

Hidrolisis Enzimatik Ampas Tebu (*Bagasse*) Memanfaatkan Enzim Selulase dari Mikrofungi *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger* Sebagai Katalisator dengan *Pretreatment Microwave*

Ferys Ika Oktavia*, Bambang Dwi Argo, Musthofa Lutfi

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

*Penulis Korespondensi, Email: Fey_rists@yahoo.com

ABSTRAK

Ampas tebu (*bagasse*) adalah salah satu sumber lignoselulosa untuk pembuatan bioetanol. Pada penelitian hidrolisis dilakukan secara enzimatik dengan memanfaatkan enzim selulase dari mikrofungi *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger*. Proses hidrolisis dilakukan dengan memvariasikan perbandingan dari kedua enzim selulase serta pengamatan terhadap waktu hidrolisis. Variasi perbandingan volume enzim selulase antara *Trichoderma reesei* : *Aspergillus niger* yaitu 1:0, 0:1, 1:1, 1:2, 2:1, sedangkan untuk waktu pengambilan sampel dilakukan pada jam ke- 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, serta pada jam ke-48. Pengukuran kadar glukosa dilakukan dengan metode DNS (*Dinitrosalicylic acid*) dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan dengan hasil tertinggi diperoleh pada variasi dengan perbandingan 0 *T.reesei* : 1 *A.niger* dengan waktu hidrolisis selama 12 jam yang menghasilkan glukosa sebesar 47,213 %.

Kata Kunci: ampas tebu, hidrolisis enzimatik, glukosa

Enzymatic Hydrolysis of Bagasse Utilizing Enzymes Cellulase From Micro Trichoderma ressei and Aspergillus niger As Catalyst In Microwave Pretreatment

ABSTRACT

Bagasse is one source of lignocellulose for bioethanol production. In this study, research conducted enzymatic hydrolysis with cellulase enzymes utilizing of micro Trichoderma reesai and Aspergillus niger. Hydrolysis process is done by varying the ratio of the two enzymes cellulase and observation of the hydrolysis time. Variation of the volume ratio between the cellulase enzyme Aspergillus niger: Trichoderma reesei 1:0, 0:1, 1:1, 1:2, 2:1, while for the time of sampling was conducted on 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, and at 48 hours. Measurement of glucose is done by the DNS method (Dinitrosalicylic acid) using spectrophotometer at wavelength of 540 nm. The results of this research showed that the best results is enzymatic hydrolysis with a ratio of T.reesei : A.niger = 0:1 at 12 hours that produces glucose by 47.213 %

Keywords : Bagasse, enzymatic hydrolysis, glucose

PENDAHULUAN

Ampas tebu (*bagasse*) merupakan ampas tebu yang sudah diekstrak gulanya pada bagian gilingan dan salah satu limbah padat dari pabrik gula, biasanya dikirim ke bagian boiler untuk dijadikan bahan bakar. Penggunaan ampas tebu (*bagasse*) sebagai bahan bakar pada boiler adalah sangat umum digunakan pada pabrik-pabrik gula yang berbahan baku tebu. Ampas tebu

termasuk biomassa yang mengandung lignoselulosa sangat dimungkinkan untuk dimanfaatkan menjadi sumber energi alternatif seperti bioetanol karena bioetanol dapat digunakan sebagai bahan bakar. Menurut Licht (2009), pada tahun 1999 produksi bahan bakar etanol mencapai 4.972 juta galon (setara dengan 18.819 juta liter) dan pada tahun 2008 meningkat menjadi 17.524 juta galon (setara dengan 66.328 juta liter).

Proses *pretreatment* dilakukan untuk mengkondisikan bahan-bahan lignoselulosa baik dari segi struktur maupun ukuran dengan memecah dan mengurangi kandungan lignin dan hemiselulosa, merusak struktur kristal dari selulosa serta meningkatkan porositas bahan (Sun dan Cheng, 2002). Produksi etanol dari biomassa lignoselulosa limbah pertanian meliputi tahap *pretreatment*, hidrolisis (sakarifikasi), fermentasi dan tahap pemurnian etanol. Pada proses hidrolisis bertujuan untuk mendapatkan glukosa yang kemudian difermentasi oleh khamir untuk menghasilkan etanol. Hidrolisis meliputi proses pemecahan polisakarida di dalam biomassa yaitu menjadi monomer gula penyusunannya.

Dalam proses hidrolisis enzimatis dengan bahan lignoselulosa, *pretreatment* menjadi satu tahapan yang penting dilakukan untuk meningkatkan akseibilitas enzim mendegradasi selulosa. Pada proses hidrolisis selulosa dalam penelitian ini menggunakan enzim selulase dari fungi *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger*. Perlakuan tersebut diharapkan dapat memperoleh kondisi optimum untuk proses hidrolisis enzimatis ampas tebu. Maka penelitian ini didapatkan glukosa yang dapat dimanfaatkan untuk proses fermentasi. Tujuan dari penelitian ini adalah Mengetahui pemanfaatan enzim selulase dari mikrofungi *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger* pada tahapan hidrolisis untuk pembuatan bioetanol dan mengetahui pengaruh perbandingan enzim selulase dari mikrofungi *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger* serta waktu hidrolisis terhadap glukosa yang dihasilkan dari proses hidrolisis enzimatis.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian adalah blender, *microwave*, loyang, timbangan digital, *waterbath shaker*, *Beaker glass* 250 ml, gelas ukur, pipet ukur, bola hisap, *stopwatch*, sentrifuge, botol steril, spektrofotometer, aluminium foil, *freezer*.

Bahan yang digunakan adalah ampas tebu, enzim selulase dari mikrofungi *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger*, akuades, larutan glukosa *anhidrat*, pereaksi DNS (*Dinitrosalicylic acid*).

Metode Penelitian

Proses *Pretreatment*

Ampas tebu terlebih dahulu dibersihkan dari kotoran sebelum digunakan sebagai substrat, kemudian dijemur lalu dipotong ± 2 cm. Selanjutnya, ampas tebu dikecilkan ukurannya menggunakan *blender*. *Pretreatment* dilakukan dengan menambahkan NaOH 3 M, kemudian dipanaskan dengan *microwave* selama 40 menit. Bubuk ampas tebu hasil *pretreatment* inilah yang dipakai dalam proses hidrolisis enzimatis.

Prosedur Produksi Enzim Selulase

Enzim selulase diproduksi dari mikrofungi *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger*. Media penanaman mikrofungi untuk produksi enzim selulase yaitu sebanyak 5 gram bubuk ampas tebu. Bubuk ampas tebu dimasukkan ke dalam *erlemeyer* dan ditambah larutan nutrisi sebanyak 25 ml. *Erlemeyer* 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 1%. Larutan suspensi tersebut kemudian dimasukkan ke dalam media penanaman dan dinkubasi selama 8 hari pada suhu 30 °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.

Hidrolisis Enzimatik

Ampas tebu dari hasil *pretreatment* ditimbang sebanyak 10 gram dan dimasukkan ke dalam *beaker glass*. Selanjutnya ditambahkan larutan buffer sitrat pH 5 sebanyak 50 ml, dengan volume enzim sesuai perlakuan. Setelah itu, perbandingan volume enzim *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger* (V) ditambahkan sesuai perlakuan yaitu 1:0, 0:1, 1:1, 2:1, 1:2. Selanjutnya, dimasukkan ke dalam *waterbath shaker* selama 48 jam dengan suhu 50°C dan kecepatan pengadukan 75 rpm (El-Zaher dkk.,2010). Sampel diambil sebanyak 2 ml setiap 6 jam selama 48 jam. Pada setiap pengambilan sampel, pengadukan dihentikan selama 1 menit untuk mengendapkan bubuk ampas tebu.

Uji Aktifitas Enzim

Pada penelitian ini aktifitas enzim dilakukan berdasarkan aktivitas CMC_{Case} dalam satuan *Internasional Unit* (IU) dengan metode DNS (*Dinitrosalicylic acid*) diuji dengan metode CMC_{Case}. Pengujian aktifitas enzim dilakukan pada masing-masing perlakuan dimana uji dilakukan tiga kali pengulangan. Pengujian aktifitas ini dilakukan berdasarkan jumlah glukosa yang dihasilkan tiap perlakuan. Jumlah kadar glukosa yang dihasilkan dilihat berdasarkan parameter panjang gelombang yang diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm.

Pengukuran Kadar Glukosa

Analisis kadar glukosa dilakukan dengan metode DNS (*Dinitrosalicylic acid*) yaitu 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 air mendidih selama 5 menit agar terjadi reaksi antara glukosa dalam sampel dengan DNS. Tabung didinginkan hingga mencapai suhu ruang, selanjutnya absorbansi sampel diukur pada panjang gelombang 540 nm dengan *spektrofotometer UV-Vis*.

Pengolahan Data

Data hasil yang diperoleh tiap variabel, dibuat tabel dan grafik sehingga kondisi optimum yang didapatkan dari masing-masing variabel yang berpengaruh dapat diketahui. Perlakuan terbaik dipilih berdasarkan pada perlakuan yang menghasilkan glukosa tertinggi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik Ampas Tebu

Penelitian ini menggunakan ampas tebu yang digunakan sebagai substrat proses hidrolisis enzimatik. Ampas tebu memiliki karakteristik seperti panjang seratnya antara 1,7 sampai 2 mm dengan diameter sekitar 20 mikro. Menurut Husin (2007) *bagasse* mengandung air 48-52%, gula rata-rata 3,3 % dan serat rata-rata 47,7 %.

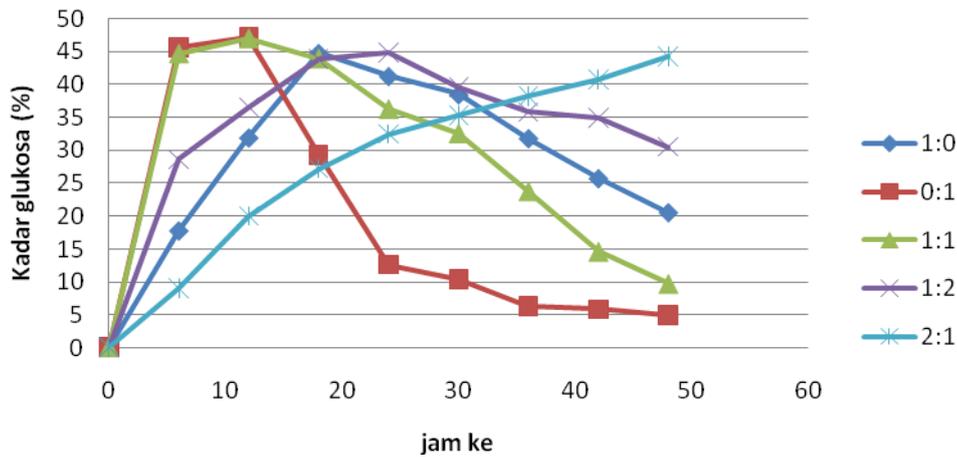
Pada penelitian Niken (2014), kandungan ampas tebu sebelum *pretreatment* dengan komponen hemiselulosa sebesar 20,97%, selulosa sebesar 53,75%, dan lignin sebesar 17,55%. sedangkan kandungan ampas tebu yang sudah *pretreatment* menghasilkan yaitu hemiselulosa sebesar 2,58%, selulosa sebesar 86,85%, dan lignin sebesar 5,47%. Bubuk ampas tebu yang diperoleh dari proses *pretreatment* tersebut digunakan sebagai substrat pada proses selanjutnya

yaitu proses hidrolisis enzimatik. Berdasarkan penelitian Rokhmah (2011) dengan adanya perlakuan awal atau proses *pretreatment*, kandungan lignin yang dapat menghambat proses hidrolisis enzimatik berkurang.

Pengukuran Glukosa

Pada proses hidrolisis ampas tebu dengan katalis enzim selulase akan menghasilkan gula reduksi dalam bentuk glukosa. Dalam penelitian ini dilakukan pengukuran glukosa hasil hidrolisis enzimatik ampas tebu dengan menggunakan metode DNS (*Dinitrosalicylic Acid*). Dalam suasana alkali, gula pereduksi akan mereduksi asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS) membentuk senyawa yang dapat diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540-550 nm (Apriyantono dkk., 1989).

Hasil pengukuran kadar glukosa pada masing-masing sampel yang dilakukan dengan menggunakan metode DNS (*Dinitrosalicylic Acid*). Grafik yang menggambarkan hasil pengukuran kadar glukosa pada berbagai perlakuan ditampilkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Kadar Glukosa Pada Berbagai Perlakuan

Pada Gambar 1 dapat dilihat bahwa hasil pengukuran kadar glukosa pada perbandingan 0 *Trichoderma reesei* : 1 *Aspergillus niger* ditunjukkan pada grafik yang berwarna merah terjadi peningkatan kadar glukosa yang tertinggi terjadi antara jam ke-6 menuju jam ke-12. Peningkatan ini terjadi karena aktivitas enzim pada mikrofungi *Aspergillus niger* mampu menghasilkan glukosidase tinggi. Hal ini didukung oleh penelitian Martins dkk (2008) yang menyatakan bahwa *Aspergillus niger* dapat menghasilkan β -glukosidase tinggi tetapi endo- β -1,4-glukanase dan ekso- β -1,4-glukanase rendah. Pada penelitian ini, kadar glukosa mengalami penurunan dari jam ke-12 menuju jam ke-48. Hal ini disebabkan oleh konsentrasi ampas tebu yang terlalu tinggi menyebabkan enzim selulase tidak mampu menghidrolisis ampas tebu tersebut, karena enzim telah jenuh dengan substrat ampas tebu *pretreatment*, dan konsentrasi substrat yang terlalu tinggi dapat menghambat aktivitas enzim. Kadar glukosa terbesar diperoleh pada jam ke-12 yaitu 47,21 % sedangkan nilai terendah didapat pada jam ke-48 yaitu 4,96 %.

Pada hasil pengukuran kadar glukosa dengan perlakuan perbandingan 2 *Trichoderma reesei* : 1 *Aspergillus niger* ditunjukkan pada grafik yang berwarna biru muda menunjukkan peningkatan kadar glukosa pada jam ke-6 menuju jam ke-48 jam. Hal ini disebabkan, semakin lamanya waktu hidrolisis, maka kadar glukosa yang dihasilkan semakin tinggi karena peningkatan aktivitas produksi enzim selulase oleh *Trichoderma reesei* semakin meningkat dengan semakin lama waktu hidrolisis. Pada perbandingan 2 *Trichoderma reesei* : 1 *Aspergillus*

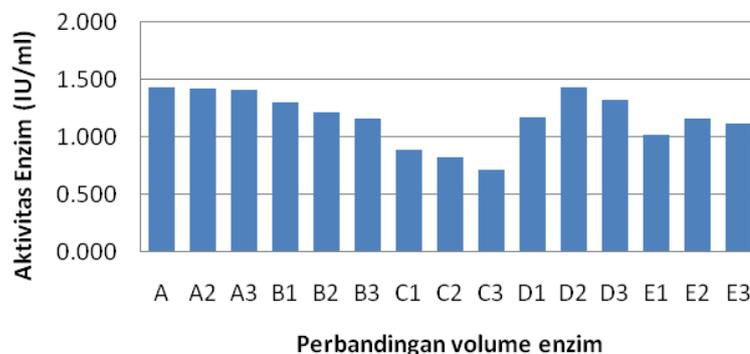
niger ini kadar glukosa dari awal jam ke-6 terendah sebesar 8,973 % sampai tertinggi pada jam ke- 48 sebesar 44,258%.

Menurut Kodri (2013), pada dasarnya mekanisme pemotongan rantai ikatan oleh enzim selulase sangat kompleks karena melibatkan sinergitas kerja 3 komponen besar yaitu endo-1,4- β -D-glukanase yang berfungsi memutuskan ikatan selulosa secara random dengan memulai serangan acak pada sisi internal daerah amorf dari serat selulosa sehingga sisi yang terbuka dapat diserang oleh *cellobiohydrolase*. Kemudian kerja dari ekso- β -1,4-glukanase yang memotong ujung-ujung rantai individu selulosa. ekso- β -1,4-glukanase atau disebut *cellobiohydrolase* menyerang bagian luar dari selulosa sehingga dihasilkan selobiosa sebagai struktur utamanya. Selanjutnya adalah kerja dari β -glukosidase yang berfungsi memotong selobiosa menjadi molekul-molekul glukosa. Glukosa dan selobiosa adalah inhibitor enzim dalam menghidrolisis selulosa. Selobiosa menghambat enzim sellobiohidrolase pada kompleks enzim selulase dan glukosa menghambat enzim penghidrolisis selobiosa. Selobiosa mempunyai potensi menjadi inhibitor yang lebih kuat dibandingkan dengan glukosa pada mekanisme hidrolisis selulosa (Marsden dan Gray, 1986 dalam Ambriyanto, 2010). Enzim selulase yang berasal dari gabungan mikrofungi *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger* memiliki kemampuan yang tinggi di dalam memecahkan ikatan pada struktur selulosa sehingga mampu menghasilkan glukosa yang lebih tinggi. Oleh karena itu, hidrolisis enzimatik limbah pertanian dapat memberikan nilai tambah (Kodri, 2013).

Aktivitas Enzim

Penelitian ini aktifitas enzim diuji dengan metode CMCCase. Pengujian aktivitas enzim dilakukan pada masing-masing perlakuan dimana uji dilakukan pada 5 perlakuan dengan 3 kali pengulangan. Pengujian aktivitas enzim ini dilakukan dengan pemberian substrat larutan CMC 1 % dan diinkubasi selama 10 menit lalu diukur kadar glukosa yang dihasilkan (Anwar dkk., 2010). Setelah itu, kadar glukosa yang dihasilkan diukur dengan menggunakan pereaksi *Dinitrosalicylic Acid* (DNS). Pereaksi ini umum digunakan untuk mengukur gula reduksi yang diproduksi oleh mikroba karena tingkat ketelitiannya yang tinggi sehingga bisa diaplikasikan pada gula dengan kadar kecil sekalipun. Menurut Apriyantono, dkk (1989), dalam suasana alkali gula pereduksi akan mereduksi asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS) membentuk senyawa yang dapat diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540–550 nm.

Hasil pengujian aktivitas enzim pada masing-masing perlakuan dengan menggunakan metode CMCCase menunjukkan adanya aktivitas enzim tertinggi dan terendah. Gambar 2 menunjukkan hasil pengukuran aktivitas enzim pada berbagai perlakuan.



Grafik 2. Grafik Hasil Pengujian Aktivitas Enzim

Pada Gambar 2, dilihat bahwa pada perlakuan A dengan perbandingan (1 *Trichoderma reesei* : 0 *Aspergillus niger*) pada pengulangan pertama yaitu 1,436 IU/ml, pengulangan kedua yaitu 1,422 IU/ml dan pengulangan ketiga yaitu 1,409 IU/ml. Pada perlakuan B dengan perbandingan (0 *Trichoderma reesei* : 1 *Aspergillus niger*) pada pengulangan pertama yaitu 1,303 IU/ml, pengulangan kedua yaitu 1,219 IU/ml dan pengulangan ketiga yaitu 1,166 IU/ml. Pada perlakuan C dengan perbandingan (1 *Trichoderma reesei* : 1 *Aspergillus niger*) pada pengulangan pertama 0,887 IU/ml, pengulangan kedua yaitu 0,829 IU/ml, dan pengulangan ketiga 0,717 IU/ml. Pada perlakuan D dengan perbandingan (1 *Trichoderma reesei* : 2 *Aspergillus niger*) pada pengulangan pertama yaitu 1,169 IU/ml, pengulangan kedua yaitu 1,439 IU/ml dan pengulangan ketiga 1,328 IU/ml. Pada perlakuan E dengan perbandingan (2 *Trichoderma reesei* : 1 *Aspergillus niger*) pada pengulangan pertama yaitu 1,027 IU/ml, pengulangan kedua yaitu 1,163 IU/ml, dan pengulangan ketiga yaitu 1,122 IU/ml. Pada 5 perlakuan dengan dilakukan 3 kali pengulangan hasil uji aktivitas enzim berbeda pada setiap perlakuan dan setiap pengulangan. Hal ini dikarenakan tidak diketahui jumlah kepadatan kapang pada setiap pengulangan, hal ini sama dengan pada penelitian yang dilakukan Wahyuningtyas (2012) mengenai hidrolisis enzimatis dengan substrat jerami padi yang menyatakan bahwa karena jumlah kapang yang disuspensikan dalam media adalah sebanyak satu ose dan tidak diketahui kepadatan kapangnya, sehingga menghasilkan aktivitas enzim yang berbeda jauh pada setiap pengulangannya. Sedangkan pada penelitian tahap produksi enzim selulase ini yang disuspensikan dalam media adalah 2% dari larutan media.

KESIMPULAN

Enzim selulase yang dihasilkan oleh mikrofungi *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger* dapat dimanfaatkan sebagai katalis dalam proses hidrolisis enzimatis ampas tebu pada proses produksi bioetanol dimana produk akhir yang dihasilkan berupa glukosa. Perbandingan volume enzim selulase dari mikrofungi *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger* berpengaruh terhadap nilai/value aktifitas enzim selulase yang dihasilkan. Dimana aktifitas enzim selulase sangat berpengaruh terhadap proses hidrolisis sehingga berpengaruh pula terhadap kadar glukosa yang dihasilkan. Hasil tertinggi dicapai pada hidrolisis dalam penelitian ini yang berlangsung selama 12 jam dengan perolehan glukosa sebesar 47,213 % dengan kombinasi perbandingan volume enzim selulase yaitu 0 *Trichoderma reesei* : 1 *Aspergillus niger*.

DAFTAR PUSTAKA

- Anwar, N., Widjaja, A., Winardi, S., 2010, Peningkatan Unjuk Kerja Hidrolisis Enzimatis Jerami Padi Menggunakan Campuran Selulase Kasar dari *Trichoderma Ressei* dan *Aspergillus niger*, *Makara Sains*, vol.14, No.2 : 113-116
- Apriyatono, A., Dedi, F., Ni Luh P, S., Slamet, B., 1989, *Petunjuk Laboratorium Analisa Pangan*. Institut Pertanian Bogor. Bogor
- El-zaher Abd, Fatma., M Fadel, 2010, *Production of Bioethanol Via Enzymatic Saccharification of Rice straw by Cellulase Produced by Trichoderma reesei Under Solid State Fermentation*, New York Science Journal
- Husin, 2007, *Analisis Serat Bagas*, <http://www.free.vlsm.org>., Diakses tanggal 6 Juli 2013.
- Kodri, 2013, *Pemanfaatan Enzim Selulase Dari Trichoderma Ressei Dan Aspergillus Niger Sebagai Katalisator Hidrolisis Enzimatis Jerami Padi Dengan Pretreatment Microwave*, Skripsi, Jurusan Keteknik Pertanian, Universitas Brawijaya : Malang
- Licht, F.O, 2009, *World ethanol production growth to hit five-year low*. *World Ethanol and Biofuels Rep.*, 7(18): 365.

- Martins, L.F., D. Kolling, M. Camassola, A.J.P. Dillon, L.P. Ramos, 2008, Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* Cellulases in Relation to Their Activity Against Various Cellulosic Substrates, *Bioresource Technology*, 99, 1417–1424.
- Marsden W.L and Gray P.P., 1986, Enzymatic Hydrolysis of Cellulase in Lignocellulosic Material, *CRC, Critical Review in Biotechnology*, 3: 235–267.
- Niken, 2014, *Pemanfaatan Microwave Dalam Proses Pretreatment Degradasi Lignin Ampas Tebu (Bagasse) (pada produksi bioetanol)*. Skripsi. Jurusan Keteknikaan Pertanian, Universitas Brawijaya : Malang
- Sun, Y. dan J. Cheng, 2002, Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. *Bioresour. Technol.* 83:1–11.
- Wahyuningtyas, P, 2012, *Studi Pembuatan Enzim Selulase dari mikrofungi Trichoderma reesei dengan Substrat Jerami Padi sebagai katalis Hidrolisis Enzimatik Pada Produksi Bioetanol*. Skripsi. Jurusan Keteknikaan Pertanian Universitas Brawijaya. Malang