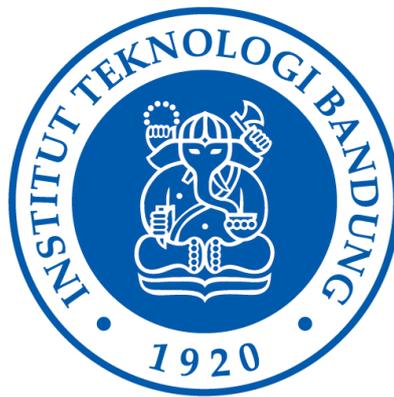


**PROPOSAL PENELITIAN**  
**Optimasi Fungi Chromista penghasil**  
**Polyunsaturated Fatty Acid (PUFA)**  
**pada media limbah sawit**



**Diajukan oleh:**

**Prof. I Nyoman Pugeg Aryantha, P.hD**

**Yayan Maryana, M.Si**

**Azizah Nur Fitriyani, S.Si**

**PUSAT PENELITIAN BIOSAINS DAN BIOTEKNOLOGI**  
**INSTITUT TEKNOLOGI BANDUNG**

**2024**

## Daftar Isi

I. Tujuan Project	3
II. Justifikasi Project	7
III. Big PictureProject	17
IV. Gantt Chart Pelaksanaan	18
V. RABProject	19
VI. DampakProject	19
DAFTAR PUSTAKA	22

## I. Tujuan Project

1. Memperoleh Fungi Chromista potensial penghasil PUFA
2. Memperoleh teknologi bioproses upstream optimum untuk produksi PUFA menggunakan isolat fungi terpilih pada substrat limbah sawit.
3. Memperoleh informasi kualitatif dan kuantitatif variasi asam lemak dari PUFA yang dihasilkan.

## II. Justifikasi Project

Departemen Pertanian Amerika Serikat (USDA) memperkirakan produksi minyak sawit dunia periode 2022/2023 sebesar 77,22 juta ton, yang mana meningkat 3,39 juta ton atau 4,59% dibanding pada tahun sebelumnya. Berdasarkan jumlah tersebut, Indonesia menyumbang 45,5 juta ton atau sekitar 59 persen. Sehingga disimpulkan bahwa Indonesia merupakan produsen minyak sawit terbesar di dunia (Tempo, 2023)

Besarnya produksi minyak sawit berbanding lurus dengan limbah yang dihasilkan. Potensi limbah pelepah daun sawit setiap panen untuk luasan 1 Ha sekitar 1.176 pelepah dengan asumsi setiap pohon terdapat 6-8 pelepah yang diturunkan setiap periode pruning (sekali dalam 6 bulan) atau dalam 1 tahun sekitar 12-16 pelepah/tahun. Jika populasi tanaman 1 ha sekitar 140 pohon dan bobot pelepah daun sekitar 4-6 kg/pelepah, maka potensi limbah pelepah daun sawit sekitar 6,67-13,44/ton/ha/tahun. Sumber lain menyebutkan bahwa produksi pelepah sawit dapat mencapai 22-26/pohon/tahun, sehingga potensinya sekitar 12,32-21,84 t/ha/tahun (Kementrian Pertanian Republik Indonesia, 2023). Sedangkan menurut Direktorat Jenderal Energi Baru, Terbarukan dan Konservasi Energi pada tahun 2018 dilaporkan bahwa jumlah limbah cair (Pome) yang dihasilkan mencapai 28,7juta ton.

Setiap jenis limbah sawit yang dihasilkan memiliki kandungan kimia yang berbeda. Polisakarida sebagai kandungan utama yang menyusun limbah sawit, memiliki potensi untuk dirubah menjadi minyak melalui rangkaian proses *pretreatment* dan fermentasi oleh fungi. Belum terdapat laporan terkait kemampuan Fungi Chromista dalam mengakumulasi lipid. Akan tetapi lemak yang dihasilkan oleh mikroba berpotensi dimanfaatkan sebagai lemak pangan

Limbah sawit merupakan salah potensi untuk dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku produksi minyak berbasis mikroba yang berkelanjutan dalam industri sawit, maka diperlukan metode untuk dapat memproses limbah sawit hingga menjadi produk minyak. Langkah awal yang penting dilakukan adalah memahami jalur metabolisme mikroba yang berperan dalam metabolisme lipid. Lipid dapat diproduksi melalui dua cara yang berbeda, yaitu melalui metabolisme substrat hidrofilik dan melalui fermentasi substrat hidrofobik (Patel et.al., 2020).

Untuk memperoleh agen mikrobayang potensial,seleksi Fungi Chromista penting dilakukan. Beberapa aspek seperti pertimbangan optimasi laju pertumbuhan yang tinggi dan produktivitas lemak yang tinggi dari isolate menjadi poin penting dalam produksi. Selanjutnya, produksi lipid oleh Fungi Chromista juga bergantung pada

kondisi kultivasi. Setiap mikroorganisme memiliki karakteristik preferensi penggunaan nutrisi yang berbeda dan juga produksi lipid yang berbeda. Secara teoritis hasil konversi gula menjadi lipid adalah 32% (w/w) dari substrat glukosa dan 34% (w/w) dari substrat xilosa. Selain jenis sumber karbon yang digunakan dalam media, sumber nitrogen serta C: N rasio juga berpengaruh terhadap produksi lipid. Pada fungi, limitasi nitrogen mampu menginduksi lipogenesis. Makro nutrient dan mikronutrien seperti fosfor, sulfur, besi, dan zink juga dapat mempengaruhi produksi lipid. Faktor suhu, pH dan *dissolved oxygen* juga sangat berpengaruh.

Produksi lipid oleh mikroorganisme dapat dilakukan via batch, *fed-batch* dan *continuous* disesuaikan dengan jenis substrat yang digunakan. Berdasarkan riset, metode *fed-batch* dari fermentasi *R.toruloides* pada media lignosellulose hidrolisat menghasilkan produk lipid paling tinggi (290mg/g) dengan pengaturan pemberian gula dan *dissolvedoxygen* (Feiet.al.,2016). Olehkarena itu, proses optimasi dan evaluasi media tumbuh, system fermentasi, serta nutrisi yang cocok bagi pertumbuhan mikroba Fungi Chromista sangat penting untuk dilakukan agar dapat meningkatkan produktivitas.

Berdasarkan latarbelakang tersebut, dalam usulan penelitian ini akan dilakukan aktivitas riset meliputi: seleksi, evaluasi pertumbuhan dalam limbah sawit, pemilihan isolate Fungi Chromista potensial, rekayasa bioproses upstream dari isolate terpilih dalam menghasilkan lemak tertinggi menggunakan substrat limbah sawit yang sesuai. Target dari penelitian ini adalah memperoleh isolate Fungi Chromista potensial serta teknologi bioproses upstream paling optimal dalam menghasilkan lemak SCO menggunakan limbah sawit yang ada.

### **III. Big Picture Project**

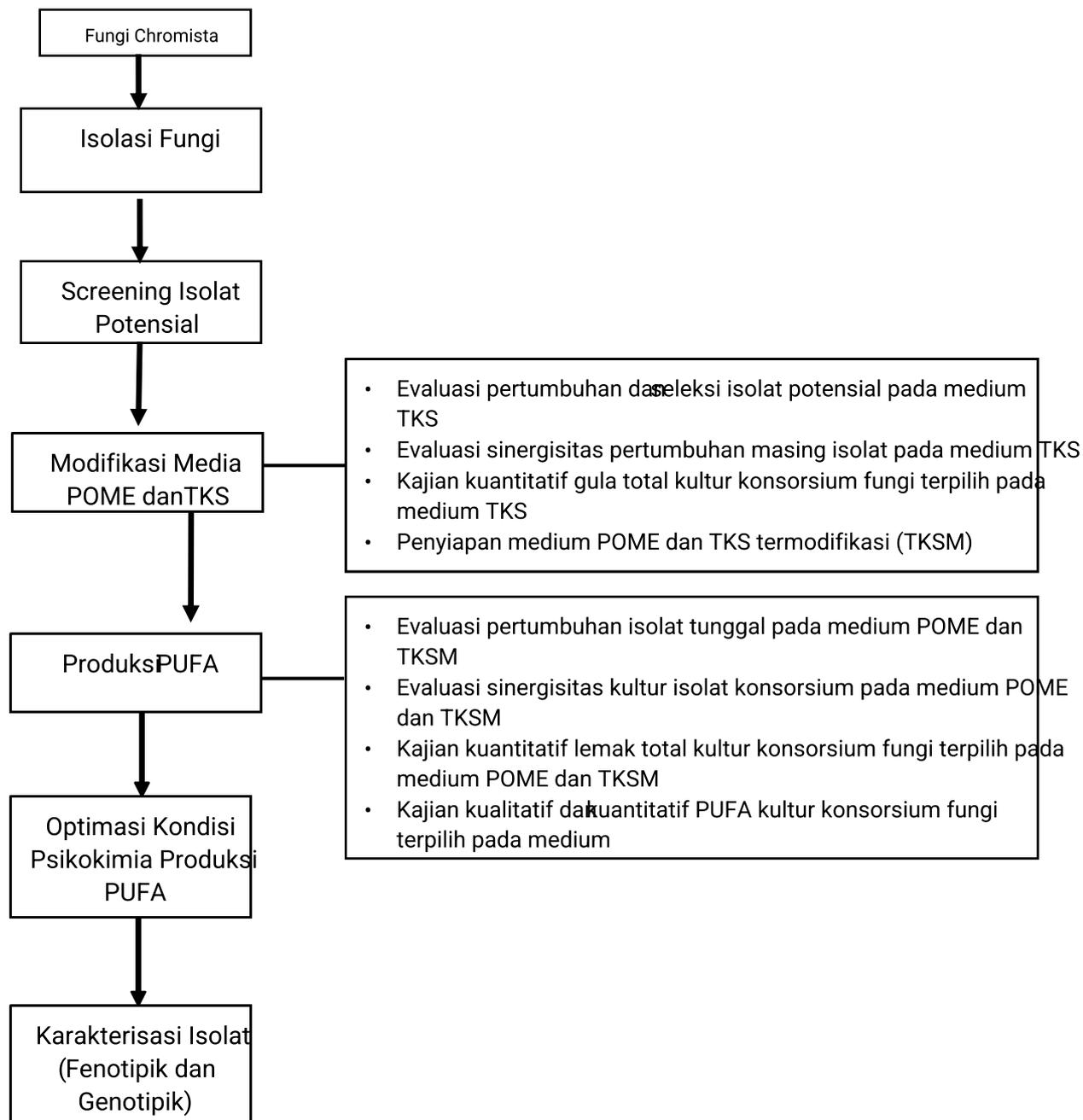
Dalam rencana penelitian yang akan dilakukan, prioritas dan focus penelitian akan dibagi menjadi dua, yaitu tahun pertama dan tahun kedua. Tahun pertama akan berfokus pada penguatan dasar-dasar penelitian bagian *upstream* dan tahun kedua dilanjutkan dengan proses optimasi, *scaleup* dan tahapan *down stream*.

Aktivitas / Bulan ke-	Tahun 1												Tahun 2											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Pengadaan isolat Fungi Chromista	■																							
2. Evaluasi pertumbuhan dan seleksi isolate potensial pada media TKS dan POME		■	■	■	■																			
3. Evaluasi sinergisitas pertumbuhan masing-masing isolate pada media TKS dan POME					■	■	■	■																
4. Pengujian kualitatif kadar gula total dari kultur konsorsium isolate terpilih								■	■	■	■													
5. Modifikasi medium POME dan TKS											■	■	■	■										
6. Evaluasi pertumbuhan isolate tunggal pada medium modifikasi POME dan TKS													■	■	■									
7. Evaluasi sinergisitas kultur konsorsium pada media modifikasi															■	■	■	■	■					
8. Pengujian kuantitatif kadar lemak total kultur konsorsium pada media																■	■	■	■					



## IV. Gantt Chart Pelaksanaan

### IV. 1 Skema Penelitian



Gambar I. 1 Skema Penelitian

### IV.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain *shaker*, cawan petri, labu Erlenmeyer 250mL dan 500mL, tabung reaksi, magnetic stirrer, gelas kimia, gelas ukur, batang oose, spatula, pembakar bunsen, batang I, neraca analitik portable, HPLC dan GC, mikroskop dan bioreaktor. Sedangkan Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain medium Minimum salt, medium PDA, PDB dan YEPD, *Yeast Extract*, Peptone,

Soluble Starch, Aquades, NaCl, *trace element*, fosfat, Glycerol, Membran Filter (0.2  $\mu\text{m}$ ), Falcon (50mL), Falcon (15mL), Spiritus, Alkohol 96%, substrat POME dan TKS.

### IV.3 Metode

#### 1. Pengadaan isolat Fungi Chromista

Isolat fungi diperoleh dari laboratorium penyedia isolat kultur murni mikroba.

#### 2. Evaluasi Pertumbuhan dan Seleksi Isolat Potensial pada Medium TKS

##### a. Persiapan Media Substrat POME

POME sebelum digunakan sebagai substrat media pertumbuhan isolate fungi memerlukan proses *pretreatment* terlebih dahulu. Sampel POME *dishaker* selama tiga puluh detik, kemudian didiamkan selama satu jam untuk mengendapkan sedimen yang ada pada sampel. Effluen kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5000rpm selama 15 menit. Supernatan dipisahkan dengan endapan. Masing-masing 100mL supernatant untuk media ditambahkan 0,5%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  dan 0,25% *yeast extract*. Campuran media kemudian disterilisasi pada  $121^\circ\text{C}$ , 15atm selama 15 menit (Nwuche, et.al., 2014).

##### b. Persiapan Media Substrat TKS

Medium TKS disiapkan dengan menambahkan 20% hidrolisat TKS, 2gr  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.2gr  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.5gr  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.1gr  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , dan diatur pada pH 6.0. (Tampitak, et.al., 2015).

Sebelum dibuat menjadi media, TKS perlu *pre-treatment* terlebih dahulu. TKS yang telah dikeringkan perlu diberikan *pre-treatment* terlebih dahulu dikarenakan kandungan materi lignosellulosik yang tinggi pada TKS akan menghambat proses pertumbuhan mikroba. Tujuan *pre-treatment* adalah untuk mengurangi kandungan lignin, mereduksi kristal selulosa, dan meningkatkan porositas TKS agar lebih mudah dihidrolisis (Sudiyani dan Hermiati, 2010). *Pre-treatment* dapat dilakukan secara fisika (metode *grinding* atau *milling* dari substrat TKS, pirolisis, *steam explosion*), kimia (Hidrolisis asam, hidrolisis basa, delignifikasi oksidatif dan ozonolysis) enzimatik, maupun menggunakan agen biologis, ataupun gabungan.

##### b.1 *Pre-treatment* Kimiawi

Untuk sistem fermentasi *submerged*, *pre-treatment* dapat dilakukan dengan melarutkan TKS ke dalam 0,4%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  dengan perbandingan padatan terhadap cairan 1:6 (w/w) dalam reaktor Parr. Kemudian distirer dengan kecepatan 100rpm pada  $170^\circ\text{C}$  selama 15 menit. Fraksi padatan dan cairan dipisahkan dengan menggunakan kertas saring Whatmann. Residu cairan di detoksifikasi dengan dipanaskan pada suhu  $42^\circ\text{C}$ , distirer kemudian ditambahkan  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  hingga pH 10, suhu diatur pada  $50^\circ\text{C}$  selama 30 menit. Campuran difiltrasi menggunakan membrane filter 0,22  $\mu\text{m}$ . Filtrat didinginkan hingga mencapai dan diasamkan kembali dengan

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> hingga pH 5,5, dilanjutkan dengan penyaringan menggunakan membran 0,22 µm dan digunakan sebagai TKS hidrolisat cair (Ahmad et.al., 2016).

Untuk sistem fermentasi padat (*solid state fermentation*), dapat dilakukan dengan merendam TKS yang telah dikeringkan dipotong-potong sekitar 1 cm ke dalam larutan NaOH 10% dengan perbandingan padatan terhadap cairan adalah 10% (w/v). Selanjutnya, dipanaskan pada suhu 100°C selama 15 menit (Boonsawang, et.al., 2012). Padatan yang telah *dipre-treatment* kemudian dibilas hingga pH mendekati netral dan dikeringkan pada suhu 60°C hingga berat konstan (Cheirsip dan Kitcha, 2014).

### b.2 *Pre-treatment* Biologis

TKS dikeringkan di bawah sinar matahari terlebih dahulu kemudian dipotongpotong. Pada *pre-treatment* ini, digunakan tangka bioreaktor dengan lubang penyemprot cairan untuk mengatur kelembaban dan nutrisi dengan penambahan cairan biogas (*biogas effluent*) yang tersusun atas *chemical oxygen demand* (COD) 1,594 6 ± 13 mg/L, total nitrogen 61.2 ± 0.2 mg/L and pH 6.66 ± 0.59. TKS yang telah dicampur dengan *effluent* biogas, diinokulasi dengan spora fungi (10<sup>11</sup> spora/mL, untuk 1kg substrat TKS) untuk fungi yang menghasilkan spora atau diinokulasi dengan kultur fungi yang telah disiapkan di PDA. Penambahan *effluent* biogas pada substrat dilakukan setiap dua hari dengan rasio 135% (v/w) untuk menjaga kelembaban substrat di rentang 65-70% dan diinkubasi di suhu ruang. Setelah substrat terfermentasi, cairan fermentasi dipisahkan dengan biomassa TKS yang diberikan pretreatment fungi. Selanjutnya, biomassa TKS terfermentasi dapat digunakan sebagai substrat untuk produksi lipid oleh ragi (Intasit, et.al., 2020).

### c. Aktivasi Isolat Fungi

Untuk proses aktivasi masing-masing isolat digunakan media PDB (*Potato Dextrose Broth*). Kultur diinkubasi pada suhu ruang dengan agitasi 140rpm selama 1-2 hari. Dilakukan perhitungan spora/sel dengan haemositometer Kerapatan spora yang digunakan adalah 10<sup>7</sup> spora/mL (Intasit, et.al., 2020).

### d. Pertumbuhan dan *Screening* Isolat Fungi pada Medium TKS dan POME

Isolat yang sudah diaktivasi ditumbuhkan pada media TKS dan POME baik broth maupun agar. Isolat diamati pertumbuhannya, baik karakteristik maupun pola pertumbuhan. Dalam tahapan ini juga dapat dilakukan pewarnaan menggunakan Teknik Sudan Black B untuk mendeteksi produksi lipid pada isolat-isolat fungi yang tumbuh (Patnayak dan Sree, 2005).

## 2. Evaluasi sinergisitas pertumbuhan masing isolat pada medium TKS dan POME

Sinergisitas antar isolat dalam satu konsorsium dapat dilakukan melalui uji sinergisme pada medium padat menggunakan metode oposisi langsung. Pada

pengujian menggunakan metode oposisi langsung di media padat, masing-masing isolat fungi yang diperoleh dikultur berhadapan satu sama lain pada medium agar TKS dan medium agar POME, kemudian diinkubasi 3-6 hari. Diamati pola pertumbuhan masing-masing isolat. Isolat yang bersifat sinergis tidak menunjukkan adanya zona hambat atau menghambat pertumbuhan satu sama lain setelah bersinggungan.

### **3. Pengembangan Konsorsium Isolat Fungi pada Medium TKS dan POME**

Setelah diperoleh kandidat isolat fungi yang memiliki pertumbuhan sinergis, dilakukan formulasi konsorsium fungi untuk produksi lipid.

#### ***6.1 Penyiapan Medium POME dan TKS Termodifikasi***

Medium modifikasi POME terdiri dari (g/L) 5gr  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 6gr  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ , 2gr  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3gr  $\text{MgSO}_4$ , 3gr  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , dan POME 10 mL sebagai satu-satunya sumber karbon. pH media disesuaikan dengan pH awal sampel POME. Medium POME kemudian disterilisasi pada  $121^\circ\text{C}$ , 15atm selama 15 menit (Nwuche, et.al., 2014). Medium modifikasi TKS terdiri dari (g/L) hidrolisat TKS 10-20%, 0.4gr  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2gr  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3mg  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  dan 0.1mg  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , dan 1.5 g *yeast extract*. pH medium diatur pada 5,5 (Ahmad, et.al., 2016).

#### ***6.2 Pembuatan Kurva Tumbuh Masing-Masing Isolat Fungi***

Masing-masing isolat fungi diaktivasi terlebih dahulu di media PDA. Aktivasi dilakukan dengan mengkultivasi isolat pada media PDA *slant*, lalu diinkubasi 3-5 hari. Setelah tumbuh dan bersporulasi, spora dapat dipanen menggunakan larutan panen dan diukur kepadatan spora untuk ditransfer ke medium cair maupun padat. Pembuatan kurva tumbuh fungi dapat menggunakan beberapa metode, seperti menggunakan metode gravimetri, metode pengukuran radial, maupun metode *total plate count*.

Untuk metode gravimetri, spora fungi yang telah diukur dengan haemositometer atau kultur miselium fungi diinokulasi pada 12 erlenmeyer yang masing-masing berisi media agar POME dan media agar TKS sesuai dengan banyaknya titik pengamatan. Diinkubasi pada suhu ruang, dengan agitasi 150rpm. Pengukuran dilakukan setiap hari dengan memanen kultur fungi yang tumbuh dalam media cair menggunakan vakum. Pelet miselia yang tumbuh dan tersaring kemudian dibilas 2-3 kali dengan akuades untuk menghilangkan sisa media. Pelet miselia kemudian dioven pada suhu  $60-80^\circ\text{C}$  hingga berat stabil. Proses ini dilakukan setiap hari, dan berat biomassa hasil pengukuran yang diperoleh, diplotkan ke dalam grafik pertumbuhan untuk melihat pola pertumbuhan dari masing-masing isolat.

Untuk metode radial, dapat digunakan untuk melengkapi data dari pengujian gravimetri. Kultur fungi yang sudah disubkultur, diinokulasi pada media agar POME dan agar TKS menggunakan Teknik kultivasi tanam. Pertumbuhan fungi

ditentukan dengan mengukur pertambahan Panjang miselium menggunakan jangka sorong setiap harinya. Penambahan Panjang miselium diplot ke dalam grafik pertumbuhan untuk melihat pola pertumbuhan dari masing-masing isolat.

Untuk metode *total plate count*, spora fungi yang telah diukur kepadatannya ( $10^7$  spora/mL) dengan haemositometer atau kultur miselium fungi diinokulasi pada 12 tabung reaksi yang masing-masing berisi medium agar POME dan agar TKS. Pengukuran pertumbuhan fungi dilakukan dengan memanen spora menggunakan larutan panen (campuran larutan fisiologis 0,85% dan Tween 80). Kepadatan spora kemudian diukur menggunakan haemositometer. Dari larutan spora yang sama, diambil 1 mL larutan dan dilakukan *serial dilution* pada larutan fisiologis 0,85%. Masing-masing pengenceran kemudian *dispread* pada media agar POME dan TKS untuk dilakukan perhitungan TPC. Hasil dari kepadatan spora dan juga koloni yang tumbuh pada media agar dapat diplot menjadi grafik pertumbuhan fungi dan dapat ditentukan viabilitas spora fungi.

### **6.3 Pembuatan Konsorsium Fungi**

Setelah diperoleh pola pertumbuhan dari masing-masing isolat fungi, formulasi pembuatan konsorsium dilakukan dengan mengombinasikan masing-masing isolat fungi dengan rasio inokulasi yang berbeda pada masing-masing media POME dan TKS. Sebagai contoh, penelitian yang dilakukan Wang et.al., (2022) melakukan variasi isolat A:B:C dengan variasi rasio inokulasi 1:1:1, 2:1:2, 3:1:3, 1:2:1, dan 1:3:1. Selanjutnya, dilakukan perhitungan TPC untuk melihat pertumbuhan dari isolat konsorsium selama waktu inkubasi. Sebanyak 1 mL konsorsium fungi diinokulasikan pada 9 mL larutan fisiologis untuk dilakukan *serial dilution*. Kemudian, sampel diambil 0,1mL dan *dispread* pada masing-masing media agar POME dan TKS untuk dikuantifikasi menggunakan *total plate count*. Dari hasil ini juga dapat ditentukan dinamika populasi dari masing-masing isolat yang ada di kultur hasil konsorsium.

### **6.4 Penentuan kadar gula total pada kultur konsorsium**

Kadar gula total pada kultur konsorsium dapat dilakukan dengan menggunakan uji Nelson-Somogyi. Sebanyak 1 mL sampel dimasukkan dalam test tube kemudian ditambahkan 10 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Sampel dipanaskan dalam air mendidih menggunakan hot plate dengan suhu 80°C selama 75 menit. Kemudian diambil 1 mL sampel hasil pemanasan dan ditambahkan 1 mL reagen Nelson. Larutan tersebut selanjutnya dipanaskan kembali pada suhu 105°C selama 20 menit. Setelah dipanaskan, sampel ditambahkan 1mL reagen arsenomolybdat dan aquades 7 mL. Selanjutnya diukur absorbansi masing-masing larutan tersebut menggunakan spektrofotometer dengan Panjang gelombang 540 nm. Nilai absorbansi yang diperoleh di plotkan pada kurva standar untuk mengetahui konsentrasi karbohidrat.

## 7. Evaluasi Pertumbuhan Isolat Tunggal pada Medium POME dan TKS Modifikasi

Masing-masing isolat fungi diaktivasi terlebih dahulu di media PDA. Untuk fungi filamentous, aktivasi dapat dilakukan dengan mengkultivasi isolat pada media PDA *slant*, lalu diinkubasi 3-5 hari. Setelah tumbuh dan bersporulasi, spora dapat dipanen menggunakan larutan panen dan diukur kepadatan spora untuk ditransfer ke medium cair maupun padat.

Untuk metode gravimetri, spora fungi yang telah diukur dengan haemositometer atau kultur miselium fungi diinokulasi pada erlenmeyer yang masing-masing berisi media agar POME dan media agar TKS modifikasi sesuai dengan banyaknya titik pengamatan. Diinkubasi pada suhu ruang, dengan agitasi 150rpm. Pengukuran dilakukan setiap hari dengan memanen kultur fungi yang tumbuh dalam media cair menggunakan vakum. Pelet miselia yang tumbuh dan tersaring kemudian dibilas 2-3 kali dengan akuades untuk menghilangkan sisa media. Pelet miselia kemudian dioven pada suhu 60-80°C hingga berat stabil. Proses ini dilakukan setiap hari, dan berat biomassa hasil pengukuran yang diperoleh, diplotkan ke dalam grafik pertumbuhan untuk melihat pola pertumbuhan dari masing-masing isolat.

Untuk metode radial, dapat digunakan untuk melengkapi data dari pengujian gravimetri. Kultur fungi yang sudah disubkultur, diinokulasi pada media agar POME dan agar TKS modifikasi menggunakan teknik kultivasi tanam. Pertumbuhan fungi ditentukan dengan mengukur pertambahan panjang miselium menggunakan jangka sorong setiap harinya. Penambahan panjang miselium diplot ke dalam grafik pertumbuhan untuk melihat pola pertumbuhan dari masing-masing isolat.

Untuk metode *total plate count*, spora fungi yang telah diukur kepadatannya ( $10^7$  spora/mL) dengan haemositometer diinokulasi pada tabung reaksi yang masing-masing berisi medium agar POME dan agar TKS modifikasi. Pengukuran pertumbuhan fungi dilakukan dengan memanen spora menggunakan larutan panen. Kepadatan spora kemudian diukur menggunakan haemositometer. Dari larutan spora yang sama, diambil 1 mL larutan dan dilakukan *serial dilution* pada larutan fisiologis 0,85%. Masing-masing pengenceran kemudian *dispread* pada media agar POME dan TKS untuk dilakukan perhitungan TPC. Hasil dari kepadatan spora dan juga koloni yang tumbuh pada media agar dapat diplot menjadi grafik pertumbuhan fungi dan dapat ditentukan viabilitas spora fungi.

## 8. Konsorsium Fungi pada Media POME dan TKS Modifikasi

Pembuatan konsorsium fungi pada media POME dan TKS yang dimodifikasi dilakukan berdasarkan pola pertumbuhan dari kurva pertumbuhan masing-masing fungi. Setiap isolate fungi dikombinasikan dengan rasio inokulasi hasil dari proses *screening* pada tahapan sebelumnya. Masing-masing isolat fungi diinokulasikan ke dalam media POME dan TKS modifikasi. Selanjutnya, dilakukan perhitungan TPC untuk melihat pertumbuhan dari isolat konsorsium selama waktu inkubasi. Sebanyak 1 mL konsorsium fungi diinokulasikan pada 9 mL larutan fisiologis untuk dilakukan *serial dilution*. Kemudian, sampel diambil 0,1 mL dan *dispread* pada masing-masing

media untuk dikuantifikasi menggunakan *total plate count*. Dari hasil ini juga dapat ditentukan dinamika populasi dari masing-masing isolat yang ada di kultur hasil konsorsium.

Saat mikroorganisme tumbuh bersama dalam inokulum campuran, pertumbuhan spesifik dari sub-populasi pada suatu waktu adalah:

$$\mu_i(t) = \frac{\frac{d}{dt} x_i(t)}{x_i(t)}$$

$X_i(t)$  merupakan konsentrasi mikroba. Konsentrasi total dilambangkan dengan  $x(t) = x_1(t)+x_2(t)+\dots$

Laju pertumbuhan spesifik seluruh populasi pada suatu waktu adalah:

$$\mu(t) = \mu_1(t) \frac{x_1(t)}{x(t)} + \mu_2(t) \frac{x_2(t)}{x(t)} + \dots$$

(Fossi, 2014)

## 9. Evaluasi Sinergisitas Kultur Isolat Konsorsium pada Medium POME dan TKS Modifikasi

Sinergisitas dan kompatibilitas kultur isolat konsorsium dapat dilakukan dengan membandingkan kurva tumbuh antara kurva pertumbuhan *single* kultur dan kurva pertumbuhan dalam kultur campuran. Hubungan komensalisme antara masing-masing isolate dapat ditentukan berdasarkan kondisi glukosa yang dirilis ke medium, dan *uptake* glukosa oleh isolate lain (Fossi et.al., 2014). Untuk mengetahui keberadaan masing-masing spesies isolate target pada konsorsium, isolate juga dievaluasi secara fenotipik untuk diamati karakteristiknya dan genotipik menggunakan metode NGS (*Next Generation Sequencing*).

## 10. Kajian kuantitatif lemak total kultur konsorsium fungi terpilih pada medium POME dan TKSM

Untuk menentukan kadar lemak total pada kultur, langkah pertama yang dilakukan adalah dengan mengekstraksi kandungan lemak pada sel biomassa. Biomassa fungi konsorsium diekstraksi dengan menggunakan pelarut kloroform:methanol (2:1) (Bligh and Dyer, 1959). Satu gram sampel dimasukkan ke dalam tabung falcon dan ditambahkan 16mL metanol, 8mL kloroform dan 6,4 mL akuades. Campuran kemudian diekstraksi selama 60 menit dengan kecepatan agitasi 250rpm. Selanjutnya, ditambahkan 8mL kloroform dan 9mL larutan natrium sulfat ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) 1,5% untuk fase pemisahan dan distirer selama dua menit. Sampel disentrifugasi selama 4 menit dengan kecepatan 3500rpm. Fase organic yang mengandung lipid

dipisahkan. Hasil ekstraksi lemak pada masing-masing media ditentukan dapat ditentukan menggunakan metode gravimetri, transesterifikasi, kromatografi dan spektroskopi.

Setelah dilakukan proses ekstraksi, fase organik yang mengandung lipid dipindahkan ke dalam 10mL tabung reaksi, dan dikeringkan di suhu 40°C untuk menghilangkan pelarut dan diukur secara gravimetri. Kandungan lipid sel dalam fermentasi *submerged* dinyatakan dalam persentase gram lipid per gram berat sel kering (%). Lipid hasil fermentasi padat dinyatakan sebagai miligram lipid per gram substrat kering (mg/gds). Lipid dalam bahan baku dikurangi dari total lipid yang diekstraksi sebelum perhitungan. Produktivitas lipid dan enzim per hari dihitung dengan mengalikan produksi per gram substrat kering dengan produktivitas biomassa yang difermentasi (Folch, et.al., 1957).

Untuk memperoleh data kuantifikasi *fatty acid methyl ester* (FAME), satu mililiter larutan methanol kalium hidroksida (0,4 M) ditambahkan ke dalam fase lipid dari proses ekstraksi. Kemudian, campuran disimpan dalam penangas air pada suhu mendidih selama 10 menit lalu ditambahkan 3 mL larutan asam sulfat methanol (1 M), disimpan di penangas air pada suhu mendidih selama 10 menit. Tahap selanjutnya, ditambahkan 2 mL heksana dan dihomogenisasi menggunakan vortex selama 30 detik. Fase di bagian atas yang mengandung FAME dihilangkan dan dilarutkan dalam heksana untuk analisis kromatografi. FAME dianalisis menggunakan Kromatografi Gas HP6850 dilengkapi dengan kapiler yang terhubung silang Kolom FFAP (panjang 30 m, ID 0,32 mm, ketebalan film 0,25 m) dan detektor ionisasi nyala.

Kondisi operasi adalah sebagai berikut: suhu masuk pada 290°C, suhu detektor pada 300°C dan suhu oven awal pada 210°C ditahan selama 12 menit, lalu ditekan hingga 250°C dengan laju 20 C/menit dan ditahan selama 8 menit. Asam lemak diidentifikasi dengan membandingkan waktu retensi mereka dengan yang standar dan dihitung sebagai persentase berdasarkan masing-masing daerah puncak menggunakan standar campuran FAME (Tonato et.al., 2018).

#### **11. Kajian kualitatif dan kuantitatif PUFA kultur konsorsium fungi terpilih pada medium POME dan TKSM**

Kandungan PUFA yang diproduksi dari konsorsium fungi di medium POME dan TKSM dapat ditentukan dengan mencuplik 50mg biomassa fungi konsorsium dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan 100µL standar internal (1%(w/v) asam heptadecanoic 9C17:0)) dan 2 ml larutan asam sulfat methanol 5%. Campuran dihomogenisasi dan diinkubasi pada *waterbath* 90°C selama satu jam. Setelah dingin, ditambahkan 1 mL heksan dan 1 mL akuades. Campuran disentrifugasi pada 1000rpm selama 5 menit. Supernatan dipisahkan untuk dianalisis kandungan PUFA menggunakan kromatografi gas yang dilengkapi dengan Omega Wax™ 250 dalam kolom kapiler leburan silika (Rtx1 leburan silika) (0,25 mm ID x 30 m) dan detektor ionisasi nyala (FID). Nitrogen dan hydrogen digunakan sebagai gas pembawa pada

laju aliran 1,22 ml/menit. suhu kolom dan detektor adalah 150 dan 260 ° C, masing-masing. Injeksi dilakukan dalam mode split 100:0 pada 250 °C (Deelai, et.al., 2015). Dari proses ini, dapat dianalisis profil kandungan PUFA dan juga konsentrasi masing-masing lipid.

## 12. Otimasi Produksi PUFA

Optimasi dapat dilakukan mengacu pada penelitian yang dilakukan Jiru et.al (2017), dengan memvariasikan jenis sumber karbon (sukrosa, glukosa, maltose, galaktosa, xylosa dan gliserol) serta konsentrasinya (10, 20, 30, 50, 70, 90 dan 100 g/L). Memvariasikan sumber nitrogen (pepton, *yeast extract*, sodium nitrat, ammonium nitrat dan urea), variasi C:N rasio (40, 60, 80, 100, 120, 140, dan 160). Untuk pH, dapat divariasikan pada rentang pH 3-8. Optimasi suhu dilakukan dengan rentang (20, 30, 35 dan 50°C). Agitasi juga memberikan pengaruh pada produksi lipid. Variasi agitasi dapat dilakukan pada rentang 100-250 rpm. Selain itu, variasi pemberian mikronutrien seperti fosfor juga dapat divariasikan konsentrasinya. Fermentasi *batch* dan *fed-batch* dilakukan di bioreactor yang memiliki control agitasi, suhu, pH dan *dissolved oxygen*. Suhu diatur pada 30°C dan *dissolved oxygen* diatur berada di atas 20% dari saturasi medium dengan suplai udara dan agitasi. Kultur pH diatur pada pH 6 dengan penambahan KOH 1 M atau H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (1 M).

Media hasil optimasi dengan kadar awal glukosa 40g/L digunakan untuk produksi SCO dengan volume inokulum yang diinokulasi adalah 5% (v/v). Pada sistem *fed-batch*, 30mL dari 100% glukosa ditambahkan ketika kadar gula menurun dan lebih rendah dari 10g/L. Sampel di Menurut Patnaik, et.al. (2022), optimasi juga dapat dilakukan dengan pemodelan Box Behnken. Variabel optimasi yang diukur adalah laju pertumbuhan dan laju konsumsi sumber karbon, produktivitas dan *yield* PUFA yang dihasilkan. Sampel yang disampling kemudian disentrifugasi untuk penentuan kadar biomassa dan ekstraksi lipid (Ayadi et.al., 2016).

## 13. Karakterisasi Isolat Potensial

Dari hasil *screening*, isolat potensial fungi dikarakterisasi secara fenotipik dan genotipik. Isolat dikarakterisasi berdasarkan karakteristik morfologi baik secara makroskopis maupun mikroskopis serta dilakukan analisis molekuler menggunakan metode sekuensing menggunakan domain ITS (Li, et.al., 2012). Hasil sekuensing diolah dengan menggunakan *tools* bioinformatika untuk mendapatkan spesies dari isolat terpilih.

## V. RAB Project

No	Aspek	Total Harga
1	Barang Habis	Rp 92.796.700,00
2	Jasa	Rp 87.750.000,00
3	Honor selama 2 tahun	Rp 76.800.000,00
4	Alat/Barang Modal	Rp 26.000.000,00
	<b>Total</b>	<b>Rp 301.086.700,00</b>

### A. Honorarium

No	Posisi	Jumlah (orang)	Gaji/Individu/Bulan	Gaji Total/Bulan	Total Gaji 1 Tahun
1	Ketua Peneliti	1	1.000.000	1.000.000	12.000.000
2	Laboran	1	600.000	600.000	7.200.000
3	Asisten Riset	2	800.000	1.600.000	19.200.000
	<b>Total</b>	<b>4</b>	<b>2.400.000</b>	<b>3.200.000</b>	<b>38.400.000</b>

### B. Barang Habis Pakai

No	Barang Habis	Volume	Harga Satuan	Total	PPn+faktor pengali	Jumlah
1	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	Rp 950.000	Rp 950.000	Rp 285.000	Rp 1.235.000
2	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2	Rp 950.000	Rp 1.900.000	Rp 570.000	Rp 2.470.000
3	NaCl	2	Rp 850.000	Rp 1.700.000	Rp 510.000	Rp 2.210.000
4	Yeast Extract	2	Rp 720.000	Rp 1.440.000	Rp 432.000	Rp 1.872.000
5	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1	Rp 1.000.000	Rp 1.000.000	Rp 300.000	Rp 1.300.000
6	NH <sub>4</sub> Cl	1	Rp 500.000	Rp 500.000	Rp 150.000	Rp 650.000
7	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1	Rp 1.000.000	Rp 1.000.000	Rp 300.000	Rp 1.300.000
8	ZnSO <sub>4</sub>	1	Rp 1.300.000	Rp 1.300.000	Rp 390.000	Rp 1.690.000
9	FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	1	Rp 1.000.000	Rp 1.000.000	Rp 300.000	Rp 1.300.000
10	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	Rp 700.000	Rp 700.000	Rp 210.000	Rp 910.000

11	Glukosa	2	Rp 760.000	Rp 1.520.000	Rp 456.000	Rp 1.976.000
12	Xylosa	1	Rp 800.000	Rp 800.000	Rp 240.000	Rp 1.040.000
13	Sukrosa	1	Rp 450.000	Rp 450.000	Rp 135.000	Rp 585.000
14	Maltosa	1	Rp 900.000	Rp 900.000	Rp 270.000	Rp 1.170.000

15	Gliserol	1	Rp 1.770.000	Rp 1.770.000	Rp 531.000	Rp 2.301.000
16	Galaktosa	1	Rp 990.000	Rp 990.000	Rp 297.000	Rp 1.287.000
17	Pepton	1	Rp 840.000	Rp 840.000	Rp 252.000	Rp 1.092.000
18	Sodium Nitrat	2	Rp 114.000	Rp 228.000	Rp 68.400	Rp 296.400
19	Ammonium Nitrat	1	Rp 690.000	Rp 690.000	Rp 207.000	Rp 897.000
20	Urea	1	Rp 700.000	Rp 700.000	Rp 210.000	Rp 910.000
21	Bacteriological Agar	1	Rp 1.955.000	Rp 1.955.000	Rp 586.500	Rp 2.541.500
22	Membran Filter	1	Rp 500.000	Rp 500.000	Rp 150.000	Rp 650.000
23	Antibiotik	1	Rp 300.000	Rp 300.000	Rp 90.000	Rp 390.000
24	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	Rp 650.000	Rp 650.000	Rp 195.000	Rp 845.000
25	Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ,	1	Rp 500.000	Rp 500.000	Rp 150.000	Rp 650.000
26	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	1	Rp 356.000	Rp 356.000	Rp 106.800	Rp 462.800
27	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	1	Rp 550.000	Rp 550.000	Rp 165.000	Rp 715.000
28	KOH	1	Rp 320.000	Rp 320.000	Rp 96.000	Rp 416.000
29	NAOH	1	Rp 290.000	Rp 290.000	Rp 87.000	Rp 377.000
30	PDA	2	Rp 1.200.000	Rp 2.400.000	Rp 720.000	Rp 3.120.000

31	YEPD	2	Rp 1.800.000	Rp 3.600.000	Rp 1.080.000	Rp 4.680.000
32	PDB	2	Rp 1.120.000	Rp 2.240.000	Rp 672.000	Rp 2.912.000
33	Ca(OH) <sub>2</sub>	1	Rp 250.000	Rp 250.000	Rp 75.000	Rp 325.000
34	Lactophenol Cotton Blue	1	Rp 350.000	Rp 350.000	Rp 105.000	Rp 455.000
35	Kit Ekstraksi	1	Rp 3.500.000	Rp 3.500.000	Rp 1.050.000	Rp 4.550.000
36	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2	Rp 1.900.000	Rp 3.800.000	Rp 1.140.000	Rp 4.940.000
37	Etanol	3	Rp 650.000	Rp 1.950.000	Rp 585.000	Rp 2.535.000
38	Spirtus	1	Rp 400.000	Rp 400.000	Rp 120.000	Rp 520.000
39	Alat Pendukung Lab	1	Rp 5.000.000	Rp 5.000.000	Rp 1.500.000	Rp 6.500.000
40	Cawan Petri	5	Rp 850.000	Rp 4.250.000	Rp 1.275.000	Rp 5.525.000
41	Reagen lainnya	1	Rp 5.000.000	Rp 5.000.000	Rp 1.500.000	Rp 6.500.000
42	Falcon	5	Rp 300.000	Rp 1.500.000	Rp 450.000	Rp 1.950.000
43	Tween 80	1	Rp 980.000	Rp 980.000	Rp 294.000	Rp 1.274.000
44	Kloroform	2	Rp 800.000	Rp 1.600.000	Rp 480.000	Rp 2.080.000
45	Metanol	2	Rp 455.000	Rp 910.000	Rp 273.000	Rp 1.183.000
46	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	Rp 280.000	Rp 280.000	Rp 84.000	Rp 364.000
47	Heksan	1	Rp 950.000	Rp 950.000	Rp 285.000	Rp 1.235.000
48	Sudan Black B stain	1	Rp 1.500.000	Rp 1.500.000	Rp 450.000	Rp 1.950.000
49	Kultur mikroba	10	Rp 600.000	Rp 6.000.000	Rp 660.000	Rp 6.660.000
<b>Total</b>				<b>Rp -</b>	<b>Rp -</b>	<b>Rp 92.796.700</b>

### C. Jasa

No	Jasa	Volume	Harga Satuan	Total	PPn+faktor pengali	Jumlah
1	Jasa Sekuensing	1	Rp 50.000.000	Rp 50.000.000	Rp 15.000.000	Rp 65.000.000
2	Jasa Analisis Uji	1	Rp 15.000.000	Rp 15.000.000	Rp 4.500.000	Rp 19.500.000
3	Jasa Lainnya	1	Rp 2.500.000	Rp 2.500.000	Rp 750.000	Rp 3.250.000
	<b>Total</b>					<b>Rp 87.750.000</b>

### D. Barang Modal

No	Barang Modal	Volume	Harga Satuan	Total	PPn+faktor pengali	Jumlah
1	Bioreaktor	1	Rp 20.000.000	Rp 20.000.000	Rp 6.000.000	Rp 26.000.000
	<b>Total</b>					<b>Rp 26.000.000</b>

## VI. Dampak Project

1. Diperoleh database fungi Chromista yang mampu mengonversi substrat menjadi omega 3 yang telah terkarakterisasi dan teridentifikasi.
2. Diperoleh data dan informasi mengenai laju pertumbuhan masing-masing isolat fungi Chromista terpilih pada beberapa substrat modifikasi limbah kelapa sawit.
3. Diperoleh formulasi medium POME dan TKS yang dimodifikasi untuk proses produksi lipid.
4. Diperoleh data dan informasi hasil optimasi substrat, total lemak tinggi berbasis C/N ratio, pH, suhu, laju alir input-output, unsur P, serta teknik fermentasi untuk produksi PUFA.
5. Diperoleh data dan informasi yang dapat digunakan sebagai basic knowledge dan basic toolbox dalam produksi single cell oil, termasuk di dalamnya informasi mengenai proses pretreatment substrat, proses ekstraksi, proses purifikasi, dapat berupa paten, SOP maupun publikasi ilmiah.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, F.B., Doherty, W., Zhang, Z., dan O'Hara, I.M. 2016. Evaluation of oil production from oil palm empty fruit bunch by oleaginous micro-organisms. *Biofuels Bioproducts and Biorefining*.
- Cheirsilp, B. dan Kittha, S. 2014. Solid state fermentation by cellulolytic oleaginous fungi for direct conversion of lignocellulosic biomass into lipids: Fed-batch and repeated-batch fermentations. *Industrial Crops and Products*. 66: 73-80
- Folch, J., Lees, M., Stanley, G.H.S., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509
- Jham, G.N., Teles, F.F.F., Campos, L.G., 1982. Use of aqueous HCl/MeOH as esterification reagent for analysis of fatty acids derived from soybean lipids. *J.Am. Oil Chem. Soc.* 59, 132–133
- Jiru, T.M., Groenewald, M., dan Abate, D. 2017. Optimization of cultivation conditions for biotechnological production of lipid by *Rhodotorula kratochvilovae* (syn,*Rhodospiridium kratochvilovae*) SY89 for biodiesel preparation. *3 Biotech.* 7:145
- Li, S., Lin, Q., Li, X., dan Xu, H. 2012. Biodiversity of The Oleaginous Microorganisms in Tibetan Plateau. *Braz.J.Microbiol.* 43(2)
- Kementrian Pertanian Republik Indonesia. 2023. BSIP dan Balitangda Prov. SulBar sukses gelar Pelatihan Pemanfaatan Limbah Padat Perkebunan Kelapa Sawit di Kab. Mamuju. [Diakses 22 Maret 2023]
- M. N. F. Norrrahim, M. A. Ahmad Farid, A. Abdullahi Lawal, T. A. Tengku Yasim-Anuar, M. H. Samsudin and A. A. Zulkifli, Emerging technologies for value-added use of oil palm biomass. *Environ. Sci.: Adv.*, 2022, DOI: 10.1039/D2VA00029F
- Patel, A., Karageorgou, D., Rova, E., dan Matsakas, L. 2020. An Overview of Potential Oleaginous Microorganisms and Their Role in Biodiesel and Omega-3 Fatty Acid-Based Industries. *Microorganisms*.8:434
- Patnaik, S., Saravanabhupaty, s., Singh, S., dan Dutta, K. 2022. Multi-objective optimization for biomass and lipid production by oleaginous bacteria using vegetable waste as feedstock. *Environ.Eng.Res.*
- Prabhu, G., Bhat, D., Bhat, R.M. et al. A Critical Look at Bioproducts Co-cultured Under Solid State Fermentation and Their Challenges and Industrial Applications. *Waste Biomass Valor* 13, 3095–3111 (2022). <https://doi.org/10.1007/s12649-022-01721-0>

- Sudiyani, Y. dan Hermiati, E. 2010. Utilization Of Oil Palm Empty Fruit Bunch (Opefb) For Bioethanol Production Through Alkali And Dilute Acid Pretreatment And Simultaneous Saccharification And Fermentation. *Indo. J. Chem.* 10(2): 261-267
- Tempo. 2023. 11 Negara Penghasil Sawit Terbesar Di Dunia 2023 Indonesia Nomor 1. <https://www.google.com/amp/s/koran.tempo.co/amp/ekonomi-dan-bisnis/482145/11-negara-penghasil-sawit-terbesar-di-dunia-2023-indonesia-nomor-1> [Diakses 22 Maret 2023]
- Q. Fei, M. O'Brien, R. Nelson, X. Chen, A. Lowell, N. Dowe, Enhanced lipid production by *Rhodospiridium toruloides* using different fed-batch feeding strategies with lignocellulosic hydrolysate as the sole carbon source, *Biotechnol Biofuels*, 9 (2016) 130.
- Yao, R., Zhang, P., Wang, H., Deng, S., Zue, H., 2012. One-step fermentation of pretreated rice straw producing microbial lipid by a novel strain of *Mortierella elongata* PFY. *Bioresour. Technol.* 124, 512–515.
- Yang, Y., Heidari, F., dan Hu, B. 2019. Fungi (Mold)-Based Lipid Production. Venkatesh Balan (ed.), *Microbial Lipid Production: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 1995, [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9484-7\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9484-7_3), Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature