

PENINGKATAN UNJUK KERJA HIDROLISIS ENZIMATIK JERAMI PADI MENGUNAKAN CAMPURAN SELULASE KASAR DARI *Trichoderma reesei* DAN *Aspergillus niger*

Nadiem Anwar, Arief Widjaja^{*)}, dan Sugeng Winardi

Jurusan Teknik Kimia, Fakultas Teknologi Industri, Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya 60111, Indonesia

^{*)}E-mail: arief_w@chem-eng.its.ac.id

Abstrak

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk membandingkan efektivitas campuran enzim selulase kasar dari *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger* dengan selulase *A. niger* komersial dari Fluka Biochemika serta mempelajari pengaruh ratio enzim dengan substrat terhadap unjuk kerja hidrolisis. Enzim kasar dibuat dengan cara fermentasi padat dengan media sederhana. Satu unit aktivitas selulase kasar dari *A. niger* dicampur dengan dua unit aktivitas selulase kasar dari *T. reesei*. Jerami padi yang akan dihidrolisis terlebih dahulu digiling dan diayak 120–140 mesh kemudian didelignifikasi menggunakan larutan NaOH 2% selama 6 jam pada temperatur 85 °C. Hidrolisis dilakukan dalam beaker glass 300 mL yang dilengkapi dengan pengaduk bermotor. Sampel dianalisis menggunakan metoda dinitrosalicic acid. Hasil percobaan menunjukkan bahwa peningkatan rasio enzim terhadap jerami padi dapat meningkatkan konsentrasi glukosa yang dihasilkan baik untuk enzim komersial maupun campuran enzim kasar. Campuran enzim selulase kasar dari *T. reesei* dan *A. niger* yang dihasilkan dari percobaan ini, dua kali lebih efektif menghidrolisis jerami padi menjadi glukosa dibandingkan dengan selulase komersial.

Abstract

Increasing the Performance of Enzymatic Hydrolysis of Rice Straw Using Mixed Crude Cellulases from *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger*. The objective of this work is to compare the effectiveness of mixed crude enzyme cellulase from *T. reesei* and *A. niger* with commercial enzyme from *A. niger*, and to investigate effect of enzyme to substrate ratio to performance of enzymatic hydrolysis of rice straw. The commercial enzyme from Fluka Biochemika was used, and crude enzyme were prepared by solid fermentation with simple media. Before hydrolyzed, the rice straw was grinded and sieved and then heated at 85 °C with 2% sodium hydroxide for six hours. Hydrolysis was conducted in 300 mL beaker flask equipped with mechanical stirrer. Samples were analyzed by dinitrosalicic acid method and measured by spectrophotometer. Both of commercial and mixed crude enzyme show that, the higher enzyme to substrate ratio was higher the glucose concentration obtained. However, ratio of glucose obtained to enzyme used become smaller. The mixture of crude enzyme from *T. reesei* dan *A. niger* that produced in this work was two fold more effective to hydrolyze rice straw than using cellulase enzyme of *A. niger* from Fluka Biochemika.

Keywords: rice straw, cellulase, hydrolysis, A. niger, T. reesei

1. Pendahuluan

Indonesia menghasilkan 180 juta ton jerami padi tiap tahun [1] yang terdiri dari 38% selulosa, 24% hemiselulosa dan 8% lignin [2]. Selulosa dalam jerami padi dapat dihidrolisis untuk menghasilkan glukosa baik secara kimiawi [3], secara enzimatik [4] maupun fermentatif [5]. Glukosa yang dihasilkan dapat difermentasi menjadi bahan bakar nabati yang ramah lingkungan seperti biohidrogen [6-8] dan bioetanol [2] ataupun menjadi produk-produk lain. Produksi bahan

bakar dari sumber terbarukan sangat prospektif karena cadangan bahan bakar fosil semakin berkurang, padahal kebutuhan energi akan terus meningkat seiring dengan pertumbuhan penduduk bumi [9]. Hidrolisis kimiawi sangat cepat tetapi memerlukan temperatur tinggi [3] sehingga memerlukan energi yang besar disamping sifatnya yang kurang ramah lingkungan. Hidrolisis fermentatif menggunakan *Aspergillus niger* menghasilkan konsentrasi glukosa tertinggi kurang dari 80 mg/dL dengan waktu fermentasi 7 jam [5]. Konsentrasi glukosa tersebut belum cukup tinggi

sehingga memerlukan cukup energi untuk proses pemekatan jika akan dilakukan proses lanjutan. Hidrolisis enzimatis lebih menarik dari sisi penggunaan energi karena dapat dilangsungkan pada temperatur rendah dan menghasilkan perolehan glukosa sampai 70% [4], akan tetapi laju reaksinya lambat. Kesulitan lain pada hidrolisis enzimatis adalah tingginya harga enzim komersial.

Enzim selulase terdiri dari tiga komponen yaitu endo-1,4- β -D-glukanase, ekso-1,4- β -D-glukanase dan 1,4- β -D-glukosidase yang dapat dihasilkan oleh berbagai macam mikroorganisme. *Trichoderma reesei* mampu menghasilkan endoglukanase sampai 80% tetapi β -glukosidasenya rendah lebih rendah dari yang dibutuhkan untuk menghidrolisis selulosa sampai menjadi glukosa secara efisien, sehingga produk utama hidrolisisnya bukan glukosa melainkan selobiosa [10-12] yang merupakan inhibitor kuat terhadap endoglukanase dan eksoglukanase. Persoalan ini dapat diatasi dengan menambahkan β -glukosidase dari luar untuk mempercepat konversi selobiosa menjadi glukosa sehingga efek inhibisinya dapat dieliminasi [11] atau memproduksi selulase dengan cara mengkombinasikan mikroorganisme yang kemampuan memproduksi endoglukanase dan eksoglukanasanya kuat seperti *T. reesei* dengan mikroorganisme yang kemampuan memproduksi β -glukosidasenya kuat seperti *A. niger* [11]. Perbandingan *A. niger* terhadap *T. reesei* yang optimum adalah 1 : 2 [11] sedangkan untuk kombinasi *A. niger* MSK-7 dengan *T. viride* MSK-10 yang optimum adalah 1 : 1 [13]. Hidrolisis jerami padi menggunakan campuran *crude* selulase dari *T. reesei* dan selulase dari *A. niger*, sejauh pengetahuan penulis belum pernah dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk menguji efektivitas campuran *enzim kasar* selulase dari *T. reesei* dan *A. niger* dalam menghidrolisis jerami padi dengan pembandingan enzim komersial *A. niger* dari Fluka Biochemika dan mempelajari pengaruh ratio enzim substrat terhadap substrat terhadap hidrolisis jerami padi.

2. Metode Penelitian

Penyiapan Jerami. Jerami padi yang diambil dari sekitar kampus ITS dijemur selama 4 hari, dipotong \pm 5 mm menggunakan pemotong kertas kemudian digiling menggunakan gilingan sereal dan diayak lolos 120–140 mesh. Jerami padi dipanaskan bersama larutan NaOH 2% pada temperatur 85 °C selama 6 jam dalam labu Erlenmeyer yang dilengkapi dengan kondensor refluks, kemudian dicuci dengan air kran sampai netral dan terakhir dicuci dengan aquades. Jerami dipisahkan menggunakan penyaring kain kemudian dikeringkan pada 105 °C selama kurang lebih 8 jam.

Penyiapan Campuran Enzim Kasar. Strain yang digunakan untuk memproduksi selulase pada penelitian adalah *Trichoderma reesei* yang berasal dari

Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi FMIPA UNAIR dan *A. niger* ITBCC F74 dari Laboratorium Mikrobiologi Departemen Teknik Kimia ITB. Kedua strain dikembangkan pada media *potato dextrose agar* (PDA) miring selama tujuh hari. Enzim dipersiapkan dengan cara menginkubasi *T. reesei* maupun *A. niger* dalam media padat jerami padi 80–100 mesh dengan larutan nutrisi yang digunakan mengandung 1,0 g ekstrak ragi (Oxoid-England), 1,5 g *bacteriological peptone* (Oxoid-England), 1,4 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2,0 g KH_2PO_4 , 0,005 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 mL larutan CMC 1% dalam tiap liter larutan buffer asetat 0,1 M dengan pH 5,0.

Lima gram serbuk jerami padi dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer 250 mL, ditambahkan 25 mL larutan nutrisi kemudian ditutup dengan kapas yang dibalut kain kasa. Campuran tersebut disterilisasi pada temperatur 121 °C selama 15 menit. Bibit *A. niger* dan *T. reesei* dalam agar miring disuspensikan dalam larutan salin 0,85% yang mengandung 0,1% Tween 80. Suspensi spora *A. niger* maupun *T. reesei* yang mengandung $\pm 1,8 \times 10^8$ /mL, diinokulasikan secara aseptik ke medium dalam labu Erlenmeyer. *T. reesei* diinkubasi selama 6 hari sedangkan *A. niger* diinkubasi selama 8 hari. Enzim dipanen menggunakan 100 mL larutan 1% Tween 80 dalam buffer asetat 0,1 M dengan pH 5,5 dan *diaduk* pada 175 rpm selama 135 menit. Campuran enzim kemudian disentrifugasi pada 5.000 rpm selama 1 jam dan disaring untuk mendapatkan *enzim kasar* (supernatan). Aktivitas enzim diuji berdasarkan aktivitas CMCase, satu unit aktivitas (U) didefinisikan sebagai 1 μ mol glukosa yang dihasilkan dari degradasi CMC tiap menit pada temperatur pengujian 35 °C. Jumlah glukosa yang dihasilkan ditentukan menggunakan dinitrosalicylic acid (DNS), diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Dua unit *enzim kasar* dari *T. Reesei* dicampur dengan satu unit *enzim kasar* dari *A. Niger*. Pada saat tidak digunakan, enzim disimpan pada suhu 4 °C.

Penyiapan Enzim Komersial. Enzim komersial yang digunakan sebagai pembandingan pada percobaan ini adalah selulase dari *A. niger* berlabel Fluka Biochemika dengan aktivitas 0,93 U/mg. Enzim ini dilarutkan dalam 100 mL buffer asetat 0,1 M dengan pH 5,5 sehingga diperoleh persediaan enzim komersial dengan aktivitas 0,93 U/mL. Untuk masing-masing percobaan dipipet enzim komersial 75, 100, 125 dan 150 mL sehingga diperoleh aktivitas enzim 70 U, 93 U, 116,3 dan 139,5 U kemudian ditambahi aquades sehingga volume larutan enzim menjadi 150 mL.

Hidrolisis. Hidrolisis dilakukan dalam beaker glass 300 mL yang dilengkapi dengan pengaduk bermotor dan pemanas berpengendali. Jerami padi yang telah didelignifikasi dan enzim dengan aktivitas tertentu masing-masing dipanaskan perlahan sampai 40 °C

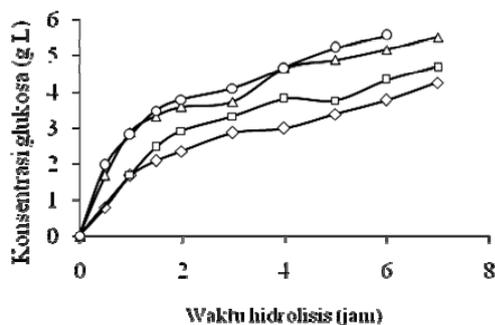
kemudian dicampur dan diaduk. Hidrolisis dilakukan dengan kondisi tetap berikut: berat jerami 5 g, ukuran partikel jerami 120–140 mesh, temperatur 40 °C, volume liquid 150 mL, putaran pengaduk 160 rpm dan pH 5,5 baik untuk campuran enzim kasar maupun enzim komersial dengan variabel unit aktivitas enzim. Pada setiap pengambilan sampel, pengadukan dihentikan selama satu menit untuk mengendapkan serbuk jerami. Sampel diambil 0,2 mL kemudian dianalisis kandungan glukosanya menggunakan DNS dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer. Analisis dilakukan duplo.

3. Hasil dan Pembahasan

Aktivitas enzim kasar dari *T. reesei* yang digunakan pada percobaan ini adalah 1,608 U/mL dan dari *A. niger* 1,680 yang diuji pada suhu 35 °C dan pH 5. Penambahan aktivitas enzim pada jumlah substrat yang tetap, secara umum meningkatkan laju produksi glukosa (Gambar 1). Hal tersebut dimungkinkan karena dengan jumlah dan konsentrasi jerami padi yang sama, makin besar aktivitas enzim, makin banyak sisi aktif enzim yang tersedia untuk memecah jerami padi sampai menjadi glukosa.

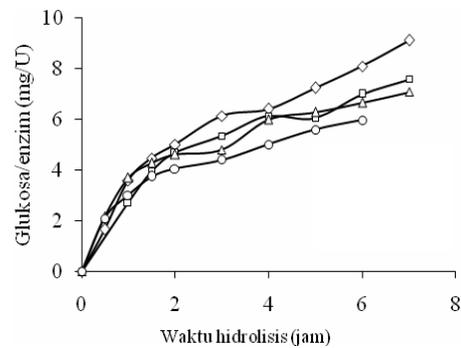
Makin besar aktivitas enzim yang digunakan, makin kecil glukosa yang dihasilkan persatuan aktivitas enzim yang digunakan (Gambar 2). Hal ini menunjukkan bahwa penambahan aktivitas enzim yang digunakan tidak proporsional dengan glukosa yang dihasilkan dan diperkirakan pada kenaikan aktivitas enzim yang terlalu tinggi tidak lagi meningkatkan glukosa yang diperoleh persatuan aktivitas enzim yang digunakan.

Untuk jumlah enzim yang sama dengan enzim komersial, glukosa yang dihasilkan pada hidrolisis menggunakan enzim kasar, kira-kira dua kali lebih besar dibandingkan yang dihasilkan oleh enzim komersial (Gambar 1 dan Gambar 3). Hal ini menunjukkan bahwa penambahan enzim kasar dari *A. niger* ke enzim kasar dari *T. reesei* dapat memperbaiki komposisi

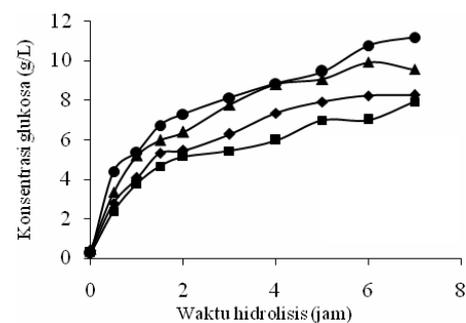


Gambar 1. Perubahan Konsentrasi Glukosa terhadap Waktu pada Aktivitas Enzim Komersial 70 U (◇), 93 U (□), 116,5 U (Δ), dan 139,5 U (○)

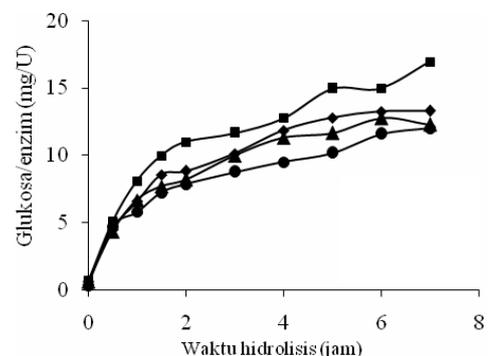
endoglukanase, eksoglukanase dan β-glukosidase menjadi lebih seimbang untuk mendegradasi selulosa dalam jerami menjadi glukosa, dibandingkan dengan komposisi pada enzim komersial tunggal. Begitu juga



Gambar 2. Perubahan Glukosa Persatuan Aktivitas Enzim Terhadap Waktu Pada Aktivitas Enzim Komersial 70 U (◇), 93 U (□), 116,5 U (Δ), dan 139,5 U (○)



Gambar 3. Perubahan Konsentrasi Glukosa terhadap Waktu Campuran Enzim Kasar adalah Campuran 2 U Selulase dari *T. reesei* dengan 1 U Selulase dari *A. niger*. Aktivitas Campuran Enzim Kasar 70 U (■), 93 U (◆), 116,5 U (▲) dan 139,5 U (●)



Gambar 4. Perubahan Glukosa Persatuan Aktivitas Enzim terhadap Waktu. Campuran Enzim Kasar adalah Campuran 2 U Selulase dari *T. reesei* dengan 1 U Selulase dari *A. niger*. Aktivitas Campuran Enzim Kasar 70 U (■), 93 U (◆), 116,5 U (▲) dan 139,5 U (●)

glukosa yang dihasilkan persatuan enzim kasar yang digunakan (Gambar 4), mirip dengan yang dihasilkan menggunakan enzim komersial (Gambar 2) tetapi berat glukosa persatuan unit aktivitas enzimnya dua kali lebih besar.

Pada percobaan ini hanya dilakukan untuk perbandingan enzim kasar dari *T. reesei* dan *A. niger* 2 : 1. Masih perlu dilakukan pengkajian lebih lanjut untuk mengetahui ratio campuran selulase *T. reesei* dengan *A. niger*, pH, temperatur yang optimum dan sebagainya.

4. Simpulan

Peningkatan aktivitas enzim pada berat jerami padi yang tetap, akan meningkatkan laju produksi glukosa. Tetapi pada penggunaan enzim yang terlalu besar, konsentrasi glukosa yang dihasilkan persatuan aktivitas enzim yang digunakan akan semakin kecil. Campuran enzim selulase kasar dari *T. reesei* dan *A. niger* yang dihasilkan pada percobaan ini lebih efektif mendegradasi jerami padi menjadi glukosa dibandingkan dengan selulase *A. niger* komersial dari Fluka Biochemika. Konsentrasi glukosa yang dihasilkan menggunakan campuran selulase kasar, dua kali lebih besar dari konsentrasi glukosa yang dihasilkan menggunakan enzim komersial.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kami menyampaikan kepada Direktorat Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat – Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi (DP2M-DIKTI) Departemen Pendidikan Nasional yang telah membiayai penelitian ini melalui skema penelitian Hibah Bersaing sesuai Surat Perjanjian Pelaksanaan Penelitian Nomor: 10473/12.7/PM/2009 tanggal 01 April 2009.

Daftar Acuan

- [1] S. Sabiham, B. Mulyanto, APECATC Workshop on Biomass Utilization Held in Tokyo and Tsukuba Japan, January, 2005.
- [2] S. Abedinifar, K. Karimia, M. Khanahmadi, M.J. Taherzadeh, Biomass and Bioenergy. 33 (2009) 828.
- [3] Q. Xiang, Y.Y. Lee, P.O. Pettersson, R.W. Torget (2003) 105.
- [4] T. de Vrije, G.G. de Haas, G.B. Tan, E.R.P. Keijsers, P.A.M. Claassen, International Journal of Hydrogen Energy. 27 (2002) 1381.
- [5] B.O. Aderemi, E. Abu, B.K. Highina, African Journal of Biotechnology, 7 (2008) 1745.
- [6] A. Reungsang, S. Sangyoka, T. Imai, P. Chairprasert, International Conference on Sustainable Energy and Environment (SEE) (2004) 319.
- [7] H. Ogino, T. Miura, K. Ishimi, M. Seki, H. Yoshida, Biotechnology Progress, 21 (2005) 1786.
- [8] S.M. Kotay, S.M., D. Das, Bioresource Technology, Elsevier (2002).
- [9] G. Antonopoulou, I. Ntaikou, H.N. Gavala, I.V. Skiadas, K. Angelopoulos, G. Lyberados, Global NEST Journal. 9 ((2002) 144.
- [10] L.F. Martins, D. Kolling, M. Camassola, A.J.P. Dillon, L.P. Ramos, Bioresource Technology. 99 (2008) 1417.
- [11] T. Juhasz, K. Kozma, Z. Szengyel, K. Reczey, Food Technol. Biotechnol. 41 (2003) 49.
- [12] A. Ahamed, P. Vermette, Biochemical Engineering Journal. 42 (2008) 41.
- [13] I. Haq, M.M. Javed, T.S. Khan, Z. Siddiq, Research Journal of Agriculture and Biological Sciences. 1 (2005) 241.