

Hidrolisis Enzimatis Menggunakan Enzim Selulase dari *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger* pada Produksi Bioetanol Jerami Padi

Haris Ferdiansyah*, Sumardi Hadi Sumarlan, Bambang Dwi Argo

Jurusan Keteknik Pertanian - Fakultas Teknologi Pertanian - Universitas Brawijaya
Jl. Veteran, Malang 65145

*Penulis Korespondensi, Email : harhezzrhezz@gmail.com

ABSTRAK

Senyawa yang paling efektif untuk digunakan pada proses bioetanol adalah selulosa. Jerami merupakan golongan kayu lunak yang mempunyai komponen utama selulosa. Oleh karena itu, jerami padi banyak dimanfaatkan sebagai bahan baku pembuatan bioetanol. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efektifitas enzim, mengetahui kadar glukosa, dan juga untuk mengetahui perbandingan volume enzim selulase yang paling optimum pada tahapan glukosa. Penelitian ini menggunakan penyelesaian dengan 1 faktor 7 level perlakuan. Faktor perlakuan adalah variasi perbandingan volume enzim selulase *Aspergillus niger* dan *Trichoderma reesei* dengan perbandingan (1:0), (0:1), (1:1), (1:2), (1:3), (2:1), (3:1) dan waktu pengambilan sampel yakni pada jam ke-8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64 dan jam ke-72. Berdasarkan hasil penelitian didapatkan perbandingan *A.niger-T.reesei* 1 : 3 (v/v) dengan waktu hidrolisis selama 64 jam yang menghasilkan glukosa sebesar 17,35 g/L.

Kata Kunci : hidrolisis enzimatis, enzim selulase, glukosa

Enzymatic Hydrolysis Using Cellulase Enzyme from *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* on Rice Straw Bioethanol Production

ABSTRACT

*The most effective compound for use in the process of bioethanol is cellulose. Rice straw is a group softwood cellulose which is having a major component. Therefore, rice straw are used as raw material for bioethanol production. The aim of this study was to determine the effectiveness of enzymes, knowing glucose levels, and also to determine the optimum cellulase enzymes volume ratio. This study uses one factor with 7 levels of treatment. The treatment factor was the variation of the volume ratio of cellulase enzymes from *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* with ratio (1: 0), (0: 1), (1: 1), (1: 2), (1: 3), (2: 1), (3: 1) and a sample of the retrieval time at 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64 and 72 hours. This study suggested the optimum glucose obtained by *A. niger-T.reesei* ratio of 1: 3 (v/v) and hydrolysis time of 64 hours which is produces glucose of 17.35 g/L.*

Keywords: enzymatic hydrolysis, enzyme cellulase, glucose

PENDAHULUAN

Bioetanol merupakan salah satu bentuk energi alternatif ramah lingkungan dan juga merupakan salah satu bahan bakar cair yang dihasilkan dari tumbuhan (Biofuel). Senyawa yang paling efektif untuk digunakan pada proses bioetanol adalah selulosa. Selulosa biasanya banyak terdapat di kayu, jerami padi, jerami gandum, batang pisang. Dalam penelitian ini sumber selulosa yang digunakan adalah jerami padi. Dalam proses pembuatan Bio-etanol pertama yang dilakukan adalah proses fermentasi kandungan glukosa yang ada dalam tumbuhan, kemudian

dilakukan proses destilasi. Permasalahan yang terjadi saat ini dalam proses pembuatan bioetanol adalah pada proses hidrolisisnya.

Berdasarkan permasalahan tersebut maka solusinya adalah menggunakan proses hidrolisis enzimatis, dimana aplikasi proses ini menggunakan enzim yang secara sederhana dilakukan dengan mengganti tahap hidrolisis asam dengan tahap hidrolisis enzim. *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger* adalah fungi yang menghasilkan enzim selulase dan dapat menghidrolisis selulosa.

Proses hidrolisis selulosa dalam penelitian ini menggunakan enzim selulosa yang berasal dari fungi yaitu *Aspergillus niger* dan *Trichoderma reesei*. Fungi jenis *Trichoderma reesei* dapat menghasilkan endo- β -1,4-glukanase dan ekso- β -1,4-glukanase sampai dengan 80% tetapi β -glukosidasenya rendah (Martins *et al.*, 2008). Sehingga dibutuhkan penambahan β -glukosidase dari luar seperti fungi jenis *Aspergillus niger* agar dapat menghasilkan β -glukosidase tinggi tetapi endo- β -1,4-glukanase dan ekso- β -1,4-glukanase rendah (Juhasz *et al.*, 2003). Diharapkan dari perlakuan tersebut dapat diperoleh kondisi terbaik untuk proses hidrolisis enzimatis jerami padi. Kondisi terbaik ini akan diperoleh dengan memperhatikan faktor yang berpengaruh terhadap proses hidrolisis seperti volume substrat dan kondisi reaksi (pH dan temperatur) (Sun & Cheng, 2002).

Kondisi terbaik hidrolisis akan menghasilkan glukosa optimum juga yang nantinya dilakukan proses fermentasi untuk menjadi bioetanol. Sehingga tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui efektifitas enzim selulase dari *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger* pada tahapan hidrolisis terhadap yield kadar glukosa, serta untuk mengetahui pengaruh perbandingan volume enzim selulase dan waktu hidrolisis yang sesuai untuk menghasilkan kadar glukosa terbaik.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Adapun alat – alat yang digunakan yaitu seperti Ayakan 100 mesh, *Disk mill*, *Microwave*, Loyang, Oven, Timbangan digital, *Waterbath shaker*, *Beaker glass* 250 ml, Gelas ukur, Pipet ukur, Bola hisap, *Stopwatch*, *Sentrifuge*, Botol steril, Spektrofotometer, *Vortex*, Aluminium foil, *Freezer*, dan juga Blender.

Metode Penelitian

Persiapan Bahan

Bahan baku utama penelitian adalah jerami padi varietas ciherang. Sebelum digunakan sebagai substrat, jerami padi terlebih dahulu dibersihkan dari sisa daun dan kotoran kemudian diangin – angin kan lalu dipotong 2 cm. Kemudian direndam dalam air kurang lebih 12 jam lamanya. Kemudian untuk membantu proses dekomposisi jerami padi terhadap kandungan selulosa, hemiselulosa, dan lignin, jerami padi hasil rendaman digiling menggunakan blender untuk mendapatkan hasil yang lebih lembut.

Proses Pretreatment

Metode *pretreatment* dilakukan berdasarkan penelitian Ni'mah (2014). *Pretreatment* dilakukan dengan menambahkan NaOH 2 M pada jerami padi dengan perbandingan 1 : 10 (10 gram jerami : 100 ml NaOH) kemudian dipanaskan dengan *microwave* selama 40 menit. Sludge yang dihasilkan kemudian di keringkan pada suhu 50 °C selama 12 jam. Bubuk jerami hasil *pretreatment* inilah yang dipakai dalam proses hidrolisis enzimatis.

Pembuatan Enzim

Enzim selulase diproduksi dari mikrofungi *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger*. Media penanaman mikrofungi untuk produksi enzim selulase yaitu sebanyak 5 gram bubuk jerami ukuran 100 mesh. Bubuk jerami dimasukkan ke dalam *erlemeyer* dan ditambah larutan nutrisi

sebanyak 25 ml. *Erlenmeyer* ditutup dengan kapas steril dan kertas, dilapisi dengan aluminium foil dan diikat dengan benang. Media kemudian disterilkan menggunakan *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121°C. Media hasil sterilisasi didinginkan terlebih dahulu kemudian masing-masing biakan *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger* diambil dari media PDA (*Potato Dextrose Agar*) dengan menggunakan kawat ose kemudian disuspensikan pada 10 ml larutan Tween 80 0.1% larutan suspensi tersebut kemudian dimasukkan ke dalam media penanaman dan diinkubasi selama 8 hari pada suhu 35 °C. Pemanenan enzim dilakukan dengan menggunakan 100 ml larutan Tween 80 1%. Endapan dan cairan hasil fermentasi dipisahkan dengan menggunakan sentrifuge selama 30 menit dengan kecepatan 4000 rpm. Dari hasil pemanenan tersebut diperoleh cairan enzim yang akan digunakan pada tahap hidrolisis enzimatik.

Proses Hidrolisis

Jerami padi hasil *pretreatment*, dengan menggunakan ayakan ukurannya diseragamkan menjadi 100 mesh. Selanjutnya jerami padi ditimbang dan dimasukkan kedalam *beaker glass* sebanyak 5 gram. Lalu ditambahkan larutan buffer sitrat pH 5 sebanyak 50 ml dengan volume enzim sesuai perlakuan. Setelah itu, sesuai perlakuan yaitu 1:0, 0:1, 1:1, 2:1, 1:2, 3:1, 1:3, volume enzim *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger* (V) ditambahkan. Selanjutnya, dimasukkan ke dalam *waterbath shaker* selama 72 jam dengan suhu 50 °C dan kecepatan pengadukan 75 rpm (Fatma *et al.*, 2010). Selanjutnya setiap 8 jam selama 72 jam, Sampel diambil sebanyak 2 ml. Pengadukan dihentikan selama 1 menit pada setiap pengambilan sampel, dengan tujuan mengendapkan bubuk jerami.

Prosedur Analisa Kadar Glukosa

Analisa kadar glukosa dilakukan dengan metode DNS (*Dinitrosalicylic acid*) dimana Sampel hasil hidrolisis enzimatik dalam keadaan jernih dipipet sebanyak 0,2 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang bersih. Selanjutnya ditambahkan 1,8 mL akuades dan 2 mL reagen DNS Tabung reaksi dipanaskan pada airmendidih selama 5 menit agar terjadi reaksi antara glukosa dalam sampel dengan DNS. Tabung didinginkan hingga mencapai suhu ruang Angka absorbansi sampel diukur pada panjang gelombang 540 nm dengan *spektrofotometer* UV-Vis. Data hasil yang diperoleh tiap variabel, dibuat tabel dan grafik sehingga kondisi optimum dari masing-masing variabel dapat diketahui. Perlakuan terbaik dipilih berdasarkan pada perlakuan yang menghasilkan glukosa tertinggi.

Pembuatan Kurva Standar

Pengukuran gula reduksi dengan menggunakan metode DNS ini memiliki prosedur kerja yang singkat akan tetapi membutuhkan ketelitian yang tinggi. *Spektrofotometer* akan membaca nilai absorbansi yang dimiliki oleh sampel. Sampel yang mengandung gula reduksi akan bereaksi dengan reagen DNS apabila dipanaskan. Warna larutan akan menjadi pekat setelah dilakukan proses pemanasan. Proses pemanasan ini dilakukan dengan cara memasukkan tabung reaksi yang terisi dengan sampel dan reagen DNS ke dalam air mendidih selama 5 menit. Perubahan warna pada sampel dapat langsung diamati, dimana semakin pekat warna larutan maka kandungan gula yang terdapat dalam sampel semakin tinggi. Kemudian diukur menggunakan *Spektrofotometer* nilai absorbansi nya, lalu diplotkan ke dalam kurva standar. Kurva standar dibuat dengan cara melarutkan 5mg glukosa anhidrat dalam 100 mL akuades, sehingga diperoleh konsentrasi larutan 100mM, lalu dipipet ke dalam tabung reaksi bersih sesuai konsentrasi yang telah ditentukan yaitu 0-100 Mm. tabung reaksi yang telah berisi larutan glukosa ditambahkan 1 mL reagen DNS, lalu dipanaskan pada air mendidih selama 5 menit kemudian dibiarkan dingin atau mencapai suhu ruang.

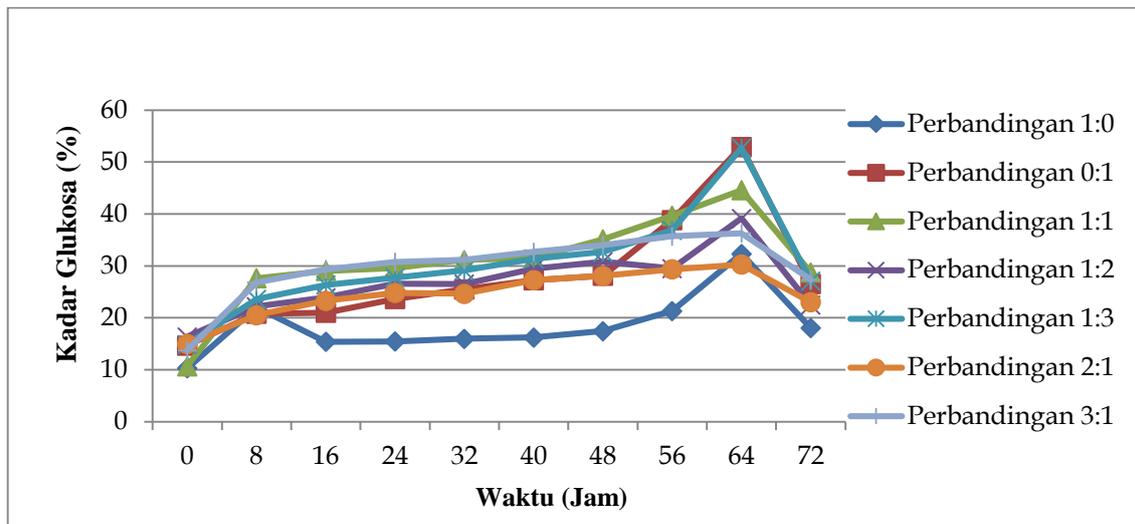
HASIL DAN PEMBAHASAN

Ploting Kurva Standar

Berdasarkan hasil pembuatan kurva standar diperoleh persamaan $y = 0.096x - 0,031$. Persamaan matematis glukosa tersebut memiliki arti bahwa nilai x merupakan konsentrasi gula dan sedangkan y merupakan nilai absorbansi dari glukosa pada panjang gelombang 540nm. Berdasarkan persamaan matematis tersebut, maka dapat dihitung berapa kadar glukosa sebagai produk dari reaksi – reaksi enzim selulase terhadap substrat jerami padi pada beberapa konsentrasi substrat dengan menggunakan data hasil pengamatan nilai absorbansi dari tiap sampel. Hasil pengukuran nilai absorbansi pada setiap konsentrasi glukosa mengalami peningkatan, dimana nilai absorbansi tertinggi terjadi pada konsentrasi glukosa 100mM yaitu sebesar 0,469. Hal ini dikarenakan karena pada bahan yang diukur oleh *spektrofotometer* memiliki kandungan glukosa yang tinggi sehingga semakin besar pula nilai yang dapat dibaca. Selain itu juga, apabila terjadi perubahan warna larutan menjadi pekat maka mengindikasikan bahwa larutan mengandung gula yang tinggi pada sampel tersebut.

Kadar Glukosa Jerami Padi

Hasil pengukuran kadar glukosa yang didapatkan pada masing – masing sampel yang menggunakan metode DNS menunjukkan hasil dengan kecenderungan terjadi peningkatan kadar glukosa seiring dengan lamanya waktu hidrolisis, namun pada saat waktu 64 jam semua sampel mengalami penurunan kadar glukosa. Grafik yang menunjukkan hasil pengukuran kadar glukosa pada berbagai perlakuan dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1 . Kadar Glukosa pada Berbagai Perlakuan

Berdasarkan pengukuran hasil kadar glukosa pada Gambar 1, dapat dilihat bahwa pada perlakuan perbandingan *Aspergillus niger* : *Trichoderma reesei* (1 : 3), kadar glukosa tertinggi yang dihasilkan yaitu sebesar 52,7% pada jam ke 64, sedangkan untuk kadar glukosa terendah terjadi pada jam ke 8 yaitu sebesar 23,6%. Pada perbandingan perlakuan ini terjadi peningkatan kadar glukosa setiap waktu, akan tetapi pada jam ke 72 terjadi penurunan kadar glukosa. Hal ini dikarenakan campuran kedua enzim selulosa yang berasal dari kapang yang berbeda memiliki aktifitas enzim awal yang tinggi, dimana dengan dengan aktifitas enzim yang tinggi memungkinkan didapatkan nya hasil glukosa yang tinggi.

Berdasarkan pengukuran hasil glukosa dari 7 perbandingan perlakuan, kadar glukosa tertinggi diperoleh dari perbandingan *Aspergillus niger* : *Trichoderma reesei* (1:3) (v/v) dengan

kadar glukosa sebesar 52,702%, sedangkan untuk perlakuan perbandingan yang terendah yaitu pada perbandingan 1 *Aspergillus niger* : 0 *Trichoderma reesei* dengan kadar glukosa sebesar 15,384%. Hal ini dikarenakan pada perlakuan dengan perbandingan enzim selulase *Aspergillus niger* : *Trichoderma reesei* (1 : 3), memiliki aktivitas enzim tertinggi jika dibandingkan dengan perlakuan yang lainnya (Salafiah, 2014). Apabila dibandingkan dengan penelitian Fatrikadona (2012), nilai yang diperoleh lebih tinggi. Dimana proses hidrolisis enzimatis dengan menggunakan enzim selulosa dari satu jenis fungi yaitu 2,241g/L sebagai yang tertinggi dan yang terendah sebesar 0,790g/L. perbedaan sumber pembentukan enzim tersebut yang menyebabkan aktifitas enzim juga berbeda sehingga kadar glukosa yang dihasilkan juga berbeda. Enzim selulase yang berasal dari gabungan mikrofungi *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger* memiliki kemampuan yang tinggi didalam memecahkan ikatan pada stuktur selulosa sehingga mampu menghasilkan glukosa yang lebih tinggi. Oleh karena itu, hidrolisis enzimatis limbah pertanian dapat memberikan nilai tambah. Glukosa dan sellobiose adalah inhibitor enzim dalam menghidrolisis selulosa. Sellobiosa menghambat enzim sellobiohidrolase pada kompleks enzim selulase dan glukosa menghambat enzim penghidrolisis sellobiosa. Sellobiose mempunyai potensi menjadi inhibitor yang lebih kuat dibandingkan dengan glukosa pada mekanime hidrolisis selulosa (Marsden and Gray, 1986 dalam Ambriyanto, 2010). Tahapan hidrolisis selulosa tergantung kepada struktur selulosa, interaksi antara enzim selulase dan serat selulosa, mekanisme hidrolisis enzim tersebut di alam dan inhibitor yang terbentuk (Coughlan, 1985 dalam Ambriyanto, 2010).

KESIMPULAN

Penelitian ini menunjukkan bahwa enzim selulase yang dihasilkan dari mikrofungi *Aspergillus niger* dan *Trichoderma reesei* dapat dimanfaatkan sebagai katalis dalam proses hidrolisis enzimatis jerami padi dimana produk akhir yang dihasilkan berupa glukosa. Perbandingan enzim selulase *Aspergillus niger*-*Trichoderma reesei* dan waktu hidrolisis merupakan faktor utama yang mempengaruhi proses hidrolisis enzimatis bioetanol dari jerami padi. Penelitian ini menyarankan untuk menggunakan perbandingan *Aspergillus niger*-*Trichoderma reesei* dan waktu hidrolisis 64 jam untuk menghasilkan glukosa optimal sebesar 17,35 g/L.

DAFTAR PUSTAKA

- Ambriyanto. K. S.2010. Isolasi dan karakterisasi Bakteri Aerob Pendegradasi Selulosa dari Serasah Daun Rumput Gajah (*Pennisetum purpureum schumm*), Institut Teknologi Sepuluh Nopember.
- Fatma, H., El-Zaher Abd., Fadel, M. 2010. Production of Bioethanol Via Enzymatic Saccharification of Rice Straw by Cellulase Produced by *Trichoderma reesei* Under Solid State Fermentation. *New York Science Journal*, 3(4): 72-78.
- Fatrikadona, A. 2011. Hidrolisis Enzimatis Jerami Padi Dengan Memanfaatkan Enzim Selulase Dari *Trichoderma Reesei* Sebagai Katalisator Pembentuk Glukosa. Skripsi. Jurusan Keteknik Pertanian, Universitas Brawijaya. Malang.
- Juhasz, T., K. Kozma, Z. Szengyel., K. Reczey. 2003. Production of β -glucosidase in Mixed Culture of *Aspergillus niger* BKMF 1305 and *Trichoderma reesei* RUT C30, *Food Technol. Biotechnol.* 41: 49-53.
- Martins, L.F., D. Kolling, M. Camassola, A.J.P. Dillon, L.P. Ramos. 2008. Comparison of *Penicillium chitinatum* and *Trichoderma reesei* Cellulases in Relation to Their Activity Against Various Cellulosic Substrates. *Bioresource Technol.* 99: 1417-1424.
- Ni'mah, Farisatun. 2014. Optimasi Pengaruh Penambahan Konsentrasi Larutan NaOH Pada Proses *Pretreatment* Degradasi Lignin Jerami Padi (*Pada Produksi Bioetanol*).

- Skripsi. Jurusan Keteknikaan Pertanian Pertanian. Fakultas Teknologi Pertanian. Universitas Brawijaya. Malang.
- Salafiah, Elivi S. 2014. Studi Pengaruh Suhu dan pH Terhadap Aktivitas Enzim Selulase Mikrofungi *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger* dengan Substrat Jerami Padi. Skripsi. Jurusan Keteknikaan Pertanian. Fakultas Teknologi Pertanian. Universitas Brawijaya. Malang.
- Sun Y and Cheng J. 2002. Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for Ethanol Production: A Review. *Bioresource Technol.* 83:1–11.