponen dalam TKKS ditunjukkan dalam Tabel 2.1 di bawah ini.

Tabel 2.1 Komponen kimiawi TKKS (%)

| Komponen | Kadar (%) |
|--------------|-----------|
| Selulosa | 48,25 |
| Lignin | 18,89 |
| Hemiselulosa | 27,24 |
| Sulphur | 0,07 |
| Nitrogen | 0,87 |
| Minyak | 2,24 |

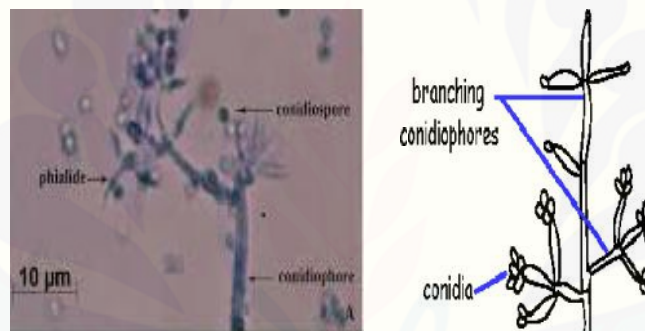
Sumber: Alam *et al.*, 2009; Moya and Torres R., 2012.

Pengolahan limbah TKKS di Indonesia saat ini belum dimanfaatkan secara optimal. Menurut Ditjen PPHP Departemen Pertanian (2006), pihak perkebunan kelapa sawit mengolah TKKS dengan cara dibuang ke lingkungan, dibakar, dijadikan mulsa, atau dikomposkan sebagai pupuk organik. Pengolahan TKKS sebagai mulsa dapat menambah nutrisi tanah, mencegah erosi, dan mengurangi dampak kurang baik pada pertumbuhan tanaman (Misson *et al.*, 2009). Namun, pemanfaatan TKKS menjadi mulsa membutuhkan biaya yang tidak murah. Pengomposan merupakan alternatif pilihan pengolahan TKKS yang dulu banyak dilakukan oleh perkebunan kelapa sawit. Namun, pengomposan membutuhkan waktu yang relatif lama yaitu berkisar 6 bulan sampai dengan 12 bulan. Lamanya waktu ini berdampak pada luas lokasi, tenaga kerja, dan fasilitas yang diperlukan untuk pengomposan TKKS sehingga pihak perkebunan sudah jarang memakai teknik pengomposan ini (Wahyuni, 2011).

2.2 Kapang *Trichoderma viride* dan Enzim Ekstraseluler

Trichoderma spp. merupakan salah satu jenis kapang yang mampu menghasilkan enzim ekstraseluler. *Trichoderma* spp. ini dapat tumbuh secara cepat dalam berbagai kondisi dengan kisaran suhu 7°C- 41°C dan dapat tumbuh optimal

pada suhu 22°C-30°C dan pada pH asam antara 2- 4, bersifat saprofit pada tanah, kayu, dan beberapa jenis bersifat parasit pada jamur lain, serta dapat memanfaatkan berbagai macam substrat. Pertumbuhan yang cepat dan produksi spora yang banyak merupakan karakteristik spesies dari genus *Trichoderma*. Hifa pada jamur ini berbentuk pipih, bersekat, dan bercabang-cabang membentuk anyaman yang disebut miselium. Miseliumnya dapat tumbuh dengan cepat dan dapat memproduksi berjuta-juta spora, karena sifatnya inilah *Trichoderma* dikatakan memiliki daya kompetitif yang tinggi (Kalsom *et al.*, 2006). Beberapa spesies *Trichoderma* yang dapat memproduksi enzim ekstraseluler diantaranya *T. reesei*, *T. viride*, *T. harzianum*, dan *T. koningii* (Beldman *et al.*, 1985).



Gambar 2.2 Struktur mikroskopis *T. viride*

Klasifikasi *T. viride* adalah sebagai berikut:

- Divisi : Ascomycota
- Kelas : Ascomycetes
- Ordo : Hypocreales
- Famili : Hypocreaceae
- Genus : *Trichoderma*
- Spesies : *T. viride* (Deacon, 1977).

T. viride merupakan kapang berfilamen yang mampu hidup sebagai mikoparasit yang mempunyai kemampuan untuk menghasilkan enzim hidrolitik yang dapat memecah senyawa polimer menjadi senyawa sederhana. Enzim selulase merupakan salah satu enzim yang dapat dihasilkan oleh berbagai jenis mikroba, tetapi

hanya sedikit mikroba yang dapat menghasilkan selulase dalam jumlah yang cukup untuk menghidrolisis seluruh selulosa kristalin seperti *T. viride* yang telah dikenal mampu menghasilkan endoglukanase dan eksoglukanase sampai 80% (Samsuri *et al.*, 2007), tetapi β -glukosidasenya rendah. Enzim ekstraseluler yang dihasilkan *T. viride* di alam, selain berfungsi sebagai cara untuk memperoleh makanan dan melawan fungi atau mikroba lain, juga dapat digunakan untuk berbagai proses industri penting, seperti dalam proses penyiapan bahan baku untuk bioetanol (Druzhinina *et al.*, 2006).

Enzim ekstraseluler merupakan enzim yang diproduksi oleh mikroba untuk merombak substrat yang ada di lingkungannya agar dapat digunakan sebagai sumber energi untuk pertumbuhannya dan bahan untuk membentuk sel-sel yang baru. Beberapa enzim ekstraseluler yang dapat diproduksi oleh *T. viride* antara lain enzim kitinase yang berfungsi merusak dinding sel fungi patogen (Lu *et al.*, 2004). Menurut Hanson and Howell (2004), *T. viride* juga mampu memproduksi enzim xilanase yang dapat menghidrolisis xilan menjadi xilosa. Beberapa penelitian dengan berbagai substrat telah banyak dilakukan untuk mengetahui kemampuan *T. viride* dalam mensekresikan enzim ekstraseluler diantaranya yaitu:

1. Gautam *et al.*, (2010), yang melakukan optimasi produksi medium limbah industri padat oleh *T. viride* untuk menghasilkan selulase melalui teknik sub-merged fermentasi dengan aktivitas enzim selulase yang dihasilkan 1,93 U/ml;
2. Mojsov (2010), menggunakan *T. viride* untuk memproduksi selulase pada jerami gandum dengan teknik fermentasi padat dan hasil aktivitas enzim selulasenya sebesar 0,88 FPU/ml;
3. Amira *et al.*, (2012), menggunakan EFB dan POME sebagai substrat *T. viride* untuk memproduksi selulase dan xilanase dengan aktivitas enzim yang dihasilkan yaitu xilanase 13,214 FPU/mg dan selulase 4,43 IU/mg;
4. Irfan *et al.*, (2012), memanfaatkan beberapa medium seperti bagasse, dedak, sekam padi, tepung jagung, dan tepung kedelai untuk produksi endoglukanase menggunakan *T. viride* secara fermentasi padat dengan hasil aktivitas enzim

- selulase pada masing-masing substrat yaitu bagasse 15,6 IU/g , dedak 12 IU/g, sekam padi 5,9 IU/g, tepung jagung 8,2 IU/g, dan tepung kedelai 4 IU/g;
5. Laziba *et al.*, (2013), melakukan optimasi xilanase dari *T. viride* pada matriks laut dengan hasil aktivitas konsentrasi xilanase yang didapatkan yaitu 4,5 mg/ml;
 6. Kandari *et al.*, (2013), juga melakukan produksi selulase dan α -glukosidase dari *T. viride* pada limbah jerami padi melalui fermentasi padat dan hasil aktivitas enzim yang dihasilkan yaitu selulase 1,84 IU/ml dan α -glukosidase 8,25 IU/ml;
 7. Irfan and Syed, (2012), juga telah melakukan purifikasi dan karakterisasi xilanase yang dihasilkan *T. viride* secara fermentasi padat dengan aktivitas spesifik xilanase sebelum dialisis 69,4 U/mg dan sesudah di dialisis 112,5 U/mg.

Dilihat dari beberapa penelitian di atas, produksi enzim ekstraseluler banyak dilakukan dengan teknik fermentasi padat atau *solid state fermentation* (SSF). Teknik SSF merupakan sistem fermentasi yang menggunakan media padat yang tidak mengandung air bebas sebagai substrat. Media ini berfungsi sebagai sumber karbon, nitrogen, dan energi. Pada SSF, umumnya substrat yang digunakan lebih banyak dan enzim yang dihasilkan beragam (Muhipidah, 2013). SSF ini memiliki beberapa keuntungan diantaranya tingkat kontaminasi rendah, produktivitas tinggi, teknik sederhana, biaya relatif murah, dan energi yang dibutuhkan rendah (Fatma *et al.*, 2010; Wahid *et al.*, 2011).

2.3 Hidrolisis Enzimatis Pada TKKS

Hidrolisis merupakan proses pemecahan polisakarida di dalam biomassa lignoselulosa, yaitu selulosa dan hemiselulosa menjadi monomer gula yang dapat dilakukan secara kimia ataupun enzimatis (Kristina *et al.*, 2012). Dibandingkan proses secara kimia, hidrolisis enzimatis memiliki beberapa keuntungan antara lain kondisi proses yang lebih lunak (suhu rendah, pH netral), berpotensi memberikan hasil yang tinggi, dan biaya pemeliharaan peralatan relatif rendah karena tidak ada bahan yang korosif dan ramah lingkungan (Samsuri *et al.*, 2007).

Hidrolisis enzimatis merupakan proses hidrolisis yang menggunakan enzim seperti enzim selulase, xilanase atau jenis enzim yang lain. Pemanfaatan enzim sebagai zat penghidrolisis tergantung pada substrat yang digunakan (Samsuri *et al.*, 2007). Pada TKKS, hidrolisis meliputi proses pemecahan polisakarida di dalam biomassa lignoselulosa yaitu, selulosa dan hemiselulosa menjadi monomer gula penyusunnya. Hambatan dalam proses hidrolisis asam maupun enzimatis adalah adanya lignin yang berfungsi sebagai pelindung selulosa sehingga sebelum hidrolisis dilakukan proses delignifikasi. Delignifikasi merupakan proses pemisahan struktur lignin yang berikatan dan menyelubungi selulosa. Delignifikasi dilakukan dengan larutan NaOH, karena larutan ini dapat merusak struktur lignin, bagian kristalin dan amorf, memisahkan lignin dan hemiselulosa serta menyebabkan pembengkakan struktur selulosa (Nenci, 2012).

TKKS merupakan biomassa berselulosa yang memiliki struktur yang kompleks. Oleh sebab itu, TKKS merupakan limbah yang sulit didegradasi. Menurut Sukumuran *et al.*, (2005), enzim selulase terdiri dari kompleks eksoglukanase, endoglukanase dan β -glukosidase yang dapat mendegradasi selulosa menjadi glukosa. Glukosa kemudian digunakan oleh kapang untuk pertumbuhannya sebagai sumber karbon. Hidrolisis sempurna selulosa menghasilkan glukosa, sedangkan hemiselulosa menghasilkan glukosa, galaktosa, manosa, xilosa, dan arabinosa (Lynd *et al.*, 2002). Monosakarida hasil hidrolisis antara lain glukosa, galaktosa dan xilosa merupakan gula pereduksi disebabkan karena adanya gugus aldehid dan gugus keton yang bebas (Laziba *et al.*, 2013). Gula pereduksi merupakan indikator aktivitas enzim dalam menghidrolisis komponen pada substrat TKKS.

BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember. Waktu pelaksanaan penelitian dimulai pada bulan Juli 2014 sampai Maret 2015.

3.2 Alat Dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian terdiri dari Neraca Analitik, Autoklaf, *Shaker*, *Sentrifuge*, Mikropipet, Vortex, *Laminar air flow* (LAF), Inkubator, Kertas saring, pH meter, DC motor, *Haemocytometer* tipe *neubauer improve*, *colony counter*, Mikroskop, Water bath dan Spektrofotometer.

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS) dari Universitas Riau, Isolat biakan *T. viride* strain B10 MCC-00136 yang diperoleh dari Balai Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT) Tangerang Selatan, NaCl 1%, Substrat Alkali Ekstrak TKKS 0,5%, NaOH, Natrium azide 0,01%, CH₃COOH, media *Potato Dextrose Agar* (PDA), Alkohol 97%, Akuades, Buffer Asetat, Buffer Fosfat, Alkohol 70% , media Alkali TKKS Agar Miring 0,1%, Substrat Alkali Ekstrak 5%, reagen Somogyi dan Nelson.

3.3 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian yang dilakukan pada penelitian ini meliputi empat tahapan yaitu tahap persiapan bahan penelitian, tahap produksi *crude enzyme*, tahap penentuan stabilitas dan optimum pH serta suhu, dan tahap analisis kemampuan hidrolisis *crude enzyme* pada substrat alkali ekstrak TKKS 5%. Tahap persiapan bahan penelitian meliputi sub kultur *T. viride* strain B10 MCC-00136, pembuatan

substrat alkali ekstrak TKKS, pembuatan substrat TKKS jenuh air, dan pembuatan reagen Somogyi dan Nelson. Tahapan produksi *crude enzyme* meliputi pre-kultur isolat *T. viride* strain B10 MCC-00136 pada media TKKS miring, penentuan kepadatan spora, optimasi produksi enzim ekstraseluler dari *T. viride* strain B10 MCC-00136 dan produksi enzim ekstraseluler dari *T. viride* strain B10 MCC-00136. Tahap ketiga yaitu penentuan stabilitas pH dan suhu, serta optimum pH dan suhu. Tahapan keempat meliputi analisis kemampuan hidrolisis *crude enzyme* dari *T. viride* strain B10 MCC-00136 pada substrat alkali ekstrak TKKS 5%.

3.4 Tahapan dan Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Tahapan Persiapan

3.4.1.1 Stok Sub- Kulture *T. viride* strain B10 MCC-00136

T. viride strain B10 MCC-00136 yang diperoleh dari BPPT Tangerang diinokulasikan pada media Potato Dextrosa Agar (PDA) secara streak plate dan diinkubasi selama 3 hari pada suhu 30°C. Selanjutnya, satu ose isolat *T. viride* strain B10 MCC-00136, diinokulasikan pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA) miring dengan membuat titik dan diinkubasi selama 3 hari serta disimpan sebagai stok isolat.

3.4.1.2 Pembuatan Substrat Alkali Ekstrak TKKS

Sebanyak 100 gram bubuk TKKS yang telah digiling dan diayak dihidrolisis menggunakan NaOH 1 M dan dihomogenkan selama 24 jam. Hidrolisis dengan NaOH berfungsi sebagai delignifikasi, yaitu proses merusak atau menguraikan struktur lignin untuk meningkatkan kandungan selulosa dan hemiselulosa (Kristina *et al.*, 2012). Selanjutnya, suspensi dinetralkan sampai pH 7 dengan CH₃COOH dan dilakukan penyaringan. Filtrat pertama yang terbentuk kemudian disaring, sedangkan ampas yang terbentuk disuspensikan dengan akuades sesuai dengan volume filtrat pertama yang didapat dan disaring kembali untuk memperoleh filtrat kedua. Filtrat pertama dan kedua yang telah disaring, diekstraksi menggunakan etanol dengan perbandingan filtrat dan etanol 4:6. Proses selanjutnya, campuran filtrat dan etanol

tersebut di sentrifuse dengan kecepatan 8000 rpm selama 10 menit sehingga akan terbentuk endapan/ pellet. Pellet kemudian diambil dan dioven pada suhu 50°C untuk menghilangkan sisa air dari pellet sehingga didapatkan bubuk. Bubuk tersebut merupakan bubuk substrat alkali ekstrak TKKS.

3.4.1.3 Persiapan Substrat TKKS Jenuh Air

Sebanyak 10 gram bubuk TKKS yang telah diayak, dijenuhkan menggunakan akuades dan dibiarkan selama 2 jam. Kemudian, suspensi diletakkan dalam alumunium foil dan ditimbang untuk mengetahui berat awal. Suspensi selanjutnya disimpan pada suhu 50°C selama 24 jam dan ditimbang setiap interval waktu 6 jam sekali untuk mendapatkan berat bubuk TKKS yang konstan. Tujuan dari perlakuan ini adalah untuk mengetahui kadar air yang harus ditambahkan pada substrat TKKS untuk mendapatkan substrat TKKS dengan kadar air yang sesuai untuk media produksi *crude enzyme*.

3.4.1.4 Pembuatan Reagen Somogyi dan Nelson

a. Pembuatan Reagen Somogyi

Pembuatan reagen Somogyi dilakukan dengan membuat 4 larutan yang terdiri dari larutan I yaitu 24 gram Na_2CO_3 anhidreus dan 12 gram tartrate tetahidrat $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6\text{H}_2\text{O}$ yang dilarutkan dalam 240 ml akuades, larutan II yaitu 1 gram $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ yang dilarutkan dalam 40 ml akuades kemudian ditambahkan dengan NaHCO_3 16 gram. Kemudian, larutan I dan larutan II dicampurkan menjadi larutan 3. Selanjutnya, dibuat larutan 4 yang terdiri dari 180 gr Na_2SO_4 anhidreus yang dilarutkan dalam 300 ml akuades sambil dipanaskan. Setelah larutan 4 dingin, larutan 3 dan larutan 4 dicampur dan dihomogenkan serta ditambahkan akuades hingga volume 1000 ml. Reagen Somogyi yang telah dibuat diinkubasi selama 7 hari pada suhu 20°C- 40°C serta disimpan dalam botol gelap.

b. Pembuatan Reagen Nelson

Sebanyak 50 gram $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan dalam 500 ml akuades kemudian dicampurkan dengan 46 ml sulfuric acid (terbentuk Larutan I). Selanjutnya, Larutan II dibuat dengan melarutkan 6 gr $\text{NaH}_4\text{SO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dalam akuades 25 ml (Norton Nelson, 1944). Proses selanjutnya, larutan I dan II yang telah dihomogenkan ditambahkan akuades sampai volume 1000 ml. Kemudian reagen yang telah terbentuk diinkubasi pada suhu 20°C - 40°C selama 24 jam serta disimpan pada botol gelap disuhu ruangan.

3.4.2 Produksi *Crude enzyme* dari *T. viride* strain B10 MCC-00136

3.4.2.1 Pre- Kultur Isolat *T. viride* strain B10 MCC-00136

Stok isolat *T. viride* strain B10 MCC-00136 diambil 1 ose dan diinokulasikan pada media alkali ekstrak TKKS agar miring 0,1%. Pre-kultur isolat *T. viride* strain B10 MCC-00136 dibuat pada 8 tabung, kemudian diinkubasi pada suhu 30°C untuk selanjutnya dilakukan penghitungan jumlah spora optimum.

3.4.2.2. Penentuan Kepadatan Sel Spora *T. viride* strain B10 MCC-00136

Penghitungan sel spora *T. viride* strain B10 MCC- 00136 dilakukan setiap hari berturut-turut selama 8 hari. Penghitungan dilakukan dengan menambahkan 10 ml akuades steril pada tiap tabung isolat *T. viride* strain B10 MCC-00136 dan dikerik perlahan menggunakan jarum ose agar spora *T. viride* strain B10 MCC-00136 terlepas. Kemudian, suspensi spora dipindahkan ke tabung lain dan dihomogenkan dengan vortex sebelum dilakukan penghitungan. Suspensi spora selanjutnya diteteskan pada bidang hitung *haemocytometer*. Jumlah spora *T. viride* strain B10 MCC-00136 yang dihitung yang terdapat pada 5 kotak dari 25 kotak berukuran sedang. Perhitungan kepadatan spora dilakukan untuk mengetahui waktu inkubasi optimum *T. viride* strain B10 MCC-00136 untuk menghasilkan jumlah spora optimum. Menurut Syahnen *et al.*, (2014), menyatakan bahwa kerapatan spora yang baik dan banyak digunakan sebagai inokulum untuk genus *Trichoderma* yaitu 10^6

spora/ml. Selanjutnya, hasil perhitungan yang diperoleh untuk mengetahui jumlah spora/ ml ditentukan dalam rumus:

$$S = \frac{R}{V} \times Fp$$

Keterangan:

S = Jumlah Sel Spora/ml

R = Rerata Jumlah spora pada 5 bidang hitung haemocytometer

V = Volume haemocytometer ($4 \times 10^{-3} \text{ mm}^3$)

Fp = Faktor Pengenceran yang dilakukan

3.4.2.3 Optimasi Produksi *Crude enzyme* dari *T. viride* strain B10 MCC- 00136

Optimasi produksi *crude enzyme* bertujuan untuk mengetahui waktu inkubasi optimum (pemanenan) pada hari tertentu dilihat dari hasil aktivitas *crude enzyme* tertinggi. Optimasi produksi enzim dilakukan dengan menginokulasikan 1 ml isolat *T. viride* strain B10 MCC- 00136 pada substrat TKKS jenuh air sebanyak 10 gram dan diinkubasi selama 7 hari pada suhu 30°C. Selanjutnya, dilakukan pemanenan *crude enzyme* dari hari ke-1 sampai hari ke-7. Pemanenan enzim meliputi preparasi dan ekstraksi enzim, preparasi dilakukan dengan menambahkan NaCl 1% dan Natrium azide 0,01% sebanyak 20 ml ke dalam suspensi untuk mencegah enzim dari kontaminasi mikroba. Kemudian, dilakukan ekstraksi yang bertujuan untuk mengambil enzim dari media, sel atau jaringan (Dheeman *et al.*, 2010), dengan cara suspensi dishaker untuk mengendapkan material padat selama 12 jam dan difiltrasi menggunakan kertas saring sehingga dihasilkan filtrat. Filtrat kemudian diambil dan disentrifugasi 8000 rpm selama 10 menit untuk memisahkan supernatan dan pellet. Selanjutnya, supernatan diambil dan didapatkan *crude enzyme* yang disimpan dalam lemari pendingin. Setelah diketahui waktu optimum pemanenan pada produksi *crude enzyme* diberbagai variasi waktu inkubasi, selanjutnya waktu optimum tersebut digunakan untuk produksi *crude enzyme* dengan menggunakan substrat TKKS jenuh air sebanyak 50 gram dan diinkubasi sesuai waktu optimum pada suhu 30°C.

Selanjutnya, pemanenan dilakukan menggunakan metode yang sama seperti pada produksi *crude enzyme* di berbagai variasi waktu inkubasi.

3.4.3 Uji Aktivitas *Crude enzyme T. viride* strain B10 MCC- 00136 berdasarkan Analisis Gula Reduksi Metode Somogyi-Nelson

3.4.3.1 Pembuatan Standart Glukosa

Pembuatan standar glukosa dibuat dengan membuat stok glukosa konsentrasi 100 µg/ml. Selanjutnya, dilakukan pengenceran dari konsentrasi 100 µg/ml untuk mendapatkan konsentrasi glukosa sebanyak 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 75 µg/ml. Pada setiap konsentrasi glukosa ditambahkan reagen Somogyi sebanyak 0,5 ml dan dipanaskan dalam air mendidih selama 15 menit. Kemudian, setelah dingin ditambahkan reagen Nelson sebanyak 0,5 ml lalu ditambahkan akuades sebanyak 2,5 ml. Perhitungan gula reduksi diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 500 nm. Nilai absorbansi yang diperoleh dibuat kurva regresi linear yang menunjukkan hubungan antara konsentrasi dengan nilai absorbansi larutan sampel. Pengukuran dibuat dua kali pengulangan.

3.4.3.2 Uji Aktivitas *Crude enzyme* Pada Substrat Alkali Ekstrak TKKS

Crude enzyme yang telah dihasilkan selanjutnya diuji dengan menggunakan 0,5% substrat alkali ekstrak TKKS dalam buffer pH 7 50 mM sebanyak 500 µl. Kemudian, masing-masing substrat ditambahkan *crude enzyme* sebanyak 50 µl dan diinkubasi 37°C selama 2 jam. Pada perlakuan kontrol, penambahan enzim dilakukan setelah penambahan reagen Somogyi. Setelah inkubasi, ditambahkan 0,5 ml reagen Somogyi yang berfungsi menghentikan reaksi enzimatik (Nelson and Somogyi, 1945) dan digojok hingga homogen. Pada reagen Somogyi terdapat ion kupri yang bersama dengan gula reduksi akan direduksi menjadi kupro oksida. Selanjutnya, dididihkan dalam penangas air selama 15 menit yang bertujuan untuk mempercepat reaksi. Setelah dingin, ditambahkan reagen Nelson sebanyak 0,5 ml kemudian ditambahkan juga 2,5 ml akuades. Pada reagen Nelson terdapat arsenomoblidat yang akan bereaksi

dengan kupro oksida dan menjadi molibdenum dan memberi warna biru pada uji. Selanjutnya, dilakukan pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 500 nm dengan dibuat dua kali pengulangan.

3.4.4 Penentuan Stabilitas dan Optimum pH dan Suhu *Crude enzyme*

a. Penentuan Stabilitas pH

Penentuan stabilitas pH dilakukan dengan mereaksikan 500 μ l *crude enzyme* dan 500 μ l buffer pH 3 sampai pH 8 50 mM sehingga didapatkan 1 ml *crude enzyme* dalam buffer pH 3 sampai pH 8 25 mM. Kemudian, larutan diinkubasi 37⁰C selama 4 jam. Selanjutnya, diambil 100 μ l *crude enzyme* dalam buffer pH 3 sampai pH 8 25 mM dan direaksikan dengan 500 μ l substrat alkali ekstrak TKKS 0,5% dalam buffer pH 5 60 mM. Selanjutnya, uji aktivitas enzim dengan berbagai variasi pH dilakukan dengan metode yang sama dengan uji aktivitas *crude enzyme* berdasarkan analisis gula reduksi metode Somogyi-Nelson. Buffer yang digunakan pada uji aktivitas ini adalah buffer asetat untuk pH 3, 3,5, 4, 4,5, 5, dan 5,5 sedangkan buffer fosfat untuk pH 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5 dan pH 8. Pada penentuan stabilitas pH, sebagai pembanding (kontrol) digunakan *crude enzyme* 500 μ l yang direaksikan dengan H₂O sebanyak 500 μ l sebagai pengganti buffer.

b. Penentuan pH Optimum

Pengujian pH optimum dilakukan dengan mereaksikan 500 μ l *crude enzyme* dan 500 μ l buffer pH 3 sampai pH 8 50 mM sehingga didapatkan 1 ml *crude enzyme* dalam buffer pH 3 sampai pH 8 25 mM tanpa inkubasi 4 jam. Kemudian, diambil 100 μ l *crude enzyme* 500 μ l buffer pH 3 sampai pH 8 25 mM dan di reaksikan dengan substrat alkali ekstrak TKKS 0,5% dalam buffer pH 5 60 mM. Cara pengukuran aktivitas enzim untuk pH optimum sama seperti metode yang digunakan untuk uji aktivitas *crude enzyme* metode Somogyi- Nelson. pH optimum yang telah diketahui digunakan untuk penentuan stabilitas dan suhu optimum

c. Penentuan Stabilitas Suhu

Penentuan stabilitas suhu dilakukan sesuai dengan pengujian stabilitas pH. Namun, pada pengujian stabilitas suhu ini *crude enzyme* dalam buffer pH optimum 50 mM yang didapat diinkubasi pada suhu 30⁰C, 35⁰C, 40⁰C, 45⁰C, 50⁰C, 55⁰C, 60⁰C, 65⁰C, dan 70⁰C selama 4 jam. *Crude enzyme* dalam buffer pH optimum 50 mM yang telah diinkubasi selama 4 jam, kemudian direaksikan dengan 500 µl substrat alkali ekstrak TKKS 0,5% dalam buffer pH optimum 60 mM. Kemudian, uji aktivitas enzim pada berbagai variasi suhu ini dilakukan dengan menggunakan metode yang sama dengan uji aktivitas enzim berdasarkan analisis gula reduksi metode *Somogyi-Nelson*. Sebagai kontrol atau pembanding, pada penentuan stabilitas suhu ini digunakan 500 µl *crude enzyme* yang direaksikan dengan 500 µl buffer pH optimum 50 mM tanpa inkubasi 4 jam.

d. Penentuan Suhu Optimum

Pada pengujian suhu optimum ini *crude enzyme* dalam buffer pH optimum 50 mM di reaksikan dengan 500 µl substrat alkali ekstrak TKKS 0,5% dalam buffer pH optimum 60 mM dan diinkubasi pada suhu 30⁰C, 35⁰C, 40⁰C, 45⁰C, 50⁰C, 55⁰C, 60⁰C, 65⁰C, dan 70⁰C selama 2 jam. Selanjutnya, uji aktivitas enzim pada berbagai variasi suhu ini dilakukan dengan menggunakan metode yang sama dengan uji aktivitas enzim berdasarkan analisis gula reduksi metode *Somogyi-Nelson*.

3.4.5 Analisis Kemampuan Hidrolisis *Crude enzyme T. viride* Strain B10 MCC-00136 pada TKKS

Penentuan waktu inkubasi optimum dari *crude enzyme T. viride* strain B10 MCC- 00136 dalam menghidrolisis TKKS dilakukan dengan mereaksikan 0,1 gram substrat alkali ekstrak TKKS 5% dalam buffer pH 7 20 mM dan 2 ml *crude enzyme* yang kemudian diinkubasi selama 48 jam. Sampling untuk mengetahui aktivitas enzim dilakukan pada jam ke 0, 6, 12, 18, 24, 36 dan 48 dengan cara mengambil 250 µl hidrolisat setiap kali sampling. Kemudian, hasil hidrolisat dididihkan 15 menit.

Setelah dididihkan, hidrolisat disentrifuse selama 5 menit 4000 rpm dan supernatan yang diperoleh dipindah ke eppendofl baru serta hasil supernatan disimpan di suhu - 20⁰C sebelum dilakukan uji serentak.

Metode yang digunakan untuk uji serentak sama dengan langkah uji aktivitas enzim berdasarkan analisis gula reduksi metode Somogyi- Nelson yaitu dengan mengambil 50 µl hidrolisat dan diencerkan dengan 450 µl akuades serta ditambahkan 500 µl reagen Somogyi. Kemudian, suspensi didihkan selama 15 menit. Setelah dingin, pada suspensi ditambahkan 500 µl reagen Nelson dan 2,5 ml akuades. Selanjutnya, untuk melihat nilai absorbansi dilakukan pengukuran dengan spektrofotometer pada 500 nm. Setelah diketahui waktu inkubasi optimum, maka dibuat kurva hubungan antara gula reduksi yang dihasilkan dengan waktu inkubasi optimum.

$$\text{Derajat Hidrolisis} = \frac{\text{Total gula reduksi hasil hidrolisis } (\mu\text{g/ml})}{\text{Total Substrat alkali ekstrak TKKS 5\% } (\mu\text{g/ml})} \times 100\%$$

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Kepadatan Sel Spora *T. viride* strain B10 MCC-00136

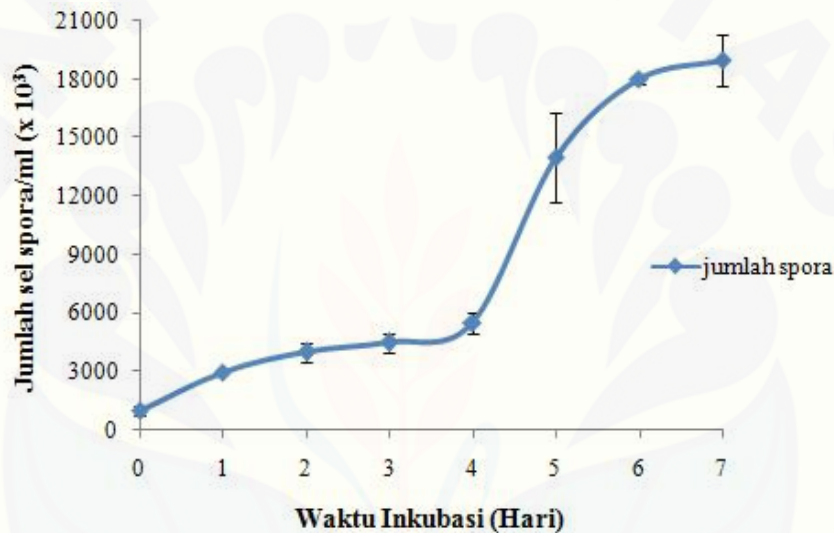
Penentuan jumlah sel spora *T. viride* strain B10 MCC- 00136 pada media alkali ekstrak TKKS agar miring 0,1%, menunjukkan bahwa isolat *T. viride* strain B10 MCC- 00136 dapat tumbuh baik (Gambar 4.1). Hal ini menunjukkan bahwa media alkali ekstrak TKKS tersebut, mampu mensuplai nutrisi bagi pertumbuhan *T. viride* strain B10 MCC- 00136. Menurut Lynd *et al.*, 2002, menyatakan bahwa suatu mikroba akan menguraikan komponen dalam suatu medium menjadi sumber karbon sebagai sumber energi untuk pertumbuhannya. Oleh sebab itu, kandungan nutrisi yang lengkap sangat diperlukan dalam suatu medium. Kandungan nutrisi yang tercukupi pada medium, akan berpengaruh terhadap kecepatan pertumbuhan isolat dalam menghasilkan spora.



Gambar 4.1 Isolat *T.viride* strain B10 MCC-00136 pada media alkali ekstrak TKKS agar miring umur 4 hari.

Pada penelitian ini, dilakukan perhitungan jumlah spora untuk mengetahui waktu inkubasi yang diperlukan oleh *T. viride* strain B10 MCC- 00136 untuk mendapatkan kepadatan spora yang sesuai untuk digunakan sebagai

Inokulum. Kepadatan spora yang umum digunakan sebagai inokulum berkisar antara 10^6 - 10^8 sel spora/ml (Kocher *et al.*, 2007; Zaldívar *et al.*, 2001). Menurut Dheeman *et al.*, (2010), menyatakan jika jumlah spora yang digunakan terlalu sedikit ($<10^6$), maka proses perombakan substrat untuk memproduksi enzim berlangsung kurang sempurna karena biomassa mikrob sedikit dan begitu pula sebaliknya, jika kepadatan spora terlalu tinggi ($>10^8$) maka akan terjadi persaingan nutrisi yang terjadi antar mikrob. Jumlah kepadatan sel spora optimum dari *T. viride* strain B10 MCC- 00136 pada penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2 Kepadatan spora *T. viride* strain B10 MCC- 00136

Pengamatan berupa penghitungan jumlah sel spora menunjukkan bahwa, jumlah sel spora yang dihasilkan oleh *T. viride* strain B10 MCC- 00136 pada hari ke-0 sampai hari ke-7 berturut-turut yaitu $1,0 \times 10^6$, $3,0 \times 10^6$, $4,0 \times 10^6$, $4,5 \times 10^6$, $5,5 \times 10^6$, $1,4 \times 10^7$, $1,8 \times 10^7$, dan $1,9 \times 10^7$ sel spora/ml. Jumlah spora *T. viride* strain B10 MCC-00136 yang digunakan sebagai inokulum pada penelitian ini adalah jumlah spora yang dihasilkan pada hari ke-4 yaitu dengan kepadatan $5,5 \times 10^6$ sel spora/ml. Hal ini dikarenakan menurut Syahnen *et al.*, (2014), menyatakan bahwa kepadatan spora yang baik dan banyak digunakan sebagai inokulum untuk genus *Trichoderma* yaitu 10^6 sel spora/ml. Pada penggunaan metode produksi enzim secara fermentasi padat

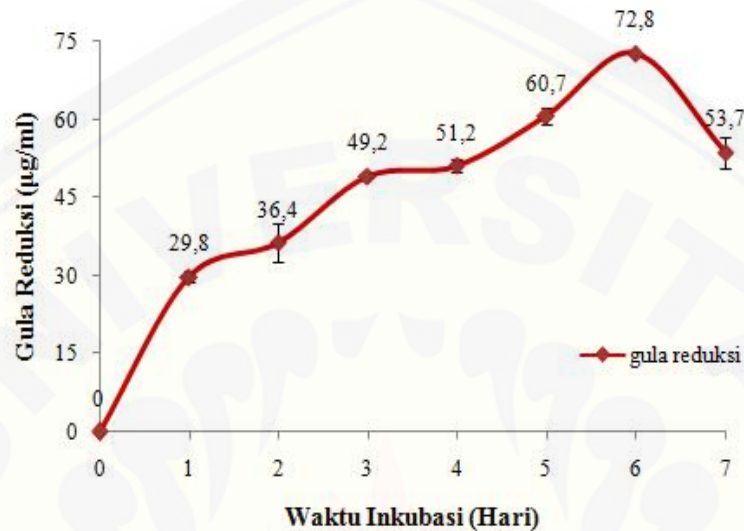
atau *solid state fermentation* inokulum yang banyak digunakan dengan kepadatan 5×10^6 sel spora/ml. Hal ini sesuai dengan beberapa penelitian yang telah dilakukan diantaranya oleh Fatma (2010), tentang produksi bioetanol pada substrat jerami padi dengan isolat *Trichoderma reesei* dengan metode SSF menggunakan inokulum 5×10^6 sel spora/ml, kemudian penelitian Zaldivar *et al.*, (2001) dan Pei- Jun *et al.*, (2004) tentang produksi selulase dengan metode SSF juga menggunakan inokulum 5×10^6 sel spora/ml.

4.2 Enzim Ekstraseluler *T. viride* strain B10 MCC- 00136

Optimasi produksi dilakukan dengan tujuan untuk memperoleh hasil aktivitas enzim tertinggi pada hari tertentu dengan waktu inkubasi 1-7 hari. Aktivitas enzim tertinggi dapat diketahui dari total gula pereduksi tertinggi yang dihasilkan berdasarkan analisis gula reduksi metode Somogyi- Nelson. Aktivitas enzim tersebut menyatakan seberapa besar kemampuan enzim dapat menguraikan atau mengkonversi komponen dalam TKKS menjadi produknya yaitu gula reduksi (Assadad *et al.*, 2013). Gula reduksi merupakan monosakarida sederhana hasil hidrolisis substrat TKKS jenuh air (Lehninger, 1995).

Menurut Laziba *et al.*, (2013), gula reduksi mampu mereduksi senyawa pengoksidasi pada reagen Somogyi dikarenakan adanya monosakarida seperti glukosa, galaktosa, dan gula-gula lain yang memiliki gugus aldehyd dan keton yang bebas. Pada penelitian ini, substrat TKKS jenuh air mengandung komponen tertinggi yaitu selulosa dan hemiselulosa. Hidrolisis selulosa menghasilkan gula reduksi berupa glukosa sedangkan hidrolisis hemiselulosa menghasilkan gula reduksi antara lain glukosa, galaktosa, dan xilosa (Irfan and Syed, 2012; Ijaz *et al.*, 2011; Lynd *et al.*, 2002). Gula reduksi yang dihasilkan dari aktivitas *crude enzyme* oleh *T. viride* strain B10 MCC- 00136 pada substrat TKKS jenuh air saat optimasi produksi dapat dilihat pada Gambar 4.3. Gula reduksi yang dihasilkan dari aktivitas *Crude enzyme* dari hari ke hari semakin meningkat. Kenaikan populasi jumlah sel mikroba isolat *T.*

viride strain B10 MCC- 00136 dan aktivitas *crude enzyme* bertambah sejalan dengan bertambahnya waktu inkubasi dari hari pertama sampai keenam.



Gambar 4.3 Aktivitas *Crude enzyme* pada optimasi produksi berdasarkan analisis gula reduksi metode Somogyi-Nelson.

Gula reduksi tertinggi yang dihasilkan isolat *T. viride* strain B10-MCC00136 sebesar 72,8 µg/ml yaitu pada hari keenam. Peningkatan hasil gula reduksi tersebut menunjukkan bahwa isolat *T. viride* strain B10-MCC00136 mampu menghidrolisis substrat TKKS dengan baik. Selain itu, kesesuaian substrat dan kondisi yang optimum juga sangat mendukung kapang untuk memproduksi enzim ekstraseluler dengan aktivitas tertinggi. Namun, setelah tercapai waktu inkubasi optimum, terjadi penurunan hidrolisis substrat TKKS yang ditunjukkan pada hari ke-7 dengan gula reduksi yang dihasilkan sebesar 53,7 µg/ml. Menurunnya aktivitas enzim tersebut, dimungkinkan terjadi represi katabolit akibat produk akhir yang dihasilkan berlebih yang menghambat aktivitas enzim ekstraseluler sehingga gula reduksi yang dihasilkan menurun. Hal tersebut dinamakan negative feedback yaitu dimana senyawa yang disintesis sel untuk menyeimbangkan produk yang ada dalam substrat. Enzim yang kerjanya dihambat oleh produk akhir akan memberikan keuntungan pada

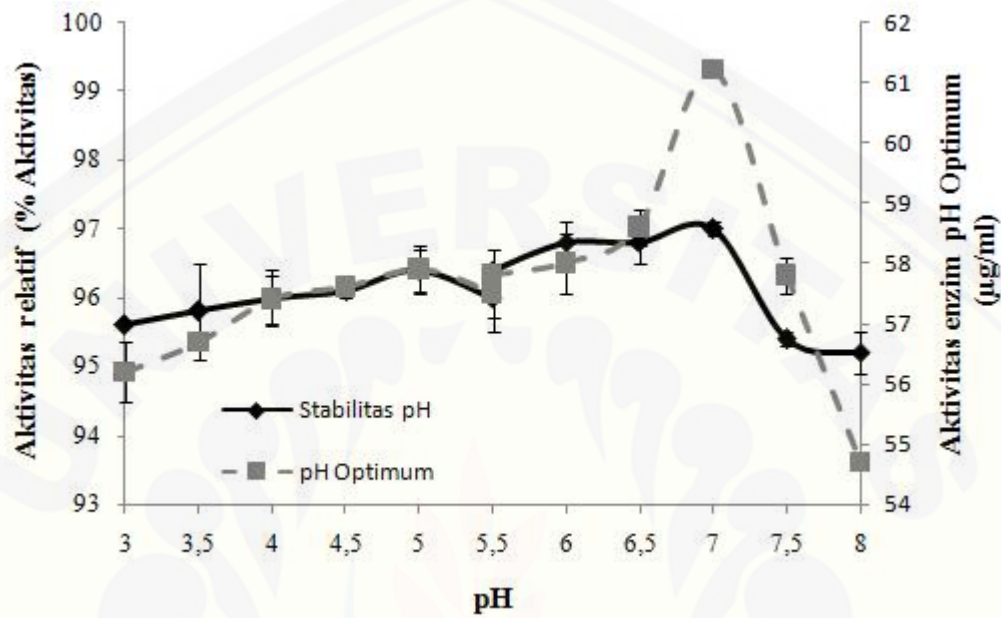
sel mikroba, yaitu mikroba dapat mengatur supply energi dan mencegah menumpuknya senyawa intermediet (Ijaz *et al.*, 2011).

4.3 Stabilitas pH dan Optimum pH Crude Enzyme

Enzim merupakan protein yang berperan sebagai biokatalisator yang sangat efektif untuk meningkatkan kecepatan reaksi kimia. Karena merupakan suatu protein, enzim sangat rentan terhadap kondisi lingkungan seperti pH, karena dapat mengakibatkan aktivitas enzim mengalami perubahan. Perubahan aktivitas enzim akibat perubahan pH disebabkan terjadinya perubahan ionisasi enzim, substrat atau kompleks enzim substrat, serta pengaruh laju reaksi. Perubahan ionisasi enzim dapat mempengaruhi aktivitas enzim, baik perubahan struktur maupun perubahan muatan pada residu asam amino yang berfungsi mengikat substrat (Lehninger, 1995). Pengaruh perubahan tersebut dapat mengganggu stabilitas enzim. Stabilitas enzim merupakan kestabilan aktivitas enzim selama penyimpanan dan penggunaan.

Setiap enzim mempunyai kondisi rentangan pH tertentu untuk memperoleh aktivitas maksimum dalam keadaan pH optimum (Irfan and Syed, 2012). Kondisi pH optimum, akan mendukung enzim untuk melakukan katalisis suatu reaksi dengan baik. Sedangkan, pH yang kurang sesuai akan mengakibatkan kerusakan atau tidak aktifnya protein dalam suatu enzim sehingga menyebabkan fungsi dan aktivitas dari enzim tersebut berkurang (Kandari *et al.*, 2013). Aktivitas enzim dapat terganggu dan mengalami penurunan aktivitas apabila berada pada lingkungan pH yang jauh dari kisaran pH optimum dikarenakan perubahan struktur dari protein enzim yang mempengaruhi sisi aktif enzim. Inaktivasi enzim dapat terjadi karena unfolding dari molekul protein yang disebabkan alterasi keseimbangan elektrostatik dan ikatan hidrogen serta perubahan struktur tersier dari protein enzim sehingga mengakibatkan rendahnya stabilitas enzim dan denaturasi enzim (Kandari *et al.*, 2013). Denaturasi merupakan rusaknya struktur atau bentuk tiga enzim dan menyebabkan enzim terlepas dari substratnya akibat dari pH yang terlalu asam atau basa. dimensi Pada penelitian ini, *crude enzyme* yang dihasilkan juga diuji aktivitas stabilitas dan

optimum pada berbagai variasi pH. Hasil aktivitas *crude enzyme* terhadap stabilitas dan optimum pH dapat dilihat pada Gambar 4.4.



Gambar 4.4 Aktivitas *crude enzim* pada stabilitas pH dan pH optimum berdasarkan analisis gula reduksi metode Somogyi-Nelson

Aktivitas *crude enzyme* berdasarkan gula reduksi yang dihasilkan memiliki rentangan stabilitas pH mulai 4 sampai pH 7 dan persen aktivitas berturut-turut dari pH 3, pH 3,5, pH 4 sampai pH 7 yaitu 95,6%, 95,8%, 95,8%, 96%, 96,4%, 96%, 96,4%, 96,8%, 96,8%, 96,8%, dan 97%. Namun, pada pH 7,5 dan pH 8 aktivitas *crude enzyme* mengalami penurunan aktivitas yaitu 95,4 % dan 95,2 %. Menurut Pelczar and Chan (1986), penurunan aktivitas pada pH dapat disebabkan karena terjadi perubahan pada daerah katalitik dan konformasi sifat ionik dari gugus karboksil dan gugus amino pada enzim. Selain itu, perubahan pH dapat menyebabkan terjadinya proses denaturasi sehingga aktivitas enzim menurun (Novita *et al.*, 2006).

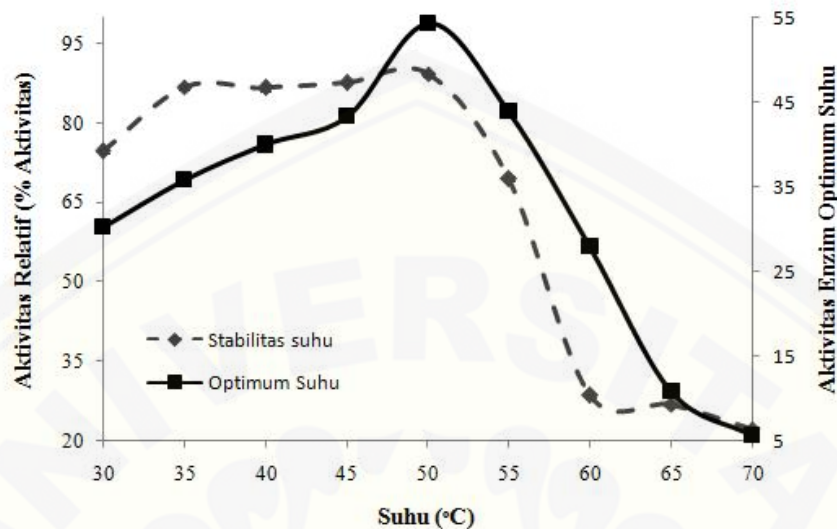
Selain stabilitas pH juga dilakukan pengamatan parameter lainnya berupa pH optimum dari *crude enzyme*. pH optimum enzim merupakan pH yang diperlukan oleh enzim untuk bekerja maksimum sehingga mencapai aktivitas enzim dengan nilai tertinggi. Berdasarkan gambar 4.4, dapat dilihat bahwa aktivitas *crude enzyme*

mencapai pH optimum pada pH 7 dengan gula reduksi sebesar 61,2 µg/ml sehingga berdasarkan hasil tersebut *crude enzyme* yang diuji dapat digolongkan pada pH alkalin karena aktivitas optimum enzim berada pada pH basa (Yasmin *et al.*, 2013). Menurut Winarno (1986), menyatakan bahwa pada umumnya enzim menunjukkan aktivitas maksimum pada pH optimum berkisar 4,5-8,0. Pada pH optimum, enzim berada pada tingkat ionisasi yang paling sesuai untuk berikatan dengan substrat membentuk kompleks enzim-substrat yang paling tepat sehingga menghasilkan produk yang maksimal. Konformasi enzim juga dalam bentuk yang stabil sehingga efektivitas pengikatan enzim-substrat tinggi (Simon and Igbasan, 2002).

4.4 Stabilitas Suhu dan Optimum Suhu

Suhu merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi kerja enzim. Pada umumnya peningkatan suhu dapat meningkatkan laju reaksi kimia akibat peningkatan jumlah energi bagi molekul reaktan, sehingga tumbukan antar molekul lebih produktif. Akan tetapi, enzim merupakan protein yang sangat peka terhadap perubahan suhu. Suhu yang terlalu tinggi akan menyebabkan rusaknya struktur enzim sehingga enzim akan mengalami inaktivasi karena sifat enzim yang mudah terdenaturasi. Inaktivasi enzim pada suhu tinggi disebabkan adanya pembukaan dan perubahan struktur enzim karena adanya perubahan atau kerusakan molekul-molekul asam-asam amino tertentu. Sebaliknya, pada suhu rendah laju inaktivasi enzim berjalan sangat lambat dan sangat kecil (Yasmin *et al.*, 2013). (Gambar 4.5.)

Pada penelitian ini penentuan stabilitas dan optimum suhu dilakukan dengan melakukan uji aktivitas enzim pada suhu yang bervariasi yaitu suhu 30⁰C, 35⁰C, 40⁰C, 45⁰C, 50⁰C, 55⁰C, 60⁰C, 65⁰C, dan 70⁰C dan dilakukan dengan menggunakan pH optimum yaitu pH 7. Stabilitas enzim terhadap panas dipengaruhi oleh ukuran dan kompleksitas enzim. Semakin besar enzim dan semakin kompleks strukturnya maka lebih stabil terhadap panas (Ijaz *et al.*, 2011). Sifat termostabilitas enzim disebabkan oleh daya tahan protein terhadap denaturasi protein oleh pengaruh panas (Lehninger, 1995).



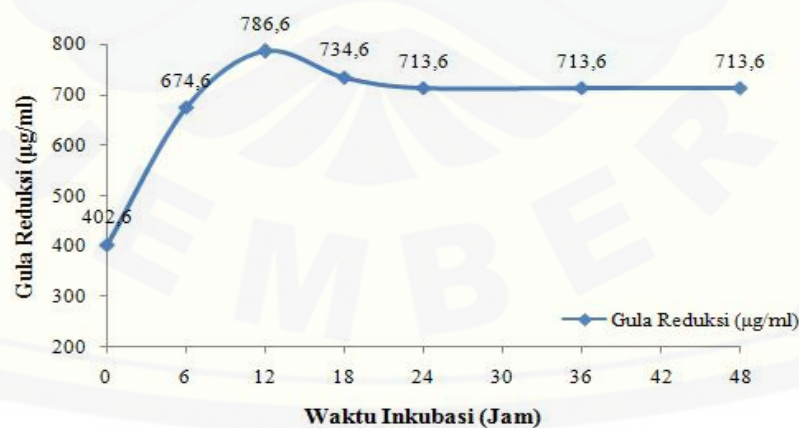
Gambar 4.5 Aktivitas *crude enzyme* pada stabilitas suhu dan optimum suhu berdasarkan analisis gula reduksi metode Somogyi-Nelson.

Berdasarkan gambar 4.5, dapat diketahui bahwa *crude enzyme* tersebut memiliki rentangan stabilitas suhu mulai dari suhu 30⁰C, 35⁰C, 40⁰C, 45⁰C, dan 50⁰C dengan persen aktivitas berturut-turut 76,73%, 90,35%, 90,1%, 91,09%, dan 95,05%. Penurunan aktivitas pada suhu 55⁰C dikarenakan enzim mengalami denaturasi. Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim pada suhu optimum dapat dilihat pada Gambar 4.5. Penentuan suhu optimum dimaksudkan untuk memperoleh suhu yang paling tepat, dimana pada suhu tersebut dihasilkan aktivitas enzim tertinggi. Menurut Pelczar and Chan (1986), kenaikan aktivitas enzim bertambah seiring dengan kenaikan suhu sampai mencapai aktivitas optimum, kemudian kenaikan suhu lebih lanjut akan berakibat pada menurunnya aktivitas enzim. Menurut Sharada *et al.*, (2013), menyatakan bahwa dengan bertambahnya suhu, terjadi kenaikan kecepatan reaksi enzim karena bertambahnya energi kinetik yang mempercepat gerak vibrasi, translasi dan rotasi enzim dan substrat, sehingga memperbesar peluang enzim dan substrat untuk bereaksi. Pada suhu yang lebih besar protein enzim mengalami perubahan konformasi. Pada suhu tinggi, substrat juga akan mengalami perubahan konformasi sehingga gugus reaktifnya tidak dapat lagi atau mengalami hambatan dalam memasuki sisi aktif enzim. Hal itu dapat dilihat pada gambar 4.5, dimana pada

suhu 30°C sampai 45°C aktivitas enzim mengalami peningkatan berdasarkan gula reduksi yang dihasilkan yaitu 30,3 µg/ml, 35,8 µg/ml, 40 µg/ml, 43,3 µg/ml, dan menunjukkan aktivitas suhu optimum berdasarkan gula reduksi tertinggi yaitu 54,3 µg/ml pada suhu 50°C (Novita *et al.*, 2006). Hal tersebut terjadi pada suhu 55°C, dimana aktivitas enzim yang dihasilkan menurun menjadi 43,9 µg/ml. Peningkatan suhu di atas suhu 50°C yang merupakan suhu optimum enzim ekstraseluler, akan menurunkan aktivitas enzim. Enzim mengalami denaturasi dan kehilangan aktivitas katalitiknya pada suhu 55°C sampai 70°C. Peningkatan suhu ini menyebabkan perubahan konformasi pada struktur molekul substrat dan sisi aktif enzim yang tidak sesuai lagi dengan substratnya, sehingga mengalami hambatan untuk berikatan (Novita *et al.*, 2006).

4.5 Kemampuan Hidrolisis *Crude Enzyme* pada Substrat TKKS

Hidrolisis enzimatis ditujukan untuk mengubah substrat TKKS menjadi produk berupa gula pereduksi berupa *crude enzyme* yang diukur aktivitasnya menggunakan metode Somogyi- Nelson. Pada analisis kemampuan hidrolisis ini untuk mengetahui waktu terbaik hidrolisis maksimum yang mampu dilakukan oleh *crude enzyme* dari isolat *T. viride* strain B10 MCC- 00136 untuk menghidrolisis substrat TKKS berdasarkan total gula pereduksi tertinggi pada aktivitas enzim yang dihasilkan. (Gambar 4.6.).



Gambar 4.6 Kemampuan Hidrolisis *Crude enzyme* pada substrat TKKS 5% berdasarkan analisis gula reduksi metode Somogyi-Nelson

Crude enzyme mampu menghidrolisis substrat TKKS 5%, hal itu dapat terlihat dari peningkatan gula reduksi yang dihasilkan pada jam ke-0, jam ke-6, dan mencapai aktivitas maksimum pada jam ke-12, serta mengalami penurunan aktivitas enzim pada jam ke-18 dan mengalami fase stasioner pada jam ke-24, sampai jam ke-48. Hasil tertinggi diperoleh pada jam ke-12 yaitu 786,6 µg/ml atau 1,6% yang berarti *crude enzyme* mampu menghidrolisis komponen TKKS sekitar 1,6% dari total komponen yang ada dalam TKKS. Hasil penelitian ini lebih rendah dibandingkan dengan hasil dari penelitian Saparianti *et al.*, (2012) yang menggunakan ampas tebu sebanyak 8% dengan kadar glukosa yang dihasilkan 13,44 mg/ml dan kadar selulosa 47,59%. Perbedaan hasil tersebut diduga karena ada perbedaan komponen baik selulosa maupun komponen lain dari bahan baku yang digunakan. Bahan baku pada penelitian ini adalah limbah TKKS yang memiliki kadar gula reduksi sebesar 786,6 µg/ml dan digunakan sebanyak 5%. Menurut Saparianti *et al.*, (2012), menyatakan bahwa konsentrasi substrat juga mempengaruhi kecepatan reaksi enzim untuk menghasilkan produk. Selain itu, rasio C/N juga mempengaruhi hasil kadar gula reduksi yang dihasilkan. Pada TKKS rasio C/N lebih tinggi daripada rasio C/N ampas tebu. Tingkat rasio C/N optimum antara 20- 30 dengan kadar N berkisar antara 1,4% - 1,7% yang ideal untuk dekomposisi. Jika tingkat rasio C/N tinggi seperti dalam TKKS, maka proses pengomposan membutuhkan waktu yang relatif lama, sedangkan jika tingkat rasio C/N rendah maka proses pengomposan relatif cepat dan nitrogen akan dibebaskan dalam bentuk amoniak (Wahyuni, 2011).

Gula reduksi yang dihasilkan pada substrat TKKS diduga merupakan gula reduksi hasil hidrolisis selulosa dan hemiselulosa. Hal ini dikarenakan pada TKKS komponen tertinggi adalah selulosa dan hemiselulosa (Assadad *et al.*, 2013). Semakin banyak substrat yang bisa dihidrolisis menjadi monomer gula sederhana, maka kadar glukosa yang dihasilkan juga akan semakin meningkat dan begitu pula sebaliknya jika substrat yang dihidrolisis sedikit, maka total gula reduksi yang dihasilkan juga lebih rendah (Sharada *et al.*, 2013). Gula reduksi yang dihasilkan pada jam ke-18 dapat mengalami penurunan dimungkinkan karena terjadi penghambatan reversibel

kompetitif. Kadar glukosa yang berlebih akan menghambat aktivitas enzim dengan membentuk kompleks dengan enzim, sehingga terjadi persaingan antara substrat dan glukosa untuk membentuk kompleks dengan enzim ekstraseluler. Jika kadar glukosa berlebih, maka pembentukan glukosa juga menjadi berkurang (Inglin *et al.*, 1980).



BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar gula reduksi pada aktivitas *crude enzyme* yang dihasilkan *T. viride* strain B10 MCC-00136 mencapai aktivitas tertinggi pada waktu optimasi produksi dengan substrat TKKS jenuh air diperoleh pada hari ke-6 dengan aktivitas sebesar 72,8 µg/ml. Enzim ekstraseluler yang dihasilkan *T. viride* strain B10 MCC-00136 stabil pada pH 4 sampai pH 7 dan optimum pada pH 7, serta stabil pada suhu 35⁰C-50⁰C dan optimum pada suhu 50⁰C. Sementara itu, kadar gula reduksi pada pengujian kemampuan hidrolisis *crude enzyme* pada substrat alkali ekstrak TKKS 5% adalah 786,6 µg/ml atau 1,6% komponen TKKS yang terhidrolisis.

5.2 Saran

Perlu adanya optimalisasi media produksi enzim yaitu substrat pada TKKS dan optimasi produksi sebaiknya dilakukan pada suhu, pH, dan waktu inkubasi tertentu agar *crude enzyme* yang dihasilkan memiliki aktivitas gula reduksi yang maksimal.

DAFTAR PUSTAKA

- Alam, M. Z., Mamun, A. A., Qudsieh, I. Y., Muyibi, S. A., Salleh, H. M., and Omar, N. M. 2009. Solid state bioconversion of oil palm empty fruit bunches for cellulase enzyme production using rotary drum bioreactor. *Journal of Biochemistry Engineering* 46: 61- 64.
- Amira, D. R., Roshanida, and A. R., Rosli. 2012. Effects of xylanase and cellulase production during composting of efb and pome using fungi. *Journal of Engineering and Technology* 6: 340- 344.
- Assadad, L., Sari, R. S., and Sugiyono. 2013. Optimasi waktu produksi hidrolisis dan fermentasi dalam produksi bioetanol dari limbah pengolahan agar (*Gracilaria sp.*) industri. *JPB Perikanan* 8(2):133-142.
- Beldman, G., Marjo, F. S. L., Frank, M. R., and Fons, G. J. V. 1985. The Cellulase of *Trichoderma viride*: purification, characterization, and comparison of all detectable endoglucanases, exoglucanase and -glucosidases. *European journal of Biochemistry* 146: 301- 308.
- Deacon, J.W. 1997. Modern Mycology Third Edition. Berlin: Blackwell Science.
- Dheeman, S. D., Frias, M. J., Henehan, M. T. G. 2010. Influence of cultivation conditions on the production of a thermostable extracellular lipase from *amycolatopsis mediterranei* DSM 43304. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 37:1-17.
- Direktorat Jenderal Bina Produksi Perkebunan. 2012. *Statistik Perkebunan Kelapa Sawit di Indonesia 2010- 2012*. Jakarta: Departemen Pertanian.
- Direktorat Jenderal Pengolahan dan Pemasaran Hasil Produk. 2006. *Harga Komoditas Crude Palm Oil*. Jakarta: Departemen Pertanian.
- Druzhinina, I. R., Kopchinskiy, A. G., Druzhinina, I. S. 2006. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience* 47:55-64.
- Fatma, El-Zaher and Abd., Fadel, M. 2010. Production of bioethanol via enzymatic saccharification of rice straw by cellulase produced by *Trichoderma reesei* under solid state fermentation. *New York Science Journal* 3 (4): 72-78.
- Gautam, S. P., Bundela, P. S., Pandey, A. K., Jamaluddin, Awasthi, M. K., and Sarsaiya, S. 2010. Optimization of the medium for the production of cellulase by the *Trichoderma viride* using submerged fermentation. *International Journal of Enviromental Sciences* 1 (4): 656- 665.

- Gunam, I. B. W., Wayan R. A., and Ida Bagus N. S. D. 2011. Produksi selulase kasar dari kapang *Trichoderma viride* dengan perlakuan konsentrasi substrat ampas tebu dan lama fermentasi. *Jurnal Biologi* 15 (2): 29- 33.
- Hanson, L. E., and Howell, C. R. 2004. Elicitors of plant defense responses from biocontrol strains of *Trichoderma virens*. *Phytopathology* 94: 171-176.
- Ijaz, A., Anwar, Z., Zafar, Y., Hussain, I., Muhammad, A., Irshad, M., Mehmood, S. 2011. Optimization of cellulase enzyme production from corn cobs using *Alternaria alternata* by solid state fermentation. *Journal of Cell and Molecular Biology* 9(2): 51-56.
- Inglin, M., Feinberg, B. A., Loewenberg, J. R. 1980. Partial purification and characterization of a new intracellular α -Glucosidase of *Trichoderma reesei*. *Journal of Biochemistry* 185: 515-519.
- Irfan, M., Muhammad Nadeem, and Syed, Q. 2012. Influence of nutritional conditions for endoglucanase production by *Trichoderma viride* in SSF. *Global Journal of Biotechnology and Biochemistry* 7 (1): 7-12.
- Irfan, M., and Syed, Q. 2012. Partial purification and characterization of xylanase from *Trichoderma viride* produced under SSF. *International Journal of Applied Research in Natural Products* 5(1): 7-11.
- Kalsom, M. S. U., H. Nur, A. A. Norlea, and S. Ngaspan. 2006. Characterization of humic acid from humification of oil palm empty fruit bunch fibre using *Trichoderma viride*. *Journal of Tropical Agriculture and Food Science* 34 (1): 165- 172.
- Kandari, V., Vajpayee, I., Kumar, D., Gupta, S. 2013. Cellulase and α -glucosidase production by *Trichoderma viride* and *Aspergillus wentii* in sub-merged fermentation utilizing pretreated lignocellulosic biomass. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research* 3(5): 63-78.
- Kocher, G., Kaira, K., Banta, G. 2007. Optimization of cellulase production by submerged fermentation of rice straw by *Trichoderma harzianum* Rut-C 8230. *The Internet Journal of Microbiology* 5 (2).
- Kristina, Sari, E. V., Novia. 2012. Alkaline pretreatment dan proses simultan sakarifikasi- fermentasi untuk produksi etanol dari tandan kosong kelapa sawit. *Jurnal Teknik Kimia* 18 (3): 34-44.
- Law, K. N., Wan Rosli, W. D., and Arniza Ghazali. 2007. Morphological and chemical nature of fiber strands of oil palm empty fruit bunch (OPEFB). *BioResources*, 2 (3): 351- 362.

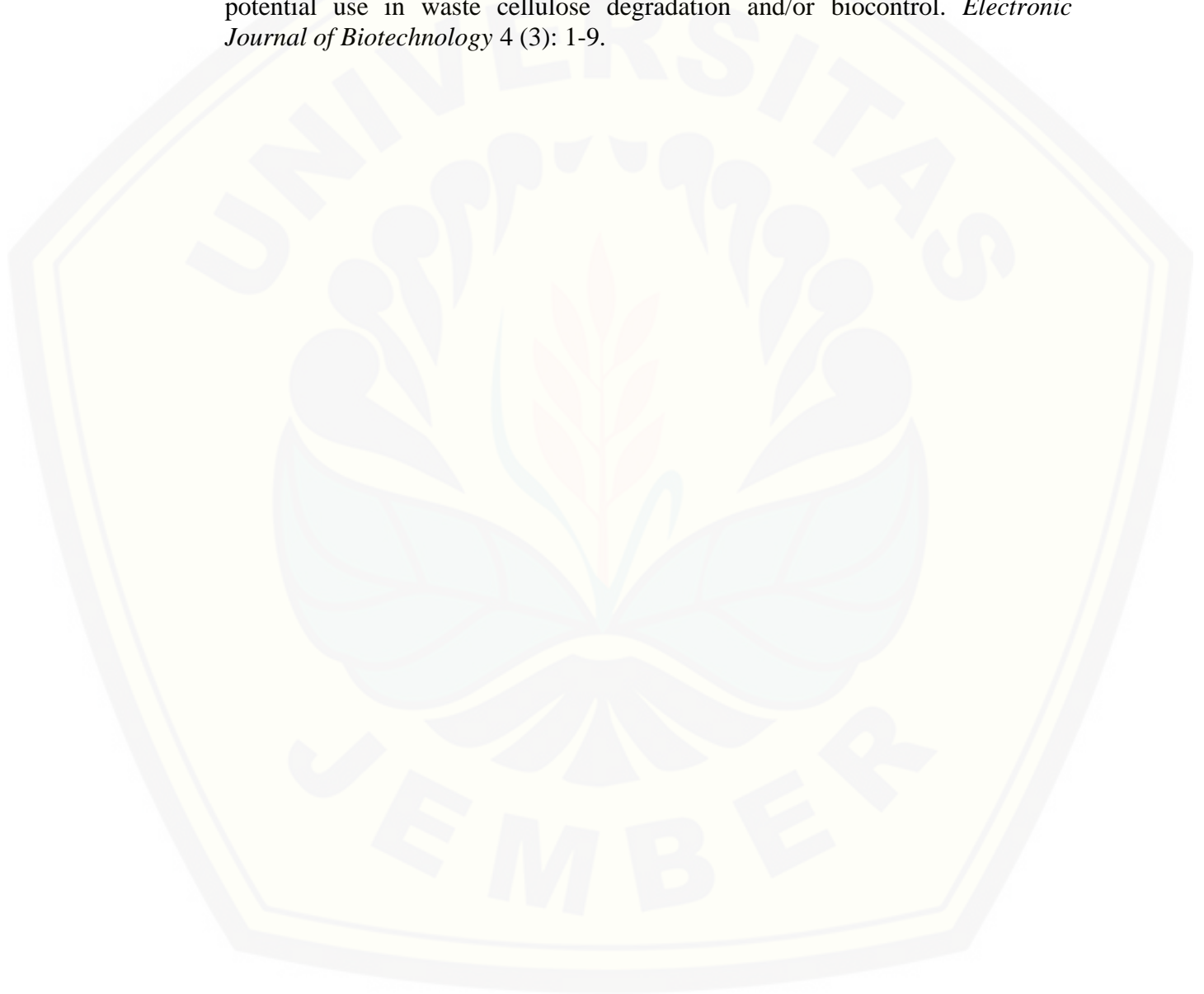
- Laziba, M., Sutrisno, and Suratmo. 2013. Optimasi amobilisasi xilanase dari *Trichoderma viride* pada matriks pasir laut. *Jurnal Kimia* 2 (1): 456- 462.
- Lehninger, A. L. 1995. *Dasar- Dasar Biokimia*. Jakarta: Erlangga.
- Lu, Z., Tombolini, R., Woo, S., Zeilinger, S., Lorito, M., Jansson, J. K. 2004. In vivo study of *Trichoderma*-pathogen-plant interactions, using constitutive and inducible green fluorescent protein reporter systems. *Application of Environmental Microbiology* 70: 3073—3081.
- Lynd, L. R., Weimer, P. J., W. H. van Zyl, and I. S. Pretorius. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66 (3): 506- 577.
- Misson, M., Haron, R., Kamaroddin, M. F. A., Amin, N. A. S. 2009. Pre-treatment of empty palm fruit bunch for production of chemicals via catalytic pyrolysis. *Bioresources of Technology* 100: 2867–2873.
- Mojsov, K. 2010. Application of solid-state fermentation for cellulase enzyme production using *Trichoderma viride*. *Perspectives of Innovations, Economics & Busines* 5 (2): 108- 110.
- Moya A., and Torres R., E. 2012. Hydrolysis of cellulose and oil palm empty fruit bunches by using consortia of fungi isolated from the soil of Colombian high andean forest. *Soils, Fertilization and Management of Water* 30 (3): 411–418.
- Muhpidah. 2013. Produksi Enzim Pektinase Dengan Fermentasi Media Padat Kulit Buah Kakao Oleh Kapang *Aspergillus niger* dan *Aspergillus oryzae*. *Skripsi*. Makassar: Universitas Hasanuddin Press.
- Nelson, N. 1944. A Photometric adaptation of the somogyi method for the determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry* 153: 375-381.
- Nelson N., and Somogyi, M. 1945. A new reagent for the determination of sugars. *Journal of Biological Chemistry* 160: 61-73.
- Nenci. 2012. Isolasi dan Karakterisasi Selulase Dari *Trichoderma viride* Strain T051 Dengan Substrat Jerami. *Skripsi*. Jakarta: Universitas Indonesia Press.
- Novita, W., Arief, K., Nisa, F. C., Murdiyatmo, U. 2006. Partial characterization of crude protease extracted from *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-14396. *Jurnal Teknologi Pertanian* 7(2): 96-105.

- Pei-Jun, L. I., De-bing, Z., Qi-xing, Z. Chun-gui. 2004. Optimization of solid state fermentation of cellulase from *Trichoderma koningii*. *Journal of Environmental Science* 6: 816-820.
- Pelczar, MJ., and Chan, E. C. S. 1986. *Dasar- Dasar Mikrobiologi*. Jakarta: Universitas Indonesia Press.
- Samsuri, M., M. Gozan, H. Hermansyah, R. Mardias, M. Baiquni, A. Wijanarko, B. Prasetya, and M. Nasikin. 2007. Pemanfaatan selulosa bagas untuk produksi ethanol melalui sakarifikasi dan fermentasi serentak dengan enzim xylanase. *Makara Teknologi Sains* 11 (1): 17- 24.
- Saparianti, E., Dewanti, T., Dhoni, S. K. 2012. Hidrolisis ampas tebu menjadi glukosa cair oleh kapang *Trichoderma viride* (kajian konsentrasi ampas tebu (*Saccharum officinarum*) dan lama fermentasi). *Jurnal Teknologi Pertanian* 5 (1): 1 – 10.
- Sharada, R., Venkateswarlu, G., Venkateshwar, S., Rao, M. A. 2013. Production of cellulase. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical, and Biological Science* 3 (4): 1070-1090.
- Simon and Igbasan, F. 2002. In vitro properties of phytases from various microbial origins. *International Journal of Food Science and Technology* 37: 813-22.
- Sitorus, S. R. 2011. Pretreatment dan Hidrolisis Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS) dengan Metode Steaming dan Enzimatik. *Skripsi*. Universitas Indonesia Press.
- Sukumuran, R. K., Reeta Rani,S., and Ashok Pandey. 2005. Microbial cellulases: production, applications, and challenges. *Journal of Scientific and Industrial Research* 64 : 832- 844.
- Syahnen, M. S., Sirait, D. D. N., Br. Pinem, S. E. 2014. *Teknik Uji Mutu Agens Pengendali Hayati (APH) di Laboratorium*. Medan: Balai Besar Perbenihan dan Proteksi Tanaman Perkebunan (BBPPTP).
- Wahid, M. Z. A., Salleh, M., Yusof, F., Karim, M. I. A., Alam, Md. Z. 2011. Factors affecting endoglucanase production by *Trichoderma reesei* RUT C-30 from solid state fermentation of oil palm empty fruit bunches using plackett-burman design. *African Journal of Biotechnology* 10 (46): 9402-9409.
- Wahyuni, S. 2011. Analisis Kadar Air, Fosfor, Kalium, dan Karbon Organik pada Kompos yang dibuat dari TKKS dengan Aktivator Lumpur Aktif PT. Bumi Sarimas Indonesia. *Skripsi*. Padang: Universitas Andalas Press.

Winarno, F. G. 1986. *Enzim Pangan*. Jakarta: Gramedia.

Yasmin, S., Mattoo, R. L., Nehvi, F. A. 2013. Isolation, characterization, and molecular weight determination of cellulase from *Trichoderma viride*. *African Journal of Biotechnology* 12 (28): 4512-4518.

Zaldivar, M., Velasquez, J. C., Contreras, I., Perez, L. M. 2001. *Trichoderma aureoviride* 7-121, a mutant with enhanced production of lytic enzymes: its potential use in waste cellulose degradation and/or biocontrol. *Electronic Journal of Biotechnology* 4 (3): 1-9.



LAMPIRAN A. KOMPOSISI MEDIA

A.1 Komposisi Media Potato Dekstrosa Agar (PDA)

| Komposisi | Jumlah/Liter |
|-----------|--------------|
| Kentang | 200 gram |
| Dekstrosa | 15 gram |
| Agar | 15 gram |
| Akuades | 1000 ml |

A.2 Komposisi Media Alkali Ekstrak TKKS Agar Miring 0,1%

| Komposisi | Jumlah/Liter |
|---------------------|--------------|
| Alkali Ekstrak TKKS | 1 gram |
| Agar | 15 gram |
| Akuades | 1000 ml |

A.3 Komposisi Media Produksi Enzim

| Komposisi | Jumlah/Liter |
|------------|--------------|
| Bubuk TKKS | 239 gram |
| Akuades | 1000 ml |

A.4. Komposisi Susbtrat Alkali Ekstrak TKKS 0,5%

| Komposisi | Jumlah/Liter |
|---------------------|--------------|
| Alkali Ekstrak TKKS | 5 gram |
| Akuades | 1000 ml |

A.5 Komposisi Substrat TKKS 5%

| Komposisi | Jumlah/Liter |
|---------------|--------------|
| Substrat TKKS | 50 gram |
| Akuades | 1000 ml |

LAMPIRAN B. KOMPOSISI REAGEN SOMOGYI-NELSON

B.1 Komposisi Reagen Somogyi

| Komposisi | Jumlah/Liter |
|---|--------------|
| Na_2CO_3 | 24 gram |
| $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6\text{H}_2\text{O}$ (<i>Potassium Sodium Tartrate Tetahydrat</i>) | 12 gram |
| NaHCO_3 | 16 gram |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 10% | 40 ml |
| Na_2SO_4 | 180 gram |
| Akuades | 1000 ml |

B.2 Komposisi Reagen Nelson

| Komposisi | Jumlah/Liter |
|---|--------------|
| $(\text{NH}_4)_2\text{MO}_7 \cdot 24\text{H}_2\text{O}$ | 50 gram |
| H_2SO_4 (<i>Sulfuric acid</i>) | 46 ml |
| $\text{NaHSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 6 gram |
| Akuades | 1000 ml |

LAMPIRAN C. KURVA KALIBRASI GLUKOSA

