

**PEMBANGUNAN BIOPROSES PENUKARAN BAHAN  
BERLIGNOSELULOSA KEPADA GULA PENURUN DAN BIOETANOL**

**oleh**

**LIM SHEH HONG**

**Tesis ini diserahkan untuk memenuhi  
keperluan bagi Ijazah Doktor Falsafah**

**Januari 2011**

## PENGHARGAAN

Pertama sekali saya ingin mengambil kesempatan ini untuk merakamkan jutaan terima kasih dan setinggi-tinggi penghargaan buat penyelia saya yang amat saya hormati dan sanjungi, **PROFESOR DR. HAJAH DARAH IBRAHIM** yang telah memberikan banyak tunjuk ajar yang bernas, bantuan, dorongan, motivasi dan sokongan kepada saya sepanjang tempoh penyelidikan ini dijalankan. Beliau adalah merupakan seorang idola bagi seseorang pelajar yang ingin berjaya dalam hidup dan kerjaya. Saya berasa amat bangga menjadi salah seorang pelajar di bawah seliaan beliau. Saya juga ingin berdoa kepada TUHAN supaya melanjutkan usia beliau, mengekalkan kesihatan baik beliau, kejayaan yang cemerlang dan gemilang dalam semua perkara yang beliau lakukan serta sentiasa bahagia bersama keluarga tercinta.

Saya juga ingin merakamkan ribuan terima kasih kepada Profesor Ibrahim Che Omar, selaku penyelia bersama saya. Bantuan, sokongan dan bimbingan serta perbincangan bernas yang beliau berikan telah membolehkan saya menjalankan penyelidikan ini dengan lancar.

Tidak lupa juga ucapan terima kasih saya kepada Profesor Madya Dr. Mohd. Jain Mohd. Noordin Kassim kerana banyak memberi tunjuk ajar dalam bahagian pengiraan kemolaran dalam penyediaan pelbagai jenis larutan penimbal. Tunjuk ajar yang diberikan oleh beliau dengan penuh kesabaran amat saya hargai.

Saya juga ingin mengucapkan terima kasih kepada kakitangan Pusat Pengajian Sains Kajiayatan yang telah banyak membantu sepanjang penyelidikan ini dijalankan. Kepada ahli-ahli 'Makmal Penyelidikan Bioteknologi Industri', terima kasih diucapkan atas sokongan, galakan dan kerjasama yang diberikan selama ini.

Teristimewa buat kedua-dua orang ibu bapa dan dua orang adik tersayang yang telah banyak memberi galakan dan sokongan. Terima kasih yang tidak terhingga nilainya ingin saya ucapkan kepada mereka. Selain itu, penghargaan ini juga ditujukan kepada Sia, Sasidharan, Kak Suraya, Goh dan Pay Luan yang banyak mengambil berat terhadap kemajuan dalam penyelidikan saya.

Saya juga ingin merakamkan jutaan terima kasih kepada Universiti Sains Malaysia yang mengurniakan 'USM Fellowship' kepada saya untuk saya melakukan dan menjayakan penyelidikan ini. Di samping itu, projek ini merupakan projek Satelit Bioteknologi (MOSTI) bersama UPEN Terengganu dan USM.

**LIM SHEH HONG**

**2011**

# KANDUNGAN

## Muka surat

<b>PENGHARGAAN</b>	ii
<b>KANDUNGAN</b>	iv
<b>SENARAI JADUAL</b>	xv
<b>SENARAI RAJAH</b>	xvi
<b>SENARAI GAMBAR FOTO</b>	xxii
<b>SENARAI SINGKATAN</b>	xxiv
<b>ABSTRAK</b>	xxv
<b>ABSTRACT</b>	xxvii
<b>BAB 1 PENGENALAN</b>	1
1.1 Objektif Penyelidikan	7
<b>BAB 2 TINJAUAN BACAAN</b>	9
2.1 Kewujudan biojisim di alam semula jadi	9
2.2 Sumber-sumber biojisim	11
2.2.1 Sisa buangan pepejal	11
2.2.2 Sisa buangan pertanian	12
2.2.3 Sisa kayu-kayan	14
2.2.4 Biojisim tumbuhan akuatik	14
2.2.5 Tanaman tenaga	15
2.3 Bahan lignoselulosa merupakan sumber tenaga yang boleh diperbaharui	16
2.3.1 Komposisi bahan berlignoselulosa	17
2.3.1.1 Selulosa	17
2.3.1.2 Hemiselulosa	21

2.3.1.3 Lignin	22
2.3.2 Taburan komposisi lignoselulosa dalam tumbuhan	26
2.4 Pengolahan pada bahan berlignoselulosa	27
2.4.1 Mekanisme pengolahan kompleks LHS	30
2.4.1.1 Pengolahan selulosa	30
2.4.1.2 Pengolahan hemiselulosa	32
2.4.1.3 Pengolahan lignin	33
2.4.2 Pengolahan dengan agen penyahwarnaan	34
2.5 Kelapa sawit	36
2.6 Mikroorganisma yang terlibat dalam penguraian lignoselulosa	38
2.6.1 Mikroorganisma pengurai selulosa	38
2.6.2 Mikroorganisma pengurai hemiselulosa	39
2.6.3 Mikroorganisma pengurai lignin	42
2.7 Pemfermentasian substrat pepejal	45
2.7.1 Perkembangan sistem pemfermentasian substrat pepejal	47
2.7.2 Kelebihan pemfermentasian substrat pepejal berbanding dengan pemfermentasian kultur tenggelam	48
2.7.3 Faktor-faktor yang mempengaruhi peningkatan skala sistem pemfermentasian substrat pepejal	51
2.8 Biopenukaran bahan berlignoselulosa menjadi bahan yang bernilai	55
2.8.1 Biopenukaran selulosa	57
2.8.2 Biopenukaran hemiselulosa	59
2.9 Penghasilan gula penurun melalui hidrolisis enzim	61

2.9.1 Gula penurun	63
2.9.1.1 Gula penurun yang tidak dapat difermentasikan	65
2.9.1.2 Gula penurun yang dapat difermentasikan	65
2.10 Penghasilan bioetanol	67
<b>BAB 3 PENYARINGAN BAHAN LIGNOSELULOSA UNTUK PENGHASILAN GULA PENURUN DALAM SISTEM PEMFERMENTASIAN SUBSTRAT PEPEJAL DENGAN MENGUNAKAN KULAT UJIAN</b>	69
3.1 Pendahuluan	69
3.2 Bahan dan kaedah	72
3.2.1 Penyampelan substrat untuk pemfermentasian substrat pepejal	72
3.2.2 Mikroorganisma dan pengkulturan	73
3.2.3 Penyediaan inokulum kulat	73
3.2.4 Penyaringan bahan berlignoselulosa dengan kulat untuk penghasilan gula penurun dalam sistem pemfermentasian substrat pepejal	74
3.2.4.1 Medium pemfermentasian substrat pepejal	74
3.2.5 Pengekstrakan sampel kajian	75
3.2.6 Penentuan pertumbuhan kulat	75
3.2.7 Penentuan gula penurun	77
3.2.8 Penentuan aktiviti enzim	78
3.2.8.1 Enzim selulase	79
3.2.8.1.1 Kaedah aktiviti kertas turas (FPA)	79
3.2.8.1.2 Kaedah aktiviti karboksimetilselulosa (CMC)	80

3.2.8.2 Enzim xilanase	81
3.2.8.3 Enzim mananase	82
3.2.8.4 Enzim lignin peroksidase dan mangan peroksidase	83
3.3 Keputusan dan perbincangan	85
3.3.1 Penyampelan substrat untuk pemfermentasian substrat pepejal	85
3.3.2 Kulat ujian	87
3.3.3 Penyaringan bahan berlignoselulosa dengan kulat untuk penghasilan gula penurun dalam sistem pemfermentasian substrat pepejal	89
3.3.3.1 Pengekstrakan sampel kajian	89
3.3.3.2 Penentuan pertumbuhan kulat dan penghasilan gula penurun	91
3.3.3.3 Penentuan aktiviti enzim	102
3.3.3.3.1 Aktiviti enzim selulase	103
3.3.3.3.2 Aktiviti enzim xilanase	113
3.3.3.3.3 Aktiviti enzim mananase	122
3.3.3.3.4 Aktiviti enzim pengurai lignin	131
3.4 Kesimpulan	142
<b>BAB 4 KAJIAN KOMPOSISI ASAS PELEPAH KELAPA SAWIT</b>	144
4.1 Pendahuluan	144
4.2 Bahan dan kaedah	146
4.2.1 Penentuan kelembapan substrat pelepah kelapa sawit	146
4.2.2 Analisis anggaran komposisi asas pelepah kelapa sawit kering	146
4.2.2.1 Penentuan bahan terlarut air	147

4.2.2.2	Penentuan lignin Klason	147
4.2.2.3	Penentuan lignin alkali	148
4.2.2.4	Penentuan abu	148
4.2.2.5	Penentuan kandungan protein kasar	149
4.2.2.6	Penentuan lipid kasar	151
4.2.2.7	Penentuan kandungan holoselulosa	152
4.3	Keputusan dan perbincangan	154
4.3.1	Penentuan kelembapan substrat pelepah kelapa sawit kering	154
4.3.2	Analisis komposisi asas pelepah kelapa sawit	156
4.4	Kesimpulan	162
<b>BAB 5</b>	<b>PROSES PENGOLAHAN AWAL SERAT PELEPAH KELAPA SAWIT</b>	<b>163</b>
5.1	Pendahuluan	163
5.2	Bahan dan kaedah	167
5.2.1	Pengolahan awal OPF	167
5.2.1.1	Pengolahan OPF dengan kaedah fizik	167
5.2.1.2	Pengolahan OPF dengan kaedah kimia	168
5.2.2	Penentuan gula penurun	169
5.2.3	Kajian morfologi OPF dengan mikroskop Elektron penskanan (SEM)	169
5.2.4	Proses pemfermentasian substrat	170
5.2.5	Penentuan komposisi asas	170
5.3	Keputusan dan perbincangan	171
5.3.1	Kesan pengolahan awal ke atas OPF	171
5.3.1.1	Kesan pengolahan OPF dengan kaedah fizik	174



5.3.1.2 Kesan pengolahan OPF dengan kaedah kimia	179
5.3.2 Kesan pengolahan awal ke atas kadar penghidrolisisan OPF dalam sistem pemfermentasian substrat pepejal	185
5.3.2.1 Kesan pengolahan awal kaedah fizik ke atas kadar penghidrolisisan OPF di dalam sistem pemfermentasian substrat pepejal	188
5.3.2.2 Kesan pengolahan awal kimia ke atas kadar penghidrolisisan OPF dalam sistem pemfermentasian substrat pepejal	193
5.3.3 Penentuan komposisi asas OPF selepas diolah dengan kaedah fizik	198
5.4 Kesimpulan	201
<b>BAB 6 PENGOPTIMUMAN PENGHASILAN GULA PENURUN DARIPADA PELEPAH KELAPA SAWIT DALAM SISTEM PEMFERMENTASIAN SUBSTRAT PEPEJAL</b>	203
6.1 Pendahuluan	203
6.2 Bahan dan kaedah	205
6.2.1 Profil penghasilan gula penurun dan pertumbuhan <i>A. niger</i> USM A11 sebelum pengoptimuman dalam sistem kelalang goncangan	205
6.2.1.1 Pengoptimuman keadaan fizikal pengkulturan dalam sistem kelalang goncangan	206
6.2.1.1.1 Kesan jumlah substrat	206
6.2.1.1.2 Kesan saiz substrat	207
6.2.1.1.3 Kesan kelembapan	207
6.2.1.1.4 Kesan saiz inokulum	208

6.2.1.1.5 Kesan pH	208
6.2.1.1.6 Kesan suhu pengkulturan	209
6.2.1.1.7 Kesan pengadukan	210
6.2.1.1.8 Kesan saiz kelalang goncangan	210
6.2.1.2 Profil penghasilan gula penurun dan pertumbuhan <i>A. niger</i> USM AI1 selepas pengoptimuman parameter fizikal dalam kelalang goncangan	211
6.2.1.3 Pengoptimuman parameter kimia pengkulturan dalam sistem kelalang goncangan	212
6.2.1.3.1 Kesan penambahan sumber nitrogen	212
6.2.1.3.2 Kesan penambahan bahan aruh dalam substrat pengkulturan	213
6.2.1.4 Profil penghasilan gula penurun oleh <i>A. niger</i> USM AI1 pada OPF <sub>Auto</sub> selepas pengoptimuman parameter fizikal dan kimia dalam sistem kelalang goncangan	214
6.2.2 Pengoptimuman penghasilan gula penurun dan pertumbuhan <i>A. niger</i> USM AI1 pada OPF <sub>Auto</sub> dalam sistem dulang	215
6.2.2.1 Pengoptimuman keadaan pengkulturan dalam sistem dulang	215
6.2.2.1.1 Kesan jumlah substrat	215
6.2.2.1.2 Kesan saiz inokulum	217
6.2.2.1.3 Kesan suhu pemfermentasian	218
6.2.2.1.4 Kesan kelembapan	218
6.2.2.2 Profil penghasilan gula penurun dan pertumbuhan <i>A. niger</i> USM AI1 selepas pengoptimuman dalam sistem dulang	219
6.2.3 Kaedah penganalisis statistik	219
6.2.4 Pemerhatian pertumbuhan <i>A. niger</i> USM AI1	220

pada OPF<sub>Auto</sub> di bawah di bawah mikroskop

6.2.4.1	Pengamatan menggunakan mikroskop elektron pensakanan (SEM)	220
6.2.4.2	Pengamatan menggunakan mikroskop cahaya (LM) dan mikroskop elektron transmisi (TEM)	220
6.3	Keputusan dan perbincangan	221
6.3.1	Profil penghasilan gula penurun dan pertumbuhan <i>A. niger</i> USM AII sebelum pengoptimuman dalam sistem kelalang goncangan	221
6.3.1.1	Pengoptimuman keadaan fizikal pengkulturan dalam sistem kelalang goncangan	227
6.3.1.1.1	Kesan jumlah substrat ke atas pertumbuhan <i>A. niger</i> USM AII dan penghasilan gula penurun	227
6.3.1.1.2	Kesan saiz substrat ke atas pertumbuhan <i>A. niger</i> USM AII dan penghasilan gula penurun	230
6.3.1.1.3	Kesan kelembapan ke atas pertumbuhan <i>A. niger</i> USM AII dan penghasilan gula penurun	233
6.3.1.1.4	Kesan saiz inokulum ke atas pertumbuhan <i>A. niger</i> USM AII dan penghasilan gula penurun	236
6.3.1.1.5	Kesan pH ke atas pertumbuhan <i>A. niger</i> USM AII dan penghasilan gula penurun	238
6.3.1.1.6	Kesan suhu pengkulturan ke atas pertumbuhan <i>A. niger</i> USM AII dan penghasilan gula penurun	241
6.3.1.1.7	Kesan pengadukan ke atas pertumbuhan <i>A. niger</i> USM AII dan penghasilan gula penurun	244
6.3.1.1.8	Kesan saiz kelalang ke atas pertumbuhan <i>A. niger</i> USM AII	246

dan penghasilan gula penurun

6.3.1.2	Profil selepas pengoptimuman parameter fizikal	249
6.3.1.3	Pengoptimuman parameter kimia pengkulturan dalam sistem kelalang goncangan	253
6.3.1.3.1	Kesan penambahan sumber nitrogen	254
6.3.1.3.2	Kesan penambahan bahan aruh	258
6.3.1.4	Profil penghasilan gula penurun oleh <i>A. niger</i> USM AI1 pada OPF <sub>Auto</sub> selepas pengoptimuman parameter fizikal dan kimia dalam sistem kelalang goncangan	264
6.3.2	Pengoptimuman penghasilan gula penurun dan pertumbuhan <i>A. niger</i> USM AI1 pada OPF <sub>Auto</sub> dalam sistem dulang	268
6.3.2.1	Pengoptimuman keadaan pengkulturan dalam sistem dulang	272
6.3.2.1.1	Kesan jumlah substrat	273
6.3.2.1.2	Kesan saiz inokulum	275
6.3.2.1.3	Kesan suhu pemfermentasian	277
6.3.2.1.4	Kesan kelembapan	280
6.3.2.2	Profil selepas pengoptimuman pada sistem dulang	283
6.3.3	Pemerhatian pertumbuhan <i>A. niger</i> USM AI1 di bawah mikroskop	290
6.3.3.1	Pengamatan menggunakan mikroskop elektron penskanan (SEM)	290
6.4	Kesimpulan	294

<b>BAB 7 PENCIRIAN DAN PEMFERMENTASIAN GULA PENURUN</b>	296
7.1 Pendahuluan	296
7.2 Bahan dan kaedah	298
7.2.1 Pencirian gula penurun dengan kaedah HPLC	298
7.2.2 Penyelenggaraan kultur yis ujian	298
7.2.3 Fermentasian penghasilan etanol di dalam botol medium	299
7.2.3.1 Penyampelan	299
7.2.3.1.1 Penentuan gula penurun	300
7.2.3.1.2 Penentuan berat biojisim <i>S. cerevisiae</i>	300
7.2.3.1.3 Penentuan kepekatan etanol	300
7.2.3.2 Pengoptimuman keadaan pemfermentasian	301
7.2.3.2.1 Kesan saiz inokulum	301
7.2.3.2.2 Kesan kepekatan gula penurun	302
7.2.4 Penghasilan biojisim yis <i>Candida utilis</i>	303
7.2.5 Fermentasi penghasilan etanol dalam fermenter	303
7.2.5.1 Pengoptimuman keadaan pemfermentasian etanol di dalam fermenter	306
7.2.5.1.1 Kesan kelajuan pengadukan	306
7.2.5.1.2 Kesan oksigen tepu dalam udara pada permulaan proses fermentasian	306
7.2.6 Kaedah penganalisis statistik	307
7.3 Keputusan dan perbincangan	308
7.3.1 Pencirian gula penurun yang diperolehi daripada OPF <sub>Auto</sub>	308

7.3.2 Fermentasian penghasilan etanol dalam botol medium	310
7.3.2.1 Pengoptimuman keadaan pemfermentasian etanol oleh <i>S. cerevisiae</i>	316
7.3.2.1.1 Kesan saiz inokulum	316
7.3.2.1.2 Kesan kepekatan gula penurun	320
7.3.3 Penghasilan biojisim sel yis	326
7.3.4 Pemfermentasian penghasilan etanol di dalam fermenter	328
7.3.4.1 Pengoptimuman keadaan pemfermentasian etanol oleh <i>S. cerevisiae</i> di dalam fermenter	333
7.3.4.1.1 Kesan pengadukan	333
7.3.4.1.2 Kesan kepekatan oksigen tepu pada permulaan proses pemfermentasian	336
7.4 Kesimpulan	343
<b>BAB 8 KESIMPULAN UMUM</b>	345
<b>RUJUKAN</b>	351
<b>LAMPIRAN</b>	390
<b>PENERBITAN DARIPADA HASIL PENYELIDIKAN INI</b>	399

## SENARAI JADUAL

	<b>Muka surat</b>	
Jadual 1.1	Komposisi kimia pelepah kelapa sawit	5
Jadual 2.1	Keluasan penanaman kelapa sawit antara tahun 1960-2000	37
Jadual 2.2	Mikroorganisma penghasil selulase utama yang digunakan secara komersial	40
Jadual 2.3	Mikroorganisma penghasil xilanase yang berupaya menguraikan xilan pada hemiselulosa	41
Jadual 2.4	Kulat pembusuk putih yang berupaya menguraikan lignin	43
Jadual 2.5	Bakteria yang berupaya menguraikan lignin pada lignoselulosa	44
Jadual 2.6	Penggunaan proses pemfermentasian substrat pepejal dalam sektor ekonomi	49
Jadual 2.7	Komposisi gula dalam sisa buangan pertanian	64
Jadual 4.1	Anggaran kelembapan substrat pelepah kelapa sawit kering	155
Jadual 4.2	Komposisi asas pelepah kelapa sawit (OPF) kering	157
Jadual 5.1	Sisa larutan turasan daripada kesan pengolahaan awal OPF dengan kaedah fizik	172
Jadual 5.2	Sisa larutan turasan daripada kesan pengolahaan awal OPF dengan 1% bahan kimia	173
Jadual 5.3	Perbandingan anggaran komposisi asas pelepah kelapa sawit (OPF) kering tanpa pengolahaan awal dan OPF yang telah diolahkan dengan air (diautoklaf pada suhu 121°C selama 20 minit)	199
Jadual 6.1	Perbandingan keadaan pengkulturan sebelum pengoptimuman dan selepas pengoptimuman parameter fizikal dan kimia oleh <i>A. niger</i> USM A11 di dalam sistem kelalang goncangan	269
Jadual 7.1	Kesan kepekatan gula penurun ke atas darjah penghasilan etanol	321

Rajah 2.1	Lakaran komposisi dan rangkaian ikatan hidrogen bagi selulosa	19
Rajah 2.2	Komponen-komponen utama dalam hemiselulosa	23
Rajah 2.3	Lakaran berskema yang menunjukkan kesan pengolahan pada bahan berlignoselulosa	29
Rajah 2.4	Skema yang dicadangkan untuk pemisahan dan penggunaan bahan berlignoselulosa	56
Rajah 2.5	Hasil fermentasi yang diterbitkan daripada glukosa	66
Rajah 3.1	Pertumbuhan dan penghasilan gula penurun oleh <i>A. niger</i> USM A11 pada substrat yang berlainan	93
Rajah 3.2	Pertumbuhan dan penghasilan gula penurun oleh <i>A. niger</i> II pada substrat yang berlainan	94
Rajah 3.3	Pertumbuhan dan penghasilan gula penurun oleh <i>Trichoderma viride</i> pada substrat yang berlainan	95
Rajah 3.4	Pertumbuhan dan penghasilan gula penurun oleh <i>A. niger</i> F4 pada substrat yang berlainan	96
Rajah 3.5	Pertumbuhan dan penghasilan gula penurun oleh <i>Phanerochaete chrysosporium</i> pada substrat yang berlainan	97
Rajah 3.6	Penghasilan enzim selulase oleh pencilan <i>A. niger</i> USM A11 pada substrat yang berlainan	104
Rajah 3.7	Penghasilan enzim selulase oleh pencilan <i>A. niger</i> II pada substrat yang berlainan	105
Rajah 3.8	Penghasilan enzim selulase oleh pencilan pada <i>Trichoderma viride</i> substrat yang berlainan	106
Rajah 3.9	Penghasilan enzim selulase oleh pencilan <i>A. niger</i> F4 pada substrat yang berlainan	107
Rajah 3.10	Penghasilan enzim selulase oleh pencilan <i>Phanerochaete chrysosporium</i> pada substrat yang berlainan	108



Rajah 3.11	Penghasilan enzim xilanase oleh pencilan <i>A. niger</i> USM AII pada substrat yang berlainan	114
Rajah 3.12	Penghasilan enzim xilanase oleh pencilan <i>A. niger</i> II pada substrat yang berlainan	115
Rajah 3.13	Penghasilan enzim xilanase oleh pencilan pada <i>Trichoderma viride</i> substrat yang berlainan	116
Rajah 3.14	Penghasilan enzim xilanase oleh pencilan <i>A. niger</i> F4 pada substrat yang berlainan	117
Rajah 3.15	Penghasilan enzim xilanase oleh pencilan <i>Phanerochaete chrysosporium</i> pada substrat yang berlainan	118
Rajah 3.16	Penghasilan enzim mananase oleh pencilan <i>A. niger</i> USM AII pada substrat yang berlainan	123
Rajah 3.17	Penghasilan enzim mananase oleh pencilan <i>A. niger</i> II pada substrat yang berlainan	124
Rajah 3.18	Penghasilan enzim mananase oleh pencilan pada <i>Trichoderma viride</i> substrat yang berlainan	125
Rajah 3.19	Penghasilan enzim mananase oleh pencilan <i>A. niger</i> F4 pada substrat yang berlainan	126
Rajah 3.20	Penghasilan enzim mananase oleh pencilan <i>Phanerochaete chrysosporium</i> pada substrat yang berlainan	127
Rajah 3.21	Penghasilan enzim pengurai lignin oleh pencilan <i>A. niger</i> USM AII pada substrat yang berlainan	133
Rajah 3.22	Penghasilan enzim pengurai lignin oleh pencilan <i>A. niger</i> II pada substrat yang berlainan	134
Rajah 3.23	Penghasilan enzim pengurai lignin oleh pencilan pada <i>Trichoderma viride</i> substrat yang berlainan	135
Rajah 3.24	Penghasilan enzim pengurai lignin oleh pencilan <i>A. niger</i> F4 pada substrat yang berlainan	136
Rajah 3.25	Penghasilan enzim pengurai lignin oleh pencilan <i>Phanerochaete chrysosporium</i> pada substrat yang berlainan	137
Rajah 5.1	Pertumbuhan dan penghasilan gula penurunan oleh <i>A. niger</i> USM AII dalam sistem pemfermentasian substrat pepejal pada OPF	189

yang telah diolahkan dengan kaedah fizikal

Rajah 5.2	Pertumbuhan dan penghasilan gula penurun oleh <i>A. niger</i> USM A11 dalam sistem pemfermentasian substrat pepejal pada OPF yang telah diolahkan dengan bahan kimia	194
Rajah 6.1	Profil penghasilan gula penurun dan pertumbuhan <i>A. niger</i> USM A11 pada OPF <sub>Auto</sub> sebelum pengoptimuman keadaan pengkulturan secara SSF dijalankan dalam kelalang kon selama 7 hari.	222
Rajah 6.2	Kesan jumlah substrat ke atas penghasilan gula penurun dan pertumbuhan kulat <i>A. niger</i> USM A11 secara SSF dalam kelalang kon	229
Rajah 6.3	Kesan saiz substrat ke atas penghasilan gula penurun dan pertumbuhan kulat <i>A. niger</i> USM A11 secara SSF dalam kelalang kon	231
Rajah 6.4	Kesan kelembapan ke atas penghasilan gula penurun dan pertumbuhan kulat <i>A. niger</i> USM A11 pada OPF <sub>Auto</sub> secara SSF dalam kelalang kon	234
Rajah 6.5	Kesan saiz inokulum ke atas penghasilan gula penurun dan pertumbuhan kulat <i>A. niger</i> USM A11 pada OPF <sub>Auto</sub> secara SSF dalam kelalang kon	237
Rajah 6.6	Kesan pH ke atas penghasilan gula penurun dan pertumbuhan kulat <i>A. niger</i> USM A11 pada OPF <sub>Auto</sub> secara SSF dalam kelalang kon	240
Rajah 6.7	Kesan suhu pemfermentasian ke atas penghasilan gula penurun dan pertumbuhan kulat <i>A. niger</i> USM A11 pada OPF <sub>Auto</sub> secara SSF dalam kelalang kon	242
Rajah 6.8	Kesan pengadukan ke atas penghasilan gula penurun dan pertumbuhan kulat <i>A. niger</i> USM A11 pada OPF <sub>Auto</sub> secara SSF dalam kelalang kon	245
Rajah 6.9	Kesan saiz kelalang Erlenmeyer ke atas penghasilan gula penurun dan pertumbuhan kulat <i>A. niger</i> USM A11 pada OPF <sub>Auto</sub> secara SSF dalam kelalang kon	247
Rajah 6.10	Profil penghasilan gula penurun dan	250

pertumbuhan kulat *A. niger* USM AII selepas pengoptimuman parameter fizikal dalam SSF yang dijalankan selama 7 hari

Rajah 6.11	Perbandingan profil penghasilan gula penurun dan pertumbuhan kulat <i>A. niger</i> USM AII sebelum dan selepas pengoptimuman parameter fizikal dalam SSF selama 7 hari	251
Rajah 6.12	Kesan sumber nitrogen tambahan ke atas penghasilan gula penurun dan pertumbuhan kulat <i>A. niger</i> USM AII pada OPF <sub>Auto</sub> secara SSF dalam kelalang kon	255
Rajah 6.13	Kesan kepekatan air rendaman jagung ke atas penghasilan gula penurun dan pertumbuhan kulat <i>A. niger</i> USM AII pada OPF <sub>Auto</sub> secara SSF dalam kelalang kon	257
Rajah 6.14	Kesan penambahan bahan pengaruh ke atas penghasilan gula penurun dan pertumbuhan kulat <i>A. niger</i> USM AII pada OPF <sub>Auto</sub> secara SSF dalam kelalang kon	259
Rajah 6.15	Mekanisme penguraian selulosa oleh enzim selulase kepada glukosa	262
Rajah 6.16	Kesan kepekatan CMC ke atas penghasilan gula penurun dan pertumbuhan kulat <i>A. niger</i> USM AII pada OPF <sub>Auto</sub> secara SSF dalam kelalang kon	263
Rajah 6.17	Profil penghasilan gula penurun dan pertumbuhan kulat <i>A. niger</i> USM AII selepas pengoptimuman parameter fizikal dan kimia dalam SSF yang dijalankan selama 7 hari	265
Rajah 6.18	Perbandingan profil penghasilan gula penurun dan pertumbuhan kulat <i>A. niger</i> USM AII sebelum pengoptimuman, selepas pengoptimuman parameter fizikal dan selepas pengoptimuman parameter fizikal dan kimia dalam SSF selama 7 hari	267
Rajah 6.19	Profil penghasilan gula penurun dan pertumbuhan <i>A. niger</i> USM AII pada OPF <sub>Auto</sub> sebelum pengoptimuman keadaan pengkulturan secara SSF dijalankan dalam sistem dulang selama 7 hari	271

Rajah 6.20	Kesan jumlah substrat ke atas penghasilan gula penurun dan pertumbuhan kulat <i>A. niger</i> USM AII secara SSF dalam sistem dulang	274
Rajah 6.21	Kesan saiz inokulum ke atas penghasilan gula penurun dan pertumbuhan kulat <i>A. niger</i> USM AII secara SSF dalam sistem dulang	276
Rajah 6.22	Kesan suhu pemfermentasian ke atas penghasilan gula penurun dan pertumbuhan kulat <i>A. niger</i> USM AII secara SSF dalam sisten dulang	278
Rajah 6.23	Kesan kelembapan ke atas penghasilan gula penurun dan pertumbuhan kulat <i>A. niger</i> USM AII pada OPF <sub>Auto</sub> secara SSF dalam sistem dulang	281
Rajah 6.24	Profil penghasilan gula penurun dan pertumbuhan <i>A. niger</i> USM AII pada OPF <sub>Auto</sub> selepas pengoptimuman keadaan pengkulturan secara SSF dijalankan dalam sistem dulang selama 7 hari	284
Rajah 6.25	Perbandingan profil penghasilan gula penurun dan pertumbuhan kulat <i>A. niger</i> USM AII sebelum pengoptimuman dan selepas pengoptimuman parameter fizikal secara SSF dalam sistem dulang selama 7 hari	285
Rajah 6.26	Perkaitan antara penghasilan gula penurun dan pertumbuhan kulat <i>A. niger</i> USM AII dengan enzim-enzim sel.	288
Rajah 7.1	Kromatogram HPLC gula penurun hasil daripada penghidrolisisan <i>A. niger</i> USM AII pada OPFAuto melalui SSF.	309
Rajah 7.2	Profil pemfermentasian etanol dengan <i>S. cerevisiae</i> di dalam botol medium sebelum pengoptimuman	312
Rajah 7.3	Kesan kepekatan glukosa dan keupayaan penghasilan etanol oleh sel yis <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	315
Rajah 7.4	Kesan pelbagai kepekatan saiz inokulum ke atas (A) penggunaan gula penurun, (B) penghasilan biojisim, (C) penghasilan etanol	317
Rajah 7.5	Kesan kepekatan gula penurun ke atas (A)	322

penggunaan gula penurun, (B) penghasilan biojisim, (C) penghasilan etanol

Rajah 7.6	Profil penghasilan etanol oleh <i>S. cerevisiae</i> selepas pengoptimuman	325
Rajah 7.7	Profil gula penurun daripada OPFAuto yang dihidrolisis oleh <i>A. niger</i> USM AI1 dalam SSF	327
Rajah 7.8	Profil pertumbuhan <i>Candida utilis</i> yang dikulturkan di dalam medium pengkulturan menggunakan sisa penyulingan etanol	329
Rajah 7.9	Profil penghasilan etanol oleh <i>S. cerevisiae</i> sebelum pengoptimuman di dalam fermenter	332
Rajah 7.10	Kesan kadar pengadukan dalam fermenter ke atas (A) penggunaan gula penurun, (B) penghasilan biojisim, (C) penghasilan etanol	334
Rajah 7.11	Kesan kepekatan oksigen tepu pada permulaan proses fermentasian ke atas (A) penggunaan gula penurun, (B) penghasilan biojisim, (C) penghasilan etanol	337
Rajah 7.12	Profil penghasilan etanol oleh <i>S. cerevisiae</i> selepas pengoptimuman di dalam fermenter	341

Gambar foto 3.1	Bahan berlignoselulosa sebagai substrat dalam sistem pemfermentasian substrat pepejal	86
Gambar foto 3.2	Pencilan kulat ujian di atas agar condong dekstroza Sabouraud (SDA)	88
Gambar foto 3.3	Larutan supernatan yang mengandungi gula penurun hasil daripada sistem pemfermentasian substrat pepejal	90
Gambar foto 5.1	Mikrograf SEM pelepah kelapa sawit (OPF) tanpa pengolahan awal	177
Gambar foto 5.2	Mikrograf SEM pelepah 'kelapa sawit (OPF) selepas diautoklaf dengan air pada suhu 121 °C selama 20 minit	178
Gambar foto 5.3	Mikrograf SEM pelepah kelapa sawit (OPF) selepas pengolahan 1% NaOH pada suhu bilik ( $30 \pm 2^\circ\text{C}$ ), 150 psm selama 24 jam	181
Gambar foto 5.4	Mikrograf SEM pelepah kelapa sawit (OPF) selepas diautoklafkan dengan pengolahan 1% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pada suhu 121°C selama 20 minit	184
Gambar foto 5.5	Pelepah kelapa sawit (OPF) yang telah diolah dengan air (kaedah fizikal) pada suhu dan masa yang berlainan	186
Gambar foto 5.6	Pelepah kelapa sawit (OPF) yang telah diolah dengan 1% pelbagai jenis bahan kimia pada suhu bilik ( $30 \pm 2^\circ\text{C}$ ) selama 24 jam	187
Gambar foto 6.1	<i>A. niger</i> USM A11 diinokulatkan pada OPF <sub>Auto</sub> dalam proses pemfermentasian substrat pepejal (sistem dulang) selepas 5 hari pemfermentasian	216
Gambar foto 6.2	Mikrograf OPF <sub>Auto</sub> sebelum pengkulturan (kawalan)	224

Gambar foto 6.3	Mikrograf OPF <sub>Auto</sub> selepas lima hari pengkulturan oleh <i>A. niger</i> USM AI1	225
Gambar foto 6.4	Mikrograf SEM <i>A. niger</i> USM AI1 yang tumbuh di atas OPF <sub>Auto</sub> pada hari pemfermentasian yang berlainan	291
Gambar foto 7.1	Proses fermentasi etanol yang dijalankan di dalam fermenter 5 L.	304
Gambar foto 7.2	Biojisim kering sel yis, <i>Candida utilis</i> yang diperolehi daripada pengkulturannya di dalam sisa penyulingan etanol	330

## SENARAI SINGKATAN

CF	Sabut kelapa
CM	Hampas isi kelapa
CMC	Karboksimetilselulosa
DNS	Asid dinitrosalisilik
FPA	Aktiviti kertas turas
LHM	Pengolahan air panas
LHS	Lignin-hemiselulosa-selulosa
LiP	Lignin peroksidase
LM	Mikroskop cahaya
MnP	Mangan peroksidase
OPF	Pelepah kelapa sawit
OPF <sub>Auto</sub>	Pelepah kelapa sawit diautoklaf pada 121°C selama 20 minit
OPT	Batang kelapa sawit
PDA	Agar dektrosa kontang
PH	Sekam padi
PKC	Isirung kelapa sawit
psm	Pusingan seminit
SB	Hampas tebu
SCP	Protein sel tunggal
SDA	Agar dektrosa Sabouraud
SEM	Mikroskop elektron penskanan
T	Hampas ubi kayu
TEM	Mikroskop elektron transmisi
WD	Habuk kayu



## ABSTRAK

### PEMBANGUNAN BIOPROSES PENUKARAN BAHAN BERLIGNOSELULOSA KEPADA GULA PENURUN DAN BIOETANOL

Pelbagai jenis bahan berlignoselulosa telah disaring untuk memperolehi gula penurun yang maksimum melalui sistem fermentasi substrat pepejal dengan menggunakan pelbagai jenis pencilan kulat. Penghasilan enzim penguraian bahan berlignoselulosa oleh setiap kulat pencilan adalah berbeza pada bahan lignoselulosa yang berlainan. Dalam kajian ini, pelepah kelapa sawit dan *Aspergillus niger* USMA11 telah dipilih sebagai substrat dan kulat yang berpotensi untuk penghasilan gula penurun selepas penyaringan. Penghasilan gula penurun oleh *A. niger* USM A11 pada pelepah kelapa sawit adalah sebanyak 53.90 mg/g substrat dan pertumbuhan kulat sebanyak 1.23 glukosamina/g substrat diperolehi di peringkat awal kajian. Kandungan holoselulosa dalam pelepah pokok kelapa sawit adalah sebanyak 60.71% (b/b). Proses pengolahan awal telah dilakukan pada substrat pelepah kelapa sawit dengan menggunakan kaedah fizikal dan kimia. Proses pengolahan awal pada pelepah kelapa sawit telah menyebabkan berlakunya perubahan morfologi pada permukaan pelepah kelapa sawit asal. Pelepah kelapa sawit yang diautoklaf dengan air (OPF<sub>Auto</sub>) merupakan proses pengolahan awal yang berkesan dan dapat diurai oleh *A. niger* USM A11 dengan menghasilkan sebanyak 70.20 mg/ g substrat gula penurun. Proses pengoptimuman parameter fizikal dan kimia telah dijalankan pada sistem pemfermentasian substrat pepejal untuk meningkatkan penghasilan gula penurun. Dalam sistem kelalang, penghasilan gula penurun selepas pengoptimuman parameter

fizikal dan kimia adalah sebanyak 200.15 mg/g substrat. Sistem pemfermentasian substrat pepejal yang optimum telah berjaya meningkatkan penghasilan gula penurun sebanyak 180% dalam sistem kelalang. Sementara itu, pengkulturan *A. niger* USM AI1 pada OPF<sub>Auto</sub> dalam sistem dulang pula mencapai penghasilan gula penurun sebanyak 185.00 mg/g substrat. Selepas pengotimuman dalam sistem dulang, penghasilan gula penurun telah meningkat sebanyak 35.75% berbanding dengan sebelum pengotimuman parameter fizikal dan kimia. Gula penurun yang diperolehi daripada OPF<sub>Auto</sub> yang dihidrolisis oleh *A. niger* USM AI1 di dalam sistem pemfermentasian substrat pepejal adalah terdiri daripada glukosa, xilosa dan fruktosa masing-masing adalah sebanyak 69.18%, 13.32% dan 17.50%. Gula penurun yang diperolehi seterusnya difermentasikan menggunakan yis *Saccharomyces cerevisiae* untuk penghasilan etanol. Kepekatan etanol yang dihasilkan dalam sistem botol medium sebelum pengotimuman parameter fizikal adalah 5.61 g/L dan selepas pengotimuman kepekatan etanol telah ditingkat kepada 23.10 g/L. Proses fermentasian etanol dalam fermenter sebelum pengotimuman telah menghasilkan kepekatan etanol sebanyak 15.40 g/L dan 20.51 g/L selepas pengotimuman. Dalam proses penghasilan protein sel tunggal, *Candida utilis* mampu menggunakan sisa penyulingan etanol yang kaya dengan xilosa sebagai sumber karbon untuk pertumbuhan sel. Peratusan gula yang terguna ialah 91.11% dan nilai penghasilan biojisim spesifik ( $Y_B$ ) yang tercapai ialah sebanyak 1.16 g biojisim/g gula. Proses pengolahan awal, penghidrolisisan dan pemfermentasian yang lebih cekap dan ekonomi perlu dibangunkan agar menjayakan projek ini.

## ABSTRACT

### DEVELOPMENT OF BIOPROCESS FOR THE CONVERSION OF LIGNOCELLULOLYTIC MATERIALS TO REDUCING SUGARS AND BIOETHANOL

Various types of lignocellulosic material were screened to obtain a maximum reducing sugar through solid substrate fermentation system by using different types of fungal strains. Production of lignocelluloses degrading enzymes on lignocellulosic material from each strain of fungus was varied with the types of lignocellulosic material used. In this research, oil palm frond and *Aspergillus niger* USM A11 were chosen as potential substrate and fungus for the production of reducing sugar after the screening process. Production of reducing sugar by *A. niger* USM A11 on oil palm frond was about 53.90 mg/ g substrate and fungal growth obtained was about 1.23 glucosamine/g substrate. The content of holocellulose in oil palm frond was about 60.71% (w/w). Oil palm fronds were pretreated using physical and chemical methods. Pretreatment process on the oil palm frond had caused the morphological changes on its surface. Oil palm fronds that were autoclaved using water (OPF<sub>Auto</sub>) were found to be the most effective pretreatment method resulting in enzyme production of 70.20 mg/g substrate reducing sugar. Optimizations of physical and chemical parameters were carried out in order to enhance the production of reducing sugar for the solid substrate fermentation. After the optimization of physical and chemical parameters the production of the reducing sugar achieved was 200.15 mg/g substrate using shake flask system. The production of reducing sugar in shake flask

system was successfully increased to 180% after the optimization. Meanwhile, the cultivation of *A. niger* USM A11 on OPF<sub>Auto</sub> in a tray system achieved maximum reducing sugar production of 185.00 mg/g substrate. After optimization in a tray system the production of reducing sugar resulted 35.75% increment compared to before optimization of physical and chemical parameters. Reducing sugar obtained from the OPF<sub>Auto</sub> hydrolysed by *A. niger* USM A11 through the solid substrate fermentation were glucose, xylose and fructose which achieved 69.18%, 13.32% and 17.50%, respectively. Reducing sugar obtained was later fermented with a yeast *Saccharomyces cerevisiae* for production of ethanol. Before optimization of physical parameter, the concentration of ethanol production through a medium bottle system was about 5.61 g/L, however after optimization of physical parameter, the concentration of ethanol was increased to 23.10 g/L. Fermentation process of ethanol before optimization in a fermenter able to produce 15.40 g/L ethanol and achieved 20.51 g/L ethanol after optimization. In the single cell protein production, *Candida utilis* was able to utilize the waste product of this ethanol distillation which riched with xylose as a carbon source for the cell growth. About 91.11% of the sugars were consumed, and the specific biomass production rate ( $Y_B$ ) produced was 1.16 g biomass/g sugars. Therefore, a more efficient and economical pretreatment, hydrolysis and the fermentation systems need to be developed to ensure the success of this project.

## BAB 1 PENGENALAN

Malaysia adalah sebuah negara dengan alam sekelilingnya yang kaya dengan berbagai-bagai jenis sumber pertanian dan perhutanan yang berguna kepada manusia (Ahmad, 1992). Setelah mencapai kemerdekaan, kemajuan ekonomi negara begitu pesat membangun dan sektor pertanian telah menjadi tulang belakang ekonomi Malaysia. Walaupun Malaysia telah melalui transformasi dari sebuah negara yang berasaskan sektor pertanian dan perlombongan ke sebuah negara yang berasaskan perindustrian dan perkhidmatan, namun sektor pertanian tetap memainkan peranan yang unggul bagi menjana ekonomi negara dan menyediakan bekalan makanan untuk rakyat pada dewasa ini.

Malaysia merupakan sebuah negara pertanian yang menjanakan sisa buangan pertanian daripada perladangan minyak sawit, getah, padi, nanas, koko, kelapa, tebu, hasil hutan dan pelbagai aktiviti pertanian kecil yang lain (Vikineswary *et al.*, 1997; Ibrahim, 2008). Jumlah ini dijangka akan meningkat pada kadar 10% setahun apabila negara dalam Rancangan Malaysia ke 10 menekan kepada Pertanian sebagai salah satu daripada sektor penting dalam memacu ekonomi negara kita (Ibrahim, 2008).

Sisa buangan pertanian yang terhasil biasanya tidak mempunyai nilai komersial. Oleh itu, didapati kurang daripada 10% daripada sisa buangan pertanian ini dikitar atau diguna semula, manakala selebihnya telah dibakar, dibuang atau dibiarkan mereput secara semula jadi. Sisa buangan pertanian mempunyai hubungan yang rapat dengan alam sekitar dan juga manusia. Pengendalian sisa buangan biojisim

yang tidak teratur akan menimbulkan masalah pencemaran alam sekitar dan seterusnya mengganggu kehidupan manusia sejagat (Cerqueira *et al.*, 2007).

Demi mengatasi masalah sisa buangan pertanian, strategi-strategi yang tertentu telah dipertimbangkan untuk meningkatkan penggunaan sisa buangan pertanian kepada aktiviti ekonomi yang mampu menjana perniagaan baru dalam masyarakat kita. Berdasarkan kekangan dalam memastikan alam sekitar tidak terjejas, hasil penyelidikan bioteknologi masa kini menekankan pendekatan yang akan hanya mempertimbangkan kaedah bioteknologi atau proses biologi yang mesra alam dan selamat kepada kehidupan haiwan dan tumbuhan serta manusia. Selain itu, pendekatan tersebut juga mensasarkan kepada kaedah pengurusan sisa buangan pertanian yang cekap dan mampu menjadi produk nilai tambah yang mempunyai potensi komersial (Wyk & Mohulatsi, 2003; Mette, 2005; Montemurro *et al.*, 2009).

Sisa buangan pertanian adalah terdiri daripada bahan lignoselulosa. Komponen asas biojisim tersebut adalah terdiri daripada selulosa (35-50%), diikuti dengan hemiselulosa (20-35%) dan lignin (10-25%) (Perez *et al.*, 2002). Manakala komponen sampingan adalah terdiri daripada protein, minyak dan abu bagi membentuk struktur biojisim lignoselulosa yang kukuh (Sjostrom, 1981; Fengel & Wegener, 1989). Memandangkan sisa buangan pertanian adalah terdiri daripada bahan lignoselulosa, proses pemfermentasian iaitu sistem fermentasi keadaan pepejal (SSF) atau hidrolisis enzim telah digunakan untuk menghasilkan produk baru yang bernilai dengan menggunakan kos yang rendah (Bjerre *et al.*, 1996; Schmidt & Thomsen, 1998; Pandey *et al.*, 2000; Tengerdy & Szakacs, 2003; Amit *et al.*, 2007; Gutierrez *et al.*, 2009; Tomas-Pejo *et al.*, 2009). Dewasa ini, sisa buangan pertanian

yang pepejal digunakan sebagai bahan mentah dalam proses pemfermentasian oleh mikroorganisma untuk menghasilkan produk yang mempunyai nilai komersial termasuklah enzim, asid organik, biopestisid, biobaja, makanan ternakan dan manusia, sebatian antibiotik dan gula terfermentasi (Viikari *et al.*, 1994; El-Hawary *et al.*, 2003; Lawford & Rousseau, 2003; Cara *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2009)

Malaysia menghasilkan lebih daripada 80% minyak mentah kelapa sawit melalui proses pengukusan dan pemerahan. Oleh itu, pengurusan sisa buangan kelapa sawit iaitu sabut, tempurung dan isirung merupakan masalah yang serius dalam industri tersebut. Sebanyak 31 juta tan tandan buah kelapa sawit dihasilkan pada setiap tahun. Di antaranya, 7.7 juta tan isirung, 6.0 juta tan sabut dan 2.4 juta tan tempurung buah sawit adalah dihasilkan sebagai sisa buangan pepejal (Iman & Nora, 2002). Walau bagaimanapun, hasil penyelidikan bioteknologi kini mendapati bahawa sisa buangan pertanian ini mempunyai potensi untuk penjanaaan ekonomi. Sisa buangan pertanian ini dapat bertindak sebagai substrat murah yang mampu menghasilkan gula campuran atau pun dikenali sebagai gula penurunan yang diperolehi apabila dihidrolisis dengan proses penghidrolisisan enzim atau pun dengan proses pengolahan.

Gula penurunan umumnya terdiri daripada gabungan xilosa, arabinosa, glukosa, galaktosa, fruktosa dan mannososa. Gabungan ini dapat bertindak sebagai sumber karbon dan boleh diformulasikan sebagai medium dalam proses fermentasian seterusnya menghasilkan bahan-bahan bernilai seperti bahan perisa makanan, bahan perwarna, bahan bakar bioetanol, dan biojisim sel (Sun & Cheng, 2002; Hendriks & Zeeman, 2009). Pendekatan ini turut merupakan konsep bioteknologi industri yang

menekankan penajanaan kekayaan melalui peningkatan nilai tambah produk menggunakan teknologi.

Sejak kebelakangan ini, sisa buangan pertanian yang semakin diberi perhatian ialah pelepah kelapa sawit iaitu hasil buangan industri minyak sawit (Laemsak & Okuma, 2000; WanRosli *et al.*, 2007). Dilaporkan Malaysia telah menghasilkan sebanyak 52.3 juta tan bahan lignoselulosa dari perladangan kelapa sawit pada tahun 1996. Angka ini telah melambung naik apabila perladangan kepala sawit mencapai 3.151 juta hektar pada 2000 (Chan, 1999). Chan (1999) juga melaporkan bahawa keluasan perladangan kelapa sawit 3.151 juta hektar dapat menghasilkan sebanyak 34.661 tan biojisim kering pelepah kelapa sawit. Walau bagaimanapun, keluasan tanaman kelapa sawit di Malaysia telah meningkat kepada 4.69 juta hektar pada akhir tahun 2009 iaitu merangkumi 60 peratus keseluruhan keluasan tanah pertanian negara Malaysia (Mamat, 2010).

Jadual 1.1 menunjukkan komposisi asas daripada pelepah kelapa sawit yang dilaporkan oleh Wan Rosli *et al.*, (2007). Kewujudan holoselulosa dan  $\alpha$ -selulosa yang tinggi pada pelepah kelapa sawit menjadikannya sesuai dijadikan sebagai substrat dalam proses pemfermentasian substrat pepejal. Menurut Law dan Wan Rosli (2001), serat pada pelepah kelapa sawit adalah terpanjang berbanding dengan serat kayu keras yang lain iaitu sehingga 1.59 mm. Penghasilan biojisim pelepah kelapa sawit yang tinggi dan berterusan serta mempunyai serat yang panjang adalah kelebihan pelepah kelapa sawit untuk digunakan sebagai substrat dalam proses pemfermentasian substrat pepejal. Penggunaan sisa buangan pertanian dalam proses



**Jadual 1.1: Komposisi kimia pelepah kelapa sawit (Wan Rosli *et al.*, 2007)**

<b>Komponen</b>	<b>Peratus (%)</b>
Lignin	15.2
Holosekulosa	82.2
$\alpha$ -selulosa	47.6
Bahan ekstraktif alkohol-benzena	1.4
Abu	0.70
<b>Komposisi polisakarida:</b>	
Arabinosa	1.5
Mannosa	2.2
Galaktosa	0.9
Glukosa	66.6
Xilosa	28.9

biopenukaran ini secara tidak langsung dapat membantu menangani masalah pencemaran alam sekitar (Pandey *et al.*, 2000).

Walaupun banyak kajian telah dijalankan mengenai hidrolisis bahan lignoselulosa dalam sisa buangan pertanian namun, keupayaan untuk ditukarkan kepada gula terfermentasi atau pun gula penurun masih merupakan satu bidang baru yang perlu dikaji dan dibangunkan (Perez *et al.*, 2002). Krisis tenaga dengan kenaikan harga petroleum telah memaksa kita mencari sumber tenaga alternatif. Walaupun punca tenaga boleh didapati daripada suria, air dan angin, namun dari segi kos penghasilan, punca tenaga ini memerlukan prasarana yang canggih yang mungkin tidak dapat disempurnakan oleh pengusaha dalam jangka masa yang singkat. Oleh yang demikian, pendekatan menggunakan sisa buangan pelepah kelapa sawit dari perladangan sebagai bahan mentah, dan mikroorganisma digunakan untuk menguraikannya kepada gula penurun seterusnya diubah kepada bahan bakar bioetanol dengan mudah telah diberi perhatian (Juhasz *et al.*, 2005).

Kini, bioetanol merupakan bahanapi alternatif yang telah banyak digunakan untuk menggerakkan kenderaan seperti yang telah dilaksanakan di negara barat dan Brazil (Bungay, 1983). Kerajaan Malaysia telah melancarkan Projek Penjanaan Kuasa Biojisim dengan tujuan mengurangkan kandungan 'gas rumah hijau' dengan menjanakan tenaga daripada bahan biojisim terutamanya dalam sektor penanaman kelapa sawit.

## 1.1 OBJEKTIF PENYELIDIKAN

Dewasa ini, kajian penghasilan gula penurun daripada bahan berlignoselulosa semakin giat dijalankan. Proses penghidrolisis enzim pada bahan berlignoselulosa melalui sistem pemfermentasian substrat pepejal pula semakin diberi perhatian, memandangkan kaedah ini boleh menghasilkan kepekatan gula yang tinggi. Oleh itu, kajian tentang pengolahan, proses hidrolisis, pencirian gula terbentuk dalam hasil penghidrolisisan serta pemfermentasian gula biojisim yang terbentuk merupakan topik-topik yang penting dan akan dikaji dalam kajian ini.

Penyelidikan ini dilaksanakan dengan tumpuan ke atas proses penguraian sisa buangan pertanian (pelepah kelapa sawit) sebagai sumber substrat melalui proses pemfermentasian substrat pepejal (SSF) dengan menggunakan kulat untuk menghasilkan gula penurun (gula terfermentasi) bagi penghasilan etanol sebagai bahan api yang boleh diperbaharui dan berkos rendah. Oleh itu, antara beberapa objektif yang ingin dicapai dalam penyelidikan ini ialah:

- Melaksanakan penyaringan ke atas pelbagai bahan buangan pertanian (bahan berlignoselulosa) sebagai sumber substrat dalam proses SSF dengan menggunakan kulat, untuk memperolehi penghasilan gula penurun yang tinggi. Pelbagai aktiviti enzim dalam proses penguraian substrat melalui SSF juga ditentukan.
- Mejalankan pengolahan ke atas pelepah kelapa sawit (OPF) supaya suatu bahan berlignoselulosa yang bersih serta mudah untuk proses

penghidrolisisan dapat dihasilkan. Perubahan morfologi permukaan OPF setelah proses pengolahan akan dilihat di bawah mikroskop elektron pensakanan (SEM).

- Mengoptimumkan keadaan pengkulturan SSF bagi penghasilan gula penurun yang maksimum dalam kelalang dan dulang. Parameter-parameter yang akan dioptimumkan dalam penyelidikan ini adalah parameter fizikal dan parameter kimia.
- Melihat perubahan morfologi yang berlaku ke atas OPF selepas proses penghidrolisisan oleh *Aspergillus niger* USM A11 pada sela masa tertentu. Penyelidikan ini adalah bertujuan untuk mengkaji mekanisme pertumbuhan *Aspergillus niger* USM A11 pada OPF dan perubahan struktur luaran dan dalaman pada OPF dalam proses penghidrolisian. Dalam kajian ini mikroskop cahaya, mikroskop elektron pensakanan (SEM) dan mikroskop elektron transmisi (TEM) digunakan.
- Mencirikan gula penurun yang terhasil dengan menggunakan kromatografi cecair berprestasi tinggi (HPLC).
- Mengoptimumkan proses pemfermentasian etanol oleh sel yis *Saccharomyces cerevisiae* dengan menggunakan gula penurun yang dihasilkan.

## 2.0 TINJAUAN BAHAN BACAAN

### 2.1 KEWUJUDAN BIOJISIM DI ALAM SEMULA JADI

Biojisim ditakrifkan sebagai bahan semula jadi yang diperolehi daripada haiwan, tumbuhan dan sisa buangan manusia yang mengandungi karbon, nitrogen dan oksigen (Hall, 1981). Selain itu, biojisim juga boleh ditakrifkan sebagai tenaga yang dijana daripada proses pereputan benda-benda hidup. Bahan-bahan ini boleh digunakan sebagai bahan api atau dalam industri. Selalunya, biojisim merujuk kepada tumbuhan yang ditanam untuk digunakan sebagai bahan api biologi, tetapi reputan pohon atau haiwan yang digunakan dalam penghasilan serat, bahan kimia atau haba juga boleh dikategorikan sebagai biojisim. Di samping itu, sisa buangan terbiodegradasi yang boleh dibakar sebagai bahan api juga dianggap sebagai biojisim. Namun bahan organik yang telah ditukar oleh proses geologi kepada bahan seperti arang batu atau petroleum tidak dianggap sebagai biojisim. Namun, menurut Eliason (1981) tisu tumbuhan dan bahan buangan organik adalah merupakan sumber biojisim yang utama di dunia ini. Manakala, Goodman & Love (1981) pula menakrifkan biojisim sebagai tumbuhan yang dapat diproseskan menjadi makanan dan serat serta bahan kimia, dan merupakan sumber tenaga boleh diperbaharui yang paling asas dan tertua. Biojisim adalah berasal daripada bekalan tenaga daripada proses fotosintesis yang disimpan dalam bentuk biojisim, seperti pada pokok-pokok di sekeliling kita (Hall, 1979).

Biojisim bahan tumbuh-tumbuhan adalah terdiri daripada karbohidrat berlignoselulosa, bahan lignin dan sebagainya. Lignoselulosa merupakan bahan organik semulajadi, merangkumi kira-kira 50 % daripada keseluruhan biojisim dunia,

dan setiap tahun penghasilannya pada setiap tahun adalah sekitar  $50 \times 10^9$  tan (Goldstein, 1981; Milstein *et al.*, 1993). Selulosa, hemiselulosa dan lignin merupakan komponen dasar bahan berlignoselulosa. Lignoselulosa menyumbang kepada kekakuan dan kekuatan mekanik kepada dinding sel tumbuhan, mengurangkan ketelapan air menerusi dinding sel tisu xilem dan juga mengawal komponen polisakarida pokok daripada serangan mikrob (Crawford, 1981). Lignoselulosa banyak ditemui di lamela tengah sel pada tisu vaskular tumbuhan tinggi, paku-pakis serta lumut (Freudenberg, 1968). Walau bagaimanapun, lignoselulosa tidak ditemui di dalam sel-sel tumbuhan primitif seperti lumut sebenar dan lumut hati (Eriksson & Mische, 1974). Selain itu, kehadiran bahan pektin yang juga merupakan sebahagian daripada komponen tumbuhan juga dianggap sebagai biojisim. Walaupun pektin hadir dalam kuantiti yang kecil, namun pektin memainkan peranan yang penting dalam pembentukan struktur dinding sel tumbuhan yang kukuh.

Di samping itu, kayu-kayan dan sisa buangan bahan pertanian contohnya, sekam padi, rumput, hampas tebu, jerami padi, sabut kelapa dan bahan buangan daripada kelapa sawit seperti pelepah, tempurung, batang, tandan dan hampas daripada kilang perahan minyak sawit telah menjadi sumber biojisim yang penting untuk digunakan dalam penghasilan bioetanol (Michelle, 2007; Baratiera *et al.*, 2008; Joshua *et al.*, 2008; Sanchez & Cardona, 2008; Keshwani & Cheng, 2009; Gutierrez *et al.*, 2009).

Kandungan biojisim adalah berbeza antara sumber-sumbernya (Perez *et al.*, 2002), tetapi secara umumnya adalah terdiri daripada 25% lignin dan 75% karbohidrat atau gula. Antara julat dua komponen utama tersebut, kebanyakan spesies tumbuhan

mengandung lebih kurang 5% bahagian pecahan molekul kecil yang dikenali sebagai bahan ekstrak. Bahagian karbohidrat adalah terdiri daripada banyak molekul gula yang digabung bersama dalam rantai yang panjang atau dipolimerisasi. Selulosa dan hemiselulosa adalah dua kategori karbohidrat besar yang mempunyai nilai yang signifikan. Lignin pula terdiri daripada molekul jenis bukan gula yang digabungkan bersama dalam dua dimensi besar struktur seperti kepingan yang terbentuk daripada ikatan rawak unit-unit polimer (Clarke, 1997).

## **2.2 SUMBER-SUMBER BIOJISIM**

Biojisim adalah sejenis sumber tenaga yang boleh diperbaharui yang terdiri daripada pelbagai jenis sisa buangan manusia dan kegiatan semula jadi yang mempunyai komponen karbon di dalamnya. Sumber biojisim merangkumi skop yang luas, termasuk sisa buangan industri pembalakan, sisa buangan pertanian, sumber mentah daripada hutan, najis haiwan, baja dan sebagainya.

### **2.2.1 Sisa buangan pepejal**

Aktiviti harian kita telah menghasilkan sejumlah sisa buangan pepejal dalam kuantiti yang banyak. Kuantiti dan ciri-ciri sisa ini berubah dari masa ke semasa mengikut perkembangan ladang, desa atau bandar. Di kawasan bandar, terdapat suatu sistem tertentu untuk pengumpulan dan pelupusan sisa buangan. Manakala, pengumpulan dan pelupusan bahan-bahan buangan di kawasan luar bandar di negara-negara sedang membangun adalah bergantung kepada individu. Oleh yang demikian, sisa buangan pepejal tersebut dipandangkan sebagai bahan pencemaran yang akan mendatangkan

masalah kepada kesihatan kita. Justeru itu, sisa buangan pepejal harus ditukarkan menjadi sumber-sumber tenaga lain, agar masalah yang dihadapi dapat diatasi (Ibrahim, 2008).

### **2.2.2 Sisa buangan pertanian**

Di banyak negara maklumat-maklumat untuk bahagian tanaman pertanian banyak disediakan, manakala maklumat-maklumat tentang pengurusan sisa yang tertinggal di lapangan atau di tapak pemprosesan yang boleh digunakan sebagai sumber tenaga pula adalah terhad. Sisa-sisa ini adalah merupakan sisa pertanian primer. Pelbagai kaedah telah dikembangkan untuk menganggar jumlah dan kos sisa buangan tanaman untuk kegunaan sebagai sumber tenaga yang boleh diperbaharui.

Negara kita merupakan sebuah negara dengan ekonominya masih bergantung kepada sektor pertanian. Hampir 3.87 juta hektar luas tanah digunakan untuk penanaman kelapa sawit, 34 ribu hektar untuk pisang dan 15 ribu hektar untuk penanam nanas. Selebihnya termasuk tanaman lain seperti tebu, sagu, padi dan sebagainya. Oleh itu, banyak sisa buangan pertanian dihasilkan semasa proses penuaian hasil (Khalil *et al.*, 2006). Sisa buangan yang biasa dihasilkan ialah sisa kelapa sawit seperti batang, pelepah dan isirung, hampas tebu, sekam padi, hampas sagu, habuk kayu dan pelbagai sisa buangan lain yang kaya dengan bahan berlignoselulosa (Pandey *et al.*, 2000; Hernandez-Salas *et al.*, 2009). Namun, sisa buangan pertanian yang dihasilkan tersebut biasanya tidak mempunyai nilai komersial dan pengurusannya juga tidak dilakukan dengan berkesan walaupun sisa-sisa tersebut dilaporkan mengandungi bahan lignoselulosa yang tinggi. Cara pengurusan hasil dan sisa buangan pertanian



yang berbeza antara ladang-ladang dengan kebun kecil dan kekurangan langkah pengawalan pihak berkuasa juga telah mengakibatkan jumlah sisa buangan pertanian yang terhasil pada setiap tahun sukar dianggarkan.

Sisa buangan pertanian yang tidak diurus dengan baik telah menimbulkan masalah pencemaran alam sekitar yang akan mempengaruhi kehidupan masyarakat. Pembakaran sekam padi dan jerami padi yang berleluasa di negeri Kedah telah dilaporkan bukan sahaja menimbulkan masalah pencemaran udara tetapi juga menjadi punca kemalangan jalan raya akibat daripada asap dan habuk yang dihasilkan daripada pembakaran (Ibrahim, 2008). Di negara kita, pembakaran sisa buangan pepejal pertanian merupakan pilihan utama pengusaha ladang untuk menguruskan bahan buangan pepejal pertanian. Ini kerana 'pembakaran' merupakan cara yang murah dan masalah sisa pertanian dapat diselesaikan dengan cepat. Selain itu, abu atau habuk sisa pembakaran pula dapat dijadikan baja untuk menyuburkan tanah di ladang. Oleh itu, kaedah pengurusan sisa buangan pertanian yang digunakan mestilah unggul agar tidak menimbulkan masalah pencemaran alam malah sisa buangan tersebut dapat digunakan untuk memperolehi hasil akhir yang mempunyai nilai komersial.

### 2.2.3 Sisa kayu-kayan

Sisa kayu-kayan adalah meliputi pelbagai sisa yang dihasilkan daripada pertumbuhan dan pembalakan kayu balak komersial. Sisa kayu-kayan ini termasuk sisa pembalakan, penebangan pokok untuk penipisan hutan (Purwadi & Taherzadeh, 2008), penyingkiran pokok-pokok yang muda di kalangan pokok-pokok yang tidak sama usia, dan penebangan pokok yang mati secara semula jadi. 'Pin chips' adalah merupakan contoh produk sampingan daripada industri pembalakan. 'Pin chips' tersebut adalah diperolehi daripada sisa permotongan balak (Kim *et al.*, 2005).

### 2.2.4 Biojisim tumbuhan akuatik

Peningkatan populasi dunia telah meningkatkan persaingan untuk mendapatkan tanah di sesetengah negara. Akibatnya, kawasan-kawasan tanah pinggir laut dan tanah yang masih tidak digunakan dapat digunakan dalam tujuan penghasilan biojisim. Oleh itu, tumbuhan akuatik telah dipertimbangkan sebagai sumber tenaga. Tumbuhan laut telah digunakan untuk makanan dan malah sesetengah spesies rumpai laut pula digunakan secara komersial untuk menghasilkan bahan-bahan kimia (Etheridge *et al.*, 1985). *Porphyra umbilicalis* adalah merupakan sejenis rumpai laut ungu-hitam yang dikultur secara besar-besaran di Japan, Korea dan China bagi tujuan penghasilan makanan manusia (Blouin *et al.*, 2007). Justeru itu, tumbuhan akuatik sememangnya menawarkan potensi yang tinggi kerana tumbuhan akuatik dapat dituai dengan lebih mudah dan cepat.

### 2.2.5 Tanaman tenaga

Konsep penanaman tanaman tenaga ialah penggunaan tanah yang terbiar atau yang tidak digunakan dengan sepenuhnya sebagai ladang tenaga. Contoh-contoh tanaman tenaga yang telah dicadangkan ialah tebu, ubi kayu, kacang soya dan sebagainya (Gong *et al.*, 1993; Boucher *et al.*, 2007; Hernandez-Salas *et al.*, 2009; Nunes *et al.*, 2009).

Konsep ladang tenaga adalah menggunakan pokok-pokok di ladang yang mempunyai masa kitaran pertumbuhan yang singkat dengan tujuan mengoptimumkan penghasilan biojisim dengan menimbangkan kos untuk operasi. Pokok-pokok di ladang tenaga ditumbuhkan dengan rapat untuk jangka masa yang singkat. Spesies pokok yang tumbuh di ladang tanaman tenaga dapat bertumbuh dengan cepat dan dapat ditebang dalam jangka masa yang pendek iaitu antara 3 hingga 4 tahun serta berketumpatan yang tinggi. Selain itu, spesies tersebut juga dapat tumbuh semula daripada batang kayu yang masih tertinggal dalam tanah dan dapat menebangnya dalam jangka masa 20-30 tahun. Kini, hutan berkitaran pertumbuhan pendek dikatakan dapat bersaing dengan sumber tenaga yang tidak dapat diperbaharui.

Mempelbagaikan spesies tumbuhan tanaman atau menglonkan pelbagai tumbuhan daripada spesies yang sama dijangka dapat mengurangkan risiko bahaya biologi yang mungkin disebabkan oleh monokultur. Selain itu, sistem ini juga membenarkan penyaraan hidupan liar, menjamin kepelbagaian hasil dan memudahkan penubuhan ladang tenaga yang berkesan di kawasan luar bandar.

Proses penghutanan semula, memberi banyak faedah seperti penggunaan hasil daripada kayu balak, pulpa kayu dan sebagainya. Pelbagai jenis tanaman juga dapat ditanam di ladang tanaman tenaga, contohnya tanaman tumbuhan tidak berkayu. Tanaman tersebut adalah tumbuhan yang mempunyai batang lembut dan tidak membentuk tisu berkayu. Seseengah tanaman tumbuhan yang tidak berkayu mempunyai pelbagai kebaikan berbanding dengan tanaman berkayu seperti dari segi hasil atau pun proses penukaran. Contohnya, tanaman tebu dapat difermentasikan menjadi etanol yang dapat digunakan untuk menggantikan bahan api diesel (Gong *et al.*, 1993).

### **2.3 BAHAN LIGNOSELULOSA MERUPAKAN SUMBER TENAGA YANG BOLEH DIPERBAHARUI**

Lignoselulosa adalah satu kompleks yang terdiri daripada selulosa, hemiselulosa dan lignin yang bersepadu secara fizikal dan kimia dengan pelbagai ikatan seperti eter, ester asetal, ketal dan hidrogen yang mengikat bahagian-bahagian lignin dan hemiselulosa bersama (Lai & Sarkanen, 1971; Erikson *et al.*, 1980). Manakala lignoselulosa pada rumput pula dicirikan dengan kehadiran asid ferulik, asid kumarik dan asid diferulik berester (Lai & Sarkanen, 1971; Hartley, 1973), yang melekat pada lignin dan polisakarida (Atsushi *et al.*, 1984).

### 2.3.1 Komposisi bahan berlignoselulosa

Lignoselulosa adalah biopolimer yang dapat dijumpai secara semula jadi dan membentuk lebih daripada 60% biojisim tumbuhan yang terdapat di dunia (Tengerdy & Szakacs, 2003). Lignoselulosa merupakan substrat yang lebih rencam berbanding dengan kanji. Molekul lignoselulosa adalah terdiri daripada gabungan polimer karbohidrat (selulosa dan hemiselulosa) dan lignin (Fengel & Wegener, 1989). Lignin akan menghubungkan polimer karbohidrat tersebut melalui ikatan hidrogen dan kovalen (Lee, 1997).

Komposisi kimia pada kayu adalah terdiri daripada pelbagai komponen seperti selulosa, hemiselulosa, lignin, berbagai-bagai jenis bahan ekstrak dan bahan tidak organik (Cowling & Brown, 1969). Walau bagaimanapun, komposisi kimia kayu keras adalah sangat berbeza berbanding dengan komposisi kimia pada kayu lembut. Secara umumnya, kayu keras mempunyai kandungan lignin yang kurang dan kandungan hemiselulosa yang lebih tinggi berbanding dengan kayu lembut (Lewis & Ritter, 1954). Manakala bahan-bahan ekstrak yang lain seperti minyak tumbuhan, protein dan abu didapati memenuhi pecahan biojisim berlignoselulosa yang lain (Wyman, 1994).

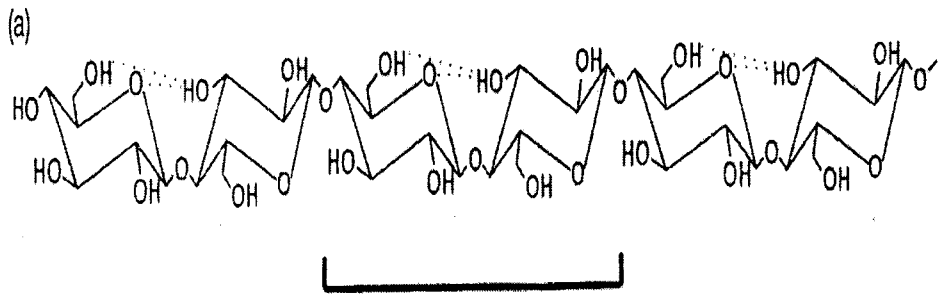
#### 2.3.1.1 Selulosa

Selulosa adalah karbohidrat utama yang disintesiskan oleh tumbuhan dan merupakan polimer organik yang paling banyak di alam semula jadi. Formula molekul umum polisakarida tersebut diwakili oleh  $(C_6H_{10}O_5)_n$ . Selulosa ialah polimer lurus yang

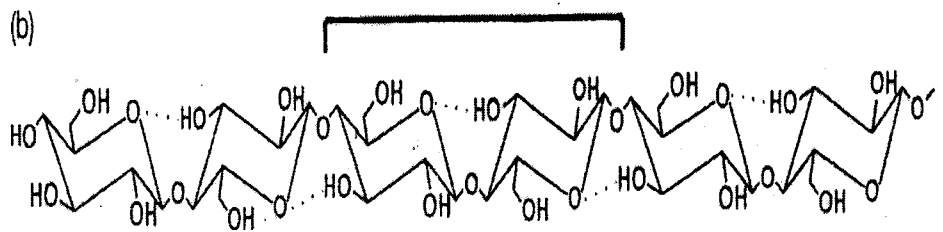
tidak bercabang dan terdiri daripada unit-unit anhidroglukosa (anhydroglucose) yang terikat bersama dengan ikatan  $\beta$ -D-1,4-glukosidik. Molekul glukosa berputar  $180^\circ$  pada paksi utama, dengan residu jirannya. Rangkaian ini menghasilkan rangkaian unit yang dikenali sebagai selobiosa (Rajah 2.1). Selulosa mempunyai struktur berlapis dengan rantaian tunggal yang dihubungkan dengan ikatan hidrogen dan daya van der Waals untuk menghasilkan ciri keteguhan kepada molekul selulosa (Laureano-Perez *et al.*, 2005). Selulosa dapat wujud dalam dua jenis konfigurasi yang stabil iaitu  $k_I$  dan  $k_{II}$ .

Pada konfigurasi  $k_I$ , oksigen dalam kumpulan hidroksil C-6 dan oksigen dalam gelang pada sesuatu unit residu glukosil yang sama akan bertindak sebagai penderma elektron dan membentuk dua ikatan hidrogen dengan proton dalam kumpulan hidroksil C-3 bagi unit glukosil yang berhampiran (Rajah 2.1a). Manakala dalam bentuk  $k_{II}$  ikatan molekul adalah lebih ringkas iaitu oksigen pada gelang bagi sesuatu unit glukosil akan bertindak sebagai penderma elektron dan membentuk satu ikatan hidrogen dengan kumpulan hidroksil C-3 dalam unit glukosil yang berdekatan (Rajah 2.1b).

Di alam semula jadi, selulosa biasanya wujud dalam bentuk tidak tulen dan terikat dengan lignin, pentosa, gam, tanin, bahan-bahan berwarna dan bahan-bahan lain. Selulosa yang tulen pada tumbuhan secara amnya terdiri daripada rantaian polimer panjang yang mempunyai unit-unit glukosa. Perbezaan dalam darjah pempolimeran dan penghabluran telah mengakibatkan ciri-ciri selulosa berbeza antara satu sama



**Selobiosa**



**Rajah 2.1: Lakaran komposisi dan rangkaian ikatan hidrogen bagi selulosa (a)  $k_I$  dan (b)  $k_{II}$ . Unit ulangan asas dalam rantai selulosa ialah selobiosa.**

(Sumber: Clarke, 1997)

lain. Ciri-ciri tersebut adalah dipengaruhi oleh sumber, umur dan proses pengolahan awal bagi bahan selulosa yang dikaji. Sementara itu, darjah penghabluran adalah ditentukan oleh darjah pengikatan hidrogen dalam molekul selulosa. Mikrofibril selulosa yang wujud pada  $k_I$  yang berdarjah pengikatan hidrogen yang tinggi dapat menghasilkan kawasan dengan darjah penghabluran yang tinggi. Di samping itu, mikrofibril selulosa juga boleh wujud dalam keadaan yang kurang teratur dan membentuk kawasan amorfus yang mungkin terdiri daripada selulosa dalam konfigurasi  $k_I$  dan  $k_{II}$ . Darjah penghabluran, darjah pempolimeran dan kelebaran mikrofibril selulosa adalah berbeza dari 0% dalam selulosa amorfus dan selulosa yang terbengkak dengan asid kepada 70% dalam serabut kapas (Wood, 1988) dan menurut Henrissat (1985), sebanyak 100% dalam selulosa yang terpecil daripada *Valonia macrophysa*. Manakala darjah penghabluran bagi kebanyakan selulosa komersil lingkungan perbezaan hanya dari tiga puluh hingga tujuh puluh peratus.

Selulosa mempunyai darjah keterlarutan yang berlainan dalam larutan natrium hidroksida.  $\alpha$ -selulosa adalah selulosa yang tidak larut dalam larutan natrium hidroksida 17.5% (b/i) pada suhu bilik.  $\beta$ -selulosa pula merujuk kepada selulosa yang larut dalam larutan natrium hidroksida 17.5% (b/i) pada suhu bilik tetapi dapat dimendapkan semula apabila larutan diasidkan. Manakala  $\gamma$ -selulosa ialah selulosa yang larut dalam larutan natrium hidroksida 17.5% (b/i) pada suhu bilik dan tidak dapat dimendapkan semula dengan asid sebaliknya dapat dimendapkan dengan menggunakan alkohol. Antara semua jenis selulosa tersebut hanya  $\alpha$ -selulosa sahaja dianggap sebagai selulosa tulen. Proses penghidrolisis yang lengkap pada  $\alpha$ -selulosa dengan asid kuat akan menghasilkan glukosa. Selulosa yang larut dalam larutan natrium hidroksida 17.5% (b/i) adalah hemiselulosa. Sementara itu, kandungan



selulosa dan hemiselulosa yang wujud dalam tisu tumbuhan dikenali sebagai holoselulosa.

Struktur selulosa yang padat dan kehadiran hemiselulosa serta lignin telah menyusahkan penyerapan enzim selulolisis ke dalam fibril (Lutzen *et al.*, 1983). Hidrolisis selulosa memerlukan kompleks enzim selulase yang terdiri daripada enzim endoglukanase, eksoglukanase, dan  $\beta$ -glukosidase. Enzim endoglukanase bertindak pada rantai selulosa dan membebaskan selo-oligosakarida. Enzim eksoglukanase pula memutuskan unit-unit selobiosa daripada hujung rantai selulosa. Manakala  $\beta$ -glukosidase pula menukarkan selobiosa kepada glukosa (Juhasz *et al.*, 2005). Menurut Ibrahim (1994) mikroorganism yang mampu menghasilkan selulase ialah *A. niger*, *Trichoderma viride* dan *Neurospora* sp.

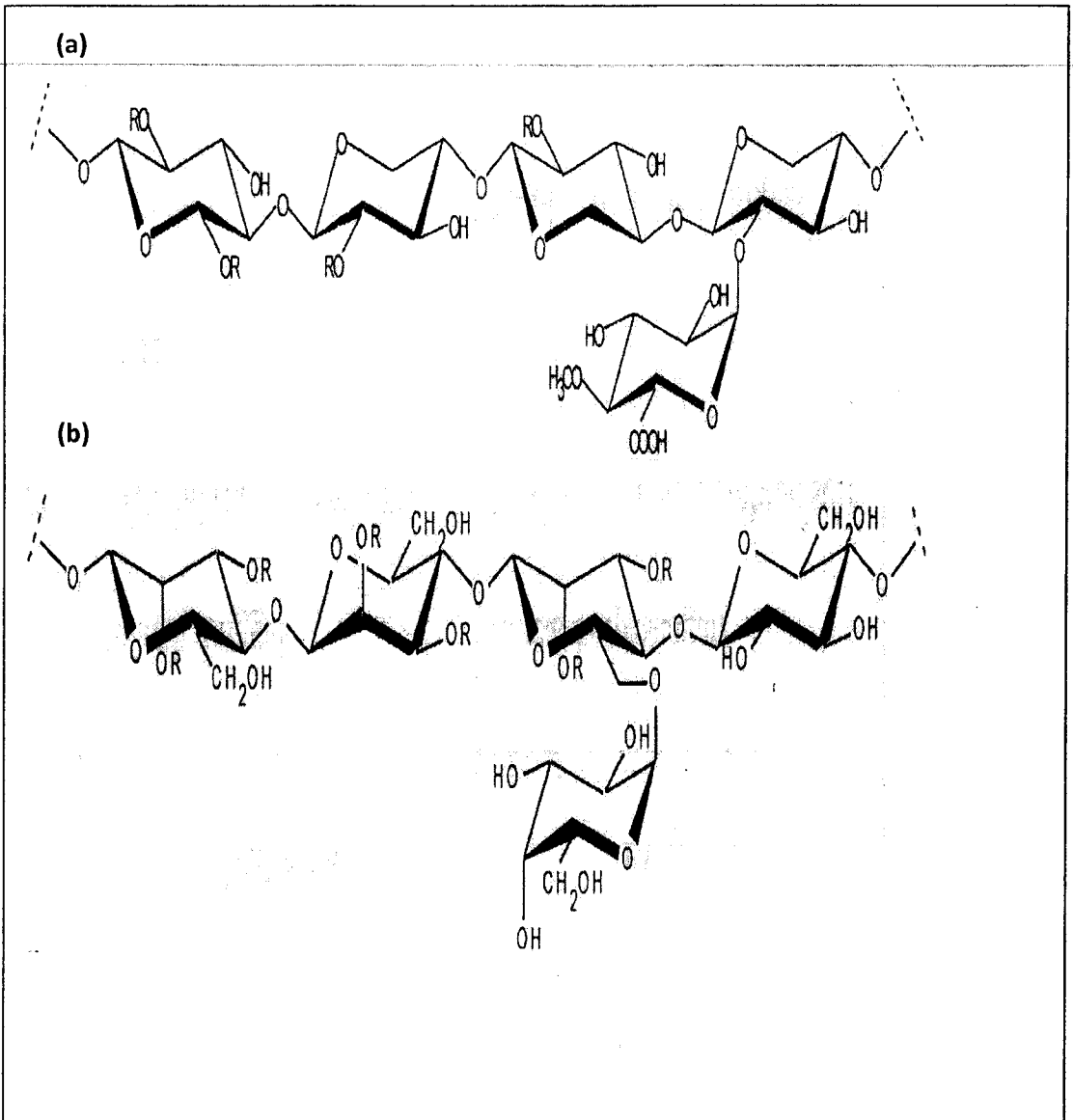
### **2.3.1.2 Hemiselulosa**

Hemiselulosa adalah polisakarida bukan selulosa yang terdapat dalam dinding sel tumbuhan gimnosperma dan dinding sel sekunder dalam tumbuhan angiosperma. Hemiselulosa wujud dalam lamela tengah sel tumbuhan dan fungsinya adalah memberi kekuatan dan kelenturan kepada dinding sel tumbuhan. Hemiselulosa adalah polisakarida yang pendek atau polimer bercabang yang dikaitkan dengan selulosa dan merangkumi 50% daripada selulosa fibril kayu. Kebanyakan hemiselulosa tidak larut dalam air, larut dalam alkali, dan mudah dihidrolisiskan oleh asid berbanding dengan selulosa. Hemiselulosa juga tersebar meluas dalam bahagian tumbuhan dan sering ditemui bergabung dengan selulosa serta berikat silang dengan lignin dalam lignoselulosa.

Hemiselulosa yang berasal daripada tumbuhan berkayu mempunyai berbagai-bagai jenis karbohidrat yang berbeza. D-xilosa adalah merupakan komponen gula yang utama dalam hemiselulosa. Manakala, komponen-komponen lain yang mungkin hadir ialah seperti D-manosa, D-glukosa, D-galaktosa, L-arabinosa, D-asid glukuronik, asid 4-O-metil-D-glukuronik dan D-asid galakturonik (Whisler & Richards, 1970; Hendriks & Zeeman, 2009). Gula-gula tersebut digabung bersama melalui  $\beta$ -1,4-glikosidik atau pun kadang-kadang digabung bersama dengan ikatan  $\beta$ -1,3-glikosidik (Rajah 2.2). Glukuronoxilan merupakan komponen utama hemiselulosa pada kayu keras (Rajah 2.2a), manakala glukomanan pula merupakan komponen pradominen dalam tumbuhan berkayu lembut (Rajah 2.2b) (Perez *et al.*, 2002). Hemiselulosa yang wujud pada kompleks lignin-karbohidrat pada rumput terdiri daripada arabinosa-4-O-metil glukuronoxilan (Azuma *et al.*, 1985). Secara umumnya, hemiselulosa mempunyai dua hingga enam jenis unit-unit pentosa dan heksosa. Di samping itu, darjah pempolimerannya adalah lebih rendah iaitu kurang daripada dua ratus unit dan pengelasan hemiselulosa adalah berasaskan taburan unit gula tersebut.

### **2.3.1.3 Lignin**

Lignin adalah makromolekul bercabang yang mengandungi struktur aromatik yang kompleks dan saling terikat serta mempunyai berat molekul yang tinggi iaitu 10,000 Dalton. Kratzl (1965) mengulaskan bahawa lignin adalah komponen bukan karbohidrat yang utama dalam kayu dan kandungannya berubah-ubah antara 15 hingga 35%.



**Rajah 2.2: Komponen-komponen utama dalam hemiselulosa. (a) O-asetil-4-O-metilglukuronoxilan daripada tumbuhan angiosperma. (b) O-asetil-galaktoglukomanan daripada tumbuhan gimnosperma.**

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

Secara umumnya, lignin dapat dikategorikan kepada dua kumpulan iaitu lignin guaiasil dan lignin-siringil. Lignin guaiasil dapat dijumpai dalam tumbuhan yang berkayu lembut (gimnosperma) seperti lignin pokok sprus. Lignin guaiasil-siringil pula kerap ditemui dalam kebanyakan tumbuhan berkayu keras (angiosperma) seperti pada kayu bic (Kirk & Farrell, 1987; Sakakibara, 1983).

Lignin dapat membantu dalam pengagihan tekanan yang dialami oleh dinding sel. Lignin juga bertanggungjawab ke atas kekuatan dinding sel tanpa mempengaruhi sifat kelenturan struktur komposit tersebut (Perez *et al.*, 2002). Selain itu, kehadiran lignin juga memberi pelbagai kelebihan kepada tumbuhan vaskular untuk berkembang dan bertumbuh di alam semula jadi.

- a. Pergabungan lignin dalam dinding sel tumbuhan menyumbangkan kepada ciri-ciri kekuatan mekanikal. Kehadiran lignin dapat memperkuat kekuatan hablur selulosa dan membolehkan tumbuhan bertumbuh dengan tinggi.
- b. Sifat hidrofobik lignin dapat mencegah proses penyerapan atau penyejatan daripada berlaku. Hal ini membolehkan tisu xilem dapat bertindak sebagai agen pengangkutan air dalam tumbuhan melalui suatu jarak yang jauh serta tidak menghadapi masalah kehilangan air. Selain itu, sifat hidrofobik dapat menghalang terjadinya pembengkakan selulosa untuk melarutkan hemiselulosa oleh sebatian hidrofilik lain (Thompson, 1983a).
- c. Lignin dalam dinding sel tumbuhan dapat mencegah proses penguraian. Sifat ini membolehkannya bertindak sebagai satu lapisan pelindung untuk menyekat serangan patogen dan binatang herbivor.