

PROTEKSI ISI LAPORAN AKHIR PENELITIAN

Dilarang menyalin, menyimpan, memperbanyak sebagian atau seluruh isi laporan ini dalam bentuk apapun kecuali oleh peneliti dan pengelola administrasi penelitian

LAPORAN AKHIR PENELITIAN TAHUN TUNGGAL

ID Proposal: aac5b4c0-382c-424b-88f6-2ad219e36325
Laporan Akhir Penelitian: tahun ke-1 dari 1 tahun

1. IDENTITAS PENELITIAN

A. JUDUL PENELITIAN

METODE ISOLASI LIGNIN DARI LIMBAH CAIR INDUSTRI PULP SEBAGAI ANTIMIKROBA

B. BIDANG, TEMA, TOPIK, DAN RUMPUN BIDANG ILMU

Bidang Fokus RIRN / Bidang Unggulan Perguruan Tinggi	Tema	Topik (jika ada)	Rumpun Bidang Ilmu
Kesehatan	Teknologi kemandirian bahan baku obat	Pengembangan fitofarmaka berbasis sumber daya lokal	Perkebunan

C. KATEGORI, SKEMA, SBK, TARGET TKT DAN LAMA PENELITIAN

Kategori (Kompetitif Nasional/ Desentralisasi/ Penugasan)	Skema Penelitian	Strata (Dasar/ Terapan/ Pengembangan)	SBK (Dasar, Terapan, Pengembangan)	Target Akhir TKT	Lama Penelitian (Tahun)
Penelitian Kompetitif Nasional	Penelitian Tesis Magister	SBK Riset Dasar	SBK Riset Dasar	2	1

2. IDENTITAS PENGUSUL

Nama, Peran	Perguruan Tinggi/ Institusi	Program Studi/ Bagian	Bidang Tugas	ID Sinta	H-Index
SRI HIDAYATI Ketua Pengusul	Universitas Lampung	Teknologi Industri Pertanian		6037882	2
Ferdiansyah Mulia Mahasiswa Bimbingan 1	swasta	-	melakukan penelitian dan membuat laporan penelitian	0	0
Ir SUBEKI M.Si Dosen Pembimbing Anggota 1	Universitas Lampung	Teknologi Industri Pertanian	membimbing analisis kimia dan mikrobiologi	6152429	11

3. MITRA KERJASAMA PENELITIAN (JIKA ADA)

Pelaksanaan penelitian dapat melibatkan mitra kerjasama, yaitu mitra kerjasama dalam melaksanakan

penelitian, mitra sebagai calon pengguna hasil penelitian, atau mitra investor

Mitra	Nama Mitra
-------	------------

4. LUARAN DAN TARGET CAPAIAN

Luaran Wajib

Tahun Luaran	Jenis Luaran	Status target capaian (<i>accepted, published, terdaftar atau granted, atau status lainnya</i>)	Keterangan (<i>url dan nama jurnal, penerbit, url paten, keterangan sejenis lainnya</i>)
1	Artikel di Jurnal Internasional Terindeks di Pengindeks Bereputasi	Accepted	Korean Society of Food Science and Technology

Luaran Tambahan

Tahun Luaran	Jenis Luaran	Status target capaian (<i>accepted, published, terdaftar atau granted, atau status lainnya</i>)	Keterangan (<i>url dan nama jurnal, penerbit, url paten, keterangan sejenis lainnya</i>)
1	Artikel di Jurnal Nasional terakreditasi peringkat 1-3	Accepted	Agrointek

5. ANGGARAN

Rencana anggaran biaya penelitian mengacu pada PMK yang berlaku dengan besaran minimum dan maksimum sebagaimana diatur pada buku Panduan Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Edisi 12.

Total RAB 1 Tahun Rp. 36,350,000

Tahun 1 Total Rp. 36,350,000

Jenis Pembelanjaan	Item	Satuan	Vol.	Biaya Satuan	Total
Bahan	ATK	Paket	1	1,250,000	1,250,000
Bahan	Bahan Penelitian (Habis Pakai)	Unit	1	18,600,000	18,600,000
Bahan	Barang Persediaan	Unit	50	50,000	2,500,000
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Publikasi artikel di Jurnal Internasional	Paket	1	12,000,000	12,000,000
Sewa Peralatan	Peralatan penelitian	Unit	2	1,000,000	2,000,000

6. HASIL PENELITIAN

A. RINGKASAN: Tuliskan secara ringkas latar belakang penelitian, tujuan dan tahapan metode penelitian, luaran yang ditargetkan, serta uraian TKT penelitian.

Salah satu bahan yang sangat potensial untuk bahan baku industri pulp dan kertas adalah Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS). Permasalahan yang sering terjadi pada industri pulp dan kertas adalah limbah cair yang dikebal sebagai black liquor atau lindi hitam yang bersifat mencemari lingkungan terutama badan sungai karena nilai BOD dan COD yang sangat tinggi. Secara potensi, lindi hitam mengandung lignin yang bisa digunakan sebagai bahan baku industri maupun kesehatan. Permasalahan yang terjadi adalah bagaimana teknik melakukan isolasi lignin karena lignin terlarut di dalam air dan memanfaatkannya menjadi produk yang lebih bermanfaat. Salah satu potensi lignin karena

mengandung gugus fenol adalah dapat digunakan sebagai anti mikroba. Tujuan khusus penelitian ini adalah mengetahui konsentrasi bahan pengisolasi terhadap rendemen dan karakteristik lignin yang dihasilkan dan aplikasinya sebagai senyawa anti mikroba dan prebiotik. Pengamatan yang dilakukan rendemen, bilangan metoksil, bobot ekuivalen, pengujian karakteristik gugus fungsional menggunakan Fourier transform infra red (FTIR), morfologi lignin dengan menggunakan SEM (Scanning Electro Microscopy), dan tingkat kemurnian lignin, uji aktivitas anti mikroba dengan menggunakan dengan uji difusi agar dan cakram.. Luaran yang ditargetkan adalah Jurnal internasional bereputasi dan jurnal terakreditasi Sinta 3. Tingkat kesiapan teknologi adalah 3

B. KATA KUNCI: Tuliskan maksimal 5 kata kunci.

lignin, isolasi, prebiotik, antimikroba

Pengisian poin C sampai dengan poin H mengikuti template berikut dan tidak dibatasi jumlah kata atau halaman namun disarankan seringkas mungkin. Dilarang menghapus/modifikasi template ataupun menghapus penjelasan di setiap poin.

C. HASIL PELAKSANAAN PENELITIAN: Tuliskan secara ringkas hasil pelaksanaan penelitian yang telah dicapai sesuai tahun pelaksanaan penelitian. Penyajian dapat berupa data, hasil analisis, dan capaian luaran (wajib dan atau tambahan). Seluruh hasil atau capaian yang dilaporkan harus berkaitan dengan tahapan pelaksanaan penelitian sebagaimana direncanakan pada proposal. Penyajian data dapat berupa gambar, tabel, grafik, dan sejenisnya, serta analisis didukung dengan sumber pustaka primer yang relevan dan terkini.

Pengisian poin C sampai dengan poin H mengikuti template berikut dan tidak dibatasi jumlah kata atau halaman namun disarankan ringkas mungkin. Dilarang menghapus/memodifikasi template ataupun menghapus penjelasan di setiap poin.

C. **HASIL PELAKSANAAN PENELITIAN:** Tuliskan secara ringkas hasil pelaksanaan penelitian yang telah dicapai sesuai tahun pelaksanaan penelitian. Penyajian dapat berupa data, hasil analisis, dan capaian luaran (wajib dan atau tambahan). Seluruh hasil atau capaian yang dilaporkan harus berkaitan dengan tahapan pelaksanaan penelitian sebagaimana direncanakan pada proposal. Penyajian data dapat berupa gambar, tabel, grafik, dan sejenisnya, serta analisis didukung dengan sumber pustaka primer yang relevan dan terkini.

4.1. Isolasi Lignin

Lindi hitam yang dihasilkan *pulping formacell* kemudian diisolasi untuk mendapatkan isolat lignin. Lignin merupakan polimer berbentuk tiga dimensi yang mempunyai basis unit fenilpropana dan gugus-gugus fungsional hidroksi, karbonil dan metoksi. Unsur-unsur struktur lignin dihubungkan oleh ikatan karbon-karbon dan eter untuk membentuk jaringan tiga dimensi dengan polisakarida dalam jaringan sel tumbuhan. Proses ekstraksi lignin dari lindi hitam dilakukan dengan cara penambahan air pada 500 mL sampel lindi hitam dalam *baker glass* 2 L dan dibiarkan sampai terbentuk endapan. Endapan yang diperoleh kemudian dipisahkan dengan penyaringan menggunakan kertas saring dan dikeringanginkan selama 3 hari dalam suhu ruang. Karakteristik lignin dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Karakteristik lignin

Parameter	Karakteristik
Warna	Hitam
Bentuk	Padatan
pH (25°C)	4,5
Rendemen	1,74%
Kadar Air	0,24%

Isolat lignin yang diperoleh memiliki penampakan warna hitam. Sifat lignin sendiri tidak bewarna namun, warna hitam pada lignin disebabkan oleh proses pemasakan lignin bereaksi dengan senyawa kimia lain membentuk kromofor sehingga menghasilkan warna. Bentuk isolat lignin berupa padatan yang berbentuk remah serat. Kadar air isolat lignin yang diperoleh adalah sebesar 0,24%. Kadar air yang rendah pada lignin dikarenakan sifat lignin yang hidrofobik. Sifat lignin yang hidropobik menyebabkan lignin tidak mudah mengikat air (Suhartati, 2016).

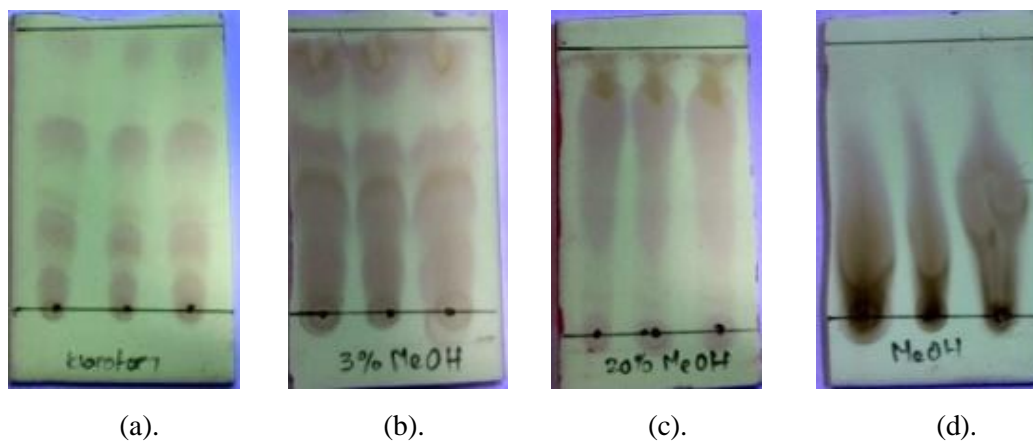
Rendemen lignin yang diperoleh sebesar 1,74%. Hal ini diduga karena tidak melakukan penambahan asam pada proses pengendapan isolat lignin. Lignin memiliki sifat tidak larut dalam kondisi asam dan larut dalam kondisi basa. Penambahan asam menyebabkan terjadinya protonasi gugus eter yang diikuti dengan pelepasan molekul alkohol menghasilkan sistem benzilium dan oksonium. Reaksi kondensasi dapat terjadi antara ion-ion benzilium dengan nukleofil menghasilkan isolat lignin. Proses pengendapan isolat lignin ditandai dengan pembentukan partikel dengan ukuran lebih besar dan menggumpal di dalam lindi hitam (Anisa, 2009).

4.2. Skrining Fraksi Monomer Lignin terhadap *Lactobacillus casei*

Proses degradasi lignin dilakukan dengan cara melarutkan lignin ke dalam larutan CuSO₄, piridin, dan NaOH, selanjutnya dilakukan pengadukkan dengan penambahan H₂O₂. Fraksi yang diperoleh kemudian dimasukkan ke dalam silika kolom kromatografi dan dielusi dengan CHCl₃, 3% MeOH:CHCl₃, 20% MeOH:CHCl₃, dan MeOH secara berurutan. Selanjutnya masing-masing fraksi dievaporasi hingga

kering. Fraksi CHCl_3 , 3% $\text{MeOH}:\text{CHCl}_3$, 20% $\text{MeOH}:\text{CHCl}_3$, dan MeOH menghasilkan rendemen secara berurutan sebesar 10,68%, 6,34%, 11,38%, dan 44,85%. Hasil masing-masing fraksi diidentifikasi pada plat Kromatografi Lapis Tipis (KLT) menggunakan sinar UV untuk melihat secara kuantitatif kandungan senyawa kimia.

Adanya senyawa kimia ditunjukkan oleh spot berwarna hitam pada KLT. Spot pada KLT masing-masing fraksi terdiri dari senyawa-senyawa yang berbeda berdasarkan *retention time* masing-masing senyawa. Spot yang dihasilkan pada fraksi CHCl_3 , 3% $\text{MeOH}:\text{CHCl}_3$, 20% $\text{MeOH}:\text{CHCl}_3$, dan MeOH secara berurutan menghasilkan 4, 4, 2, dan 1 spot. Spot yang terbentuk diduga merupakan komponen senyawa dominan pada masing-masing fraksi lignin. Spot hitam pada KLT dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Profil kromatografi lapis tipis masing-masing fraksi (a) CHCl_3 , (b) 3% $\text{MeOH}:\text{CHCl}_3$, (c) 20% $\text{MeOH}:\text{CHCl}_3$, dan (d) MeOH

Masing-masing fraksi lignin dilakukan skrining aktivitas prebiotik terhadap *Lactobacillus casei*. Skrining fraksi lignin sebagai prebiotik terhadap *L. casei* dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Skrining fraksi lignin sebagai prebiotik terhadap *Lactobacillus casei*

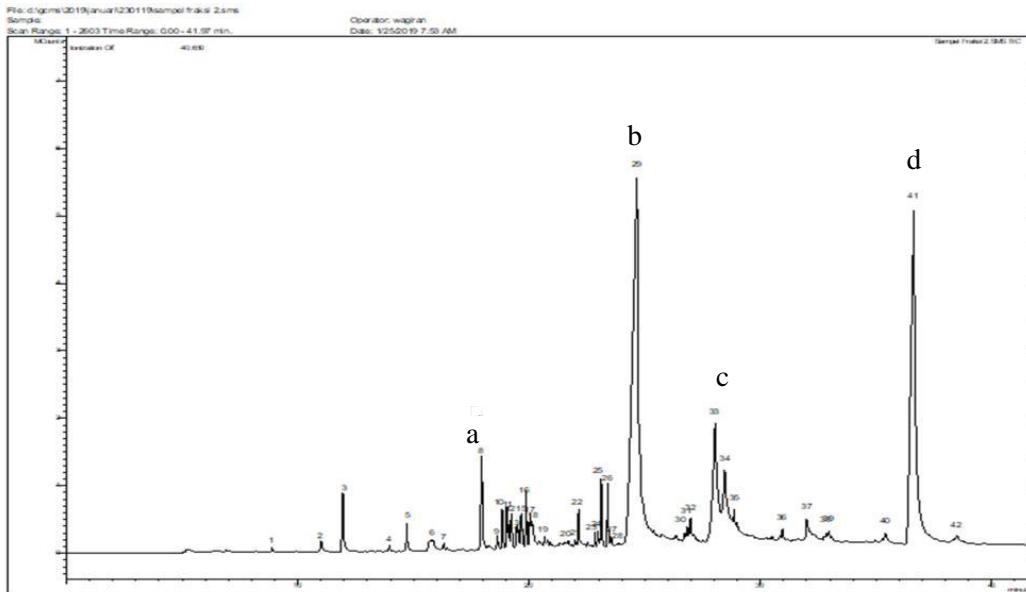
Fraksi	Jumlah Mikroba (10^2 koloni/mL)
CHCl_3	1,48±0,29
3% $\text{MeOH}:\text{CHCl}_3$	4,52±0,10
20% $\text{MeOH}:\text{CHCl}_3$	2,58±0,23
MeOH	2,41±0,34

Tabel 5 menunjukkan bahwa fraksi 3% $\text{MeOH}:\text{CHCl}_3$ memiliki aktivitas prebiotik yang lebih tinggi daripada fraksi lainnya. Fraksi 3% $\text{MeOH}:\text{CHCl}_3$ memiliki aktivitas prebiotik terhadap *L. casei* sebesar $4,52 \times 10^2$ koloni/mL, sedangkan fraksi CHCl_3 , 20% $\text{MeOH}:\text{CHCl}_3$, dan MeOH secara berurutan memiliki aktivitas prebiotik terhadap *L. casei* sebesar $1,48 \times 10^2$ koloni/mL, $2,58 \times 10^2$ koloni/mL, dan $2,41 \times 10^2$ koloni/mL.

4.3. Identifikasi Kandungan Senyawa Fraksi 3% $\text{MeOH}:\text{CHCl}_3$

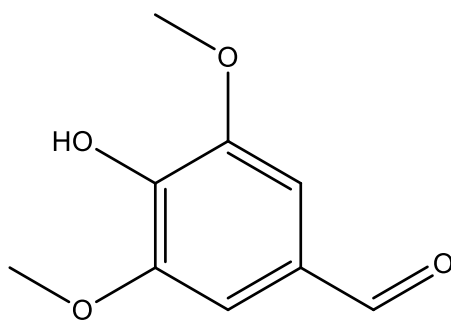
Fraksi 3% $\text{MeOH}:\text{CHCl}_3$ selanjutnya diidentifikasi menggunakan GC-MS. Proses identifikasi menggunakan GC-MS dilakukan dengan cara menginjektikan fraksi 3% $\text{MeOH}:\text{CHCl}_3$ ke dalam alat. Sampel yang diinjeksikan ke dalam GC-MS akan diubah menjadi fase uap dan dialirkan melewati kolom kapiler dengan bantuan gas pembawa. Pemisahan senyawa campuran menjadi senyawa tunggal terjadi

berdasarkan perbedaan sifat kimia yang spesifik untuk masing-masing senyawa. Pendeteksian berlangsung di dalam Spektroskopi Massa dengan mekanisme penembakan senyawa oleh elektron menjadi molekul terionisasi dan pencatatan pola fragmentasi yang terbentuk dibandingkan dengan pola fragmentasi senyawa standard yang diindikasikan dengan prosentase Similarity Index (SI). Fraksi 3% MeOH:CHCl₃ dianalisis menggunakan GC-MS varian CP-3800 dengan detektor MS Saturn 2200 menggunakan kolom VF-5ms 30 mm x 0,25 mm dengan metode injeksi manual pada suhu 240 °C dan analisis berlangsung selama 40 menit. Hasil identifikasi GC-MS didapatkan dalam bentuk kromatogram. Kromatogram fraksi 3% MeOH:CHCl₃ dapat dilihat pada Gambar 8.

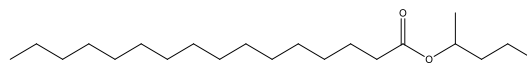


Gambar 8. Kromatogram fraksi 3% MeOH:CHCl₃. (a) benzaldehyde, 4-hydroxy-3,5-dimethoxy-, (b) 1-methylbutyl hexadecanoate, (c) oleic acid, dan (d) di-2-ethylhexyl phthalate

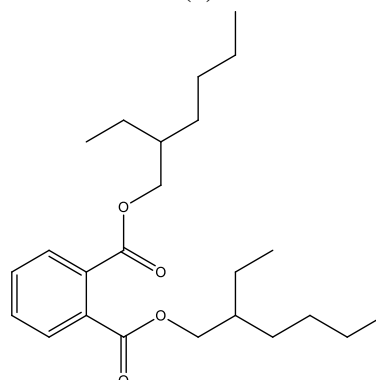
Gambar 8 menunjukkan bahwa fraksi 3% MeOH:CHCl₃ mengandung senyawa (a) benzaldehyde, 4-hydroxy-3,5-dimethoxy- sebanyak 2,76%, (b) 1-methylbutyl hexadecanoate sebanyak 41,03%, (c) oleic acid sebanyak 3,61%, dan (d) di-2-ethylhexyl phthalate sebanyak 31,25%. Hidrolisis lignin menggunakan katalis NaOH menghasilkan produk utama berupa monomeric phenol dan oligomers (Roberts *et al.* 2011). Struktur senyawa dari fraksi 3% MeOH:CHCl₃ dapat dilihat pada Gambar 9.

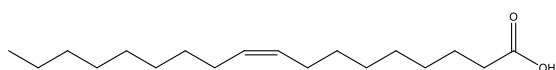


(a)



(b)





(c)

(d)

Gambar 9. Senyawa fraksi 3%MeOH:CHCl₃(a) *benzaldehyde,4-hydroxy-3,5-dimethoxy-*, (b) *1-methylbutyl hexadecanoate*, (c) *oleic acid*, dan (d) *di-2-ethylhexyl phthalate*

Peak pada kromatogram dibandingkan dengan senyawa referensi pada library sehingga dapat diketahui kandungan senyawa dalam sampel. Hasil identifikasi GC-MS senyawa fraksi 3% MeOH:CHCl₃dapat dilihat pada lampiran Tabel 6.

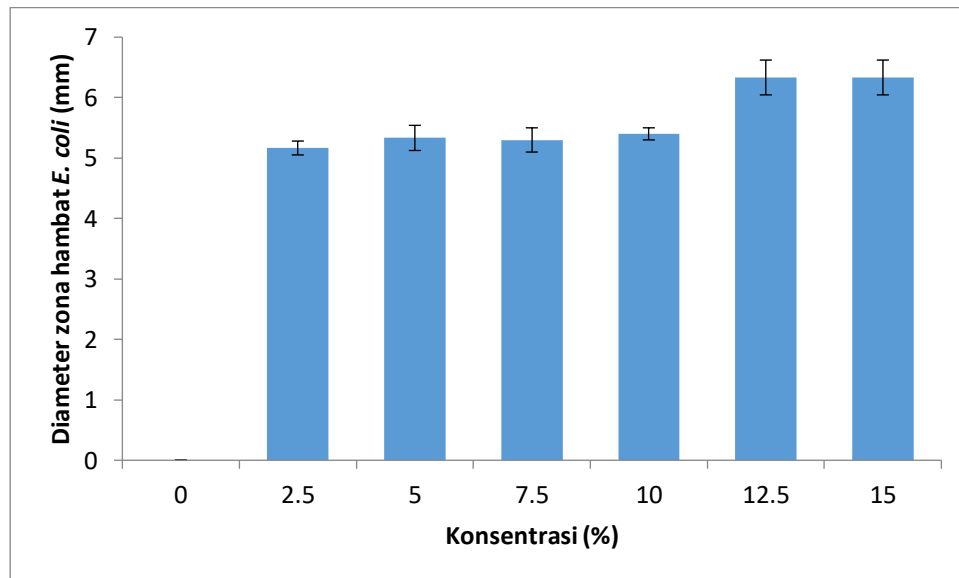
Tabel 6. Identifikasi kandungan senyawa monomer lignin fraksi 3% MeOH:CHCl₃

RT	BM	Senyawa	Jumlah(%)
8,886	207	Phenol,2-(1-methylpropyl)-,methylcarbamate	0,1
11,008	212	Propanoic acid,3-chloro-,4-formylphenyl Ester	0,3
11,942	152	Vanillin	1,9
13,958	166	Ethanone,1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-	0,1
14,709	166	Undecanoic acid,10-methyl-,methyl ester	0,4
15,839	214	Benzoic acid,4-hydroxy-3-methoxy-	1,0
16,313	168	Diethyl Phthalate	0,1
17,952	222	Benzaldehyde,4-hydroxy-3,5-dimethoxy-	2,7
18,621	182	p-Anisic acid,4-nitrophenyl ester	0,3
18,838	273	m-Anisic acid,3,4-dichlorophenyl ester	0,9
19,022	413	Carbamic acid,N-[1,1- bis(trifluoromethyl)ethyl]-4,(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phen ester	0,9
19,114	220	4-Methyl-2-tert-octylphenol	0,5
19,235	296	m-Anisic acid,3,4-dichlorophenyl ester	1,1
19,447	270	Hexestrol	0,5
19,643	220	Phenol,2-methyl-4-(1,1,3,3- tetramethylbutyl)-	0,3
19,708	192	1,3-Dimethyl-5-ethyladamantane	0,7
19,870	413	Carbamic acid,N-[1,1- Bis (trifluoromethyl)ethyl]-4,(1,1,3, tetramethylbutyl)phenyl ester	1,0
20,034	220	Phenol,2-methyl-4-(1,1,3,3- tetramethylbutyl)-	0,7
20,126	228	Tetradecanoic acid	1,1
21,690	268	2-Pentadecanone,6,10,14-trimethyl-	0,0
21,980	194	Caffeine	0,1
22,135	278	1,2-Benzenedicarboxylic acid,bis(2- methylpropyl) ester	0,7
22,520	338	Erucic acid	0,0
22,848	604	Tritetracontane	0,2
22,968	268	9-Hexadecenoic acid, methyl ester,(Z)-	0,4
23,116	276	7,9-Di-tert-butyl-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-diene-2,8 dione	1,6
23,395	270	Pentadecanoic acid,14-methyl-,methyl ester	1,3
23,358	292	Benzenepropanoic acid,3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-4 hydroxy ,methyl ester	0,2
24,659	326	1-Methylbutyl hexadecanoate	41,0
26,713	298	1-Eicosanol	0,2
26,837	294	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-,methyl ester	0,3
26,971	352	9,12,15-Octadecatrienoic acid,2,3 dihydroxypropylester,(Z,Z,Z)-	0,5
28,036	282	Oleic acid	0,8

28,453	282	Oleic acid	3,6
28,853	282	Oleic acid	0,3
30,953	604	Tritetracontane	0,2
31,997	324	4,8,12,16-tetramethylheptadecan-4-olide	0,5
32,860	298	1-Eicosanol	0,1
32,963	604	Tritetracontane	0,1
35,399	242	1-decanol,2-hexyl-	0,2
36,624	390	Di-2-ethylhexyl phthalate	31,2
38,491	592	1-Hentetracontanol	0,2

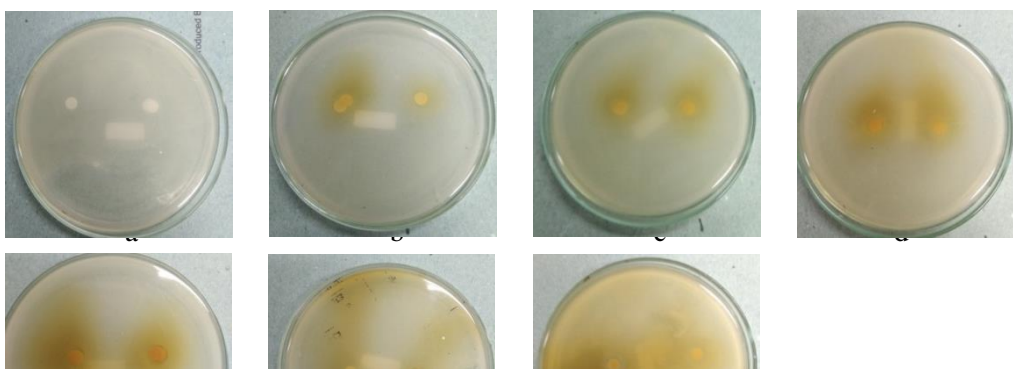
4.4. Aktivitas Antimikroba Fraksi 3% MeOH:CHCl₃ terhadap *Eschericia coli*

Fraksi 3% MeOH:CHCl₃ diuji aktivitas antimikroba pada berbagai konsentrasi 0%, 2,5%, 5%, 7,5%, 10%, 12,5%, dan 15%. Masing-masing fraksi ditetaskan sesuai konsentrasinya ke bagian atas kertas cakram yang diletakan di atas permukaan Nutrient Agar sebagai media pertumbuhan *Eschericiacoli* dalam cawan petri. Pengamatan diameter zona hambat dilakukan setelah 24 jam dan diukur dengan menggunakan jangka sorong. Berdasarkan hasil pengukuran diameter zona hambat masing-masing konsentrasi fraksi 3% MeOH:CHCl₃ terhadap *Eschericia coli* dapat dilihat pada Gambar 10.



Gambar 10. Pengaruh berbagai konsentrasi fraksi 3% MeOH:CHCl₃ terhadap diameter zona hambat bakteri *Eschericia coli*

Gambar 10 menunjukkan bahwa fraksi 3% MeOH:CHCl₃ pada konsentrasi 0% tidak memiliki aktivitas antimikroba terhadap *E. coli*. Hal ini ditunjukkan dengan tidak terbentuknya zona hambat disekeliling kertas cakram. Fraksi 3% MeOH:CHCl₃ pada konsentrasi 12,5 dan 15% memiliki aktivitas antimikroba yang sama dan tertinggi terhadap *E. coli* dengan diameter zona hambat sebesar 6,33mm, sedangkan aktivitas antimikroba terendah terhadap *E. coli* dimiliki fraksi 3% MeOH:CHCl₃ pada konsentrasi 2,5% dengan diameter zona hambat sebesar 5,17mm. Zona hambat yang terbentuk pada uji aktivitas antimikroba fraksi 3% MeOH:CHCl₃ terhadap *E. coli* dapat dilihat pada Gambar 11.



e f g

Gambar 11. Zona hambat yang terbentuk pada uji aktivitas antimikroba fraksi 3% MeOH:CHCl₃ terhadap *Escherichia coli*.

Fraksi 3% MeOH:CHCl₃ menunjukkan aktivitas daya hambat terhadap *E. coli* tergolong lemah dan tidak memiliki respon hambatan. Davis dan Stout (1971) menyatakan bahwa apabila zona hambat yang terbentuk pada uji difusi agar berukuran 5 mm atau kurang, maka aktivitas penghambatannya dikategorikan lemah. Apabila zona hambat berukuran 5-10 mm dikategorikan sedang, zona hambat 10-19 mm dikategorikan kuat dan zona hambat 20 mm atau lebih dikategorikan sangat kuat. Menurut Greenwood (1995), klasifikasi respon hambatan pertumbuhan bakteridengan diameter zona hambat lebih dari 20 mm tergolong kuat, 16-20 mm tergolong sedang, 10-15 mm tergolong lemah, kurang dari 10 mm menunjukkan tidak ada respon hambatan pertumbuhan bakteri.

Adanya senyawa antioksidan dan antibakteri yang terdapat di dalam fraksi hasil isolasi lignin dapat menghambat pertumbuhan mikroba. Komponen antibakteri seperti golongan benzene, bersifat sebagai antibakteri (Bartolomeazzi *et al.*, 2007), seperti *1,2 benzenedicarboxylic acid, bis(2- methylpropyl) ester, benzenepropanoic acid, 3,5-bis (1,1 dimethylethyl)-4-hydroxy-, methyl ester*. Komponen fenolik seperti *phenol, 2-(1-methylpropyl)-, methylcarbamate, m-anisic acid, 3,4-dichlorophenyl ester*, dan *phenol, 2-methyl-4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-* adalah komponen yang bersifat antimikrobial (Soldera *et al.*, 2008; Kristinsson *et al.* 2007; Gomez-Estaca, 2007; Milly *et al.* 2005, Muratore and Licciardello, 2005; Sunen *et al.* 2003, Sunen *et al.* 2001, Vitt *et al.*, 2001).

Penghambatan bakteri terjadi karena fenol menyerang sel vegetatif berprenetasi dan merepresitifikasi protein yang terdapat dalam sel mikroba dan adanya interaksi antara ikatan hidrogen dengan protein penyusun enzim (Panagan dan Syarif, 2009; Saravanakumar *et al.*, 2009). Beberapa jenis asam, seperti asam anisic dan asam karbamat, diduga sebagai antibakteri (Budianto, 2008). Lefroi and Joffraud 2000; Rorvik 2000) mengatakan bahwa senyawa aldehid, asam karboksilat dan fenol mempunyai sifat antimikrobial dan antioksidan.

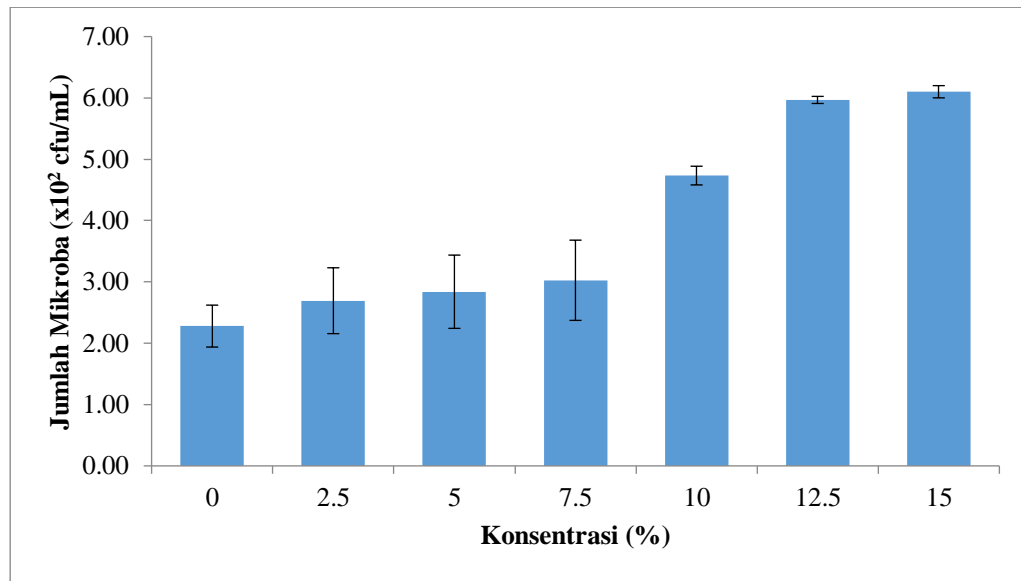
Senyawa fenol dan flavonoid hasil pecahan monomer lignin dari tanaman softwood bersifat sebagai antimikroba dan antibiotik (Roller and Seedhar, 2002). Philip (2000), menyatakan bahwa hasil monomer dari lignin dengan proses *alcell* dapat menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli*, *S. aureus*, dan *Pseudomonas*. Senyawa fenol dari lignin dapat merusak dinding mikroba dan menyebabkan lisis pada bakteri diikuti pelepasan konten sel (Sabu, 2011).

Pada fraksi terdapat asam lemak jenuh dan tak jenuh yang memiliki atom karbon lebih dari sepuluh yang dapat mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan bakteri atau kematian pada bakteri patogen yang diujikan (Hou, 2000). Asam lemak yang memiliki aktivitas antimikroba adalah *9-hexadecanoic acid* (Agoramoorthy *et al.* 2007). Senyawa *9-hexadecanoic acid* memberikan efek terhadap permeabilitas membran dan partisi ion ada lapisan membran sel dari mikroorganisme (Lagner and Hui, 2000). Senyawa dari golongan *benzene* juga memiliki aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan mikroorganisme. Suzuki *et al.* (1988) menyatakan bahwa senyawa *di-2-ethylhexyl phthalate* dapat bereaksi dengan sisi hidrofobik pada membran sel yang menyebabkan terganggunya permeabilitas dari membran sel.

4.5. Aktivitas Prebiotik Fraksi 3% MeOH:CHCl₃ terhadap *Lactobacillus casei*

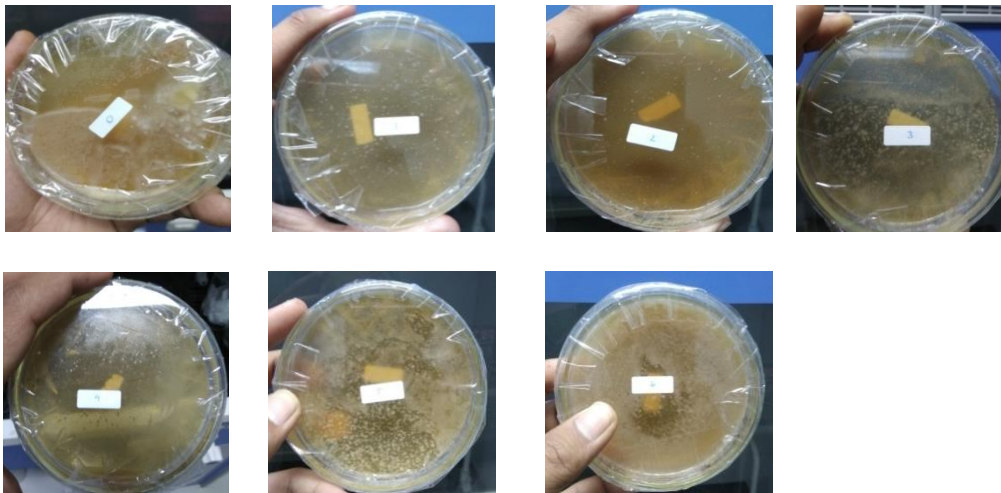
Uji aktivitas prebiotik menggunakan konsentrasi antara media pertumbuhan dengan fraksi 3% metanol-kloroform sebesar 0; 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; dan 15 (%). *Lactobacillus casei* yang sudah disegarkan pada media MRSB diencerkan sebanyak 0,05 mL ke dalam 4,95 mL larutan fisiologis. Selanjutnya sebanyak 1 mL dari larutan fisiologis diinokulasikan ke dalam media MRSA, kemudian dituang ke dalam cawan petri sebanyak 20; 19,5; 19; 18,5; 18; 17,5; dan 17 mL dan ditambahkan fraksi 3% MeOH:CHCl₃ sebanyak 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; dan 3 mL.

Perhitungan jumlah koloni dilakukan setelah 24 jam pertama. Perhitungan dilakukan secara manual untuk menghitung jumlah koloni bakteri. Jumlah koloni dari pertumbuhan *Lactobacillus casei* untuk masing-masing konsentrasi fraksi 3% MeOH:CHCl₃ dapat dilihat pada Gambar 12.



Gambar 12. Pengaruh beberapa konsentrasi fraksi 3% MeOH:CHCl₃ sebagai prebiotik terhadap jumlah mikroba *Lactobacillus casei*

Gambar 12 menunjukkan bahwa tanpa penambahan fraksi 3% MeOH:CHCl₃ ke dalam media pertumbuhan memiliki aktivitas prebiotik terhadap *L. casei* sebesar 2,28 x 10² koloni/mL. Fraksi 3% MeOH:CHCl₃ pada konsentrasi 15% memiliki aktivitas prebiotik tertinggi terhadap *L. casei* sebesar 6.10 x 10² koloni/mL, sedangkan fraksi 3% MeOH:CHCl₃ pada konsentrasi 2,5 % memiliki aktivitas prebiotik terendah terhadap *L. casei* sebesar 2,69 x 10² koloni/mL. Aktivitas prebiotik fraksi 3% MeOH:CHCl₃ pada pertumbuhan *L. casei* dapat dilihat pada Gambar 13.



Gambar 13. Aktivitas prebiotik fraksi 3% MeOH:CHCl₃ terhadap pertumbuhan *Lactobacillus casei*.

Hasil analisis aktivitas prebiotik fraksi 3% MeOH:CHCl₃ menunjukkan bahwa semakin meningkatnya konsentrasi yang ditambahkan pada media pertumbuhan, semakin meningkat pertumbuhan *L. casei*. Baurhooet *al.*, (2007) menyatakan bahwa monomer lignin pada proses alcell mempunyai kemampuan sebagai prebiotik. Prayuwidayati *et al.* (2016) melaporkan bahwa produk pemurnian lignin formacell dari serat tandan kosong kelapa sawit dan oligomer yang merupakan senyawa fenolik menunjukkan efek prebiotik yang dapat merangsang pertumbuhan bakteri asam laktat. Hal ini menunjukkan bahwa fraksi hasil isolasi lignin dan turunannya dapat menggantikan glukosa dalam medium MRS dan dapat digunakan sebagai sumber energi untuk pertumbuhan *L. casei*.

Hasil ini menunjukkan bahwa fraksi hasil isolasi lignin dapat digunakan sebagai suplemen pakan dan menunjukkan efek prebiotik dengan mendukung pertumbuhan *L. casei*. Cota and Whitfield (1998), melaporkan bahwa semua bakteri rumen hemiselulolitik mampu memanfaatkan xylooligosaccharides sebagai substrat tumbuh. Peningkatan *digestibility* protein kasar dan serat kasar akan mendukung protein dan metabolisme energi ruminansia. Prebiotik golongan *non-digestible* karbohidrat termasuk laktulosa, inulin, *resistant starch* dan sejumlah oligosakarida yang dapat menjadi sumber karbohidrat bagi bakteri yang menguntungkan dalam saluran pencernaan (Crittenden, 1999).

Substrat seperti inulin, frukto-oligosakarida (FOS) dan manan-oligosakarida (MOS) yang berasal dari sel ragi, selain dapat dihidrolisis oleh enzim *endogenous* pencernaan juga bisa diabsorpsi oleh inang. Mekanisme yang mungkin terjadi yaitu penurunan pH karena dihasilkannya asam lemak rantai pendek, sekresi bakteriosin dan stimulasi imun. MOS sebagai prebiotik mempunyai mekanisme yang berbeda dimana secara selektif tidak menyebabkan peningkatan populasi bakteri yang menguntungkan, tetapi melalui kemampuannya yang dapat melekat pada lektin spesifik manosa dari patogen G negatif tipe 1 fimbriae seperti *Salmonella* dan *E. coli* yang kemudian akan dikeluarkan dari saluran pencernaan (Baurhoo *et al.*, 2007; Thomas *et al.*, 2004). Kesamaan efek MOS dan *antibiotik-free diet supplemented 1,25% alcell lignin (LL)* pada lactobacilli dan bifidobacteria, lignin pada level rendah memiliki potensi untuk diklasifikasikan sebagai prebiotik (Baurhoo *et al.*, 2007).

5.1. Simpulan

1. Lignin dari lindi hitam tandan kosong kelapa sawit mengandung senyawa *benzaldehyde, 4-hydroxy-3,5-dimethoxy, 1-methylbutyl hexadecanoate, oleic Acid, dan di-2-ethylhexyl phthalate*.
2. Fraksi lignin 3% MeOH:CHCl₃ dengan konsentrasi 15% menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap *Eschericia coli* dengan diameter zona hambat sebesar 6,33 mm dan aktivitas prebiotik terhadap *Lactobacillus casei* sebesar 6,1x10² koloni/ml.

Daftar Pustaka

1. [1] Direktorat Jenderal Perkebunan. 2014. Statistik Perkebunan Indonesia Komoditas Kelapa Sawit 2013-2015. Direktorat Jenderal Perkebunan : Jakarta.
2. [2] Azis, S. and Sarkanen, K. 1989. Organosolv Pulping-a Review. *TAPPI Journal*. March 1989. (3): 72.
3. [3] Ibrahim, M.N.M., S.B. Chuah. 2003. Characterization of Lignin Precipitated From The Soda Black Liquor of Oil Palm Empty Fruit bunch Fibers by Various Mineral Acids. *AJSTD*. 21 (1): 57-67.
4. [4] Lin, S. Y. dan Carlton W.Dence. 1992. *Methods in Lignin Chemistry*. Berlin Heidelberg : Springer-Verlag.
5. [5] Xu, F., Sun, J., Sun, R., Fowler, P., dan Baird, M.S. 2006. Comparative Study of Organosolve Lignin From Wheat Straw. *Ind. Crops Product*. Vol 23 (2): 180-193.
6. [6] Siroth and Sunthornvarabhas, *Biochem Pharmacol (Los Angel)* 2018, Lignin from Sugar Process as Natural Antimicrobial Agent. Volume 7(1): 1-4
7. [7] Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Simin, N., Anackov, G. 2006. Characterization of the volatile composition of essential oils of some lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *J.Agric. Food Chem*. 54, 1822–1828.
8. [8] Prayuwidayati, M., T. C. Sunarti., Sumardi, Subeki, dan K. G. Wiryawan. 2016. Use of Lignin Formacell of Empty Bunch Palm Fiber as Feed Supplement and Prebiotics Candidate in Ruminant. *Pakista Journal of Nutrition* 15 (1): 58-65 2016
9. [9] Wells AL, Saulnier DMA, Gibson GR. 2008. *Gastrointestinal microflora and interactions with gutmucosa*. In: Gibson GR, Roberfroid MB, editor. *Handbook of Prebiotics*. New York (US): CRC.Press. <http://doi.org/fmgrnz>
10. [10] Simatupang, H, A. Nata, dan N. Herlina. 2012. Studi Isolasi dan Rendemen Lignin Dari Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS). *Jurnal Teknik Kimia USU*, Vol. 1, No. 1

11. [11] Guerra, A.; I Filpponen, L. Lucia, C Saquing, S Baumberger Dan D Argyropoulos. 2006. Toward a Better Understanding of the Lignin Isolation Process from Wood. *J. Agric. Food Chem.* (54) : 5939-5947
12. [12] Heradewi. 2007. Isolasi Lignin Dari Lindi Hitam Proses Pemasakan *Organosolv* Serat Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS). Skripsi. Institut Pertanian Bogor. Bogor
13. [13] Hidayati, S, Zuidar, W Satyajaya, Murhadi, and D Retnowati. 2018. Isolation and characterization of formacell Lignins from oil empty fruits bunches IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering 344
14. [14] Baurhoo B, C.A. Ruiz-Feria b, X. Zhaoa. 2008. Purified lignin: Nutritional and health impacts on farm animals—A review *Animal Feed Science and Technology* 144: 175–184
15. [15] Mollahosseini A, Rahimpour A, Jahamshahi M, Peyravi M, Khavarpour M. 2012. The effect of silver nanoparticle size on performance and antibacteriability of polysulfone ultrafiltration membrane. *Desalination* 306: 41-50.
16. [16] Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils-a review. *Food and Chemical Toxicology* 46: 446-475
17. [17] Sabu, T., Visakh, P.M. and Mathew, A.P. 2011. *Advances in natural polymers: composites and nanocomposites*. Springer, Dordrecht.
18. [18] Gyawali R, Ibrahim SA. 2014. Natural products as antimicrobial agents. *Food Control* 46: 412-429.
19. [19] Yang W, Fortunati E, Dominici F, Giovanale G, Mazzaglia A. 2016. Effect of cellulose and lignin on disintegration, antimicrobial and antioxidant properties of PLA active. *International Journal of Biological Macromolecules* 89: 360-368.
20. [20] Ugartondo V, Mitjans M, Vinardell MP. 200. Comparative antioxidant and cytotoxic effects of lignins from different sources. *Bioresource Technology* 99: 6683-6687.
21. [21] Hidayati, S., Zuidar, S., dan Fahreza, A. 2016. Optimasi Produksi Pulp *Formacell* dari Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS) dengan Metode Permukaan Respon, *Reaktor*, 16(4), 161-171.
22. [22] NREL. 2008. Determination of Structural Carbohydrat dan Lignin in Biomass. Biomass program Analysis Technology Team Laboratory Procedure, National Renewable Energy Lab
23. [23] American Society for Testing dan Material. 1981. Methoxyl Content of Pulp dan Wood. ASTM 15120-81.
24. [24] Kline, L.M., Hayes, D.G, Komac, A.R dan Labbe, N. 2010. Simplified Determination of Lignin Content in Hard dan Soft Woods Via UV-Spectrofotometric Analysis of Biomass Dissolved in Ionic Liquids. *Bioresources*. Volume 5 (3): 1366-1383.
25. [25] Parasuraman, P., Singh, R., Bolton, T.S., Omori, S dan Francis, R.C. 2007. Estimation of Hardwood Lignin Concentrations by UV Spectroscopy dan Chlorine Demethylation. *Bioresources*. Vol 2 (3): 459-471.
26. [26] Ohra-aho, T; Gomes, F.J.B; Colodette, J.L dan Tamminen, T. 2013. S/G ratio and lignin structure among Eucalyptus hybrids determined by Py-GC/MS and nitrobenzene oxidation. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* (101):166–171.

LUARAN JURNAL INTERNASIONAL PAKISTAN JOURNAL AGRICULTURAL SCIENCE

THE UTILIZATION OF LIGNIN MONOMER ISOLATION RESULTS FROM BLACK LIQUOR OF EMPTY PALM OIL BUNCHES AS A PREBIOTIC

Muhammad Ferdiansyah Mulya Harahap¹, Sri Hidayati², Subeki² and Dewi Sartika²

1. Master's Degree in Agricultural Industry Technology, University of Lampung, Jl. Sumantri Brojonegoro No. 1 Bandar Lampung, Indonesia
2. Department of Agricultural Product Technology, University of Lampung, Jl. Sumantri Brojonegoro No. 1 Bandar Lampung, Indonesia
Correspondence: srihidayati.unila@gmail.com

Abstract

Pulp processing produces waste in the form of black liquor. The main ingredient of black liquor is lignin. Lignin contains phenolpropanoid compound which is considered to have prebiotic and anti-microbial activity. It is a component of lignocellulose which is known to have prebiotic and antimicrobial activity effects due to its nature which is difficult to digest and consists of phenolpropanoid components. This study aims to look and identify the results of purification lignin and activity test as a prebiotic. The identification technique of lignin fraction was carried out by using Thin Layer Chromatography (TLC) and Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) plates. Prebiotic activity tests were carried out by using the calculation of total bacteria on the growth of *Lactobacillus casei*. The results showed that the purification process using CHCl_3 , 3% MeOH: CHCl_3 , 20% MeOH: CHCl_3 , and MeOH yielded yields of 10.68%, 6.34%, 11.38% and 44.85%. The 3% MeOH: CHCl_3 fraction was identified as containing benzaldehyde, 4-hydroxy-3,5-dimethoxy, 1-methylbutyl hexadecanoate, oleic acid, and di-2-ethylhexyl phthalate. The 3% MeOH: CHCl_3 fraction at a concentration of 15% showed activity as a prebiotic for *L. casei* at 6.1×10^2 colonies / mL.

Keywords: lignin, black liquor, prebiotic, Empty palm oil bunches

INTRODUCTION

The process of pulp processing produces liquid waste known as black liquor. The content of lignin in black liquor has a complex structure that is difficult to decompose so that it has the potential to pollute the environment (Lara et al., 2003). Lignin content in black liquor is around 25-35% of the total (Ibrahim et al., 2010; Goujon et al., 2003) so that it can be isolated for further use. Currently, there are people who want to utilize black liquor as a source of raw material for lignin (Min et al., 2013). Lignin can be used as biomass (Schorr et al., 2014), adhesives (Elaine et al., 2010; Yasumitsu and Keiichi, 2015), dispersants, adhesives, and surfactants, as antioxidants in plastics and rubbers, dyes, synthetic floors, thermosets, paints, and fuel for road maintenance (Laurichesse and Averous, 2013; Mankar et al., 2012; Magnus and Akan, 2014; Podkořcielna et al., 2017; Conzatti et al., 2013).

Hidayati et al. (2018) isolates lignin from black liquor of empty palm oil bunches by using NaOH with a concentration of 30% resulted in a yield of 5.67%, pH 5.42, total black liquor solid of 65.11%, methyl lignin level of 14.61%, and equivalent weight 1787.23. Prayuwidayati et al. (2016) showed that lignin can be used as a prebiotic which is considered to have an antimicrobial effect by reducing the rate of growth of pathogenic bacteria in cattle rumen. According to Baurhoo et al. (2008), the product of purified lignin which has been tested has a prebiotic effect. Prebiotic is one component of functional food that is developed. Prebiotic is a component of food that is beneficial to humans because it can stimulate the growth and activity of a number of probiotic bacteria in the colon so that it can improve the health of the human digestive tract (Toma and Pokrotnieks, 2006). The purpose of this study is to identify the components contained in lignin purification products by Thin Layer Chromatography (TLC), Chromatography Column and Gas Chromatography-Mass Spectrometer (GC-MS) and prebiotic activity testing.

III. RESEARCH METHODS

Tools and Materials

The materials used in this study were the TKKS black liquor from the results of formacell pulping. Acetic Acid, Formic Acid, HCl, CuSO_4 , H_2O_2 , NaOH, pyridine, MeOH, CHCl_3 , aquades, the media used were NA (Nutrient Agar), NB (Nutrient Broth), MRSA and MRSB. Microbial cultures used in this study were *Lactobacillus casei* and *Escherichia coli*. The tools used were oven, Buchner funnel, silica gel 60 F₂₅₄ thin layer chromatography plate, column chromatography, chamber, autoclave, micropipet, incubator, calipers, capillary pipette, Gas Chromatography-Mass Spectrometer (Variant / CP- 3800 GC and Saturn 2200 MS), and supporting glasses.

3.3. Research Method

The study was conducted with a Completely Randomized Design (CRD). Black liquor was extracted until lignin was obtained 2 times. Lignin was fractionated until it obtained a lignin monomer fraction. Each lignin monomer fraction was identified by TLC analysis and prebiotic activity was screened for *Lactobacillus casei*. The fraction that had the highest prebiotic activity was carried out by GC-MS analysis to determine the chemical composition. Furthermore, the fractions that had the highest prebiotic activity were made at several concentrations of 0%, 2.5%, 5%, 7.5%, 10%, 12.5%, and 15% to be tested for antimicrobial and prebiotic activity for 3 replications. The data obtained were analyzed descriptively and presented in figures and tables.

3.4. Research Implementation

Lignin degradation

Lignin obtained from black liquor which was resulted after cooking the pulp with the raw material of oil palm empty bunches that was precipitated and degraded using CuSO_4 , pyridin, and H_2O_2 . A total of 2 g of lignin precipitate was dissolved with 20 mL NaOH solution pH 12. A total of 25 mL of 10^{-2} M CuSO_4 and 5 mL pyridine were added to the lignin solution. The solution was stirred with a magnetic stirrer for 30 minutes. Furthermore, 10 ml of H_2O_2 1 M was added 5 times over a period of 30 minutes, stirred and stored in a dark space for 72 hours.

Lignin Purification Fraction

The fractionated filtrate was then evaporated until a residue was obtained. The residue was then dissolved in 500 mL H_2O and extracted with EtOAc 500 mL 3 times to obtain H_2O and EtOAc layers. The EtOAc layer was evaporated until a residue was obtained. The residue was then put into the chromatographic column silica gel and eluted with CHCl_3 (1L) solution. The CHCl_3 fraction was then evaporated and the residue obtained was then purified by preparative thin layer chromatography (PTLC). The lignin monomer isolation process can be seen in Figure 1.

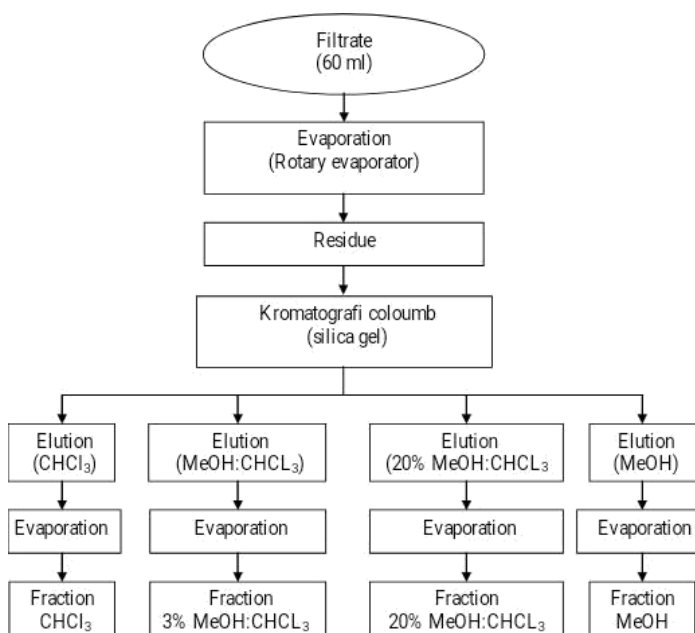


Figure 1. Lignin monomer fractionation flow diagram

Lignin Fraction Identification

Identification of lignin monomers obtained was done using TLC and GC-MS plates. Lignin monomer isolates were dissolved in hexane and then injected into GC-MS devices. It was analyzed by using GC-MS CP-3800 variant with MS Saturn 2200 detector using VF-5ms column 30 mm x 0.25 mm by manual injection method at 240 °C and the analysis lasted for 40 minutes (Suroso et al, 2018).

Prebiotic Activity Test for Lignin Fraction

Prebiotic tests were performed microbologically using *Lactobacillus casei* grown on MRSA media. The measured variable was the number of bacteria by counting living bacterial colonies method. The lignin monomer fraction was composed with media so that each cup was 0%, 2.5%, 5%, 7.5%, 10%, 12.5%, and 15%. *Lactobacillus casei* that had been refreshed on MRSB media was diluted as much as 0.05 mL into 4.95 mL of physiological solution. Then, 1 mL of physiological solution was inoculated into MRSA media, then poured into 20 petri cups; 19.5; 19; 18.5; 18; 17.5; and 17 mL and added 3% MeOH:CHCl₃ fraction of 0; 0.5; 1; 1.5; 2; 2.5; and 3 mL. Furthermore, the bacteria were incubated for 24 hours in an incubator.

RESULT AND DISCUSSION

Lignin Isolation

The black liquor produced by pulping formacell was then isolated to obtain lignin isolates. The extraction process of lignin from black liquor is done by adding water to 500 mL of black liquor sample in a 2 L glass baker and allowed to form a precipitate. The precipitate obtained was then separated by filtering using filter paper and dried for 3 days at room temperature and seen for its characteristics (Table 1).

Table 1. Characteristics of lignin

Parameter	Characteristics
Color	Black
Form	Solids
pH (25°C)	4,5
Rendemen	1,74%
Water content	0,24%

Lignin isolates obtained have a black appearance. The form of lignin isolates is solids in the form of fiber crumbs. Moisture content of lignin isolates obtained is 0.24%. The yield of lignin obtained is 1.74%. This is presumed because it did not add acid to the precipitation process of lignin isolates.

Lignin Monomer Fraction Screening for *Lactobacillus Casei*

The process of lignin degradation was done by dissolving lignin into a solution of CuSO₄, pyridine, and NaOH, then stirring and adding H₂O₂. The obtained fraction was then put into the chromatographic column silica and eluted with CHCl₃, 3% MeOH:CHCl₃, 20% MeOH:CHCl₃, and MeOH respectively. Then each fraction was evaporated to dryness. The fraction of CHCl₃, 3% MeOH:CHCl₃, 20% MeOH:CHCl₃, and MeOH resulted yields respectively 10.68%, 6.34%, 11.38%, and 44.85%. The results of each fraction were identified on a Thin Layer Chromatography (TLC) plate using UV light to look quantitatively at the content of chemical compounds.

The presence of chemical compounds was shown by black spots on TLC. Spot on TLC of each fraction consists of different compounds based on the retention time of each compound. Spots generated at fractions of CHCl₃, 3% MeOH:CHCl₃, 20% MeOH:CHCl₃, and MeOH sequentially produced 4, 4, 2, and 1 spot. The spot formed was considered to be the dominant compound in each lignin fraction. Black spots on TLC can be seen in Figure 2 and the results of screening for *L. casei* growth (Table 2)

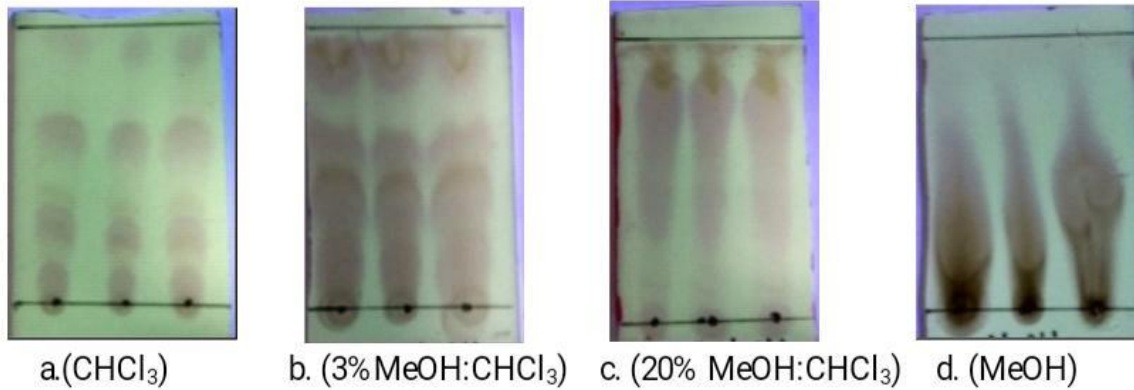


Figure 2. Chromatographic profile of thin layers of each fraction (a) CHCl₃, (b) 3%MeOH:CHCl₃, (c) 20% MeOH:CHCl₃, and (d) MeOH

Table 2. Screening the lignin fraction as a prebiotic for *Lactobacillus casei*

Fraction	Number of Microbes
	(10 ² colony /mL)
CHCl ₃	1,48 ± 0,29
3% MeOH:CHCl ₃	4,52 ± 0,10
20% MeOH:CHCl ₃	2,58 ± 0,23
MeOH	2,41 ± 0,34

3% MeOH:CHCl₃ fraction has higher prebiotic activity than other fractions. The 3% MeOH:CHCl₃ fraction has prebiotic activity against *L. casei* at 4,52 x 10² colonies / mL, while the CHCl₃ fraction, 20% MeOH:CHCl₃, and MeOH sequentially has the prebiotic activity against *L. casei* at 1,48 x 10²colonies / mL, 2,58 x 10²colonies / mL, and 2,41 x 10²colonies / mL.

Identification of 3% MeOH:CHCl₃ fraction compound content

3% MeOH:CHCl₃ fraction was subsequently identified using GC-MS. The identification process using GC-MS is done by injecting a 3% MeOH:CHCl₃fraction into the instrument . Lignin hydrolysis using NaOH catalysts produces the main products in the form of monomeric phenols and oligomers (Roberts et al. 2011). The compound structure of the 3% MeOH:CHCl₃ fraction can be seen in Figure 4 and the identification results is in Table 3.

Figure 4. Fraction compound of 3% MeOH:CHCl₃ (a) *benzaldehyde,4-hydroxy-3,5-dimethoxy-*,
(b) *1-methylbutyl hexadecanoate*, (c) *oleic acid*, (d) *di-2-ethylhexyl phthalate*

Table 3. Identification of lignin fraction monomer compounds of 3% MeOH:CHCl₃

Retention Time	Molecule Weight	Compound	(%)
8,886	207	Phenol,2-(1-methylpropyl)-,methylcarbamate	0,12
11,008	212	Propanoic acid,3-chloro-,4-formylphenyl Ester	0,38
11,942	152	Vanillin	1,96
13,958	166	Ethanone,1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-	0,15
14,709	166	Undecanoic acid,10-methyl-,methyl ester	0,47
15,839	214	Benzoic acid,4-hydroxy-3-methoxy-	1,04
16,313	168	Diethyl Phthalate	0,13
17,952	222	Benzaldehyde,4-hydroxy-3,5-dimethoxy-	2,76
18,621	182	p-Anisic acid,4-nitrophenyl ester	0,32
18,838	273	m-Anisic acid,3,4-dichlorophenyl ester	0,90
19,022	413	Carbamic acid,N-[1,1-bis(trifluoromethyl)ethyl]-4,(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenyl ester	0,95
19,114	220	4-Methyl-2-tert-octylphenol	0,54
19,235	296	m-Anisic acid,3,4-dichlorophenyl ester	1,10
19,447	270	Hexestrol	0,58
19,643	220	Phenol,2-methyl-4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-	0,33
19,708	192	1,3-Dimethyl-5-ethyladamantane	0,74
19,870	413	Carbamic acid,N-[1,1-Bis (trifluoromethyl)ethyl]-4,(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenyl ester	1,06
20,034	220	Phenol,2-methyl-4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-	0,71
20,126	228	Tetradecanoic acid	1,17
21,690	268	2-Pentadecanone,6,10,14-trimethyl-	0,07
21,980	194	Caffeine	0,12
22,135	278	1,2-Benzenedicarboxylic acid,bis(2- methylpropyl) ester	0,70
22,520	338	Erucic acid	0,09
22,848	604	Tritetracontane	0,28
22,968	268	9-Hexadecenoic acid, methyl ester,(Z)-	0,41

23,116	276	7,9-Di-tert-butyl-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-diene-2,8 dione	1,60
23,395	270	Pentadecanoic acid,14-methyl-,methyl ester	1,37
23,358	292	Benzenepropanoic acid,3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-4 hydroxy ,methyl ester	0,20
24,659	326	1-Methylbutyl hexadecanoate	41,03
26,713	298	1-Eicosanol	0,23
26,837	294	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-,methyl ester 9,12,15-Octadecatrienoic acid,2,3	0,32
26,971	352	dihydroxypropylester,(Z,Z,Z)-	0,58
28,036	282	Oleic acid	0,89
28,453	282	Oleic acid	3,61
28,853	282	Oleic acid	0,33
30,953	604	Tritetracontane	0,21
31,997	324	4,8,12,16-tetramethylheptadecan-4-olide	0,57
32,860	298	1-Eicosanol	0,11
32,963	604	Tritetracontane	0,16
35,399	242	1-decanol,2-hexyl-	0,25
36,624	390	Di-2-ethylhexyl phthalate	31,25
38,491	592	1-Hentetracontanol	0,21

Prebiotic Activity of 3% MeOH:CHCl₃ fraction against *Lactobacillus casei*

Prebiotic activity test uses a concentration between growth media with a fraction of 3% methanol-chloroform of 0; 2.5; 5; 7.5; 10; 12.5; and 15 (%). The number of colonies from *Lactobacillus casei* growth for each concentration of 3% MeOH:CHCl₃ fraction can be seen in Figure 5.

The 3% MeOH:CHCl₃ fraction at a concentration of 15% has the highest prebiotic activity against *L. casei* at 6.10×10^2 colonies / mL, while the 3% MeOH:CHCl₃ fraction at a concentration of 2.5% has the lowest prebiotic activity against *L. casei* at $2,69 \times 10^2$ colonies / mL. The prebiotic activity of the 3% MeOH:CHCl₃ fraction in *L. casei* growth can be seen in Figure 6.

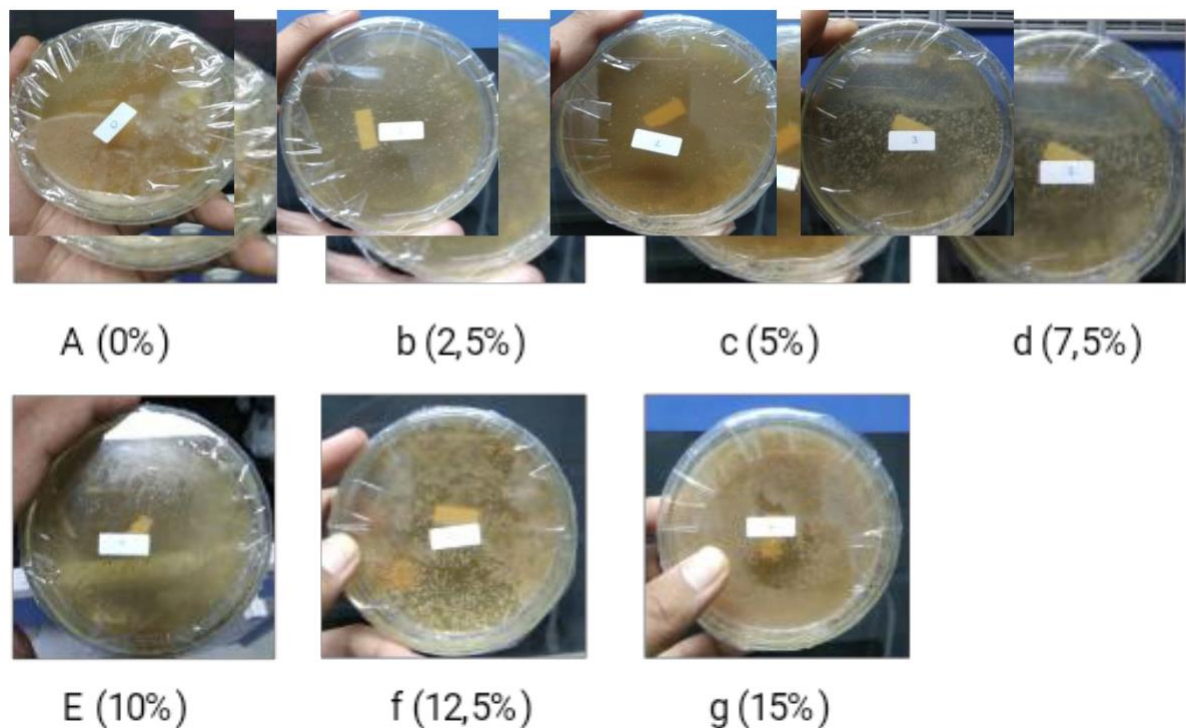


Figure 6. Prebiotic activity of the 3% MeOH:CHCl₃ fraction against the growth of *Lactobacillus casei*.

The results of prebiotic activity analysis of the 3% MeOH:CHCl₃ fraction showed that the more concentrations added to the growth media, the higher the growth of *L. casei*. Baurhoo et al., (2007) states that the lignin monomer in the alcell process has the ability as a prebiotic. Prayuwidayati et al. (2016) reported that the purification product of lignin formacell from oil palm empty bunches and oligomers which are phenolic compounds showed a prebiotic effect that can stimulate the growth of lactic acid bacteria. This shows that the fraction isolated from lignin and its derivatives can replace glucose in the MRS medium and can be used as an energy source for *L. casei* growth. These results indicate that the fraction of lignin isolation can be used as a dietary supplement which shows the prebiotic effect by supporting the growth of *L. casei*. Lignin in the purified Alcell process shows prebiotic effects in chickens, beneficial for bacterial growth and improves intestinal morphological structure, as measured by an increase in the number of villi and the number of goblet cells (Baurhoo et al., 2007). Cota and Whitfield (1998), reported that all hemicellulolytic rumen bacteria were able to utilize xylooligosaccharides as a growing substrate. The increased digestibility of crude protein and crude fiber will support ruminants' protein and energy metabolism. Non-digestible carbohydrate prebiotics include

lactulose, inulin, resistant starch and a number of oligosaccharides that can be a source of carbohydrates for beneficial bacteria in the digestive tract (Crittenden, 1999). Substrates such as inulin, fructo-oligosaccharides (FOS) and manan-oligosaccharides (MOS) derived from yeast cells, in addition to being hydrolyzed by endogenous enzymes, digestion can also be absorbed by the host. The possible mechanisms would decrease pH due to the production of short chain fatty acids, bacteriocin secretion and immune stimulation. MOS as a prebiotic has a different mechanism which selectively does not cause an increase in the population of beneficial bacteria, through its ability to attach and specific manosaic lectins from type 1 fimbriae negative G pathogens such as *Salmonella* and *E. coli* which will then be removed from the digestive tract (Baurhoo et al., 2007; Thomas et al., 2004).

Similar to the effects of MOS and antibiotic-free diet supplemented by 1.25% alcell lignin (LL) on lactobacilli and bifidobacteria, lignin at low levels has the potential to be classified as prebiotics (Baurhoo et al., 2007). The results showed that the use of lignin in the alcell process (12.5 g) could increase the intestinal concentration of Lactobacilli and Bifidobacteria in broilers (Baurhoo et al., 2007). Proliferation of digestive tract microbiota populations such as Lactobacilli and Bifidobacteria can be increased through prebiotic consumption. An increase in the number of microbiota ranges from 10-100 times in faeces (Salminen and Lee, 2009).

CONCLUSION

Lignin from oil palm empty bunch of black liquor contains benzaldehyde, 4-hydroxy-3,5-dimethoxy, 1-methylbutyl hexadecanoate, oleic acid, and di-2-ethylhexyl phthalate. Lignin 3% MeOH:CHCl₃ fraction with a concentration of 15% showed prebiotic activity against *Lactobacillus casei* at 6.1x10² colonies / ml. .

REFERENCES

- Baurhoo B, C.A. Ruiz-Feria and Zhaoa, X. 2008. Purified lignin: Nutritional and health impacts on farm animals—A review *Animal Feed Science and Technology* 144:175– 184
- Conzatti, L; F. Giunco, and Stagnaro, P. 2013. :Composites based on polypropylene and short wool fibres, *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 47: 165–171.
- Crittenden, R.G. 1999. Prebiotics In: Probiotics: A Critical Review. Horizon Scientific Press, Wymondham. pp. 141 – 156.
- Cotta, M.A. and Whitefield, T.R 1998. Xylooligosaccharides utilization by ruminal anaerobic bacterium *Selemonas ruminantium*. *Curr. Microbiol.* 36: 183-189.
- Elaine C, Ramires D, Megiatto, Christian G, and Alain C. 2010 Valorization of an Industrial Organosolv-Sugarcane Bagasse Lignin: Characterization and Use as a Matrix in Biobased Composites Reinforced With Sisal Fibers. *Biotechnol Bioeng*, 107(4): 612-621
- Hidayati, S., Zuidar, A.S., Satyajaya, W., Murhadi, dan Retnowati, D. 2018. Isolation and Characteruzation of Formacell Lignins from Oil Empty Fruits Bunches. Departement of Agro-industrial Technology. Universitas Lampung. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. 344. doi:10.1088/1757-899X/344/1/012006
- Goujon T, Ferret V, Mila I, Pollet B, Ruel K, Burlat V, Joseleau JP, Barrière Y, Lapierre C, and Jouanin L. 2003. Down-regulation of the AtCCR1 gene in *Arabidopsis thaliana*: effects on phenotype, lignins and cell wall degradability. *Planta*, 217: 218-228.
- Ibrahim, M.M., Agblevor , F.A., and EL-Zawawy, W.K., (2010), Isolation and Characterization of Cellulose and Lignin from Steam-Exploded Lignocellulosic Biomass, *Bioresources*, 5: 397-418.
- Lara, M.A., Rodríguez-Malaver, A.J., Rojas, O.J., Holmuist,O., González, A.M., and Bullón , J. 2003., Blackliquor Lignin Biodegradation by *Trametes elegans*, *International iodeteriorationandBiodegradation*, 52: 167–173.
- Laurichesse, S. ; L. Averous. 2013. Chemical Modification of lignin: Toward Biobased Polymers, *Progress in Polymer Science*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.11.004>
- Mankar, S. S. ; A. R. Chaudhari, and I. Soni, —Lignin in phenolformaldehyde adhesives, *International Journal of Knowledge Engineering*, 3 (1): 116–118, 2012.

- Magnus, N and E. H°akan. 2014. Lignin: recent advances and emerging applications. *Current Opinion in Colloid&Interface Science*, 19 (5): 409–416.
- Min, D.Y., Smith, S.W., Chang, H.M. and Jameel, H. 2013. Influence of Isolation Condition on Structure of Milled Wood Lignin Characterized by Quantitative C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Bioresources* 8 (2): 1790-1800.
- Podkořcielna, B; M. Goliszek, and O. Sevastyanova. 2017. New approach in the application of lignin for the synthesis of hybrid materials. *Pure and Applied Chemistry*, 89 (1): 161– 171.
- Prayuwidayati, M., Sunarti, T.C., Sumardi, Subeki, dan Wiryawan, K.G. 2016. Use of Lignin Formacell of Empty Bunch Palm Fiber as Feed Supplement and Prebiotics Candidate in Ruminant. *Pakistan Journal of Nutrition*, 15 (1): 58-65.
- Roberts, V., Stein, V., Reiner, T., Lemonidou, A., Li, X., and Lercher, J.A. 2011. Towards quantitative catalytic lignin depolymerization. *Chem. Eur. J.* 17 (21): 5939–5948.
- Rovrik, L.M. 2000. *Listeria Monocytogenes* in the Smoked Salmon Industry. *International Journal of Food Microbiology*. 62: 183-190.
- Salminen, S. and Wright, A.V. 1998. *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects* 2nd Edition, Revised and Expanded. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Salminen S. and Y.K Lee. 2009. *Handbook of Probiotics and Prebiotics* 2nd Edition. John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Schorr, D. ; P. N. Diouf, and T. Stevanovic. 2014. Evaluation of industrial lignins for biocomposites production. *Industrial Crops and Products*, 52: 65-73.
- Suroso E, Utomo TP, Hidayati S, Nuraini A. 2018. Pengasapan ikan kembung menggunakan asap cair dari kayu karet hasil redestilasi. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 21(1): 42-53.
- Thomas, W.E., Nilsson, L.M., Ferero, M., Sokurenko, E.V., and Vogel, V. 2004. Shear-dependent stick and roll adhesion of type 1 fimbriated *Eschericia coli*. *Mol. Microbiol.* 53: 1545 – 1557.
- Toma, M.M., and Pokrotnieks, J. 2006. Prebiotics as Functional Food: Microbiological and Medical Aspects. *Acta Universitatis Latviensis*. 710: 117 - 129.
- Yasumitsu U, Keiichi K. 2015. Utilization of wood cell wall components. *J Wood Sci*, 61(5): 447-454

Jurnal Teknologi pertanian Universitas Andalas, Status Accepted

**PEMANFAATAN LINDI HITAM HASIL ISOLASI LIGNIN DARI TANDAN
KOSONG KELAPA SAWIT SEBAGAI ANTI MIKROBA**

Muhammad Ferdiansyah Mulya Harahap¹, Sri Hidayati², Subeki² and Dewi Sartika²

1. Magister Teknologi Industri pertanian Pertanian, Universitas Lampung, Jl. Sumantri Brojonegoro No. 1 Bandar lampung, Indonesia

2. Departemen Teknologi Hasil Pertanian, Universitas lampung, Jl. Sumantri Brojonegoro No. 1 Bandar lampung, Indonesia

Korepondensi: srihidayati.unila@gmail.com

Abstrak

Telah dilakukan isolasi lignin hasil proses metode formacell dari Tandan kosong kelapa sawit. Hasil monomer dari pemecahan lignin diduga memiliki senyawa yang bersifat anti mikroba. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi hasil pemecahan monomer lignin dengan perlakuan 0%, 2,5%, 5%, 7,5%, 10%, 12,5%, dan 15% terhadap daya hambat sebagai antimikroba. Hasil penelitian menunjukkan bahwa proses pemurnian menggunakan fraksi 3% MeOH:CHCl₃ pada konsentrasi 12,5 dan 15% memiliki aktivitas antimikroba yang sama dan tertinggi terhadap *E. coli* dengan diameter zona hambat sebesar 6,33 mm, sedangkan aktivitas antimikroba terendah terhadap *E. coli* dimiliki fraksi 3% MeOH:CHCl₃ pada konsentrasi 2,5% dengan diameter zona hambat sebesar 5,17 mm.

Katakunci: lignin, lindi hitam, antimikroba, tandan kosong kelapa sawit

Pendahuluan

Indonesia merupakan penghasil kelapa sawit nomor satu dunia dengan produksi sawit diperkirakan mencapai 34,5 juta ton pada tahun 2018. Potensi TKKS sangat besar yaitu dalam satu ton tandan buah segar (TBS) yang diolah akan dihasilkan tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS) sekitar 23% dari tandan buah segar [1]. TKKS memiliki kadar selulosa 50%, lignin 16% dan hemiselulosa 19,6%. sehingga TKKS berpotensi untuk dijadikan alternatif pembuatan pulp non kayu pengganti pulp kayu [2]. Salah satu permasalahan pada industri pulp dan kertas adalah adanya limbah yang dikenal sebagai lindi hitam yang sangat mencemari lingkungan. Padahal, lindi hitam dapat diisolasi baik secara asam, alkohol maupun metode basa untuk mendapatkan lignin yang murni. Lindi dapat diisolasi dengan menggunakan metode asam maupun basa. Isolasi lignin dari lindi hitam TKKS menggunakan NaOH 30% menghasilkan padatan sebanyak 65,11% [3][4][5]. Hasil isolasi lignin dapat dimanfaatkan secara komersial menjadi karbon fiber, adhesif, poliuretan, poliester, bioplastik, dan *biooil* untuk campuran minyak bumi dari fosil, sebagai antibakteri dan antioksidan [6][7][8][5]. Monomer lignin dari tanaman softwood mengandung phenol yang seperti carvacrol, thymol dan cinnamaldehyde yang diduga dapat menghambat pertumbuhan mikroba [9][10][11][12][13][14][15][16][17] sehingga diharapkan dapat berfungsi sebagai obat yang memiliki kemampuan sebagai antimikroba yang bisa diharapkan sebagai pengganti obat sintetik atau penicillin yang sudah dilarang penggunaannya. Senyawa ini juga untuk antibakteri patogen [18][14][15] dan antibiotik . [9][10][11][12][13][34], mudah terurai dan renewable [36][37]. Hasil monomer dari lignin dengan proses alcell dapat menghambat pertumbuhan bakteri [38]. Selain itu

AlcellligninmengurangikonsentrasiEscherichiacolidalamkotoranunggasbiladibandingkandengandiet bebasantibiotikatauyangmengandungantibiotic[34]. Lignin dari hasil isolasi limbah cair pulp berbahan baku TKKS belum banyak diteliti terutama monomer dan senyawa yang dihasilkan akibat perbedaan cara ekstraksi. Dengan mengetahui senyawa yang dihasilkan terutama gugus fenolik dan senyawa senyawa yang bersifat anti mikroba sehingga diharapkan penelitian ini bermanfaat selain untuk memanfaatkan limbah pencemar lingkungan juga untuk memanfaatkan sumberdaya lokal seperti tandan kosong kelapa sawit untuk pengganti obat. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui karakteristik monomer lignin hasil isolasi dan uji efektifitasnya sebagai anti mikroba.

Metode penelitian

Bahanyangdigunakandalampenelitianadalah TKKS,asamasetatglasial,Piridin,CHCL₄, HPO₃,KMNO₄,KI,Na₂S₂O₃,HCl,H₂SO₄(72%),indikatoramilum0,2%. Alat yangdigunakanadalahreaktor,alat soxhletapparatus,dan alat analisis lain

Pelaksanaan Penelitian

A. Pemasakanpulp

Pemasakanpulp dilakukan denganmenggunakan proses*formacell* Sebanyak1000 gTKKS dimasukkandalamrotarydigester(alatpemasak).Kondisipemasakanmengacupadapenelitian[5]yaitumenggunakanrasioasamasetat1:14.Suhumaksimum150^oCdenganwaktu90menit,waktu padasuhumaksimum90menit. PulpdisaringdenganmenggunakanHidrolicScreener. Filtratyang berupaliquorataulindihitamdianalisis kadarligninnya.

B. EkstraksiPemurnianLignin

Endapan lignin didegradasi menggunakan CuSO₄, pridin, dan H₂O₂. Sebanyak 2 g endpan lignin dilarutkan dengan 20 mL larutan NaOH pH 12. Sebanyak 25 mL CuSO₄ 10⁻² M dan 5 mL piridin ditambahkan ke dalam larutan lignin. Larutan diaduk dengan pengaduk magnetik selama 30 menit, setelah itu ditambahkan 10 mL H₂O₂ 1 M sebanyak 5 kali dengan jarak waktu 30 menit. Selanjutnya larutan diaduk di ruang gelap selama 72 jam. Filtrat yang telah difraksinasi selanjutnya dievaporasi hingga diperoleh residu. Residu kemudian dilarutkan dalam 500 mL H₂O dan diekstraksi dengan EtOAc 500 mL sebanyak 3 kali hingga diperoleh lapisan H₂O dan EtOAc. Lapisan EtOAc dievaporasi hingga diperoleh residu. Residu

kemudian dimasukkan ke dalam silika gel kolom kromatografi dan dielusi dengan 3% MeOH:CHCl₃

E. Uji antimikroba

Pengujian anti mikroba dilakukan dengan menggunakan bakteri *E.coli*, *Salmonella*, dan *Staphylococcus*. Peubah yang diamati pada masing-masing senyawa monomer lignin yaitu uji zona hambat dengan metode difusi cakram.

Uji zona hambat dilakukan pada bakteri patogen dengan metode difusi agar. Uji antimikroba dilakukan terhadap *E. coli*. Peubah yang diamati pada masing-masing senyawa monomer lignin yaitu zona hambat yang terbentuk pada cawan. Uji zona hambat dilakukan pada bakteri patogen dengan metode cakram. (Gariga *et al.*, 1983). Bakteri yang digunakan dalam uji ini adalah *E. coli*. Kultur disegarkan terlebih dahulu dalam tabung yang berisi medium NB steril dan diinkubasi 24 jam pada 37⁰C . Sebagai stok bakteri, dbuat kultur bakteri dalam agar miring dengan medium NA, disimpan di dalam lemari pendingin setelah terlebih dahulu diinkubasi selama 24-48 jam.

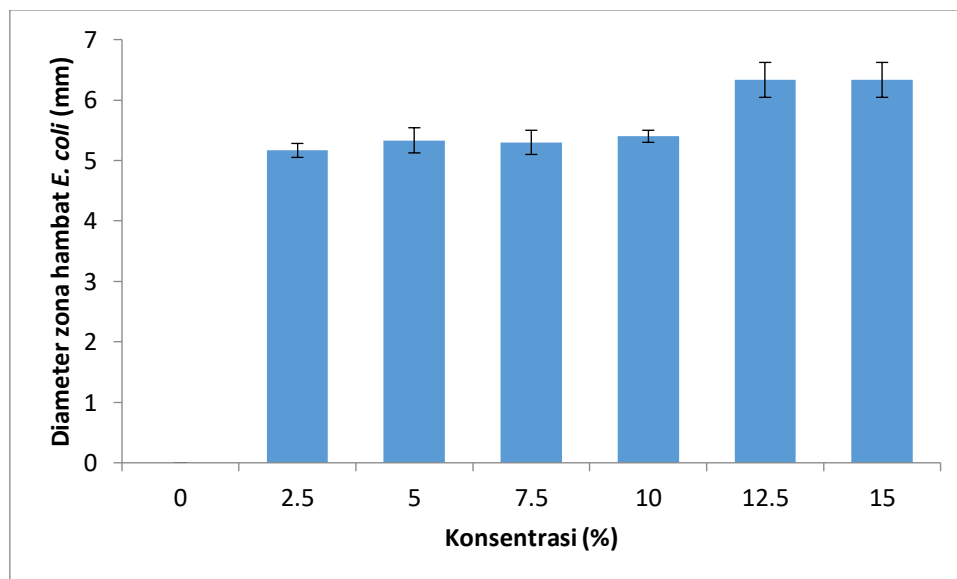
Setiap stok bakteri yang akan digunakan dalam pengujian aktivitas antibakteri, selalu disegarkan kembali di dalam medium NB steril selama 24 jam 37⁰C, dihomogenkan dengan alat vorteks, lalu diinokulasikan sebanyak 20 µl ke dalam labu Erlenmeyer yang berisi 20 mL medium agar cair (NA, 44-45⁰C) steril, dikocok merata, kemudian dituang ke dalam cawan petri steril dan dibiarkan sampai membeku. Selanjutnya letakkan kertas cakram yang sudah disterilisasi terlebih dahulu di atas media agar. Fraksi monomer lignin yang akan diuji dibuat konsentrasi dengan menggunakan pelarut aquades sebesar 0%, 2,5%, 5%, 7,5%, 10%, 12,5%, dan 15%. Zona penghambatan yang diukur adalah radius (r, mm) penghambatan berupa areal beining di sekeliling kertas cakram, setelah diinkubasi selama 1 hari pada 37⁰C. Pengukuran jari-jari zona hambat di sekeliling sumur uji dilakukan dengan cara mengukur jarak dari tepi

kertas cakram uji ke batas lingkaran zona hambat menggunakan jangka sorong (ketelitian 0,01 mm) pada beberapa sisi kertas cakram, lalu dirata-ratakan.

Hasil dan Pembahasan

Aktivitas Antimikroba Fraksi 3% MeOH:CHCl₃ terhadap *Eschericia coli*

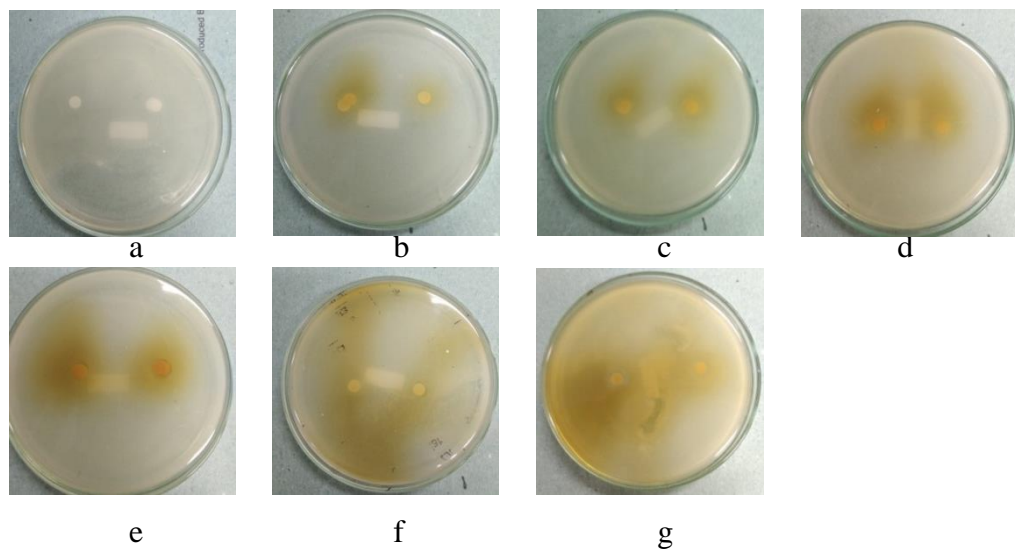
Fraksi 3% MeOH:CHCl₃ diuji aktivitas antimikroba pada berbagai konsentrasi 0%, 2,5%, 5%, 7,5%, 10%, 12,5%, dan 15%. Masing-masing fraksi diteteskan sesuai konsentrasinya ke bagian atas kertas cakram yang diletakan di atas permukaan Nutrient Agar sebagai media pertumbuhan *Eschericia coli* dalam cawan petri. Pengamatan diameter zona hambat dilakukan setelah 24 jam dan diukur dengan menggunakan jangka sorong. Berdasarkan hasil pengukuran diameter zona hambat masing-masing konsentrasi fraksi 3% MeOH:CHCl₃ terhadap *Eschericia coli* dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Pengaruh berbagai konsentrasi fraksi 3% MeOH:CHCl₃ terhadap diameter zona hambat bakteri *Eschericia coli*

Gambar 1 menunjukkan bahwa fraksi 3% MeOH:CHCl₃ pada konsentrasi 0% tidak memiliki aktivitas antimikroba terhadap *E. coli*. Hal ini ditunjukkan dengan tidak terbentuknya zona hambat disekeliling kertas cakram. Fraksi 3% MeOH:CHCl₃ pada konsentrasi 12,5 dan 15%

memiliki aktivitas antimikroba yang sama dan tertinggi terhadap *E. coli* dengan diameter zona hambat sebesar 6,33 mm, sedangkan aktivitas antimikroba terendah terhadap *E. coli* dimiliki fraksi 3% MeOH:CHCl₃ pada konsentrasi 2,5% dengan diameter zona hambat sebesar 5,17 mm. Zona hambat yang terbentuk pada uji aktivitas antimikroba fraksi 3% MeOH:CHCl₃ terhadap *E. coli* dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Zona hambat yang terbentuk pada uji aktivitas antimikroba fraksi 3% MeOH:CHCl₃ terhadap *Eschericia coli*.

Adanya senyawa antioksidan dan antibakteri yang terdapat di dalam fraksi hasil isolasi lignin dapat menghambat pertumbuhan mikroba. Komponen antibakteri seperti golongan benzene, bersifat sebagai antibakteri (Bartolomeazzi *et al.*, 2007), seperti *1,2 benzenedicarboxylic acid, bis(2- methylpropyl)ester, benzenepropanoic acid, 3,5-bis (1,1 dimethylethyl)-4-hydroxy-, methyl ester*. Komponen fenolik seperti *phenol, 2-(1-methylpropyl)-, methylcarbamate, manisic acid, 3,4-dichlorophenyl ester*, dan *phenol, 2-methyl-4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-* adalah komponen yang bersifat antimikrobal (Soldera *et al*, 2008; Kristinsson *et al* 2007; Gomez-Estaca, 2007; Milly *et al* 2005, Muratore and Licciardello, 2005; Sunen *et al* 2003, Sunen *et al* 2001, Vitt *et al*, 2001).

Penghambatan bakteri terjadi karena fenol menyerang sel vegetatif berprenetasi dan merepresitifikasi protein yang terdapat dalam sel mikroba dan adanya interaksi antara ikatan hidrogen dengan protein penyusun enzim (Panagan dan Syarif, 2009; Saravanakumar *et al.*, 2009). Beberapa jenis asam, seperti asam anisic dan asam karbamat, diduga sebagai antibakteri (Budianto, 2008). Lefroi and Joffraud 2000; Rorvik 2000) mengatakan bahwa senyawa aldehid, asam karboksilat dan fenol mempunyai sifat antimikrobial dan antioksidan.

Senyawa fenol dan flavonoid hasil pecahan monomer lignin dari tanaman softwood bersifat sebagai antimikroba dan antibiotik (Roller and Seedhar, 2002). Philip (2000), menyatakan bahwa hasil monomer dari lignin dengan proses *alcell* dapat menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli*, *S. aureus*, dan *Pseudomonas*. Senyawa fenol dari lignin dapat merusak dinding mikroba dan menyebabkan lisis pada bakteri diikuti pelepasan konten sel (Sabu, 2011).

Pada fraksi terdapat asam lemak jenuh dan tak jenuh yang memiliki atom karbon lebih dari sepuluh yang dapat mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan bakteri atau kematian pada bakteri patogen yang diujikan (Hou, 2000). Asam lemak yang memiliki aktivitas antimikroba adalah *9-hexadecanoic acid* (Agoramoorthy *et al.* 2007). Senyawa *9-hexadecanoic acid* memberikan efek terhadap permeabilitas membran dan partisi ion ada lapisan membran sel dari mikroorganisme (Lagner and Hui, 2000). Senyawa dari golongan *benzene* juga memiliki aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan mikroorganisme. Suzuki *et al.* (1988) menyatakan bahwa senyawa *di-2-ethylhexyl phthalate* dapat bereaksi dengan sisi hidrofobik pada membran sel yang menyebabkan terganggunya permeabilitas dari membran sel.

Hasil identifikasi GC-MS senyawa fraksi 3% MeOH:CHCl₃

Tabel 1. Identifikasi kandungan senyawa monomer lignin fraksi 3% MeOH:CHCl₃

RT	BM	Senyawa	Jumlah(%)
8,886	207	Phenol,2-(1-methylpropyl)-,methylcarbamate	0,12
11,008	212	Propanoic acid,3-chloro-,4-formylphenyl Ester	0,38
11,942	152	Vanillin	1,96
13,958	166	Ethanone,1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-	0,15
14,709	166	Undecanoic acid,10-methyl-,methyl ester	0,47
15,839	214	Benzoic acid,4-hydroxy-3-methoxy-	1,04
16,313	168	Diethyl Phthalate	0,13
17,952	222	Benzaldehyde,4-hydroxy-3,5-dimethoxy-	2,76
18,621	182	p-Anisic acid,4-nitrophenyl ester	0,32
18,838	273	m-Anisic acid,3,4-dichlorophenyl ester	0,90
19,022	413	Carbamic acid,N-[1,1- bis(trifluoromethyl)ethyl]-4,(1,1,3, tetramethylbutyl)phenyl ester	0,95
19,114	220	4-Methyl-2-tert-octylphenol	0,54
19,235	296	m-Anisic acid,3,4-dichlorophenyl ester	1,10
19,447	270	Hexestrol	0,58
19,643	220	Phenol,2-methyl-4-(1,1,3,3- tetramethylbutyl)-	0,33
19,708	192	1,3-Dimethyl-5-ethyladamantane	0,74
19,870	413	Carbamic acid,N-[1,1- Bis (trifluoromethyl)ethyl]-4,(1,1,3, tetramethylbutyl)phenyl ester	1,06
20,034	220	Phenol,2-methyl-4-(1,1,3,3- tetramethylbutyl)-	0,71
20,126	228	Tetradecanoic acid	1,17
21,690	268	2-Pentadecanone,6,10,14-trimethyl-	0,07
21,980	194	Caffeine	0,12
22,135	278	1,2-Benzenedicarboxylic acid,bis(2- methylpropyl) ester	0,70
22,520	338	Erucic acid	0,09
22,848	604	Tritetracontane	0,28
22,968	268	9-Hexadecenoic acid, methyl ester,(Z)-	0,41
23,116	276	7,9-Di-tert-butyl-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-diene-2,8 dione	1,60
23,395	270	Pentadecanoic acid,14-methyl-,methyl ester	1,37
23,358	292	Benzenepropanoic acid,3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-4 hydroxyl-,methyl ester	0,20
24,659	326	1-Methylbutyl hexadecanoate	41,03
26,713	298	1-Eicosanol	0,23
26,837	294	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-,methyl ester	0,32
26,971	352	9,12,15-Octadecatrienoic acid,2,3 dihydroxypropylester,(Z,Z,Z)-	0,58
28,036	282	Oleic acid	0,89
28,453	282	Oleic acid	3,61
28,853	282	Oleic acid	0,33
30,953	604	Tritetracontane	0,21
31,997	324	4,8,12,16-tetramethylheptadecan-4-olide	0,57
32,860	298	1-Eicosanol	0,11
32,963	604	Tritetracontane	0,16
35,399	242	1-decanol,2-hexyl-	0,25
36,624	390	Di-2-ethylhexyl phthalate	31,25
38,491	592	1-Hentetracontanol	0,21

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa proses pemurnian menggunakan fraksi 3% MeOH:CHCl₃ pada konsentrasi 12,5 dan 15% memiliki aktivitas antimikroba yang sama dan tertinggi terhadap *E. coli* dengan diameter zona hambat sebesar 6,33 mm,

sedangkan aktivitas antimikroba terendah terhadap *E. coli* dimiliki fraksi 3% MeOH:CHCl₃ pada konsentrasi 2,5% dengan diameter zona hambat sebesar 5,17 mm.

DAFTAR PUSTAKA

27. [1]Darnoko. 1992. Potensi Pemanfaatan Limbah Lignoselulosa Kelapa Sawit melalui Biokonversi. Berita Penelitian Perkebunan. 2 (2): 85-87.
28. [2]Hidayati, S., Zuidar and Satyajaya. 2017. Effect Of Acetic Acid: Formic Acid Ratio on Characteristics Of Pulp From Oil Palm. ARPN Journal of Engineering and Applied Sciences. Vol. 12, No. 12, June 2017
29. [3]Lin, S. Y. dan Carlton W.Dence. 1992. Methods in Lignin Chemistry. Berlin Heidelberg : Springer-Verlag.
30. [4]Hidayati, S, Zuidar, W Satyajaya, Murhadi, and D Retnowati. 2018. Isolation and characterization of formacell Lignins from oil empty fruits bunches IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering 344 (2018)
31. [5]Ayyachamy, M; Finola E. Cliffe, Jessica M. Coyne, John Collier, Maria G. Tuohy. 2013. Lignin: untapped biopolymers in biomass conversion technologies. Biomass Conversion and Biorefinery, Volume 3, Number 3, Page 255
32. [6]Bonini, C., Auria, M; Emmanuel, L., Ferri, R., Pucciarello, R dan sabia, A.R. 2005. Polyurethanes and Polyester from Lignin. J.Appl.Polym.Sci. Vol. 98 (3): 1451-1456.
33. [7]Kleinert, M dan Barth, T. 2008. Towards in Lignicellulosic Biorefinery: Direct One Step Conversion of Lignin to Hydrogen-Enriched Biofuel. Energy Fuels. Vol 22 (2): 1371-1379.
34. [8]Xu, F., Sun, J., Sun, R., Fowler, P., dan Baird, M.S. 2006. Comparative Study of Organosolve Lignin From Wheat Straw. Ind. Crops Product. Vol 23 (2): 180-193.
35. [9]Smid, E.J., Hendriks, I., Boerrigter, H.A.M., Gorris, L.G.M., 1996. Surface disinfection of tomatoes using the natural plant compound trans-cinnamaldehyde. Postharvest Biol. Tech. 9, 343–350.
36. [10]Ultee, A., Slump, R.A., Steging, G., Smid, E.J., 2000. Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. J. Food Prot. 63, 620–624.
37. [11]Skandamis, P.N., Nychas, G., 2001. Effect of oregano essential oil on microbiological and physio-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. J. Appl. Microbiol. 91, 1011–1022.
38. [12] Smith-Palmer, A., Stewart, J., Fyfe, L., 2001. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. Food Microbiol. 18, 463–470.
39. [13] Roller, S., Seedhar, P., 2002. Carvacrol and cinnamic acid inhibit microbial growth in fresh-cut melon and kiwifruits at 4 °C and 8 °C. Lett. Appl. Microbiol. 35, 390–394.
40. [14] Lee, K.W., Everts, H., Beynen, A.C., 2004. Essential oils in broiler nutrition. Inter. J. Poult. Sci. 3, 738–752.
41. [15] Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Simin, N., Anackov, G., 2006. Characterization of the volatile composition of essential oils of some lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. J.Agric. Food Chem. 54, 1822–1828.

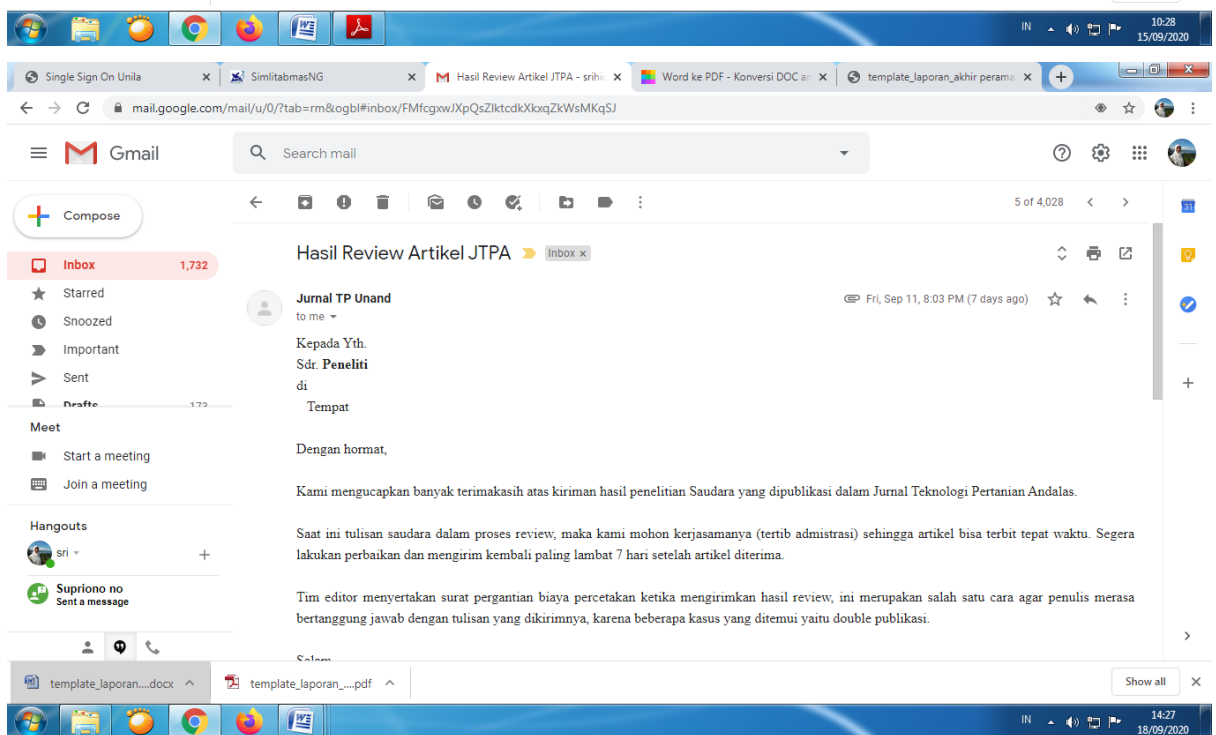
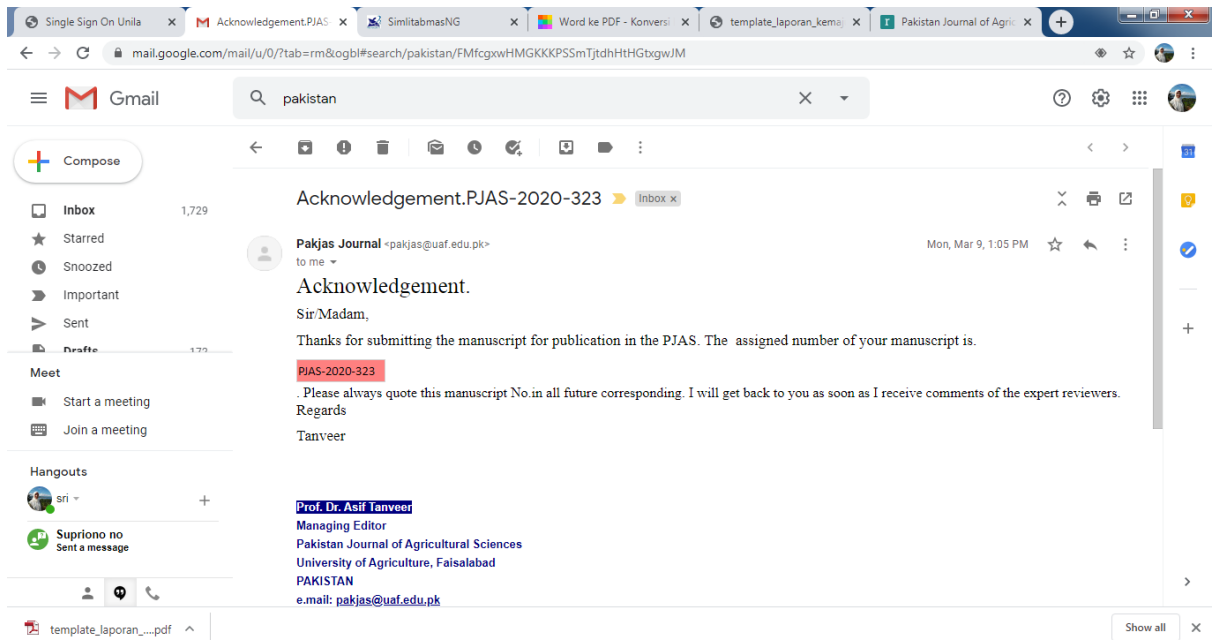
42. [16] Doherty WOS, Mousavioun P, Fellows CM (2011) Value-adding to cellulosic ethanol:Lignin polymers. *Industrial Crops and Products* 33: 259-276.
43. [17]Sriroth and Sunthornvarabhas, *Biochem Pharmacol* (Los Angel) 2018,Lignin from Sugar Process as Natural Antimicrobial Agent. Volume 7 • Issue 1 : 1-4.
44. [18] Prayuwidayati, M., T. C. Sunarti., Sumardi, Subeki, dan K. G. Wiryawan. 2016. *Use of Lignin Formacell of Empty Bunch Palm Fiber as Feed Supplement and Prebiotics Candidate in Ruminant.* *Pakista Journal of Nutrition* 15 (1): 58-65 2016
45. [19] Toma MM, Pokrotnieks J. 2006. Prebiotics as Functional Food: Microbiological and MedicalAspects. *Acta Universitatis Latviensis.* 129.:710: 117
46. [20] Wells AL, Saulnier DMA, Gibson GR. 2008.*Gastrointestinal microflora and interactions with gutmucosa.* In: Gibson GR, Roberfroid MB, editor. *Handbook of Prebiotics.* New York (US): CRC.Press. <http://doi.org/fmgrnz>
47. [21] Simatupang, H, A. Nata, dan N. Herlina. 2012. Studi Isolasi dan Rendemen Lignin Dari Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS). *Jurnal Teknik Kimia USU*, Vol. 1, No. 1
48. [22] Achmadi, S.S. 1980. *Organosolv Pulping of Aspen Chips. A Research Report* Departement of Forestry.
49. [23] Rostika. 2002. *Karakteristik Lignin Dari Limbah Pemasakan Kayu Hutan Tanaman Industri (HTI) Secara Kromatografi.* Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Industri ; Departemen Perindustrian dan Perdagangan.
50. [24] Setiawan, Y. dan E. Ruhyat. 2001. *Pemanfaatan Lindi Hitam (Black Liquor) Industri Kertas Sembahyang (Joss Paper) Untuk Pembuatan Dispersan.* *Berita Selulosa* (37) 3 & 4. Departemen Perindustrian RI. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Industri Selulosa. Bdanung.
51. [25] Sjostrom, E. 1995. *Kimia Kayu, Dasar-dasar dan Penggunaan Edisi Kedua.* Diterjemaahkan oleh Sastrohamidjojo, H. Terjemahan dari : *Wood Chemistry, Fundamentals dan Application Second Edition.* Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
52. [26] Guerra, A;, I Filpponen, L. Lucia, C Saquing, S Baumberger Dan D Argyropoulos. 2006. *Toward a Better Understaning of the Lignin Isolation Process from Wood.* *J. Agric. Food Chem.* (54) : 5939-5947
53. [27] Ibrahim, M.N.M., S.B. Chuah. 2003. *Characterization of Lignin Precipitated From The Soda Black Liquor of Oil Palm Empty Fruit bunch Fibers by Various Mineral Acids.* *AJSTD.* 21 (1): 57-67.
54. [28] Heradewi. 2007. *Isolasi Lignin Dari Lindi Hitam Proses Pemasakan Organosolv Serat Tandan Kosong Kelapa Sawit (Tkks).* Skripsi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
55. [29] Gibson, G.R., Roberfroid, M.B., 1995. *Dietary modulation of the human colonic microbiotica: introducing the concept of prebiotics.* *J. Nutr.* 125, 1404–1412.
56. [30] Ralph, J.; Marita, J.; Ralph, S.; Hatfield, R.; Lu, F.; Ede, R.; Peng, J.; Quideau, S.; Helm, R.; Grabber, J.; Kim, H.; Jimenez-Monteon, G.; Zhang, Y.; Jung, H.; Ldanucci, L.; Mackay, J.; Sederoff, R.; Chapple, C.; Boudet, A. 2000. *Solution-state NMR of lignins.* In *Advances in Lignocellulosic Characterization;* Argyropoulos, D., Rials, T., Eds.; TAPPI Press: Atlanta. Pp 55-108.
57. [31] Gibson, G.R., Wang, X., 1994. *Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria.* *J.Appl. Bacteriol.* 77, 412–420.

58. [32] Jin, L.Z., Ho, Y.W., Abdullah, N., Ali, M.A., Jalaludin, S., 1996a. Influence of dried *Bacillus subtilis* and *Lactobacilli* cultures on intestinal microflora and performance in broilers. *Asian Aust. J. Anim. Sci.* 9, 397–403
59. [33] Salminen S., Wright AV, dan Ouwehand A. 2004. *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects* 3th Edition, Revised and Expanded. Marcel Dekker, Inc., New York.
60. [34] Baurhoo B, C.A. Ruiz-Feria b, X. Zhaoa. Purified lignin: Nutritional and health impacts on farm animals—A review *Animal Feed Science and Technology* 144 (2008) 175–184
61. [35] Pelzcar, M. J. and R. D. Reid. 1979. *Food of Microbiology*. Tata McGraw Hill Book Co.Inc, Kogunha Co. Ltd, Tokyo.
62. [36] Mollahosseini A, Rahimpour A, Jahamshahi M, Peyravi M, Khavarpour M . (2012). The effect of silver nanoparticle size on performance and antibacterially of polysulfone ultrafiltration membrane. *Desalination* 306: 41-50.
63. [37] Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M (2008) Biological effects of essential oils—a review. *Food and Chemical Toxicology* 46: 446-475.
64. [38] Phillip, L. E., E. S. Idziak, and S. Kubow. 2000. The potential use of lignin in animal nutrition, and in modifying microbial ecology of the gut. Pages 1–9 in *East. Nutr. Conf. Anim. Nutr. Assoc. of Canada*, Montreal, Quebec, Canada.
65. [39] Sabu, T., Visakh, P.M. and Mathew, A.P. (2011), “Advances in natural polymers: composites and nanocomposites”. Springer, Dordrecht.
66. [40] Soldera, S., Sebastianutto, N., and Bortolomeazzi, R. 2008. Composition of phenolic compounds and antioxidant activity of commercial aqueous smoke flavorings. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 56: 2727-2734.
67. [41] Kristinsson, H.G., Danyali, N., and Ua-Angkoon, S. 2007. Effect of Filtered Wood Smoked Treatment on Chemical and Microbial Changes in Mahi-mahi fillets. *Journal of Food Science*. 72: 16-24
68. [42] Gomez-Estaca J, Montero P, Gimenez B, Gomez-Guillen, M.C. 2007. Effect of Functional Edible Films and Highpressure Processing on Microbial and Oxidative Spoilage in Cold-Smoked Sardine (*Sardina pilchardus*). *Food Chemistry*. 105: 511-520
69. [43] Milly, P.J., Toledo, R.T., and Ramakrishnan, S. 2005. Determination of Minimum Inhibitory Concentrations of Liquid Smoke Fractions. *Journal of Food Science*. 70: 12-17.
70. [44] Muratore G, and Licciardello, F. 2005. Effect of Vacuum and Modified Atmosphere Packaging on the Shelf-life of Liquid-smoked Wood Fish (*Xiphias gladius*) slices. *Journal of Food Science*. 68: 1155-1160.
71. [45] Sunen, E., Aristimuni, C., and Fernandez-Galian B. 2003. Activity of Smoke Wood Condensates against *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* in vacuum-packed, Cold-Smoked Rainbow Trout Stored at 4°C. *Food Research International*. 36: 111-116.
72. [46] Sunen, E., Fernandez-Galian B., and Arustumuno, C. 2001. Antibacterial Activity of Smoke Wood Condensates Against *Aeromonas Hydrophila*, *Yersinia Enterocolitica* and *Listeria Monocytogenes* at Low Temperature. *Food Microbiology*. 18: 387-383.

73. [47] Gyawali R, Ibrahim SA (2014) Natural products as antimicrobial agents. *Food Control* 46: 412-429.
74. [48] Yang W, Fortunati E, Dominici F, Giovanale G, Mazzaglia A, et al. (2016) Effect of cellulose and lignin on disintegration, antimicrobial and antioxidant properties of PLA active. *International Journal of Biological Macromolecules* 89: 360-368.
75. [49] Ugartondo V, Mitjans M, Vinardell MP (2008) Comparative antioxidant and cytotoxic effects of lignins from different sources. *Bioresource Technology* 99: 6683-6687
76. [50] Datta, R. 1981. Acidogenic fermentation of linocellulose acid yield conversion of components. *Biotechnol. Bioeng* 23: 2167-2170.
77. [51] Hidayati, S., Zuidar, S., dan Fahreza, A. 2016. Optimasi Produksi Pulp *Formacell* dari Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS) dengan Metode Permukaan Respon, *Reaktor*, 16(4), 161-171,
78. [52] NREL. 2008. Determination of Structural Carbohydrat dan Lignin in Biomass. Biomass program Analysis Technology Team Laboratory Procedure, National Renewable Energy Lab.
79. [53] American Society for Testing dan Material. 1981. Methoxyl Content of Pulp dan Wood. ASTM 15120-81.
80. [54] Kline, L.M., Hayes, D.G, Komac, A.R dan Labbe, N. 2010. Simplified Determination of Lignin Content in Hard dan Soft Woods Via UV-Spectrofotometric Analysis of Biomass Dissolved in Ionic Liquids. *Bioresources*. Volume 5 (3): 1366-1383.
81. [55] Parasuraman, P., Singh, R., Bolton, T.S., Omori, S dan Francis, R.C. 2007. Estimation of Hardwood Lignin Concentrations by UV Spectroscopy dan Chlorine Demethylation. *Bioresources*. Vol 2 (3): 459-471.
- [56] Ohra-aho, T; Gomes, F.J.B; Colodette, J.L dan Tamminen, T. 2013. S/G ratio and lignin structure among Eucalyptus hybrids determined by Py-GC/MS and nitrobenzene oxidation. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*(101):166–171..

D. **STATUS LUARAN:** Tuliskan jenis, identitas dan status ketercapaian setiap luaran wajib dan luaran tambahan (jika ada) yang dijanjikan pada tahun pelaksanaan penelitian. Jenis luaran dapat berupa publikasi, perolehan kekayaan intelektual, hasil pengujian atau luaran lainnya yang telah dijanjikan pada proposal. Uraian status luaran harus didukung dengan bukti kemajuan ketercapaian luaran sesuai dengan luaran yang dijanjikan. Lengkapi isian jenis luaran yang dijanjikan serta unggah bukti dokumen ketercapaian luaran wajib dan luaran tambahan melalui Simlitabmas mengikuti format sebagaimana terlihat pada bagian isian luaran

1. Judul: THE UTILIZATION OF LIGNIN MONOMER ISOLATION RESULTS FROM BLACK LIQUOR OF EMPTY PALM OIL BUNCHES AS A PREBIOTIC,
Pada jurnal *Pakistan journal of Agricultural Science*, Q3 SJR 0,28, dalam proses revisi
2. Judul : PEMANFAATAN LINDI HITAM HASIL ISOLASI LIGNIN DARI TANDAN KOSONG KELAPA SAWIT SEBAGAI ANTI MIKROBA pada jurnal *Teknologi pertanian Andalas*, Sinta 3 ACCEPTED



E. **PERAN MITRA:** Tuliskan realisasi kerjasama dan kontribusi Mitra baik *in-kind* maupun *in-cash* (jika ada). Bukti pendukung realisasi kerjasama dan realisasi kontribusi mitra dilaporkan sesuai dengan kondisi yang sebenarnya. Bukti dokumen realisasi kerjasama dengan Mitra diunggah melalui Simlitabmas mengikuti format sebagaimana terlihat pada bagian isian mitra

Tidak ada

F. **KENDALA PELAKSANAAN PENELITIAN:** Tuliskan kesulitan atau hambatan yang dihadapi selama melakukan penelitian dan mencapai luaran yang dijanjikan, termasuk penjelasan jika pelaksanaan penelitian dan luaran penelitian tidak sesuai dengan yang direncanakan atau dijanjikan.

Terlalu lama menunggu hasil rewiuw

G. RENCANA TINDAKLANJUT PENELITIAN: Tuliskan dan uraikan rencana tindaklanjutan penelitian selanjutnya dengan melihat hasil penelitian yang telah diperoleh. Jika ada target yang belum diselesaikan pada akhir tahun pelaksanaan penelitian, pada bagian ini dapat dituliskan rencana penyelesaian target yang belum tercapai tersebut.

Memperbaiki jurnal hasil rewiuw

H. DAFTAR PUSTAKA: Penyusunan Daftar Pustaka berdasarkan sistem nomor sesuai dengan urutan pengutipan. Hanya pustaka yang disitasi pada laporan akhir yang dicantumkan dalam Daftar Pustaka.

1. Suhartati, S., Puspito, R., Rizali, F., dan Anggraini, D. 2016. Analisis Sifat Fisika dan Kimia Lignin Tandan Kosong Kelapa Sawit asal Desa Sape, Kabupaten Sanggau, Kalimantan Barat. Akademi Kimia analisis Caraka Nusantara. Jakarta
2. Anisa, 2009. Karakteristik Lignin dari Lindi Hitam Tandan Kosong Sawit Menggunakan H_2PO_4 dan H_2SO_4 dengan Variasi Suhu dan Konsentrasi. Skripsi: Universitas Tanjungpura
3. Roberts, V., Stein, V., Reiner, T., Lemonidou, A., Li, X., and Lercher, J.A. 2011. Towards quantitative catalytic lignin depolymerization. *Chem. Eur. J.* 17 (21): 5939–5948
4. Davis, W.W. and Stout, T.R. 1971. Disc Plate Method of Microbiological Antibiotic Assay. *Journal of Microbiology* Vol 22 No. 4
5. Greenwood. 1995. Antibiotics. Susceptibility (Sensitivity) Test Antimicrobial and Chemotherapy. Mc. Graw Hill Company, USA
6. Bartolomeazzi, R., Sebastianutto, N., Toniolo, R., and Pizzariello, A. 2007. Comparative evaluation of the antioxidant capacity of smoke flavouring phenols by crocin bleaching inhibition, DPPH radical scavenging and oxidation potential. *Food Chemistry*. 100: 1481 – 1489.
7. Soldera, S., Sebastianutto, N., and Bartolomeazzi, R. 2008. Composition of phenolic compounds and antioxidant activity of commercial aqueous smoke flavorings. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 56: 2727-2734
8. Roller, S., Seedhar, P., 2002. Carvacrol and cinnamic acid inhibit microbial growth in fresh-cut melon and kiwifruits at 4 °C and 8 °C. *Lett. Appl. Microbiol.* 35, 390–394
9. Sabu, T., Visakh, P.M. and Mathew, A.P. 2011. Advances in natural polymers: composites and nanocomposites. Springer, Dordrecht.
10. Hou, C.T. 2000. Biotransformation of unsaturated fatty acids to industrial products. *Advances in applied Microbiology*
11. Baurhoo B, C.A. Ruiz-Feria b, X. Zhaoa. 2008. Purified lignin: Nutritional and health impacts on farm animals—A review *Animal Feed Science and Technology* 144: 175–184
12. Prayuwidayati, M., T. C. Sunarti., Sumardi, Subeki, dan K. G. Wiryawan. 2016. Use of Lignin Formacell of Empty Bunch Palm Fiber as Feed Supplement and Prebiotics Candidate in Ruminant. *Pakistan Journal of Nutrition* 15 (1): 58-65 2016
13. Thomas, W.E., Nilsson, L.M., Ferero, M., Sokurenko, E.V., and Vogel, V. 2004. Shear-dependent stick and roll adhesion of type 1 fimbriated *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 53: 1545 – 1557

Dokumen pendukung luaran Wajib #1

Luaran dijanjikan: Artikel di Jurnal Internasional Terindeks di Pengindeks Bereputasi

Target: Accepted

Dicapai: Sedang direview

Dokumen wajib diunggah:

1. Naskah artikel
2. Bukti sedang direview

Dokumen sudah diunggah:

1. Naskah artikel
2. Bukti sedang direview

Dokumen belum diunggah:

- Sudah lengkap

Nama jurnal: pakistan Journal Agricultural Science

Peran penulis: corresponding author | EISSN: 20760906/ 05529034

Nama Lembaga Pengindek: scopus, Thomson Reuters

URL jurnal: <https://www.pakjas.com.pk/>

Judul artikel: THE UTILIZATION OF LIGNIN MONOMER ISOLATION RESULTS FROM BLACK LIQUOR OF EMPTY PALM OIL BUNCHES AS A PREBIOTIC

THE UTILIZATION OF LIGNIN MONOMER ISOLATION RESULTS FROM BLACK LIQUOR OF EMPTY PALM OIL BUNCHES AS A PREBIOTIC

Muhammad Ferdiansyah Mulya Harahap¹, Sri Hidayati², Subeki² and Dewi Sartika²

1. Master's Degree in Agricultural Industry Technology, University of Lampung, Jl. Sumantri Brojonegoro No. 1 Bandar Lampung, Indonesia
2. Department of Agricultural Product Technology, University of Lampung, Jl. Sumantri Brojonegoro No. 1 Bandar Lampung, Indonesia
Correspondence: srihidayati.unila@gmail.com

Abstract

Pulp processing produces waste in the form of black liquor. The main ingredient of black liquor is lignin. Lignin contains phenolpropanoid compound which is considered to have prebiotic and anti-microbial activity. It is a component of lignocellulose which is known to have prebiotic and antimicrobial activity effects due to its nature which is difficult to digest and consists of phenolpropanoid components. This study aims to look and identify the results of purification lignin and activity test as a prebiotic. The identification technique of lignin fraction was carried out by using Thin Layer Chromatography (TLC) and Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) plates. Prebiotic activity tests were carried out by using the calculation of total bacteria on the growth of *Lactobacillus casei*. The results showed that the purification process using CHCl_3 , 3% MeOH: CHCl_3 , 20% MeOH: CHCl_3 , and MeOH yielded yields of 10.68%, 6.34%, 11.38% and 44.85%. The 3% MeOH: CHCl_3 fraction was identified as containing benzaldehyde, 4-hydroxy-3,5-dimethoxy, 1-methylbutyl hexadecanoate, oleic acid, and di-2-ethylhexyl phthalate. The 3% MeOH: CHCl_3 fraction at a concentration of 15% showed activity as a prebiotic for *L. casei* at 6.1×10^2 colonies / mL.

Keywords: lignin, black liquor, prebiotic, Empty palm oil bunches

INTRODUCTION

The process of pulp processing produces liquid waste known as black liquor. The content of lignin in black liquor has a complex structure that is difficult to decompose so that it has the potential to pollute the environment (Lara et al., 2003). Lignin content in black liquor is around 25-35% of the total (Ibrahim et al., 2010; Goujon et al., 2003) so that it can be isolated for further use. Currently, there are people who want to utilize black liquor as a source of raw material for lignin (Min et al., 2013). Lignin can be used as biomass (Schorr et al., 2014), adhesives (Elaine et al., 2010; Yasumitsu and Keiichi, 2015), dispersants, adhesives, and surfactants, as antioxidants in plastics and rubbers, dyes, synthetic floors, thermosets, paints, and fuel for road maintenance (Laurichesse and Averous, 2013; Mankar et al., 2012; Magnus and Akan, 2014; Podkořcielna et al., 2017; Conzatti et al., 2013).

Hidayati et al. (2018) isolates lignin from black liquor of empty palm oil bunches by using NaOH with a concentration of 30% resulted in a yield of 5.67%, pH 5.42, total black liquor solid of 65.11%, methyl lignin level of 14.61 %, and equivalent weight 1787.23. Prayuwidayati et al. (2016) showed that lignin can be used as a prebiotic which is considered to have an antimicrobial effect by reducing the rate of growth of pathogenic bacteria in cattle rumen. According to Baurhoo et al. (2008), the product of purified lignin which has been tested has a prebiotic effect. Prebiotic is one component of functional food that is developed. Prebiotic is a component of food that is beneficial to humans because it can stimulate the growth and activity of a number of probiotic bacteria in the colon so that it can improve the health of the human digestive tract (Toma and Pokrotnieks, 2006). The purpose of this study is to identify the components contained in lignin purification products by Thin Layer Chromatography (TLC), Chromatography Column and Gas Chromatography-Mass Spectrometer (GC-MS) and prebiotic activity testing.

III. RESEARCH METHODS

Tools and Materials

The materials used in this study were the TKKS black liquor from the results of formacell pulping, Acetic Acid, Formic Acid, HCl, CuSO₄, H₂O₂, NaOH, pyridine, MeOH, CHCl₃, aquades, the media used were NA (Nutrient Agar), NB (Nutrient Broth), MRSA and MRSB. Microbial cultures used in this study were *Lactobacillus casei* and *Escherichia coli*.

The tools used were oven, Buchner funnel, silica gel 60 F₂₅₄ thin layer chromatography plate, column chromatography, chamber, autoclave, micropipet, incubator, calipers, capillary pipette, Gas Chromatography-Mass Spectrometer (Variant / CP- 3800 GC and Saturn 2200 MS), and supporting glasses.

3.3. Research Method

The study was conducted with a Completely Randomized Design (CRD). Black liquor was extracted until lignin was obtained 2 times. Lignin was fractionated until it obtained a lignin monomer fraction. Each lignin monomer fraction was identified by TLC analysis and prebiotic activity was screened for *Lactobacillus casei*. The fraction that had the highest prebiotic activity was carried out by GC-MS analysis to determine the chemical composition. Furthermore, the fractions that had the highest prebiotic activity were made at several concentrations of 0%, 2.5%, 5%, 7.5%, 10%, 12.5%, and 15% to be tested for antimicrobial and prebiotic activity for 3 replications. The data obtained were analyzed descriptively and presented in figures and tables.

3.4. Research Implementation

Lignin degradation

Lignin obtained from black liquor which was resulted after cooking the pulp with the raw material of oil palm empty bunches that was precipitated and degraded using CuSO₄, pyridin, and H₂O₂. A total of 2 g of lignin precipitate was dissolved with 20 mL NaOH solution pH 12. A total of 25 mL of 10⁻² M CuSO₄ and 5 mL pyridine were added to the lignin solution. The solution was stirred with a magnetic stirrer for 30 minutes. Furthermore, 10 ml of H₂O₂ 1 M was added 5 times over a period of 30 minutes, stirred and stored in a dark space for 72 hours.

Lignin Purification Fraction

The fractionated filtrate was then evaporated until a residue was obtained. The residue was then dissolved in 500 mL H₂O and extracted with EtOAc 500 mL 3 times to obtain H₂O and EtOAc layers. The EtOAc layer was evaporated until a residue was obtained. The residue was then put into the chromatographic column silica gel and eluted with CHCl₃(1L) solution. The CHCl₃ fraction was then evaporated and the residue obtained was then purified by preparative thin layer chromatography (PTLC). The lignin monomer isolation process can be seen in Figure 1.

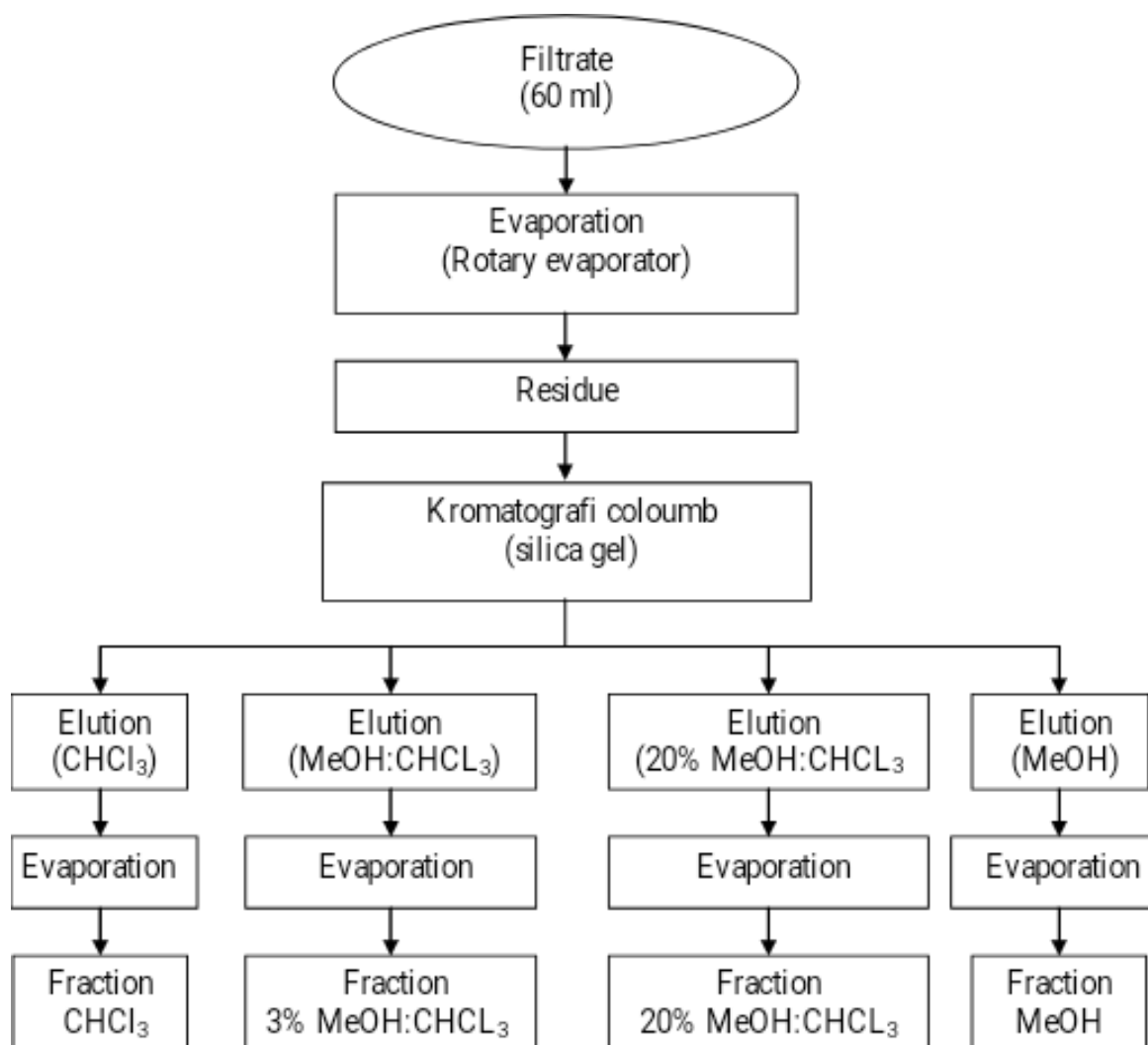


Figure 1. Lignin monomer fractionation flow diagram

Lignin Fraction Identification

Identification of lignin monomers obtained was done using TLC and GC-MS plates. Lignin monomer isolates were dissolved in hexane and then injected into GC-MS devices. It was analyzed by using GC-MS CP-3800 variant with MS Saturn 2200 detector using VF-5ms column 30 mm x 0.25 mm by manual injection method at 240 °C and the analysis lasted for 40 minutes (Suroso et al, 2018).

Prebiotic Activity Test for Lignin Fraction

Prebiotic tests were performed microbiologically using *Lactobacillus casei* grown on MRSA media. The measured variable was the number of bacteria by counting living bacterial colonies method. The lignin monomer fraction was composed with media so that each cup was 0%, 2.5%, 5%, 7.5%, 10%, 12.5%, and 15%. *Lactobacillus casei* that had been refreshed on MRSB media was diluted as much as 0.05 mL into 4.95 mL of physiological solution. Then, 1 mL of physiological solution was inoculated into MRSA media, then poured into 20 petri cups; 19.5; 19; 18.5; 18; 17.5; and 17 mL and added 3% MeOH:CHCl₃ fraction of 0; 0.5; 1; 1.5; 2; 2.5; and 3 mL. Furthermore, the bacteria were incubated for 24 hours in an incubator. The number of bacteria was calculated by counting the living bacterial colonies by using Ogimoto and Imai (1981) method as follows:

$$\text{Bacterial population} = \frac{\text{Number of colonies}(kol)}{0,05 \times 10^x \times 0,1 (ml)}$$

Note:

x : x-dilution series tube

RESULT AND DISCUSSION

Lignin Isolation

The black liquor produced by pulping formacell was then isolated to obtain lignin isolates. The extraction process of lignin from black liquor is done by adding water to 500 mL of black liquor sample in a 2 L glass baker and allowed to form a precipitate. The precipitate obtained was then separated by filtering using filter paper and dried for 3 days at room temperature and seen for its characteristics (Table 1).

Table 1. Characteristics of lignin

Parameter	Characteristics
Color	Black
Form	Solids
pH (25°C)	4,5
Rendemen	1,74%
Water content	0,24%

Lignin isolates obtained have a black appearance. The form of lignin isolates is solids in the form of fiber crumbs. Moisture content of lignin isolates obtained is 0.24%. The yield of lignin obtained is 1.74%. This is presumed because it did not add acid to the precipitation process of lignin isolates.

Lignin Monomer Fraction Screening for *Lactobacillus Casei*

The process of lignin degradation was done by dissolving lignin into a solution of CuSO_4 , pyridine, and NaOH , then stirring and adding H_2O_2 . The obtained fraction was then put into the chromatographic column silica and eluted with CHCl_3 , 3% $\text{MeOH}:\text{CHCl}_3$, 20% $\text{MeOH}:\text{CHCl}_3$, and MeOH respectively. Then each fraction was evaporated to dryness. The fraction of CHCl_3 , 3% $\text{MeOH}:\text{CHCl}_3$, 20% $\text{MeOH}:\text{CHCl}_3$, and MeOH resulted yields respectively 10.68%, 6.34%, 11.38%, and 44.85%. The results of each fraction were identified on a Thin Layer Chromatography (TLC) plate using UV light to look quantitatively at the content of chemical compounds.

The presence of chemical compounds was shown by black spots on TLC. Spot on TLC of each fraction consists of different compounds based on the retention time of each compound. Spots generated at fractions of CHCl_3 , 3% $\text{MeOH}:\text{CHCl}_3$, 20% $\text{MeOH}:\text{CHCl}_3$, and MeOH sequentially produced 4, 4, 2, and 1 spot. The spot formed was considered to be the dominant compound in each lignin fraction. Black spots on TLC can be seen in Figure 2 and the results of screening for *L. caseii* growth (Table 2)

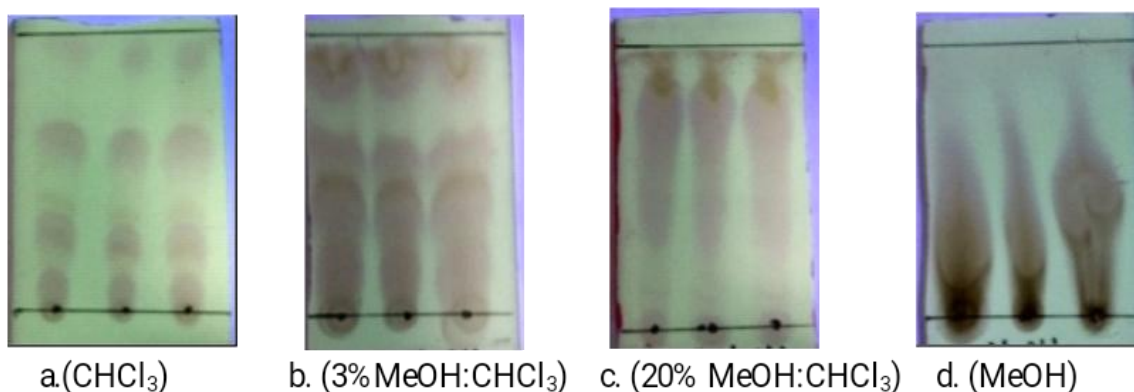


Figure 2. Chromatographic profile of thin layers of each fraction (a) CHCl_3 , (b) 3% $\text{MeOH}:\text{CHCl}_3$, (c) 20% $\text{MeOH}:\text{CHCl}_3$, and (d) MeOH

Table 2. Screening the lignin fraction as a prebiotic for *Lactobacillus casei*

Fraction	Number of Microbes (10 ² colony /mL)
CHCl ₃	1,48 ± 0,29
3% MeOH:CHCl ₃	4,52 ± 0,10
20% MeOH:CHCl ₃	2,58 ± 0,23
MeOH	2,41 ± 0,34

3% MeOH:CHCl₃ fraction has higher prebiotic activity than other fractions. The 3% MeOH:CHCl₃ fraction has prebiotic activity against L. casei at 4,52 x 10² colonies / mL, while the CHCl₃ fraction, 20% MeOH:CHCl₃, and MeOH sequentially has the prebiotic activity against L. casei at 1,48 x 10²colonies / mL, 2,58 x 10²colonies / mL, and 2,41 x 10²colonies / mL.

Identification of 3% MeOH:CHCl₃ fraction compound content

3% MeOH:CHCl₃ fraction was subsequently identified using GC-MS. The identification process using GC-MS is done by injecting a 3% MeOH:CHCl₃fraction into the instrument (Figure 3).

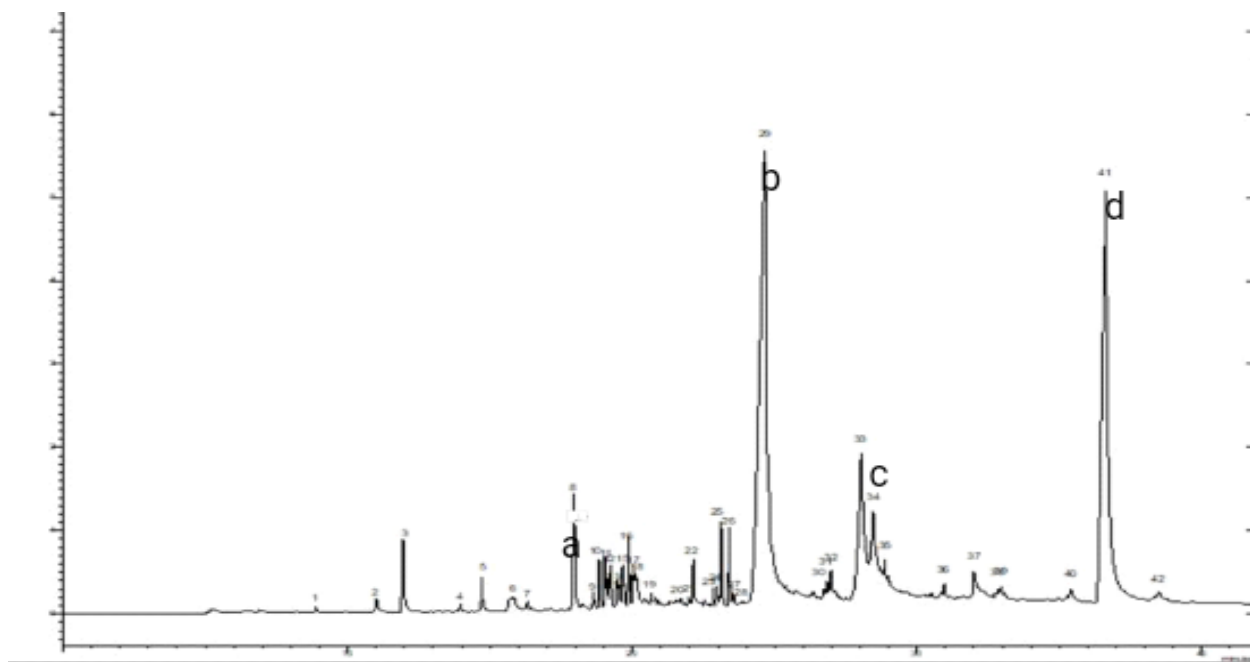


Figure 3. Fraction chromatogram 3% MeOH:CHCl₃ (a) *benzaldehyde,4-hydroxy-3,5-dimethoxy-*, (b) *1-methylbutyl hexadecanoate*, (c) *oleic acid*, and (d) *di-2-ethylhexyl phthalate*

3% MeOH:CHCl₃ fraction contains (a) benzaldehyde, 4-hydroxy-3,5-dimethoxy- 2.76%, (b) 1-methylbutyl hexadecanoate as much as 41.03%, (c) oleic acid as much as 3.61%, and (d) di-2-ethylhexyl phthalate as much as 31.25%. Lignin hydrolysis using NaOH catalysts produces the main products in the form of monomeric phenols and oligomers (Roberts et al. 2011). The compound structure of the 3% MeOH:CHCl₃ fraction can be seen in Figure 4 and the identification results is in Table 3.

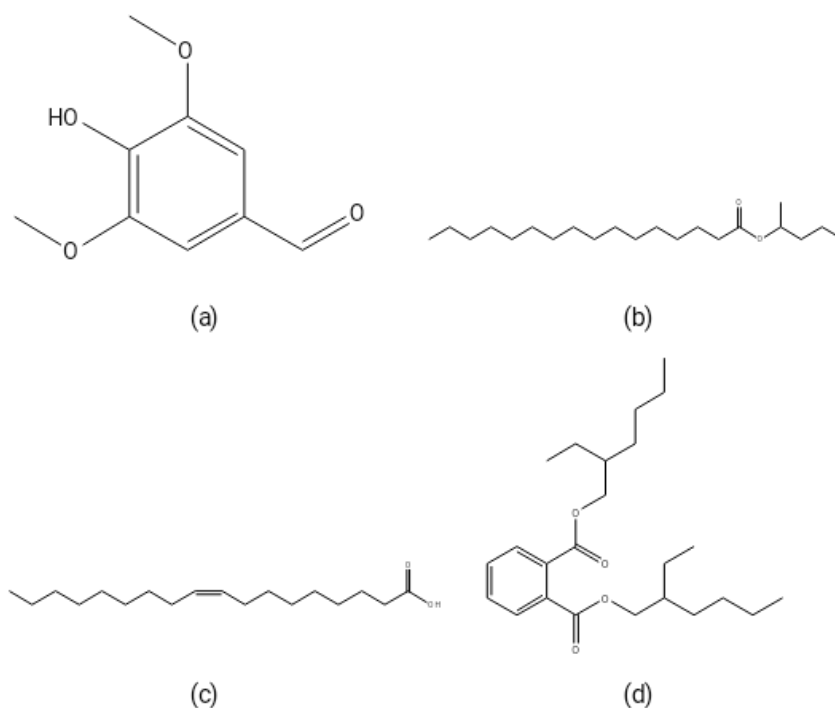


Figure 4. Fraction compound of 3% MeOH:CHCl₃ (a) *benzaldehyde,4-hydroxy-3,5-dimethoxy-*, (b) *1-methylbutyl hexadecanoate*, (c) *oleic acid*, (d) *di-2-ethylhexyl phthalate*

Table 3. Identification of lignin fraction monomer compounds of 3% MeOH:CHCl₃

Retention Time	Molecule Weight	Compound	(%)
8,886	207	Phenol,2-(1-methylpropyl)-,methylcarbamate	0,12
11,008	212	Propanoic acid,3-chloro-,4-formylphenyl Ester	0,38
11,942	152	Vanillin	1,96
13,958	166	Ethanone,1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-	0,15
14,709	166	Undecanoic acid,10-methyl-,methyl ester	0,47
15,839	214	Benzoic acid,4-hydroxy-3-methoxy-	1,04
16,313	168	Diethyl Phthalate	0,13
17,952	222	Benzaldehyde,4-hydroxy-3,5-dimethoxy-	2,76
18,621	182	p-Anisic acid,4-nitrophenyl ester	0,32
18,838	273	m-Anisic acid,3,4-dichlorophenyl ester	0,90
19,022	413	Carbamic acid,N-[1,1- bis(trifluoromethyl)ethyl]-4,(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenyl ester	0,95
19,114	220	4-Methyl-2-tert-octylphenol	0,54

19,235	296	m-Anisic acid,3,4-dichlorophenyl ester	1,10
19,447	270	Hexestrol	0,58
19,643	220	Phenol,2-methyl-4-(1,1,3,3- tetramethylbutyl)-	0,33
19,708	192	1,3-Dimethyl-5-ethyladamantane	0,74
19,870	413	Carbamic acid,N-[1,1- Bis (trifluoromethyl)ethyl]-4,(1,1,3,3- tetramethylbutyl)phenyl ester	1,06
20,034	220	Phenol,2-methyl-4-(1,1,3,3- tetramethylbutyl)-	0,71
20,126	228	Tetradecanoic acid	1,17
21,690	268	2-Pentadecanone,6,10,14-trimethyl-	0,07
21,980	194	Caffeine	0,12
22,135	278	1,2-Benzenedicarboxylic acid,bis(2- methylpropyl) ester	0,70
22,520	338	Erucic acid	0,09
22,848	604	Tritetracontane	0,28
22,968	268	9-Hexadecenoic acid, methyl ester,(Z)-	0,41
23,116	276	7,9-Di-tert-butyl-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-diene-2,8 dione	1,60
23,395	270	Pentadecanoic acid,14-methyl-,methyl ester	1,37
23,358	292	Benzenepropanoic acid,3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-4 hydroxy ,methyl ester	0,20
24,659	326	1-Methylbutyl hexadecanoate	41,03
26,713	298	1-Eicosanol	0,23
26,837	294	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-,methyl ester	0,32
26,971	352	9,12,15-Octadecatrienoic acid,2,3 dihydroxypropylester,(Z,Z,Z)-	0,58
28,036	282	Oleic acid	0,89
28,453	282	Oleic acid	3,61
28,853	282	Oleic acid	0,33
30,953	604	Tritetracontane	0,21
31,997	324	4,8,12,16-tetramethylheptadecan-4-olide	0,57
32,860	298	1-Eicosanol	0,11
32,963	604	Tritetracontane	0,16
35,399	242	1-decanol,2-hexyl-	0,25
36,624	390	Di-2-ethylhexyl phthalate	31,25
38,491	592	1-Hentetracontanol	0,21

Prebiotic Activity of 3% MeOH:CHCl₃ fraction against Lactobacillus casei

Prebiotic activity test uses a concentration between growth media with a fraction of 3% methanol-chloroform of 0; 2.5; 5; 7.5; 10; 12.5; and 15 (%). The number of colonies from

Lactobacillus casei growth for each concentration of 3% MeOH:CHCl₃ fraction can be seen in Figure 5.

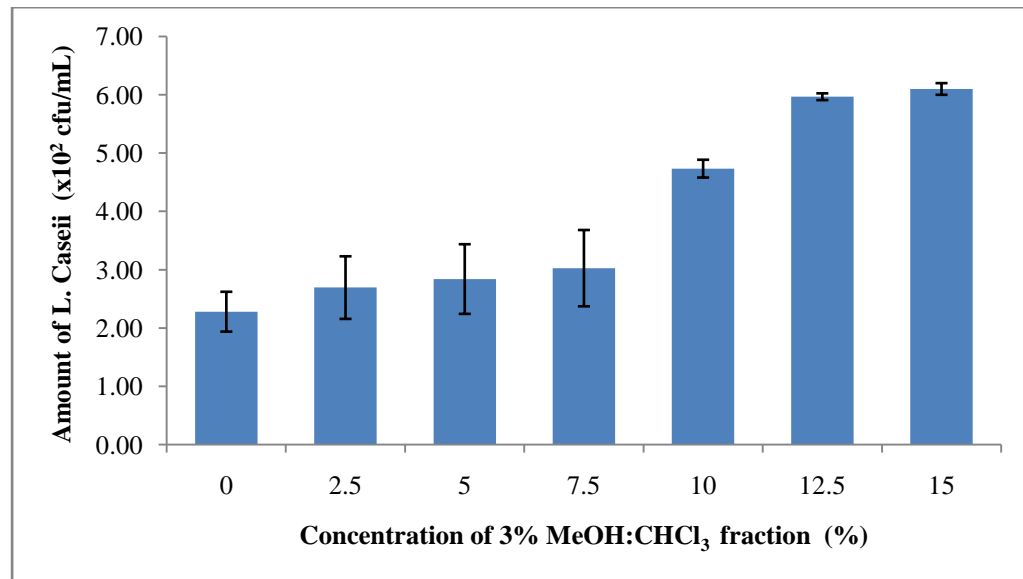


Figure 5. Effect of some concentrations of 3% MeOH:CHCl₃ fraction as a prebiotic on the number of Lactobacillus casei microbes

The 3% MeOH:CHCl₃ fraction at a concentration of 15% has the highest prebiotic activity against L. casei at 6.10 x 10² colonies / mL, while the 3% MeOH:CHCl₃ fraction at a concentration of 2.5% has the lowest prebiotic activity against L. casei at 2, 69 x 10² colonies / mL. The prebiotic activity of the 3% MeOH:CHCl₃ fraction in L. casei growth can be seen in Figure 6.

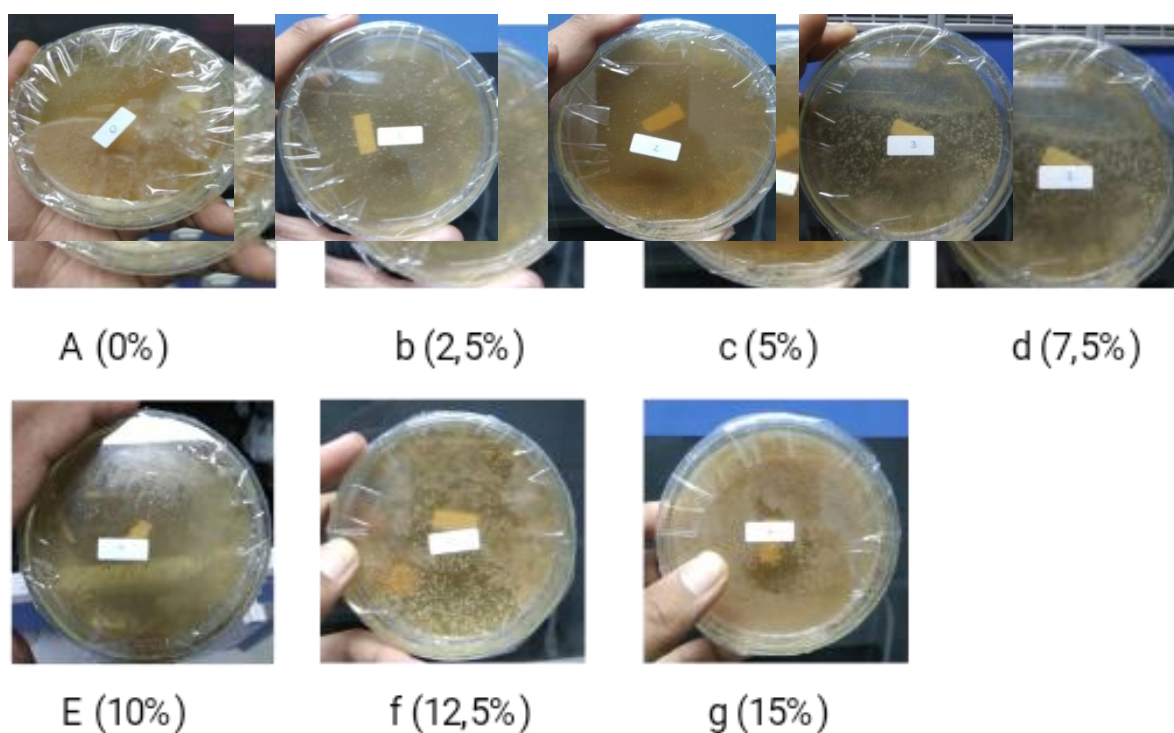


Figure 6. Prebiotic activity of the 3% MeOH:CHCl₃ fraction against the growth of *Lactobacillus casei*.

The results of prebiotic activity analysis of the 3% MeOH:CHCl₃ fraction showed that the more concentrations added to the growth media, the higher the growth of *L. casei*. Baurhoo et al., (2007) states that the lignin monomer in the alcell process has the ability as a prebiotic. Prayuwidayati et al. (2016) reported that the purification product of lignin formacell from oil palm empty bunches and oligomers which are phenolic compounds showed a prebiotic effect that can stimulate the growth of lactic acid bacteria. This shows that the fraction isolated from lignin and its derivatives can replace glucose in the MRS medium and can be used as an energy source for *L. casei* growth. These results indicate that the fraction of lignin isolation can be used as a dietary supplement which shows the prebiotic effect by supporting the growth of *L. casei*. Lignin in the purified Alcell process shows prebiotic effects in chickens, beneficial for bacterial growth and improves intestinal morphological structure, as measured by an increase in the number of villi and the number of goblet cells (Baurhoo et al., 2007). Cota and Whitfield (1998), reported that all hemicellulolytic rumen bacteria were able to utilize xylooligosaccharides as a growing substrate. The increased digestibility of crude protein and crude fiber will support ruminants' protein and energy metabolism. Non-digestible carbohydrate prebiotics include

lactulose, inulin, resistant starch and a number of oligosaccharides that can be a source of carbohydrates for beneficial bacteria in the digestive tract (Crittenden, 1999). Substrates such as inulin, fructo-oligosaccharides (FOS) and manan-oligosaccharides (MOS) derived from yeast cells, in addition to being hydrolyzed by endogenous enzymes, digestion can also be absorbed by the host. The possible mechanisms would decrease pH due to the production of short chain fatty acids, bacteriocin secretion and immune stimulation. MOS as a prebiotic has a different mechanism which selectively does not cause an increase in the population of beneficial bacteria, through its ability to attach and specific manosaic lectins from type 1 fimbriae negative G pathogens such as Salmonella and E. coli which will then be removed from the digestive tract (Baurhoo et al., 2007; Thomas et al., 2004). Similar to the effects of MOS and antibiotic-free diet supplemented by 1.25% alcell lignin (LL) on lactobacilli and bifidobacteria, lignin at low levels has the potential to be classified as prebiotics (Baurhoo et al., 2007). The results showed that the use of lignin in the alcell process (12.5 g) could increase the intestinal concentration of Lactobacilli and Bifidobacteria in broilers (Baurhoo et al., 2007). Proliferation of digestive tract microbiota populations such as Lactobacilli and Bifidobacteria can be increased through prebiotic consumption. An increase in the number of microbiota ranges from 10-100 times in faeces (Salminen and Lee, 2009).

CONCLUSION

Lignin from oil palm empty bunch of black liquor contains benzaldehyde, 4-hydroxy-3,5-dimethoxy, 1-methylbutyl hexadecanoate, oleic acid, and di-2-ethylhexyl phthalate. Lignin 3% MeOH:CHCl₃ fraction with a concentration of 15% showed prebiotic activity against Lactobacillus casei at 6.1×10^2 colonies / ml. .

REFERENCES

- Baurhoo B, C.A. Ruiz-Feria and Zhaoa, X. 2008. Purified lignin: Nutritional and health impacts on farm animals—A review *Animal Feed Science and Technology* 144:175–184
- Conzatti, L; F. Giunco, and Stagnaro, P. 2013. :Composites based on polypropylene and short wool fibres,” *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 47: 165–171.

- Crittenden, R.G. 1999. Prebiotics In: Probiotics: A Critical Review. Horizon Scientific Press, Wymondham. pp. 141 – 156.
- Cotta, M.A. and Whitefield, T.R 1998. Xylooligosaccharides utilization by ruminal anaerobic bacterium *Selemonas ruminantium*. *Curr. Microbiol.* 36: 183-189.
- Elaine C, Ramires D, Megiatto, Christian G, and Alain C. 2010 Valorization of an Industrial Organosolv-Sugarcane Bagasse Lignin: Characterization and Use as a Matrix in Biobased Composites Reinforced With Sisal Fibers. *Biotechnol Bioeng*, 107(4): 612-621
- Hidayati, S., Zuidar, A.S., Satyajaya, W., Murhadi, dan Retnowati, D. 2018. Isolation and Characteruzation of Formacell Lignins from Oil Empty Fruits Bunches. Departement of Agro-industrial Technology. Universitas Lampung. IOP Conference Series:Materials Science and Engineering. 344. doi:10.1088/1757-899X/344/1/012006
- Goujon T, Ferret V, Mila I, Pollet B, Ruel K, Burlat V, Joseleau JP, Barrière Y, Lapierre C, and Jouanin L. 2003. Down-regulation of the AtCCR1 gene in *Arabidopsis thaliana*: effects on phenotype, lignins and cell wall degradability. *Planta*, 217: 218-228.
- Ibrahim, M.M., Agblevor , F.A., and EL-Zawawy, W.K., (2010), Isolation and Characterization of Cellulose and Lignin from Steam-Exploded Lignocellulosic Biomass, *Bioresources*, 5: 397- 418.
- Lara, M.A., Rodríguez-Malaver, A.J., Rojas, O.J., Holmuist,O., González, A.M., and Bullón , J. 2003., Blackliquor Lignin Biodegradation by *Trametes elegans*, *International BiodeteriorationandBiodegradation*, 52: 167–173.
- Laurichesse, S. ; L. Averous. 2013. Chemical Modification of lignin: Toward Biobased Polymers”, *Progress in Polymer Science*, <http://dx.doi.org./10.1016/j.progpolymsci.2013.11.004>
- Mankar, S. S. ; A. R. Chaudhari, and I. Soni, “Lignin in phenolformaldehyde adhesives,” *International Journal of KnowledgeEngineering*, 3 (1): 116–118, 2012.
- Magnus, N and E. H°akan. 2014. Lignin: recent advances and emerging applications. *Current Opinion in Colloid&Interface Science*, 19 (5): 409–416.

- Min, D.Y., Smith, S.W., Chang, H.M. and Jameel, H. 2013. Influence of Isolation Condition on Structure of Milled Wood Lignin Characterized by Quantitative C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Bioresources* 8 (2): 1790-1800.
- Podkořcielna, B; M. Goliszek, and O. Sevastyanova. 2017. New approach in the application of lignin for the synthesis of hybrid materials. *Pure and Applied Chemistry*, 89 (1): 161–171.
- Prayuwidayati, M., Sunarti, T.C., Sumardi, Subeki, dan Wiryawan, K.G. 2016. Use of Lignin Formacell of Empty Bunch Palm Fiber as Feed Supplement and Prebiotics Candidate in Ruminant. *Pakistan Journal of Nutrition*, 15 (1): 58-65.
- Roberts, V., Stein, V., Reiner, T., Lemonidou, A., Li, X., and Lercher, J.A. 2011. Towards quantitative catalytic lignin depolymerization. *Chem. Eur. J.* 17 (21): 5939–5948.
- Rovrik, L.M. 2000. *Listeria Monocytogenes* in the Smoked Salmon Industry. *International Journal of Food Microbiology*. 62: 183-190.
- Salminen, S. and Wright, A.V. 1998. *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects* 2nd Edition, Revised and Expanded. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Salminen S. and Y.K Lee. 2009. *Handbook of Probiotics and Prebiotics* 2nd Edition. John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Schorr, D. ; P. N. Diouf, and T. Stevanovic. 2014. Evaluation of industrial lignins for biocomposites production. *Industrial Crops and Products*, 52: 65-73.
- Suroso E, Utomo TP, Hidayati S, Nuraini A. 2018. Pengasapan ikan kembung menggunakan asap cair dari kayu karet hasil redestilasi. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 21(1): 42-53.
- Thomas, W.E., Nilsson, L.M., Ferero, M., Sokurenko, E.V., and Vogel, V. 2004. Shear-dependent stick and roll adhesion of type 1 fimbriated *Eschericia coli*. *Mol. Microbiol.* 53: 1545 – 1557.
- Toma, M.M., and Pokrotnieks, J. 2006. Prebiotics as Functional Food: Microbiological and Medical Aspects. *Acta Universitatis Latviensis*. 710: 117 - 129.

Yasumitsu U, Keiichi K. 2015. Utilization of wood cell wall components. *J Wood Sci*, 61(5):
447-454

Single Sign On Unila x Acknowledgement.PJAS x SimlitabmasNG x Word ke PDF - Konversi x template_laporan_kema x Pakistan Journal of Agric x

mail.google.com/mail/u/0/?tab=rm&ogbl#search/pakistan/FMfcgwxHMGKKKPPSSmTjtdhHtHGbgwJM

Gmail Search: pakistan

Compose

Inbox 1,729

Starred

Snoozed

Important

Sent

Drafts 179

Meet

Start a meeting

Join a meeting

Hangouts

Supriono no Sent a message

template_laporan_...pdf

Acknowledgement.PJAS-2020-323

Pakjas Journal <pakjas@uaf.edu.pk> to me Mon, Mar 9, 1:05 PM

Acknowledgement.

Sir/Madam,

Thanks for submitting the manuscript for publication in the PJAS. The assigned number of your manuscript is **PJAS-2020-323**.

Please always quote this manuscript No. in all future corresponding. I will get back to you as soon as I receive comments of the expert reviewers.

Regards

Tanveer

Prof. Dr. Asif Tanveer
Managing Editor
Pakistan Journal of Agricultural Sciences
University of Agriculture, Faisalabad
PAKISTAN
e.mail: pakjas@uaf.edu.pk

Show all

10:28 15/09/2020

Dokumen pendukung luaran Tambahan #1

Luaran dijanjikan: Artikel di Jurnal Nasional terakreditasi peringkat 1-3

Target: Accepted

Dicapai: Published

Dokumen wajib diunggah:

1. Artikel yang terbit

Dokumen sudah diunggah:

1. Artikel yang terbit

Dokumen belum diunggah:

-

PEMANFAATAN LINDI HITAM HASIL ISOLASI LIGNIN DARI TANDAN KOSONG KELAPA SAWIT SEBAGAI ANTI MIKROBA

Muhammad Ferdiansyah Mulya Harahap¹, Sri Hidayati², dan Subeki²

¹Magister Teknologi Industri pertanian Pertanian, Universitas Lampung

²Departemen Teknologi Hasil Pertanian, Universitas Lampung

Email: srihidayati.unila@gmail.com

ABSTRAK

Telah dilakukan isolasi lignin dari lindi hitam hasil proses pulping menggunakan metode formacell dari tandan kosong kelapa sawit. Hasil monomer dari pemecahan lignin diduga memiliki senyawa yang bersifat anti mikroba. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi hasil pemecahan monomer lignin dengan perlakuan 0%, 2,5%, 5%, 7,5%, 10%, 12,5%, dan 15% terhadap daya hambat sebagai antimikroba. Hasil penelitian menunjukkan bahwa proses pemurnian menggunakan fraksi 3% MeOH:CHCl₃ pada konsentrasi 12,5 dan 15% memiliki aktivitas antimikroba yang sama dan tertinggi terhadap *E. coli* dengan diameter zona hambat sebesar 6,33 mm, sedangkan aktivitas antimikroba terendah terhadap *E. coli* dimiliki fraksi 3% MeOH:CHCl₃ pada konsentrasi 2,5% dengan diameter zona hambat sebesar 5,17 mm.

Kata Kunci-antimikroba; isolasi; lignin; lindi hitam

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan penghasil kelapa sawit nomor satu dunia dengan produksi sawit diperkirakan mencapai 34,5 juta ton pada tahun 2018. Potensi TKKS sangat besar yaitu dalam satu ton tandan buah segar (TBS) yang diolah akan dihasilkan tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS) sekitar 23% dari tandan buah segar (Darnoko, 1992). TKKS memiliki kadar selulosa 50%, lignin 16% dan hemiselulosa 19,6% sehingga TKKS berpotensi untuk dijadikan alternatif pembuatan pulp non kayu pengganti pulp kayu (Hidayati *et al.*, 2017). Salah satu permasalahan pada industri pulp dan kertas adalah adanya limbah yang dikenal sebagai lindi hitam yang sangat mencemari lingkungan. Lindi hitam dapat diisolasi baik secara asam, alkohol maupun metode basa untuk mendapatkan lignin yang murni.

Lindi dapat diisolasi dengan menggunakan metode asam maupun basa. Isolasi lignin dari lindi hitam TKKS menggunakan NaOH 30% menghasilkan padatan sebanyak 65,11% (Lin *et al.*, 1992; Hidayati *et al.*, 2018). Karakteristik kimia lignin dapat diperoleh dengan analisis unsur dan penentuan gugus metoksil. Jumlah gugus metoksil dalam lignin bergantung pada sumber lignin dan proses isolasi yang digunakan (Ayyachamy *et al.*, 2013). Hasil isolasi lignin dapat dimanfaatkan secara komersial menjadi karbon fiber, adhesif, poliuretan, poliester, bioplastik, dan *bio oil* untuk campuran minyak bumi dari fosil, sebagai anti bakteri dan antioksidan (Bonini *et al.*, 2005; Kleinert and Barth, 20087; Xu *et al.*, 2006; Ayyachamy *et al.*, 2013). Monomer lignin dari tanaman softwood mengandung phenol yang seperti carvacrol, thymol dan cinnamaldehyde yang diduga dapat menghambat pertumbuhan mikroba (Smid *et al.*, 1996; Ultee *et al.*, 2000; Skandamis *et al.*, 2001; Smith-Palmer *et al.*, 2001; Roller and Seedhar, 2002; Lee *et al.*, 2004; Bozin *et al.*, 2006; Doherty *et al.*, 2011; Sriroth and Sunthornvarabhas, 2018) sehingga diharapkan dapat berfungsi sebagai obat yang memiliki kemampuan sebagai anti mikroba yang bisa diharapkan sebagai pengganti obat sintetik atau penicillin yang sudah dilarang penggunaannya. Senyawa fenolik ini juga tidak bisa digunakan sebagai sumber karbon untuk pertumbuhan bakteri patogen dan diduga memiliki efek antimikroba dengan mengurangi laju pertumbuhan bakteri patogen (Prayuwidayati *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2004; Bozin *et al.*, 2006). Senyawa fenol dan flavonoid hasil pecahan monomer lignin dari tanaman softwood bersifat sebagai anti mikroba dan bersifat antibiotik (Baurhoo *et al.*, 2008).

Kelebihan lignin sebagai anti mikroba adalah bersifat renewable, mudah teruraikan oleh lingkungan dan ketersediaannya berlimpah di alam (Mollahosseini *et al.*, 2012; Bakkali *et al.*, 2008). Hasil monomer dari lignin dengan proses alcell dapat menghambat pertumbuhan bakteri (Phillip *et al.*, 2000) Selain itu Alcell lignin mengurangi konsentrasi *Escherichia coli* dalam kotoran unggas bila dibandingkan dengan diet bebas antibiotik atau yang mengandung antibiotik (Baurhoo *et*

al., 2008). Lignin dari hasil isolasi limbah cair pulp berbahan baku TKKS belum banyak diteliti terutama pemanfaatannya sebagai antimikroba sehingga diharapkan penelitian ini bermanfaat selain untuk memanfaatkan limbah pencemar. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui pengaruh konsentrasi lignin hasil isolasi terhadap daya hambat bakteri.

METODOLOGI PENELITIAN

A. Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian adalah TKKS, asam asetat glasial, Piridin, CHCl_3 , HPO_3 , KMNO_4 , KI, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, HCl, H_2SO_4 (72%), indikator amilum 0,2%. Alat yang digunakan adalah reaktor, alat soxhlet apparatus, GC-MS dan alat analisis lain

B. Pelaksanaan Penelitian

1. Pemasakan pulp

Pemasakan pulp dilakukan dengan menggunakan proses formacell. Sebanyak 1000 g TKKS dimasukkan dalam rotary digester (alat pemasak). Kondisi pemasakan mengacu pada penelitian (Hidayati *et al.*, 2016) yaitu menggunakan rasio asam asetat 1:14. Suhu maksimum 150°C dengan waktu 90 menit, waktu pada suhu maksimum 90 menit. Pulp disaring dengan menggunakan Hidrolic Screener. Filtrat yang berupa liquor atau lindi hitam dilakukan proses pemurnian.

2. Ekstraksi Pemurnian Lignin

Endapan lignin didegradasi menggunakan CuSO_4 , piridin, dan H_2O_2 . Sebanyak 2 g endapan lignin dilarutkan dengan 20 mL larutan NaOH pH 12. Sebanyak 25 mL CuSO_4 10^{-2} M dan 5 mL piridin ditambahkan ke dalam larutan lignin. Larutan diaduk dengan pengaduk magnetik selama 30 menit, setelah itu ditambahkan 10 mL H_2O_2 1 M sebanyak 5 kali dengan jarak waktu 30 menit. Selanjutnya larutan diaduk di ruang gelap selama 72 jam. Filtrat yang telah difraksinasi selanjutnya dievaporasi hingga diperoleh residu. Residu kemudian dilarutkan dalam 500 mL H_2O dan diekstraksi dengan EtOAc 500 mL sebanyak 3 kali hingga diperoleh lapisan H_2O dan EtOAc. Lapisan EtOAc dievaporasi hingga diperoleh residu. Residu kemudian dimasukkan ke dalam silika gel kolom kromatografi dan dielusi dengan 3% $\text{MeOH}:\text{CHCl}_3$

3. Uji antimikroba

Pengujian anti mikroba dilakukan dengan menggunakan bakteri *E. coli*. Peubah yang diamati pada masing-masing senyawa monomer lignin yaitu uji zona hambat dengan metode difusi cakram. Uji zona hambat dilakukan pada bakteri patogen dengan metode difusi agar. Kultur disegarkan terlebih dahulu dalam tabung yang berisi medium NB steril dan diinkubasi 24 jam pada 37°C . Sebagai stok bakteri, dibuat kultur bakteri dalam agar miring dengan medium NA, disimpan di dalam lemari pendingin setelah terlebih dahulu diinkubasi selama 24-48 jam.

Setiap stok bakteri yang akan digunakan dalam pengujian aktivitas antibakteri, selalu disegarkan kembali di dalam medium NB steril selama 24 jam 37°C , dihomogenkan dengan alat vorteks, lalu diinokulasikan sebanyak 20 μl ke dalam labu Erlenmeyer yang berisi 20 mL medium agar cair (NA, $44-45^\circ\text{C}$) steril, dikocok merata, kemudian dituang ke dalam cawan petri steril dan dibiarkan sampai membeku. Selanjutnya letakkan kertas cakram yang sudah disterilisasi terlebih dahulu di atas media agar. Fraksi monomer lignin yang akan diuji dibuat konsentrasi dengan menggunakan pelarut aquades sebesar 0%, 2,5%, 5%, 7,5%, 10%, 12,5%, dan 15%.

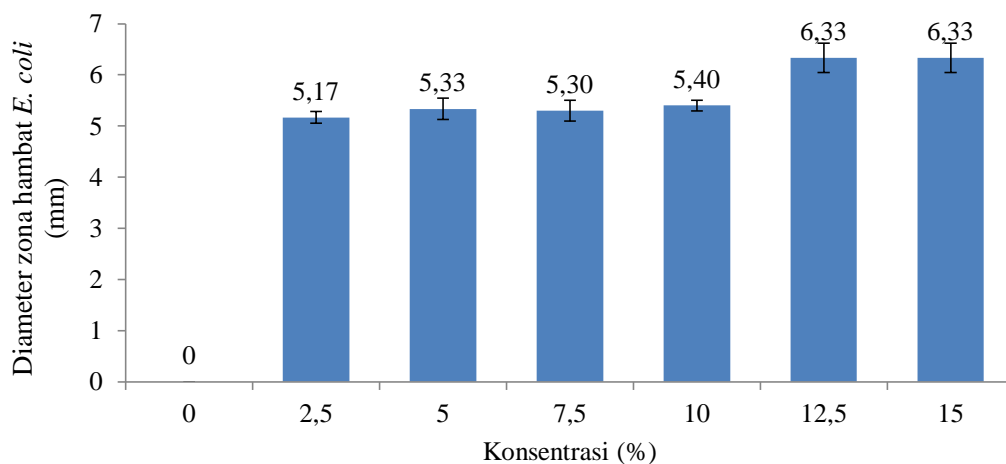
C. Pengamatan

Zona penghambatan yang diukur adalah radius (r , mm) penghambatan berupa areal beining di sekeliling kertas cakram, setelah diinkubasi selama 1 hari pada 37°C . Pengukuran jari-jari zona hambat di sekeliling sumur uji dilakukan dengan cara mengukur jarak dari tepi kertas cakram uji ke batas lingkaran zona hambat menggunakan jangka sorong (ketelitian 0,01 mm) pada beberapa sisi kertas cakram, perhitungan dilakukan dengan menghitung rata-rata dari data yang diperoleh.

HASIL DAN PEMBAHASAN

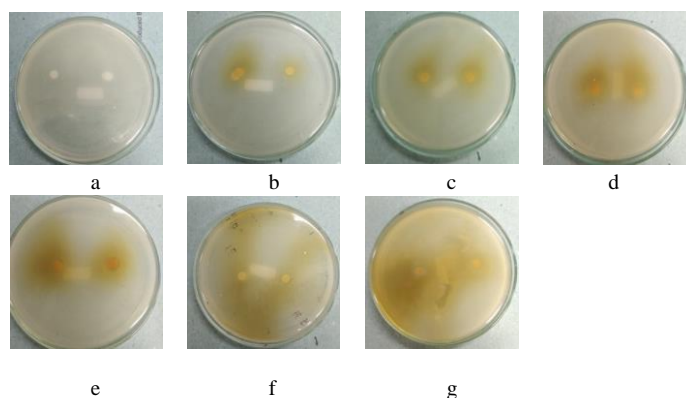
Aktivitas Antimikroba Fraksi 3% MeOH:CHCl₃ terhadap bakteri *Eschericia coli*

Fraksi 3% MeOH:CHCl₃ diuji aktivitas antimikroba pada berbagai konsentrasi 0%, 2,5%, 5%, 7,5%, 10%, 12,5%, dan 15%. Masing-masing fraksi diteteskan sesuai konsentrasinya ke bagian atas kertas cakram yang diletakan di atas permukaan Nutrient Agar sebagai media pertumbuhan *Eschericia coli* dalam cawan petri. Pengamatan diameter zona hambat dilakukan setelah 24 jam dan diukur dengan menggunakan jangka sorong. Berdasarkan hasil pengukuran diameter zona hambat masing-masing konsentrasi fraksi 3% MeOH:CHCl₃ terhadap *Eschericia coli* dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Pengaruh Berbagai Konsentrasi Fraksi 3% MeOH:CHCl₃ terhadap Diameter Zona Hambat Bakteri *Eschericia coli*

Gambar 1 menunjukkan bahwa fraksi 3% MeOH:CHCl₃ pada konsentrasi 0% tidak memiliki aktivitas antimikroba terhadap *E. coli*. Hal ini ditunjukkan dengan tidak terbentuknya zona hambat disekeliling kertas cakram. Fraksi 3% MeOH:CHCl₃ pada konsentrasi 12,5 dan 15% memiliki aktivitas antimikroba yang sama dan tertinggi terhadap *E. coli* dengan diameter zona hambat sebesar 6,33 mm, sedangkan aktivitas antimikroba terendah terhadap *E. coli* dimiliki fraksi 3% MeOH:CHCl₃ pada konsentrasi 2,5% dengan diameter zona hambat sebesar 5,17 mm. Hasil yang sama ditunjukkan oleh Alzagameem et al., 2019) yang menyatakan bahwa peningkatan konsentrasi lignin dapat meningkatkan aktifitas gugus fungsi seperti OH alifatik, CO karbonil dan COOH sedangkan konsentrasi lignin dalam jumlah yang kecil belum mampu bertindak sebagai antimikroba pada *E. Coli*. Zona hambat yang terbentuk pada uji aktivitas antimikroba fraksi 3% MeOH:CHCl₃ terhadap *E. coli* dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Zona Hambat yang Terbentuk pada Uji Aktivitas Antimikroba Fraksi 3% MeOH:CHCl₃ terhadap *Eschericia coli*. a) 0%; b) 2,5%; c) 5%; d) 7,5%; e) 10%; f) 12,5% dan g) 15%

Adanya senyawa antioksidan dan antibakteri yang terdapat di dalam fraksi hasil isolasi lignin dapat menghambat pertumbuhan mikroba. Lignin mengandung gugus aktif hidroksi phenolic, epoksi dan metoksil yang bersifat antimikroba (Yang et al., 2016; Lupoi et al., 2015; Alzagameem et al., 2018; Kaur et al, 2017). Komponen antibakteri seperti golongan benzene, bersifat sebagai antibakteri (Bartolomeazzi et al., 2007), seperti *1,2 benzenedicarboxylic acid,bis(2- methylpropyl) ester, benzenepropanoic acid,3,5-bis (1,1 dimethylethyl)-4-hydroxy-,methyl ester*. Komponen fenolik seperti *phenol,2-(1-methylpropyl)-,methylcarbamate, m-anisic acid,3,4-dichlorophenyl ester*, dan *phenol,2-methyl-4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-* adalah komponen yang bersifat antimikroba (Soldera et al., 2008; Kristinsson et al., 2007; Gomez-Estaca, 2007; Milly et al., 2005, Muratore and Licciardello, 2005; Sunen et al., 2003, Sunen et al., 2001).

Penghambatan bakteri terjadi karena fenol menyerang sel vegetatif berprenetasi dan merepresitifikasi protein yang terdapat dalam sel mikroba dan adanya interaksi antara ikatan hidrogen dengan protein penyusun enzim (Saravanakumar et al., 2009). Beberapa jenis asam, seperti asam anisic dan asam karbamat, diduga sebagai antibakteri. Lefroi, 2000; Rorvik, 2000) mengatakan bahwa senyawa aldehyd, asam karboksilat dan fenol mempunyai sifat antimikroba dan antioksidan. Senyawa fenol dan flavonoid hasil pecahan monomer lignin dari tanaman softwood bersifat sebagai antimikroba dan antibiotik (Roller and Seedhar, 2002). Philip (2000), menyatakan bahwa hasil monomer dari lignin dengan proses *alcell* dapat menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli*, *S. aureus*, dan *Pseudomonas*. Senyawa fenol dari lignin dapat merusak dinding mikroba dan menyebabkan lisis pada bakteri diikuti pelepasan konten sel (Sabu, 2011).

Pada fraksi terdapat asam lemak jenuh dan tak jenuh yang memiliki atom karbon lebih dari sepuluh yang dapat mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan bakteri atau kematian pada bakteri patogen yang diujikan (Hou, 2000). Asam lemak yang memiliki aktivitas antimikroba adalah *9-hexadecanoic acid* (Agoramoorthy et al., 2007). Senyawa *9-hexadecanoic acid* memberikan efek terhadap permeabilitas membran dan partisi ion ada lapisan membran sel dari mikroorganisme (Lagner and Hui, 2000). Senyawa dari golongan *benzene* juga memiliki aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan mikroorganisme. Suzuki et al., (1988) menyatakan bahwa senyawa *di-2-ethylhexyl phthalate* dapat bereaksi dengan sisi hidrofobik pada membran sel yang menyebabkan terganggunya permeabilitas dari membran sel. Hasil identifikasi komponen monomer lindi hitam hasil isolasi yang diduga mengandung senyawa anti mikroba disajikan pada Tabel 1. Berdasarkan Tabel 1. Senyawa yang diduga bersifat sebagai antimikroba dalam jumlah cukup banyak pada lignin yaitu Benzaldehyde,4-hydroxy-3,5-dimethoxy sebesar 2,76%, m-Anisic acid,3,4-dichlorophenyl ester sebesar 1,1%, golongan phenol lain seperti Phenol,2-methyl-4-(1,1,3,3- tetramethylbutyl)-sebesar 0,71%, Di-2-ethylhexyl phthalate sebesar 31,25% dan 9-Hexadecenoic acid, methyl ester,(Z)- sebesar 0,41%. Hal ini yang menyebabkan semakin tinggi konsentrasi lignin yang digunakan dapat meningkatkan daya hambat sebagai antimikroba (Gambar 2) karena meningkatnya konsentrasi antimikroba didalam larutan lignin tersebut.

Tabel 1. Identifikasi senyawa hasil isolasi dari monomer lignin yang bersifat antimikroba

No	Nama senyawa	Berat molekul	Jumlah (%)
1	Phenol,2-(1-methylpropyl)-,methylcarbamate	207	0,12
2	Benzoic acid,4-hydroxy-3-methoxy-	214	1,04
3	Benzaldehyde,4-hydroxy-3,5-dimethoxy	222	2,76
4	p-Anisic acid,4-nitrophenyl ester	182	0,32
5	m-Anisic acid,3,4-dichlorophenyl ester	273	0,9
6	m-Anisic acid,3,4-dichlorophenyl ester	296	1,1
7	Phenol,2-methyl-4-(1,1,3,3- tetramethylbutyl)-	220	0,3
8	Phenol,2-methyl-4-(1,1,3,3- tetramethylbutyl)-	220	0,71
9	1,2-Benzenedicarboxylic acid,bis(2- methylpropyl) ester	278	0,7
10	9-Hexadecenoic acid, methyl ester,(Z)-	268	0,41
11	1-Methylbutyl hexadecanoate	326	41,03
12	Di-2-ethylhexyl phthalate	390	31,25

KESIMPULAN

Peningkatan konsentrasi ligin dapat meningkatkan daya hambat terhadap mikroba. Penghambatan tertinggi terjadi konsentrasi lignin sebesar 12,5 dan 15% memiliki aktivitas antimikroba yang sama terhadap *E. coli* dengan diameter zona hambat sebesar 6,33 mm. Hasil isolasi lignin mengandung senyawa antimikroba yaitu Benzaldehde,4-hydroxy-3,5-dimethoxysebesar, m-Anisic acid,3,4-dichlorophenyl ester, Phenol,2-methyl-4-(1,1,3,3- tetramethylbutyl), Di-2-ethylhexyl phthalate sebesar 31,25% dan 9-Hexadecenoic acid, methyl ester,(Z)-.

DAFTAR PUSTAKA

- Alzagameem, A., Klein, S.E., Bergs, M., Do. X.T., Korte, I., Dohlen, S. ., , Cuwe, Kreyenschmidt, J Kamm, B., Larkins, M & Schulze, M.; 2019. Antimicrobial Activity of Lignin and Lignin-Derived Cellulose and Chitosan Composites against Selected Pathogenic and Spoilage Microorganism. *Polymers (Basel)*. 11(4): 670. doi: 10.3390/polym11040670
- Alzagameem A., El Khaldi-Hansen B., Kamm B., Schulze M. 2018. Lignocellulosic Biomass For Energy, Biofuels, Biomaterials, and Chemicals. In: Vaz S. Jr., editor. *Biomass and Green Chemistry*. 1st ed. Springer International Publishing; Basel, Switzerland: 2018. pp. 95–132.
- Agoramoorthy, G; Chandrasekaran, M; Venkatesalu, M & Hsu, M.J., 2007. Bacterial and Antifungal Activities Of Fatty Acid Methyl Esters Of The Blind-Your -Eye Mangrove From India. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38: 739-742
- Ayyachamy, M; Finola,E., Cliffe, Jessica, M., Coyne, John Collier, & Maria G. T., 2013. Lignin: Untapped Biopolymers In Biomass Conversion Technologies. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 3 (3): 255.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D.,& Idaomar, M., 2008. Biological Effects of Essential Oils. *Review. Food and Chemical Toxicology*, 46: 446-475.
- Bartolomeazzi, R., Senastianutto, N., Toniolo, R & Pizzariello, A., 2007. Comparative Evaluation of The Antuoxidant Capacity of Smoke Flavouring Phenols Bycrocin Bleaching Inhibition, DPPH Radical Scavenging and Oxidation Potential. *Food Chemistry*. 100: 1481 – 1489.
- Baurhoo B, C.A., Ruiz-Feria, & Zhao, X., 2008. Purified Lignin: Nutritional and Health Impacts On Farm Animals. *A review Animal Feed Science and Technology*. 144: 175–184
- Bonini, C., Auria, M; Emmanuel, L., Ferri, R., Pucciarello, R & Sabia, A.R., 2005. Polyutrethanes and Polyester from Lignin. *J.Appl.Polym.Sci*. 98 (3): 1451-1456.
- Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Simin, N., & Anackov, G., 2006. Characterization of The Volatile Composition of Essential Oils of Some Lamiaceae Spices and The Antimicrobial and Antioxidant Activities of The Entire Oils. *J.Agric. Food Chem*. 5: 1822–1828.
- Darnoko. 1992. Potensi Pemanfaatan Limbah Lignoselulosa Kelapa Sawit melalui Biokonversi. *Berita Penelitian Perkebunan*. 2 (2): 85-87.
- Doherty, W.O.S., Mousavioun, P & Fellows, C.M., 2011. Value-adding to Cellulosic Ethanol: Lignin Polymers. *Industrial Crops and Products*, 3: 259-276.
- Gomez-Estaca, J., Montero, P., Gimenez, B. & Gomez-Guillen, M.C., 2007. Effect of Functional Edible Films and High Pressure Processing on Microbial and Oxidative Spoilage in Cold-Smoked Sardine (*Sardina pilchardus*). *Food Chemistry*. 105: 511-520.
- Hidayati, S., Zuidar, S., & Fahreza, A. 2016. Optimasi Produksi Pulp Formacell dari Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS) dengan Metode Permukaan Respon, *Reaktor*, 16(4):161-171.
- Hidayati, S., Zuidar & Satyajaya. 2017. Effect of Acetic Acid: Formic Acid Ratio on Characteristics of Pulp From Oil Palm. *ARNP Journal of Engineering and Applied Sciences*. 12 (12): 3802-3807.
- Hidayati, S., Zuidar, A.S., Satyajaya, W., Murhadi & Retnowati, D.,. 2018. Isolation and Characterization Of Formacell Lignins From Oil Empty Fruits Bunches. *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering* 344. 2018.
- Hou, C, T., 2000. Biotransformation of Unsaturated Fatty Acids to Industrial Products. *Advances in Applied Microbiology*. 47:201-220
- Kleinert, M & Barth, T., 200 8. Towards in Lignicellulosic Biorefinery: Direct One Step Conversion of Lignin to Hydrogen-Enriched Biofuel. *Energy Fuels*. 22 (2): 1371-1379.

- Kaur, R., Uppal, S.K., & Sharma, P. 2017. Antioxidant and Antibacterial Activities of Sugarcane Bagasse Lignin and Chemically Modified Lignins. *Sugar Tech.* 19:675–680. doi: 10.1007/s12355-017-0513-y.
- Kristinsson, H.G., Danyali, N., & Ua-Angkoon, S., 2007. Effect of Filtered Wood Smoked Treatment on Chemical and Microbial Changes in Mahi-mahi fillets. *Journal of Food Science.* 72:16-24.
- Langner M. and Hui S. (2000), Effect of Free Fatty Acids On The Permeability Of 1, 2-myristoyl-Sn-Glycero-3-Phosphocholine Bilayer At The Main Phase Transition BBA-. *Membranes*, 1463, 439-447.
- Lee, K.W., Everts, H., & Beynen, A.C., 2004. Essential oils in broiler nutrition. *Inter. J. Poult. Sci.* 3: 738–752.
- Leroi, J.J.J., 2000. Salt and Smoke Simultaneously Effect Chemical and Sensory Quality of Cold-Smoked Salmon during 5° Celcius Storage Predicted using Factorial Design. *Journal of Food Protection.* 63: 1222-1227.
- Lin, S. Y. & Dence, C.W., 1992. *Methods in Lignin Chemistry.* Berlin Heidelberg : Springer-Verlag.
- Lupoi J.S., Singh, S., Parthasarathi R., Simmons B.A., & Henry R.J., 2015. Recent Innovations In Analytical Methods for The Qualitative and Quantitative Assessment of Lignin. *Renew. Sustain. Energy.* 4: 871–906. doi: 10.1016/j.rser.2015.04.091.
- Milly, P.J., Toledo, R.T., & Ramakrishnan, S., 2005. Determination of Minimum Inhibitory Concentrations of Liquid Smoke Fractions. *Journal of Food Science.* 70: 12-17.
- Mollahosseini, A., Rahimpour, A., Jahamshahi, M., Peyravi, M & Khavarpour, M., 2012. The Effect of Silver Nanoparticle Size on Performance and Antibacteriality of Polysulfone Ultrafiltration Membrane. *Desalination*, 30: 41-50.
- Muratore G, & Licciardello, F., 2005. Effect of Vacuum and Modified Atmosphere Packaging on the Shelf-life of Liquid-Smoked Sardine Fish (*Xiphias gladius*) slices. *Journal of Food Science.* 68: 1155-1160.
- Phillip, L. E., Idziak, E. S. & Kubow, S., 2000. The potential use of lignin in animal nutrition, and in modifying microbial ecology of the gut. Pages 1–9 in *East. Nutr. Conf. Anim. Nutr. Assoc. of Canada*, Montreal, Quebec, Canada.
- Prayuwidayati, M., Sunarti., T. C., Sumardi, Subeki, & Wiryawan, K. G., K. G., 2016. Use of Lignin Formcell of Empty Bunch Palm Fiber as Feed Supplement and Prebiotics Candidate in Ruminant. *Pakistan Journal of Nutrition*, 15 (1): 58-65.
- Roller, S., & Seedhar, P., 2002. Carvacrol and Cinnamic Acid Inhibit Microbial Growth in Fresh-Cut Melon and Kiwifruits at 4 °C and 8 °C. *Lett. Appl. Microbiol.* 35: 390–394.
- Rovrik, L.M., 2000. *Listeria Monocytogenes* In The Smoked Salmon Industry. *International Journal of Food Microbiology.* 62: 183-190.
- Sabu, T., Visakh, P.M. & Mathew, A.P., 2011. *Advances in Natural Polymers: Composites and Nanocomposites.* Springer, Dordrecht.
- Saravanakumar, A., Venkateshwaran, K., Vanitha, J., Ganesh, M., Vasudevan, M., & Sivakumar, T., 2009. Evaluation of Antibacterial Activity Phenol and Flavonoid Contents of The *Spesial Populnae* Flower Extracts. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Science*, 22: 282-286.
- Skandamis, P.N., & Nychas, G., 2001. Effect of Oregano Essential Oil on Microbiological and Physio-Chemical Attributes of Minced Meat Stored in Air And Modified Atmospheres. *J. Appl. Microbiol.* 9: 1011–1022.
- Smith-Palmer, A., Stewart, J., & Fyfe, L., 2001. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiol.* 18: 463–470.
- Smid, E.J., Hendriks, I., Boerrigter, H.A.M., & Gorris, L.G.M., 1996. Surface Disinfection of Tomatoes Using The Natural Plant Compound Trans-Cinnamaldehyde. *Postharvest Biol. Tech.* 9: 343–350.
- Sriroth & Sunthornvarabhas. 2018, Lignin from Sugar Process as Natural Antimicrobial Agent. *Biochem Pharmacol.* 7 (1): 1-4.
- Soldera, S., Sebastianutto, N., & Bortolomeazzi, R., 2008. Composition of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Commercial Aqueous Smoke Flavorings. *Journal of Agriculture and Food Chemistry.* 56: 2727-2734.

- Sunen, E., Aristimuni, C., & Fernandez-Galian, B., 2003. Activity of Smoke Wood Condesates against *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytigenes* in vacuum-packed, Cold-Smoked Rainbow Trout Stored at 4°C. *Food Research International*. 36: 111-116.
- Sunen, E., Fernandez-Galian, B., & Arustumuno, C., 2001. Antibacterial Activity of Smoke Wood Condesates Against *Aeromonas Hydrophila*, *Yersinia Enterocolitica* and *Listeria Monocytigenes* at Low Temperature. *Food Microbiology*. 18: 387-383.
- Suzuki, K., Nakano, N., Tanaka, R., Uyeda, M., & Shibata, M., 1988. Cell Aggregation Factor Produced by *Streptomyces* sp. Strain No. A-3315. *Agricultural and Biological Chemistry*. 52(10): 2589-2595
- Ultee, A., Slump, R.A., Steging, G., & Smid, E.J., 2000. Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. *J. Food Prot.* 63: 620–624.
- Xu, F., Sun, J., Sun, R., Fowler, P., & Baird, M.S., 2006. Comparative Study of Organosolve Lignin From Wheat Straw. *Ind. Crops Product*. 23 (2): 180-193.
- Yang W., Fortunati E., Dominici F., Kenny J.M., Giovanale G., Mazzaglia A., Balestra G.M., & Puglia, D., 2016. Effect of Cellulose and Lignin on Disintegration, Antimicrobial and Antioxidant Properties Of PLA Active Films. *Int. J. Biol. Macromol.* 89: 360–368. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.04.068.