

Optimasi Penggunaan Nutrisi *Brown Sugar*, Urea, dan Gliserol pada Produksi Enzim Pektinase dari Limbah Padat Kelapa Sawit Melalui Proses Fermentasi

Andri Febryanto Hermawan¹, dan Eli Hendrik Sanjaya^{1,2,3*}

¹Department of Chemistry, Universitas Negeri Malang, Indonesia

²Department of Biotechnology, Universitas Negeri Malang, Indonesia

³Center of Sciences and Engineering, LPPM Universitas Negeri Malang, Universitas Negeri Malang, Indonesia; e-mail: eli.hendrik.fmipa@um.ac.id

ABSTRAK

Limbah kelapa sawit merupakan sumber bioproduk yang kurang dimanfaatkan secara optimal. Penelitian ini bertujuan untuk mengeksplorasi potensi limbah kelapa sawit sebagai substrat untuk produksi enzim pektinase menggunakan *submerged fermentation* (SmF). Substrat diuji dengan berbagai variasi nutrisi, yaitu *brown sugar*, urea, dan gliserol, untuk mengukur pengaruhnya terhadap kadar protein dan aktivitas enzim pektinase. Purifikasi ekstrak kasar enzim dilakukan dengan ammonium sulfat dan dialysis, serta pengukuran aktivitas enzim menggunakan metode DNS (3,5-dinitrosalisilat). metode low Hasil menunjukkan bahwa serabut kelapa sawit (SKS) menghasilkan kadar protein lebih tinggi dan aktivitas enzim pektinase lebih tinggi dibandingkan tandan kosong kelapa sawit (TKKS), dengan aktivitas enzim tertinggi tercatat pada SKS-urea (1,641 U/mL), sedangkan pada TKKS-urea tercatat 1,494 U/mL. Penambahan *brown sugar* menghasilkan aktivitas spesifik enzim tertinggi pada SKS (1,983 U/mg) yang menunjukkan bahwa jenis sumber karbon mempengaruhi efektivitas produksi enzim. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa SKS lebih efisien dalam menghasilkan pektinase dibandingkan TKKS, dengan pengaruh penting dari keseimbangan antara sumber karbon dan nitrogen dalam proses fermentasi. Temuan ini memberikan kontribusi baru dalam pemanfaatan limbah kelapa sawit untuk produksi enzim secara efisien dan berkelanjutan, serta membuka arah untuk penelitian lanjutan mengenai mikroba indigen dan optimasi kondisi fermentasi dalam skala industri.

Kata kunci: Limbah Padat Kelapa Sawit, Fermentasi, Pemurnian Enzim, Dialisis, Aktivitas Enzim, Aktivitas Spesifik Enzim

ABSTRACT

Palm oil waste is an underutilized source of bioproducts. This study aims to explore the potential of palm oil waste as a substrate for pectinase enzyme production using *submerged fermentation* (SmF). The substrates were tested with various nutrient variations, including brown sugar, urea, and glycerol, to evaluate their effects on protein content and pectinase enzyme activity. Enzyme purification of the crude extract was carried out using ammonium sulfate and dialysis, with enzyme activity measured using the DNS (3,5-Dinitrosalicylic acid) method. The results showed that oil palm mesocarp fiber (SKS) produced higher protein content and pectinase enzyme activity compared to oil palm empty fruit bunch (TKKS), with the highest enzyme activity recorded in SKS-urea (1.641 U/mL), while TKKS-urea yielded 1.494 U/mL. The addition of brown sugar resulted in the highest specific enzyme activity in SKS (1.983 U/mg), indicating that the type of carbon source significantly influences enzyme production effectiveness. These findings suggest that SKS is more efficient than TKKS for pectinase production, highlighting the important influence of the balance between carbon and nitrogen sources in the fermentation process. This study provides a new contribution to the utilization of palm oil waste for efficient and sustainable enzyme production and opens avenues for further research on indigenous microbes and the optimization of fermentation conditions at an industrial scale.

Keywords: Palm Solid Waste, Fermentation, Enzyme Purification, Dialysis, Enzyme Activity, Enzyme Specific Activity

Citation: Hermawan, A. F. dan Sanjaya, E. H. (2025). Optimasi Penggunaan Nutrisi *Brown Sugar*, Urea, dan Gliserol pada Produksi Enzim Pektinase dari Limbah Padat Kelapa Sawit Melalui Proses Fermentasi. Jurnal Ilmu Lingkungan, 23(6), 1464-1473, doi:10.14710/jil.23.6.1464-1473

1. PENDAHULUAN

Kelapa sawit (*Elaeis guineensis*) merupakan salah satu komoditas perkebunan yang memiliki peran signifikan dalam perekonomian Indonesia.

Berdasarkan data Badan Pusat Statistik (BPS) tahun 2022, Indonesia memiliki lebih dari 2.800 pabrik pengolah tandan buah segar (TBS) kelapa sawit menjadi minyak kelapa sawit mentah (CPO), dengan

total produksi mencapai 46 juta metrik ton CPO. Proses ekstraksi CPO menghasilkan rendemen sekitar 20-23% dengan sisa 67-70% berupa limbah padat, termasuk tandan kosong kelapa sawit (TKKS), serabut kelapa sawit (SKS), dan cangkang kelapa sawit (CKS) (*DSNG's CPO Production*, 2022). Limbah padat ini mengandung komponen lignoselulosa, seperti selulosa, hemiselulosa, dan lignin, yang sulit dicerna dan memerlukan solusi inovatif untuk pengelolaannya (Illyin Abdi Budianta, 2022) (Farag et al., 2025).

Pengelolaan limbah kelapa sawit pada umumnya terbatas pada produk bernilai rendah, seperti bioenergi dan pupuk yang tergolong memberikan manfaat ekonomi terbatas. Namun, limbah ini memiliki potensi besar untuk dikonversi menjadi produk bernilai tinggi melalui bioteknologi. Salah satu solusi yang menjanjikan adalah produksi enzim pektinase melalui teknologi fermentasi. Dibandingkan dengan bioenergi dan pupuk, produksi enzim menawarkan nilai tambah yang lebih tinggi dengan aplikasi luas di industri pangan, farmasi, dan kosmetik, sekaligus mengurangi dampak lingkungan dari limbah tersebut.

Pektinase memiliki potensi pasar global yang besar, dengan proyeksi mencapai USD 30,2 juta pada 2024 dan laju pertumbuhan tahunan sekitar 7,2% (*Pectinase Market Size, Trends, Growth*, 2024). Enzim pektinase bekerja untuk memecah polimer pektin menjadi fragmen yang lebih kecil atau sederhana melalui hidrolisis (Singh Jadaun, 2018). Enzim pektinase berfungsi sebagai pembentuk gel atau sebagai bahan pengental yang sering digunakan dalam pembuatan krim, sabun, dan lain-lain (Husni et al., 2021). Oleh karena itu, pemanfaatan limbah kelapa sawit sebagai substrat dalam produksi enzim pektinase menawarkan solusi untuk pengelolaan limbah yang lebih baik.

Pada beberapa penelitian, beberapa spesies mikroba ditemukan pada limbah kelapa sawit, seperti *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, dan *Lactobacillus sp.* (Lee et al., 2023). Beberapa dari spesies bakteri tersebut memiliki kemampuan mendegradasi lignoselulosa seperti selulosa, hemiselulosa, dan pektin, yang menjadi komponen utama limbah padat kelapa sawit (Chen et al., 2025). Mikroba ini juga dapat menghasilkan enzim pektinase yang berfungsi memecah pektin menjadi fragmen yang lebih sederhana. Penggunaan mikroba indigen dalam proses fermentasi dapat meningkatkan efisiensi konversi limbah menjadi produk enzim, dibandingkan dengan menggunakan mikroba yang telah dikulturkan secara komersial. Selain itu, pendekatan ini lebih ramah lingkungan karena memanfaatkan mikroorganisme yang sudah ada dalam limbah tersebut, mengurangi kebutuhan akan inokulasi mikroba eksternal dan bahan kimia tambahan.

Dalam pengolahan limbah kelapa sawit, submerged fermentation (SmF) menjadi pilihan yang lebih efisien dibandingkan dengan solid-state fermentation (SSF). Peter (2025) melakukan

penelitian perbandingan mengenai SmF dengan SSF, metode SmF banyak digunakan karena mudah untuk dikembangkan, kontrol tetap, dan ekonomis (Peter, 2025). Metode SmF menggunakan medium cair, yang memungkinkan kontrol lebih baik terhadap parameter fermentasi, seperti pH, suhu, dan aerasi. Hal ini mendukung peningkatan produksi enzim pektinase dengan lebih stabil dan efisien. Selain itu, SmF dapat lebih mudah diterapkan pada skala industri dan menghasilkan enzim dengan titer yang lebih tinggi, mengingat kontrol yang lebih baik terhadap proses fermentasi (Sharif et al., 2021). (Oiza et al., 2022).

Penelitian terdahulu sebagian besar berfokus pada penggunaan substrat standar dan inokulasi mikroorganisme yang dikulturkan dalam produksi enzim pektinase. Penelitian oleh Jalil (2023), menggunakan kultur *Aspergillus niger* LFP-1 untuk produksi pektinase dengan sumber nutrisi sintetis dengan metode SmF (Mat Jalil et al., 2023). Pendekatan ini sering kali tidak optimal, khususnya dalam penggunaan mikroba indigen dan dalam pengendalian proses fermentasi yang efisien. Penggunaan limbah padat kelapa sawit sebagai substrat dalam fermentasi spontan dengan mikroba indigen membuka peluang untuk produksi enzim pektinase, serta meminimalkan dampak lingkungan yang ditimbulkan oleh pengelolaan limbah yang tidak efisien.

Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mengeksplorasi potensi limbah padat kelapa sawit, khususnya TKKS dan SKS, sebagai substrat dalam produksi enzim pektinase melalui metode submerged fermentation (SmF) dengan menggunakan mikroba indigen yang terdapat dalam limbah tersebut. Penelitian ini juga akan mengevaluasi pengaruh variasi larutan nutrisi terhadap pertumbuhan mikroorganisme dan titer enzim yang dihasilkan. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi dalam pengembangan produksi enzim pektinase yang ekonomis, ramah lingkungan, dan dapat diaplikasikan dalam skala industri, serta menjadi solusi untuk pengelolaan limbah kelapa sawit yang lebih berkelanjutan.

2. METODE PENELITIAN

2.1. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini mencakup sebagai berikut yaitu toples berbahan plastik tertutup dengan berukuran 2000 ml, tabung reaksi, rak tabung reaksi, batang pengaduk, neraca analitik, mikropipet 1000 μ L dan 5000 μ L, tip, *microtube* 2 ml, spatula, *beaker glass* 500 ml; 100 ml; 250 ml; 500 ml; dan 500 ml, erlenmeyer 100 ml, gelas ukur 100 ml, corong kaca, pipet tetes, pipet ukur 5 ml dan 10 ml, neraca analitik, Vortex Thermolyne Maxi Mix II Type 37600 mixer, *sentrifuge refrigerated* Tomy MX – 105, *magnetic stirrer*, spektrofotometer UV – Vis Genesys 20 Thermo Scientific, *Hot Plate* Thermolyne Cimarec 2, dan pH meter.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi limbah padat kelapa sawit yang diperoleh dari PT Sawit Arum Madani yang berupa tandan kosong kelapa sawit (TKKS) dan serabut kelapa sawit (SKS), gula atau *brown sugar* palm suiker, urea, gliserol *foodgrade*, air, ammonium sulfat, buffer asetat, natrium-K-Tartrat, *Bovine Serum Albumin* (BSA), Pereaksi Folin - C, reagen DNS, campuran pektin terlarut 1%, NaOH, Na₂CO₃, CuSO₄.5H₂O, Natrium Tartrat.

2.2. Prosedur Kerja

2.2.1. Preparasi Sampel

Limbah kelapa sawit berupa tandan kosong yang diperoleh dari PT Sawit Arum Madani dicacah menggunakan mesin selep hingga berukuran kecil sekitar ±5–10 cm. Serabut kelapa sawit tidak dilakukan pencacahan karena memiliki ukuran awal yang sudah sesuai (±2–5 cm). Selanjutnya, sampel dimasukkan ke dalam wadah tertutup dan disimpan pada tempat kering.

2.2.2. Fermentasi Limbah Padat Kelapa Sawit

Metode fermentasi limbah padat kelapa sawit menggunakan metode SMF fermentasi spontan pada kondisi anaerobik. Proses fermentasi dilakukan dengan memasukkan 240 gram limbah kelapa sawit yang telah hancur ke dalam toples plastik berkapasitas 2 liter, kemudian ditambahkan larutan nutrisi (*brown sugar*/urea/gliserol) dengan variasi penambahan 60, 70, 80, 90, dan 100 mL. Ditambahkan air sebanyak 800 mL ke dalam campuran media dan ditutup rapat. Proses fermentasi berlangsung selama 3 bulan, dengan wadah ditutup rapat dan secara berkala tutup dilonggarkan untuk melepaskan gas karbon dioksida (CO₂) yang terbentuk.

2.2.3. Pemurnian Ekstrak Kasar Enzim

Tahap selanjutnya adalah pemurnian menggunakan ekstrak kasar hasil fermentasi. Pemurnian dilakukan dengan metode salting out (penggaraman) menggunakan amonium sulfat untuk memperoleh fraksi enzim (pemurnian parsial), kemudian dilanjutkan dengan dialisis guna menghilangkan garam dan memperoleh fraksi enzim yang lebih murni. Ekstrak kasar pektinase diendapkan dengan penambahan amonium sulfat hingga mencapai kejenuhan 100%. Setelah penggaraman, sampel disentrifugasi pada 4 °C, 10.000 rpm selama 20 menit. Endapan dipisahkan dari supernatan, lalu dilarutkan kembali dalam buffer asetat pH 5,6 hingga volume akhir 10 mL sebelum tahap dialysis (Azizah, 2021; Su'i & Suprihana, 2013).

2.2.4. Uji Protein Metode Lowry

Perhitungan kadar protein dilakukan dengan menggunakan metode lowry dengan larutan *Bovine Serum Albumin* (BSA) sebagai standar. Sampel berupa ekstrak kasar dan fraksi enzim hasil pemurnian masing-masing diambil 0,5 mL, kemudian

ditambahkan 2,5 mL reagen biuret dan diinkubasi 10 menit pada suhu ruang. Selanjutnya ditambah 0,25 mL reagen Folin-Ciocalteu dan diinkubasi kembali selama 30 menit pada tempat gelap. Absorbansi diukur pada 750 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis, dan konsentrasi protein sampel dihitung dari kurva standar BSA. (Martina & Vojtech, 2015; Nadea et al., 2023).

2.2.5. Uji Aktivitas Enzim Metode DNS

Aktivitas enzim pektinase ditentukan dengan metode DNS (3,5-dinitrosalisilat) menggunakan pektin 1% sebagai substrat. Sebanyak 0,5 mL sampel enzim (ekstrak kasar maupun fraksi hasil pemurnian) dicampur dengan 2,0 mL larutan pektin 1% yang dilarutkan dalam buffer natrium asetat 50 mM, pH 5,0. Campuran diinkubasi pada 37°C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 2,5 mL reagen DNS, kemudian dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 5 menit. Setelah itu didinginkan ke suhu ruang, volume dapat ditambah air suling hingga konstan bila diperlukan, dan absorbansi diukur pada 540 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

Aktivitas enzim pektinase dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$AE = \frac{KG \times VT}{Mr \text{ Glukosa} \left(\frac{\mu g}{mol} \right) \times WI \times VP}$$

Keterangan:

- KG = Konsentrasi Glukosa ($\frac{\mu g}{ml}$)
- VT = Volume Total (ml)
- WI = Waktu Inkubasi (menit)
- VP = Volume Pektinase (ml)

2.2.6. Uji Aktivitas Spesifik Enzim Pektinase

Aktivitas spesifik enzim pektinase dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut (Wirajana et al., 2021):

$$ASE(U/mg) = \frac{\text{Aktivitas Enzim Pektinase} \left(\frac{U}{ml} \right)}{\text{Konsentrasi Protein} \left(\frac{mg}{ml} \right)}$$

Keterangan:

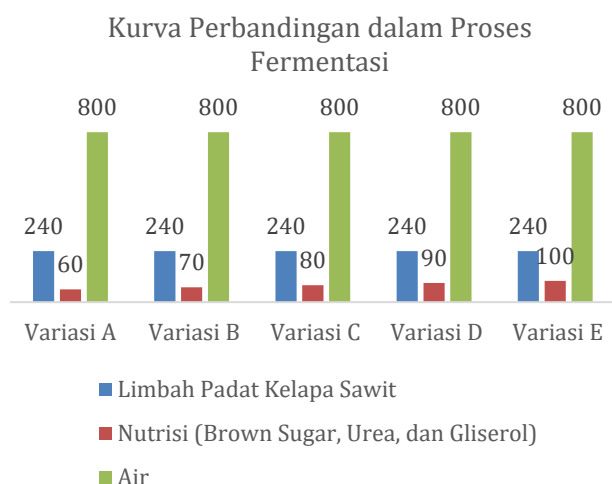
- ASE = Aktivitas Spesifik Enzim

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1. Proses Fermentasi Limbah Padat Kelapa Sawit

Proses fermentasi (Gambar 2) pada penelitian ini merupakan modifikasi dari metode "eco-enzyme" oleh Dr. Rosukon. Metode ini merupakan proses SMF dengan perbandingan antara limbah, larutan nutrisi, dan air yaitu 3:1:10 (Gambar 1). Larutan nutrisi yang terdiri dari *brown sugar*, urea, dan gliserol, sebagai sumber C dan N untuk mikroorganisme. Meskipun belum memiliki standar baku, proses fermentasi anaerobik diketahui menghasilkan campuran asam organik (asam asetat) dan terdapatnya aktivitas enzimatik selama ±3 bulan (Rahman et al., 2020). Variasi nutrisi dilakukan secara bertingkat untuk

mengetahui efek nutrisi awal terhadap produksi enzim.



Gambar 1. Grafik Perbandingan dalam Proses Fermentasi

Selama proses fermentasi limbah kelapa sawit, perubahan fisik seperti terbentuknya gelembung gas, perubahan warna media, dan pengurangan volume larutan media dapat diamati. Pada kondisi anaerobic, mikroorganisme akan mendegradasi karbohidrat menjadi asam organik, gas (CO), dan alcohol, proses ini menyebabkan terjadinya perubahan warna dan konsistensi larutan (Patricia et al., 2024). Oleh karena itu, pengamatan fisik seperti itu sering ditemukan pada proses fermentasi secara anaerobik.



Gambar 2. Proses Fermentasi pada Limbah Padat Kelapa Sawit

3.2. Hasil Analisis Kadar Protein

3.2.1. Kadar Protein Ekstrak Kasar Enzim

Penentuan kadar protein pada penelitian ini dilakukan dengan Analisa secara kuantitatif dengan menggunakan metode Lowry berdasarkan kurva standar BSA. Kadar protein harus diketahui agar dapat menentukan aktivitas spesifik enzim tersebut.

Berdasarkan Gambar 3, penambahan brown sugar menunjukkan peningkatan kadar protein yang hampir linear pada kedua jenis substrat, hal ini dikarenakan masih tercukupinya sumber karbon dan nitrogen mikroorganisme. Pada TKKS, kadar protein

meningkat dari sekitar 0,4 mg/mL menjadi 1,1 mg/mL seiring bertambahnya volume brown sugar hingga 100 mL. Pola serupa juga terjadi pada SKS, dengan peningkatan dari 0,6 mg/mL menjadi 1,6 mg/mL. Mikroba memanfaatkan monosakarida sebagai sumber energi utama, oleh karena itu ketersediaan gula sebagai sumber karbon dapat mendorong laju akumulasi protein (Ding et al., 2024).

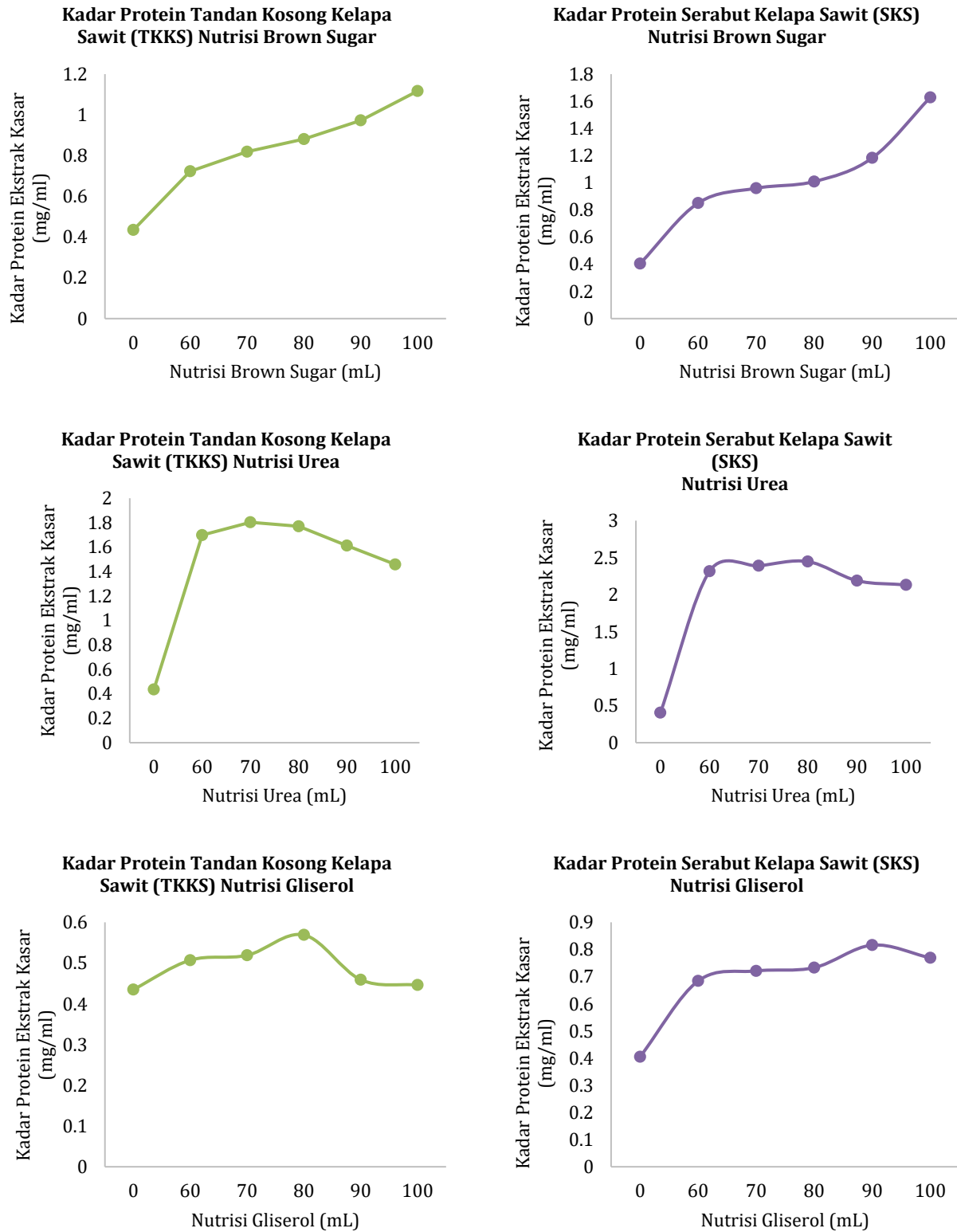
Pada penambahan urea, terjadi perbedaan yang cukup signifikan dari variabel kontrol. Pada TKKS, kadar protein meningkat tajam hingga 1,8 mg/mL pada volume 60–70 mL, sedangkan pada SKS mencapai 2,6–2,7 mg/mL pada volume yang sama sebelum menurun pada 90–100 mL. Urea menyediakan nitrogen yang dibutuhkan untuk pembentukan protein. Namun jika jumlahnya terlalu tinggi, urea akan menghasilkan amonia berlebih yang meningkatkan pH dan bersifat toksik bagi mikroorganisme (Yang et al., 2024). Akibatnya, aktivitas enzim terganggu dan produksi protein menurun. Pola ini menggambarkan adanya titik optimum konsentrasi urea yang mendukung pertumbuhan mikroba dan sintesis protein.

Pada perlakuan dengan gliserol, kedua substrat menunjukkan pola yang hampir sama. Terjadi peningkatan kadar protein moderat hingga titik optimum pada volume 70–90 mL, lalu sedikit menurun pada 100 mL. Nilai kadar protein maksimum pada TKKS sekitar 0,55 mg/mL, sedangkan pada SKS mencapai 0,9 mg/mL. Gliserol merupakan sumber karbon yang memiliki jalur metabolik lebih lambat dibanding glukosa. Dalam jumlah tinggi, gliserol meningkatkan kekentalan media dan mengurangi kadar oksigen terlarut yang menghambat aktivitas enzim dan metabolisme sel (Pio et al., 2023). Oleh karena itu, peningkatan kadar protein tidak sebesar pada perlakuan brown sugar atau urea.

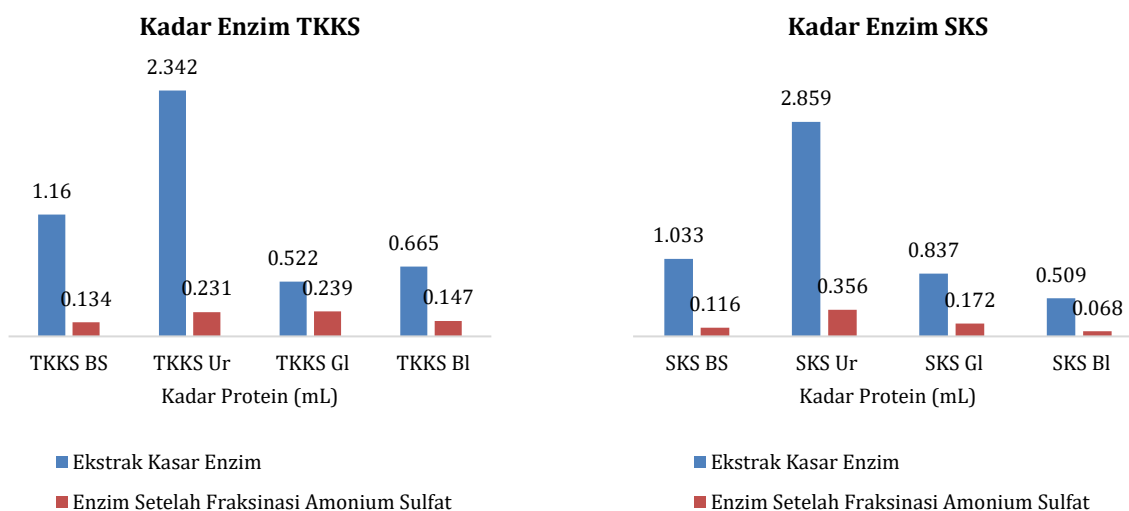
Secara keseluruhan, SKS menghasilkan kadar protein ekstrak kasar yang lebih tinggi dibandingkan TKKS pada semua jenis nutrisi dan variasi volume. Struktur SKS lebih mudah diakses oleh mikroba karena memiliki serat yang lebih terbuka dibanding TKKS, sehingga kolonisasi/difusi nutrient lebih efisien (Bakar et al., 2022; Rama Rao & Ramakrishna, 2022). Hal ini menunjukkan bahwa SKS merupakan substrat yang lebih mudah didegradasi oleh mikroorganisme.

3.3. Kadar Protein Enzim Hasil Pemurnian

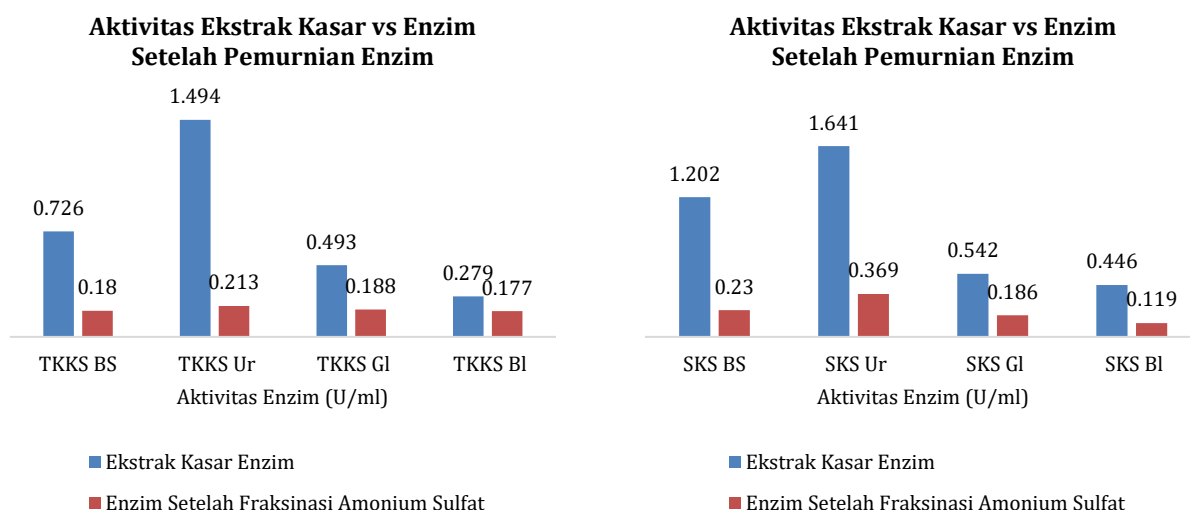
Untuk dapat memisahkan ekstrak kasar enzim dari molekul – molekul protein lain, protein perlu melalui proses pemurnian dengan metode *salting out* menggunakan fraksinasi ammonium sulfat. Pada grafik (Gambar 4) telah dibandingkan kadar protein ekstrak kasar dengan kadar enzim hasil pemurnian.



Gambar 3. Grafik Kadar Protein Ekstrak Kasar Enzim pada Sampel Tandan Kosong Kelapa Sawit (Kiri) dan Serabut Kelapa Sawit (Kanan)



Gambar 4. Grafik Kadar Protein Ekstrak Kasar vs Enzim Pektinase Setelah Proses Pemurnian pada sampel TKKS (Kanan) dan SKS (Kiri)



Gambar 5. Aktivitas Enzim pada Ekstrak Kasar vs Enzim Setelah Proses Pemurnian Enzim pada TKKS (Kanan) dan SKS (Kiri)

Dapat dilihat dari hasil pengukuran kadar protein pada grafik, susbtat TKKS pada masing-masing variasi memiliki persen pemulihan (*recovery*) enzim secara berturut 11,55% (BS), 9,86% (Ur), 45,79% (Gl), dengan persen pemulihan variabel kontrol 22,11% (BI) dengan rata-rata pemulihan untuk semua variasi 22,33%. Pada substrat SKS, memiliki persen pemulihan yaitu 11,23% (BS), 12,45% (Ur), 20,55% (Gl), dan 13,36% (BI) dengan rata-rata *recovery* 14,40%. Secara umum, urea memiliki kadar ekstrak kasar enzim paling tinggi pada kedua substrat tetapi gliserol memiliki persen pemulihan pasca fraksinasi yang paling tinggi. Hal ini dikarenakan gliserol mampu untuk menjaga stabilitas struktur tiga dimensi protein serta mengurangi tekanan osmotik pada molekul protein, sehingga enzim lebih tahan terhadap perubahan kondisi lingkungan seperti kejenuhan garam atau pH (Hirai et al., 2018). Dengan demikian, mikroorganisme yang tumbuh pada media bergliserol

cenderung menghasilkan enzim yang lebih stabil dan aktif, sehingga persen pemulihan menjadi lebih tinggi.

Sementara itu, urea menghasilkan persen pemulihan yang relatif sama atau lebih rendah meskipun memiliki kadar ekstrak kasar enzim tertinggi. Hal ini karena urea sebagai sumber nitrogen berfungsi untuk mendukung pertumbuhan dan pembentukan protein secara umum, namun tidak berperan langsung dalam menjaga kestabilan enzim selama proses fraksinasi amonium sulfat (Konzock et al., 2022). Selain itu, efisiensi pemulihan lebih banyak dipengaruhi oleh faktor teknis fraksinasi, seperti tingkat kejenuhan garam, pH larutan, serta suhu proses, daripada jenis sumber nitrogen yang digunakan.

3.4. Aktivitas Enzim Pektinase dengan Metode DNS

Metode DNS merupakan metode kolorimetrik untuk penentuan gula tereduksi pada hidrolisis

pektin. Pengujian aktivitas enzim pectinase dilakukan pada Ekstrak kasar dan Enzim murni hasil dari fraksinasi ammonium sulfat berbagai variasi larutan nutrisi.

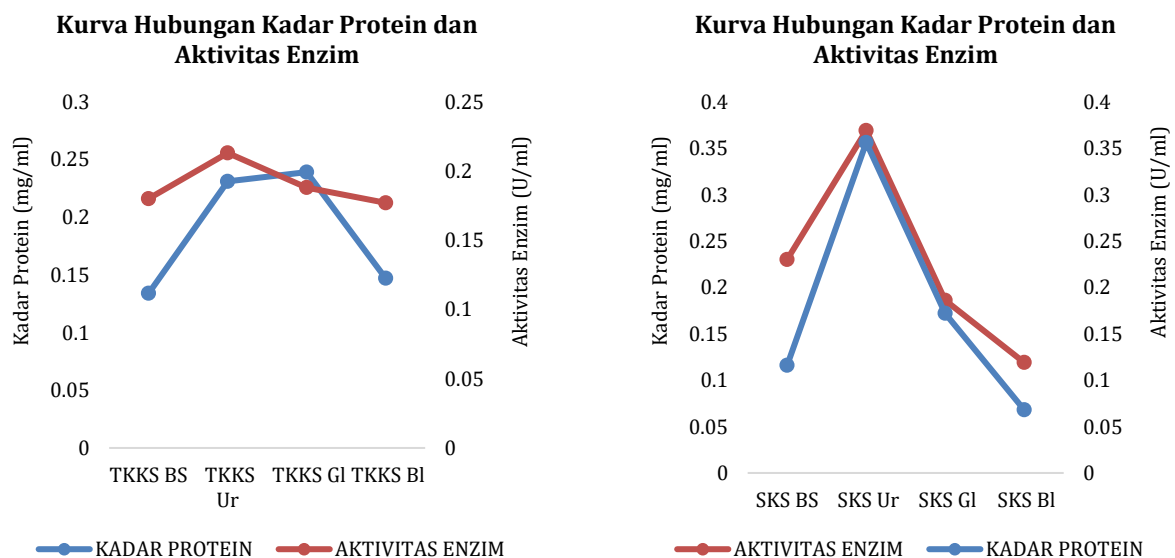
Dari pengukuran hasil aktivitas enzim pada grafik Gambar 5, diketahui bahwa pola aktivitas enzim pectinase menunjukkan urutan yang konsisten pada kedua substrat, yaitu Urea (Ur) > Brown sugar (BS) > Gliserol (Gl) > Blanko (Bl). Pada ekstrak kasar SKS, memberikan aktivitas lebih tinggi daripada TKKS di semua perlakuan (SKS-Ur 1,641 U/mL dan TKKS-Ur 1,494 U/mL). Hal ini dimungkinkan karena substrat SKS memiliki keunggulan dalam hal komposisi polisakarida dan potensi aksesibilitas mikroba dibanding TKKS, sehingga mikroba yang melakukan fermentasi pada substrat tersebut cenderung menghasilkan aktivitas enzimatis yang lebih tinggi. Penelitian yang dilakukan oleh Hossain (2023) menyimpulkan bahwa, lignin dan hemiselulosa yang ada pada TKKS dapat menghambat akses enzim/hidrolisis, oleh karena itu pre-treatment perlu dilakukan untuk sampel yang memiliki struktur lebih kompleks (Belal Hossain Sikder et al., 2023). Urutan pola aktivitas enzim tetap konsisten pada enzim hasil fraksinasi.

Selain itu, perlakuan dengan penambahan nutrisi urea menghasilkan aktivitas enzim pectinase paling tinggi dibandingkan nutrisi lain untuk kedua substrat. Khususnya pada substrat TKKS, aktivitas menurun dari 1,494 U/mL pada ekstrak kasar menjadi 0,213 U/mL setelah fraksinasi, sementara pada SKS aktivitas menurun dari 1,641 U/mL menjadi 0,369 U/mL setelah fraksinasi. Hal ini dikarenakan urea sebagai sumber nitrogen yang mudah diassimilasi oleh mikroorganisme. Gousiyo dan Srinivas (2021) melaporkan bahwa, meskipun urea tidak lebih baik dari nitrat sebagai sumber nitrogen mikroorganisme, tetapi tetap secara signifikan mempengaruhi produksi enzim pectinase pada *Aspergillus niger* (Begum & Munjam, 2021).

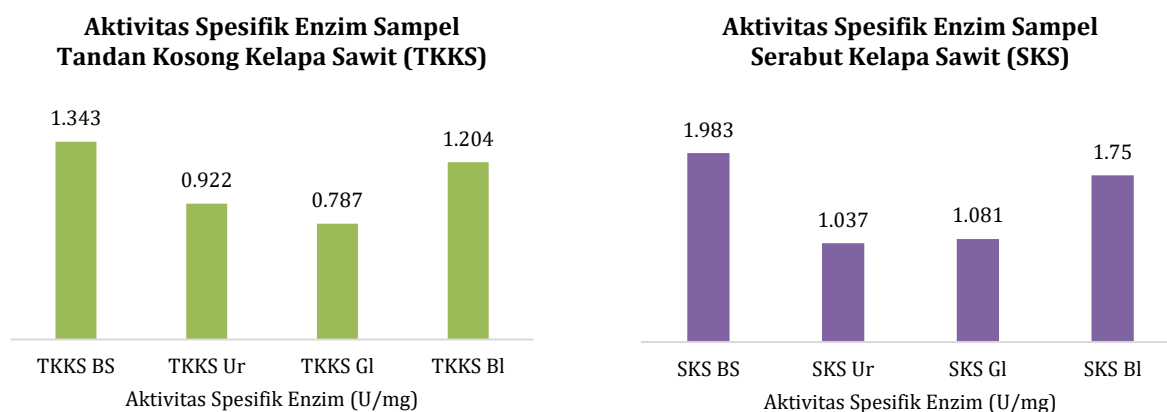
Penurunan aktivitas enzim pada sampel enzim hasil fraksinasi merupakan hal yang umum, dimana kemurnian enzim tidak berbanding lurus terhadap aktivitas enzim tersebut. Tahapan pemurnian sering menyebabkan penurunan jumlah enzim aktif akibat perubahan kondisi yang memungkinkan terjadinya penurunan yield total (Alqahtani et al., 2022).

Berdasarkan nilai aktivitas enzim yang diperoleh, dapat dibandingkan dengan penelitian oleh Aprilliani (2013), yaitu didapatkan aktivitas enzim pada sampel tandan kosong kelapa sawit (TKKS) sebesar 0,028 U/ml sedangkan serabut kelapa sawit (SKS) sebesar 0,019 U/ml yang keduanya menggunakan nutrisi berupa *brown sugar* (Aprilliani, 2013). Dari hasil aktivitas enzim pada penelitian ini dapat dikatakan lebih tinggi jika dibandingkan dengan aktivitas enzim yang diperoleh. Pada penelitian lain, Anggraini (2013) berhasil memproduksi enzim pectinase dari sari buah jambu dengan aktivitas enzimatis pada fraksi 80-100% mendapatkan nilai 77,0 U/ml (Anggraini et al., 2013). Hal ini dapat disebabkan karena adanya protein enzim lain selain pectinase yang dapat dihasilkan oleh konsorsium mikroba atau mikroorganisme yang ada didalam sampel limbah padat kelapa sawit tersebut.

Berdasarkan kedua nilai penting yang telah didapatkan yaitu kadar protein serta aktivitas enzim menunjukkan bahwa keduanya memiliki hubungan yang berbanding terbalik (Gambar 6). Diketahui bahwa nilai aktivitas enzim pada ekstrak kasar lebih tinggi jika dibandingkan dengan enzim hasil fraksinasi ammonium sulfat yang dapat diakibatkan karena banyaknya pengotor atau senyawa lainnya yang berada di dalam ekstrak kasar enzim tersebut. Begitu pula pada kadar protein yang dihasilkan pada Gambar 6 adalah kurva yang menunjukkan kadar protein pada nutrisi *brown sugar* mengalami peningkatan pada nutrisi urea dan kemudian mengalami penurunan pada nutrisi selanjutnya yaitu gliserol.



Gambar 6. Grafik Hubungan Kadar Protein dan Aktivitas Enzim pada TKKS (Kanan) dan SKS (Kiri)



Gambar 7. Grafik Aktivitas Spesifik Enzim Pektinase pada Sampel TKKS (Kanan) dan SKS (Kiri)

Tabel 1. Pemurnian Enzim Pada Sampel Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS)

Sampel	Prosedur (Step)	Volume (ml)	Total Protein (mg)	Total Aktivitas (Unit)	Aktivitas Spesifik (U/mg)	Yield (%)
TKKS BS	Ekstrak Kasar Enzim	45	0,580	0,363	0,626	100
	Fraksinasi Amonium Sulfat + Dialisis	41	0,067	0,090	1,343	24,7
TKKS Ur	Ekstrak Kasar Enzim	45	1,171	0,747	0,638	100
	Fraksinasi Amonium Sulfat + Dialisis	41	0,116	0,107	0,922	14,3
TKKS Gl	Ekstrak Kasar Enzim	45	0,261	0,247	0,944	100
	Fraksinasi Amonium Sulfat + Dialisis	41	0,120	0,094	0,787	38,1
TKKS BI	Ekstrak Kasar Enzim	45	0,333	0,140	0,420	100
	Fraksinasi Amonium Sulfat + Dialisis	41	0,074	0,089	1,204	63,4

Tabel 2. Pemurnian Enzim Pada Sampel Serabut Kelapa Sawit (SKS)

Sampel	Prosedur (Step)	Volume (ml)	Total Protein (mg)	Total Aktivitas (Unit)	Aktivitas Spesifik (U/mg)	Yield (%)
SKS BS	Ekstrak Kasar Enzim	45	0,517	0,601	1,164	100
	Fraksinasi Amonium Sulfat + Dialisis	41	0,058	0,115	1,983	19,1
SKS Ur	Ekstrak Kasar Enzim	45	1,430	0,821	0,574	100
	Fraksinasi Amonium Sulfat + Dialisis	41	0,178	0,185	1,037	22,5
SKS Gl	Ekstrak Kasar Enzim	45	0,419	0,217	0,648	100
	Fraksinasi Amonium Sulfat + Dialisis	41	0,086	0,093	1,081	34,3
SKS BI	Ekstrak Kasar Enzim	45	0,255	0,223	0,876	100
	Fraksinasi Amonium Sulfat + Dialisis	41	0,034	0,060	1,750	26,6

3.5. Aktivitas Spesifik Enzim Pektinase

Setelah diketahui nilai dari aktivitas enzim serta kadar protein, maka dapat dihitung pula nilai aktivitas spesifik enzim pektinase yang dapat dilihat pada Gambar 7. Berdasarkan Gambar 7, aktivitas spesifik enzim pada SKS lebih tinggi dibandingkan TKKS pada semua perlakuan nutrisi tambahan. Nilai tertinggi tercatat pada SKS-BS sebesar 1,983 U/mg, sedangkan pada TKKS tertinggi pada BS sebesar 1,343 U/mg. Hal ini menunjukkan bahwa pektinase hasil fermentasi menggunakan substrat SKS memiliki tingkat kemurnian dan efisiensi katalitik yang lebih baik setelah proses fraksinasi dan dialisis. Selain itu, perlakuan menggunakan *brown sugar* menunjukkan aktivitas spesifik yang lebih tinggi dibandingkan urea dan gliserol, dimana hal ini menandakan bahwa jenis

sumber karbon yang digunakan berpengaruh terhadap efektivitas enzim.

Jika dilihat dari hubungan total protein dan aktivitas total (Tabel 1 dan Tabel 2), pada SKS maupun TKKS memiliki kecenderungan bahwa semakin tinggi kandungan protein total maka aktivitas total (U) juga meningkat, namun aktivitas spesifik (U/mg) justru menurun. Sebagai contoh pada SKS-Ur, total protein mencapai 0,178 mg dengan aktivitas total 0,185 U, namun aktivitas spesifiknya hanya 1,037 U/mg yang dimana lebih rendah dari SKS-BS yang memiliki protein hanya 0,058 mg tetapi aktivitas spesifik mencapai 1,983 U/mg. Pola ini menunjukkan bahwa peningkatan total protein tidak selalu berarti peningkatan kemurnian enzim, karena sebagian besar protein yang disekresikan dapat berupa protein non-enzimatis.

Fenomena perbedaan aktivitas spesifik dan hubungan antara total protein serta aktivitas enzim dapat menunjukkan bahwa substrat SKS mampu menginduksi produksi enzim pektinase secara lebih selektif dibandingkan TKKS. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh komposisi kimia dan struktur fisik SKS yang lebih mudah didegradasi. Menurut Sunday (2025), serabut kelapa sawit memiliki kandungan selulosa dan hemiselulosa tinggi serta lignin lebih rendah dibandingkan TKKS, sehingga menyediakan permukaan dan sumber karbon lebih mudah diakses oleh mikroba untuk sintesis enzim hidrolitik termasuk pectinase (Ajayi et al., 2024). Dengan demikian, fraksi protein yang terbentuk didominasi oleh enzim aktif yang menghasilkan nilai U/mg lebih tinggi.

Sementara itu, perbedaan pengaruh sumber nutrisi menunjukkan peran penting ketersediaan karbon dan nitrogen dalam regulasi biosintesis enzim. Perlakuan dengan *brown sugar* menghasilkan aktivitas spesifik tertinggi karena gula sederhana mudah digunakan oleh mikroorganisme dan dapat menginduksi produksi pektinase tanpa menimbulkan efek *catabolite repression* yang kuat seperti glukosa murni. Berdasarkan studi yang dilakukan oleh Sandri (2018), menyebutkan bahwa sumber karbon kompleks seperti sukrosa dan molase mampu meningkatkan ekspresi gen pektinase pada *Aspergillus niger* dibandingkan gliserol (Sandri & da Silveira, 2018). Berdasarkan mekanisme availibilitas karbon, secara implisit sukrosa dan molase lebih mudah diakses oleh mikroba dan tidak terlalu cepat menimbulkan repressi. Sebaliknya, perlakuan urea meningkatkan total protein dan aktivitas total namun menurunkan aktivitas spesifik karena urea memacu pertumbuhan sel dan sekresi protein umum, bukan hanya pectinase (Begum & Munjam, 2021).

Secara keseluruhan, hasil menunjukkan bahwa SKS merupakan substrat terbaik untuk produksi pektinase karena menghasilkan aktivitas spesifik lebih tinggi dibandingkan TKKS. Sementara urea memberikan aktivitas total tinggi akibat peningkatan protein total dan *brown sugar* menghasilkan aktivitas spesifik tertinggi karena memfokuskan sekresi protein enzimatis aktif. Korelasi negatif antara total protein dan aktivitas spesifik menegaskan bahwa peningkatan protein total tidak selalu mencerminkan peningkatan efisiensi enzim. Temuan ini mendukung prinsip bahwa efektivitas bioproses ditentukan bukan hanya oleh kuantitas protein, tetapi oleh proporsi enzim aktif yang dihasilkan.

4. KESIMPULAN

Penelitian ini menunjukkan bahwa serabut kelapa sawit (SKS) lebih efektif dibandingkan tandan kosong kelapa sawit (TKKS) dalam produksi enzim pektinase melalui fermentasi terendam (SmF), dengan aktivitas spesifik enzim lebih tinggi pada SKS (1,983 U/mg) dibandingkan TKKS (1,343 U/mg). *Brown sugar* sebagai sumber karbon memberikan hasil terbaik dalam meningkatkan aktivitas enzim, 1472

sementara urea meningkatkan total protein tetapi menurunkan aktivitas spesifik enzim. Penelitian ini juga mengungkapkan bahwa SKS lebih mudah didegradasi oleh mikroba yang secara langsung meningkatkan efisiensi produksi enzim, sementara TKKS memerlukan pre-treatment untuk mengoptimalkan hasil. SKS dapat digunakan sebagai substrat yang lebih efisien untuk produksi pektinase, dengan pengaturan sumber karbon dan nitrogen yang tepat. Penelitian lanjutan perlu mengeksplorasi mikroba indigen dan optimalisasi kondisi fermentasi untuk produksi enzim yang lebih efisien.

DAFTAR PUSTAKA

- Ajayi, S. M., Olusanya, S. O., Didunyemi, A. E., Abimbade, S. F., Olumayede, E. G., & Akintayo, C. O. (2024). Physicochemical properties of oil palm biomass waste fibres and its cellulose for engineering applications: a review. *Biomass Conversion and Biorefinery* 2024 15:5, 15(5), 6545–6555. <https://doi.org/10.1007/S13399-024-05486-5>
- Alqahtani, Y. S., More, S. S., Keerthana, R., Shaikh, I. A., Anusha, K. J., More, V. S., Niyonzima, F. N., Muddapur, U. M., & Khan, A. A. (2022). Production and Purification of Pectinase from *Bacillus subtilis* 15A-B92 and Its Biotechnological Applications. *Molecules* 2022, Vol. 27, Page 4195, 27(13), 4195. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27134195>
- Anggraini, D. P., Roosdiana, A., Prasetyawan, S., & Mardiana, D. (2013). Pengaruh ion-ion logam terhadap aktivitas pektinase dari *Aspergillus niger* pada penjernihan sari buah jambu. *Natural B*, 2(1), 66–72.
- Aprilliani, V. (2014). (2013). *Potensi Penggunaan Limbah Padat Kelapa Sawit Dalam Produksi Enzim Pektinase*.
- Azizah, N. (2021). Pemurnian Enzim Selulase Dari Isolat Khamir Jenis *Candida Utilis* Menggunakan Fraksinasi Amonium Sulfat. *Jurnal Al-Ulum*, 12(90500120088), 77–96.
- Bakar, N. F. A., Rahman, N. A., Mahadi, M. B., Zuki, S. A. M., Amin, K. N. M., Wahab, M. Z., & Lenggono, I. W. (2022). Nanocellulose from oil palm mesocarp fiber using hydrothermal treatment with low concentration of oxalic acid. *Materials Today: Proceedings*, 48, 1899–1904. <https://doi.org/10.1016/I.MATPR.2021.09.357>
- Begum, G., & Munjam, S. (2021). Carbon and Nitrogen Sources Effect on Pectinase Synthesis by *Aspergillus niger* Under Submerged Fermentation. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 18(1), 185–195. <https://doi.org/10.13005/BBRA/2906>
- Belal Hossain Sikder, M., Rashid, S. S., Ab Rahim, M. H., Mazila Ramli, A. N., & Roslan, R. (2023). Enzymatic pretreatment of palm oil empty fruit bunch. *Materials Today: Proceedings*, 75, 193–196. <https://doi.org/10.1016/I.MATPR.2022.12.241>
- Chen, M., Li, Q., Liu, C., Meng, E., & Zhang, B. (2025). Microbial Degradation of Lignocellulose for Sustainable Biomass Utilization and Future Research Perspectives. *Sustainability* 2025, Vol. 17, Page 4223, 17(9), 4223. <https://doi.org/10.3390/SU17094223>
- Ding, K., Liu, D., Chen, X., Zhang, H., Shi, S., Guo, X., Zhou, L., Han, L., & Xiao, W. (2024). Scalable lignocellulosic

- biorefineries: Technoeconomic review for efficient fermentable sugars production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 202, 114692. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2024.114692>
- DSNG's CPO Production. (2022). PT Dharma Satya Nusantara Tbk. <https://dsn.co.id/press-release/in-2022-dsngs-cpo-production-increased-by-17/>
- Farag, G. Y., Abou Taleb, E. M. A., & Hamouda, T. (2025). Natural Fibers Extraction Methods and Properties: A Review. *Egyptian Journal of Chemistry*, 68(3), 445-464. <https://doi.org/10.21608/EJCHEM.2024.296725.9842>
- Hirai, M., Ajito, S., Sugiyama, M., Iwase, H., Takata, S. ichi, Shimizu, N., Igarashi, N., Martel, A., & Porcar, L. (2018). Direct Evidence for the Effect of Glycerol on Protein Hydration and Thermal Structural Transition. *Biophysical Journal*, 115(2), 313-327. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.06.005>
- Husni, P., Ikhsom, U. K., & Hasanah, U. (2021). Uji dan Karakterisasi Serbuk Pektin dari Albedo Durian sebagai Kandidat Eksipien Farmasi. *Majalah Farmasetika*, 6(3), 202. <https://doi.org/10.24198/mfarmasetika.v6i3.33349>
- Illyin Abdi Budianta, and M. G. (2022). *What Should We Do with the Oil Palm Solid Waste?* <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1111/1/012015>
- Konzock, O., Zaghen, S., Fu, J., & Kerkhoven, E. J. (2022). Urea is a drop-in nitrogen source alternative to ammonium sulphate in *Yarrowia lipolytica*. *IScience*, 25(12). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.105703>
- Lee, J. A., Cheah, E. S. G., Sethupathi, S., & Mohd Ismail, N. I. (2023). Isolation and characterization of effective microorganisms from palm oil sludge for enhancement of spent bio-adsorbents from aquaculture wastewater treatment. *Materials Today: Proceedings*. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2023.04.542>
- Martina, V., & Vojtech, K. (2015). a Comparison of Biuret, Lowry and Bradford Methods for Measuring the Egg'S Proteins. *Mendelnet, Vol. 1*(No. 1), 394-398.
- Mat Jalil, M. T., Zakaria, N. A., Salikin, N. H., & Ibrahim, D. (2023). Assessment of cultivation parameters influencing pectinase production by *Aspergillus niger* LFP-1 in submerged fermentation. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 21(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/s43141-023-00510-z>
- Nadea, N. S. W. P., Indrayati, A., & Leviana, F. (2023). Potensi Ekstrak Kasar Enzim dari Tempe Kedelai Hitam (Glycine soja (L.) Merr.) sebagai Obat Fibrinolitik Alami dengan Metode Clot Lysis In Vitro. *Jurnal Sains Dan Kesehatan*, 5(2), 115-125. <https://doi.org/10.25026/jsk.v5i2.1712>
- Oiza, N., Moral-Vico, J., Sánchez, A., Oviedo, E. R., & Gea, T. (2022). Solid-State Fermentation from Organic Wastes: A New Generation of Bioproducts. *Processes* 2022, Vol. 10, Page 2675, 10(12), 2675. <https://doi.org/10.3390/PR10122675>
- Patricia, V. M., Suarantika, F., Hazar, S., Rusdi, B., & Yuniarni, U. (2024). Production, characterization, and antibacterial activity of eco-enzyme from fruit and vegetable wastes. *AIP Conference Proceedings*, 3065(1). <https://doi.org/10.1063/5.0227496/3311915>
- Pectinase Market Size, Trends, Growth. (2024). Zion Market Research. https://www.zionmarketresearch.com/report/pectinase-market?utm_source=chatgpt.com
- Peter, R. (2025). Comparative Study of Submerged and Solid-State Fermentation for the Production of Industrial Enzymes. *Fermentation Technology*, 14(1), 1-2. <https://doi.org/10.35248/2167-7972.25.14.182>
- Pio, F. S., Silva, F. S., Cardoso, V. L., & Batista, F. R. X. (2023). Overview of glycerol as a carbon source in the hydrogen production process. *Biomass Conversion and Biorefinery* 2023 14:20, 14(20), 26387-26400. <https://doi.org/10.1007/S13399-023-04722-8>
- Rahman, S., Haque, I., Goswami, R. C. D., Barooah, P., Sood, K., & Choudhury, B. (2020). Characterization and FPLC Analysis of Garbage Enzyme: Biocatalytic and Antimicrobial Activity. *Waste and Biomass Valorization* 2020 12:1, 12(1), 293-302. <https://doi.org/10.1007/S12649-020-00956-Z>
- Rama Rao, P., & Ramakrishna, G. (2022). Oil palm empty fruit bunch fiber: surface morphology, treatment, and suitability as reinforcement in cement composites- A state of the art review. *Cleaner Materials*, 6, 100144. <https://doi.org/10.1016/j.clema.2022.100144>
- Sandri, I. G., & da Silveira, M. M. (2018). Production and Application of Pectinases from *Aspergillus niger* Obtained in Solid State Cultivation. *Beverages* 2018, Vol. 4, Page 48, 4(3), 48. <https://doi.org/10.3390/BEVERAGES4030048>
- Sharif, M., Zafar, M. H., Aqib, A. I., Saeed, M., Farag, M. R., & Alagawany, M. (2021). Single cell protein: Sources, mechanism of production, nutritional value and its uses in aquaculture nutrition. *Aquaculture*, 531, 735885. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735885>
- Singh Jadaun, J. (2018). Pectinase: A Useful Tool in Fruit Processing Industries. *Nutrition & Food Science International Journal*, 5(5). <https://doi.org/10.19080/nfsij.2018.05.555673>
- Su'i, M., & Suprihana. (2013). Lipase fractionation of Coconut Endosperm by Salting out Method. *Agritech*, 33(4), 377-384.
- Wirajana, I. N., Sirait, R. R., & Suarya, P. (2021). Pemurnian Amilase Mikroba Amilolitik Dengan Fraksinasi Amonium Sulfat Dan Amobilisasi Pada Agar-Agar Komersial. *Jurnal Kimia*, 15(1), 41. <https://doi.org/10.24843/jchem.2021.v15.i01.p07>
- Yang, J., Zhang, J., Du, X., Gao, T., Cheng, Z., Fu, W., & Wang, S. (2024). Ammonia inhibition in anaerobic digestion of organic waste: a review. *International Journal of Environmental Science and Technology* 2024 22:5, 22(5), 3927-3942. <https://doi.org/10.1007/S13762-024-06029-1>