

Studi Pembuatan Enzim Selulase Dari Mikrofungi *Trichoderma reesei* Dengan Substrat Jerami Padi Sebagai Katalis Hidrolisis Enzimatis Pada Produksi Bioetanol

Study of Enzyme Cellulase Production from Trichoderma reesei with Rice Straw Substrate for Enzymatic Hydrolysis Catalyst in Bioethanol Production

Puspita Wahyuningtyas, Bambang Dwi Argo*, Wahyunanto Agung Nugroho
Jurusan Keteknik Pertanian - Fakultas Teknologi Pertanian - Universitas Brawijaya
Jl. Veteran, Malang 65145

*Penulis Korespondensi, E-mail : dwiargo@ub.ac.id

ABSTRAK

Pengaruh kondisi inkubasi terhadap produksi enzim selulase merupakan tujuan penelitian ini. Enzim selulase merupakan enzim yang berperan dalam degradasi tumbuhan materi selulosa menjadi gula sederhana. Tahapan pembuatan enzim selulase ini meliputi pemilihan dan pengembangbiakan mikroba selulolitik, *pretreatment* fisik pada jerami padi hingga didapatkan bubuk jerami padi, proses inkubasi, serta pemanenan enzim dengan sistem sentrifugasi. Mikroba selulolitik yang digunakan adalah mikrofungi *Trichoderma reesei*, sedangkan substrat bubuk jerami padi varietas Ciherang yang telah lolos ayakan 100 mesh. Inkubasi dilakukan pada 27 °C, 30 °C, dan 35 °C dalam waktu 4,6, dan 8 hari dengan pH larutan nutrisi 4,5,6. Aktivitas enzim diuji dengan metode CMC_{Case} menggunakan reagen *Dinitrosalicylic Acid* (DNS), sedangkan kadar protein menggunakan metode Biuret. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kondisi optimal pertumbuhan enzim selulase diperoleh pada suhu 35 °C, waktu inkubasi 8 hari, pH larutan nutrisi 6 dengan aktivitas enzim mencapai 1,0313 IU/mL dan kadar protein 393,178 µg/mL.

Kata kunci : Selulase, *Trichoderma reesei*, Rice straw

ABSTRACT

The purpose of this research is to produce cellulase enzyme which used to catalyst of hidrolisis enzymatic process in rice straw's bioethanol production. Cellulase is a kind of enzyme used to degrade cellulose material into simpler sugar. There are many step to produce cellulase, first step is microbe election dan breeding, make nutrition solution, incubation process, and harvesting with centrifugation system. Cellulotic microbe that used is *Trichoderma reesei* and rice straw from Ciherang's variety which pore 100 mesh as substrate. Incubation process done at 27 °C, 30 °C, and 35 °C on 4,6 and 8 days with 4,5,6 nutrition solution pH. Enzyme activity and proteint content as the parameter that used to show the level of enzyme effectivity. Enzyme activity determined by CMC_{Case} method used Dinitrosalicylic Acid reagent and Biuret method used to determined proteint content. The result of the research show that optimal condition for cellulase production by *Trichoderma reesei* and rice straw's substrate at temperature 35 °C, nutrition solution pH is 6, and 8 days incubation time. Enzyme activity were 1.0313 IU/mL and 393.178 µg/mL for proteint content.

Key words : Cellulase, *Trichoderma reesei*, Rice straw

PENDAHULUAN

Jerami padi merupakan limbah pertanian terbesar di Indonesia, produksinya mencapai 12-15 ton/ha/panen bervariasi tergantung pada lokasi dan varietas padi yang ditanam (BPS, 2006). Sejauh ini pemanfaatan jerami padi sebagai pakan ternak baru mencapai 31-39%, untuk keperluan industri sekitar 7-16%, sedangkan sisanya digunakan sebagai pupuk atau dibakar. Jerami padi mengandung lignin, selulosa, dan hemiselulosa. Berdasarkan uji kandungan kimia dengan metode *Chesson*, jerami padi varietas Ciherang mengandung 22,97% hemiselulosa; 30,73% selulosa; 8,85% lignin. Selulosa yang ada di dalam jerami padi dapat digunakan sebagai bahan baku bioetanol, namun memerlukan tahapan khusus dalam proses konversinya. Tahapan tersebut antara lain *pretreatment* fisik, delignifikasi, hidrolisis, fermentasi, dan purifikasi (Rachmania dan Lazuardi, 2009).

Hidrolisis merupakan salah satu tahapan penting dalam proses biokonversi jerami padi menjadi bioetanol dimana pada proses ini terjadi degradasi selulosa menjadi gula yang lebih sederhana baik berupa selobiosa maupun glukosa dengan bantuan katalis (Fox, 1991). Hidrolisis dapat dilakukan secara kimia (asam) atau enzimatik. Hidrolisis enzimatik menggunakan enzim selulase sebagai katalisnya, katalis enzim menjanjikan proses yang lebih ramah lingkungan, kondisi operasi yang lebih lunak (suhu rendah, pH netral) serta berpotensi memberikan hasil yang lebih tinggi jika dibandingkan katalis asam (Tahezadeh dan Karimi, 2007).

Enzim selulase dapat diproduksi dari mikroba selulolitik baik kapang maupun bakteri, kapang selulolitik yang biasa digunakan dari jenis *Trichoderma*, *Aspergillus*, dan *Penicillium*. Sedangkan bakteri yang bisa menghasilkan selulase adalah *Pseudomonas*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Cellovibrio*, dan *Sporosphytophaga*. Diantara semua jenis kapang selulolitik, *Trichoderma reesei* adalah kapang yang paling banyak diteliti karena mampu mensekresikan selulase sekitar 80% (Lynd *et al.*, 2002).

Produksi enzim memerlukan substrat yang biasanya berasal dari bahan berpati maupun bahan berselulosa. Pada penelitian ini substrat yang digunakan adalah bubuk jerami padi yang telah lolos ayakan 100 mesh. Pemilihan substrat ini didasarkan pada potensi kandungan kimia jerami padi serta aplikasi enzim ini nantinya yaitu sebagai katalis hidrolisis pada produksi bioetanol jerami padi.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan antara lain: *diskmill*, oven, ayakan 100 mesh, timbangan digital, inkubator, *sentrifuge*, kertas saring, *vortex*, spektrofotometer tipe 20 D, pipet ukur, gelas ukur, tabung reaksi, *erlenmeyer*, *magnetic stirrer*. Bahan utama yang digunakan pada penelitian ini antara lain biakan *Trichoderma reesei* yang berasal dari Dinas Pertanian Magelang, jerami padi varietas Ciherang yang diperoleh dari area persawahan di Kabupaten Kediri, Potato Dextrose Agar (PDA), larutan nutrisi atau media pertumbuhan mikroba (aquades, ekstrak ragi, *Bacteriological peptone*, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 ; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; dan Laturan CMC (*Carboxy Methyl Cellulose*) 1%), reagen *Dinitrosalicylic Acid* (DNS), reagen Biuret, *Trichloroacetic Acid* (TCA), dan *Petroleum Ether* (PE).

Metode Penelitian

Pengembangbiakan Mikroba

Pengembangbiakan mikroba dilakukan pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA) miring secara zig – zag dengan bantuan kawat ose dan api bunsen (secara aseptik) di dalam ruangan steril. Biakan mikrofungi diinkubasi pada suhu $\pm 27^\circ\text{C}$ di dalam lemari aseptik selama 7 hari kemudian hasil biakan mikroba disimpan dalam lemari pendingin.

Penyiapan Larutan Nutrisi

Larutan nutrisi atau media cair merupakan larutan yang berfungsi untuk menyediakan unsur – unsur yang diperlukan untuk pertumbuhan mikroba. Larutan nutrisi dibuat dengan mencampurkan 1 L larutan buffer sitrat dengan 1,0 g ekstrak ragi (*yeast extract*); 1,5 g *bacteriological peptone*; 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 (*Carboxy Methyl Cellulose*) 1% (Anwar dkk, 2010). Larutan nutrisi kemudian diaduk menggunakan *magnetic stirer* hingga homogen.

Produksi Enzim Selulase

Produksi enzim selulase dimulai dengan mencampurkan 5 gram bubuk jerami dengan 25 mL larutan nutrisi ke dalam erlenmeyer 250 mL kemudian ditutup dengan kapas steril dan dilapisi aluminium foil, kertas, dan diikat dengan benang. Campuran substrat dan media kemudian disterilkan menggunakan *autoclave* pada temperatur 121 °C selama 15 menit. Media kemudian didinginkan hingga suhu ruang sebelum proses inokulasi mikroba secara aseptik dilakukan. Spora yang tumbuh di dalam satu tabung reaksi disuspensikan kedalam 1mL larutan 0,1% *tween 80* kemudian diinokulasikan secara aseptik ke dalam media. Hasil dari proses tersebut kemudian diinkubasi selama 4,6, dan 8 hari pada suhu 27 °C, 30 °C dan 35 °C dengan variasi pH pada media cair sebesar 4,5, dan 6.

Pemanenan Enzim

Enzim dipanen dengan sistem sentrifugasi menggunakan *sentrifuge*. Enzim di dalam erlenmeyer terlebih dahulu dicampur dengan 100 mL larutan 1% *tween 80*. Sentrifugasi dilakukan selama 30 menit dengan kecepatan 4000 rpm. Cairan enzim (*supernatan*) yang dihasilkan kemudian disaring dengan kertas saring agar terpisah dengan residu padatan.

Pengujian Aktivitas Enzim

Aktivitas enzim diuji menggunakan metode CMCase dalam satuan *International Unit* (IU) dengan reagen *Dinitrosalicylic Acid* (DNS) (Miller, 1959). Menurut Apriyanto, dkk (1989), dalam suasana alkali gula pereduksi akan mereduksi asam 3,5 – dinitrosalisilat membentuk senyawa yang dapat diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540-550 nm. Metode CMCase dalam pengujian aktivitas enzim mendefinisikan satu *International Unit* (IU) sebagai 1 μmol glukosa yang dihasilkan dari degradasi substrat CMC tiap menit dalam waktu inkubasi 10 menit dengan suhu 35 °C. Jumlah glukosa yang dihasilkan dilihat melalui indikator spektrum warna menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 550 nm. Larutan glukosa 0; 0,5; 1; 1,5; 2,0 μM digunakan untuk membuat kurva standard pada perhitungan jumlah glukosa yang dihasilkan. Konversi kadar glukosa ke dalam unit aktivitas (IU) menggunakan rumus (Ghose, 1987) :

$$IU = \frac{\mu\text{M glukosa}}{\text{mL} * \text{waktu}}$$

Pengujian Kadar Protein

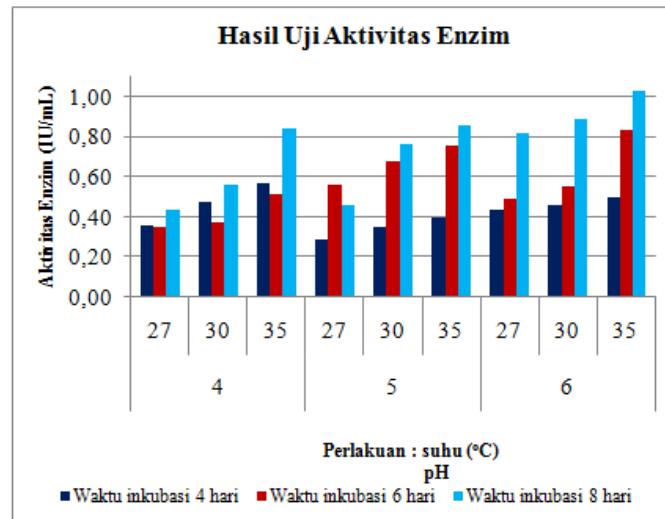
Analisa kandungan protein dilakukan dengan metode Biuret, metode ini memanfaatkan reaksi antara logam Cu^{2+} dengan ikatan peptida pada protein. Kadar protein dihitung dalam satuan $\mu\text{g/mL}$ enzim. Kadar protein diukur berdasarkan indikator spektrum warna menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 520 nm. Kurva standard dibuat menggunakan Larutan *Bovine Serume Albumin* (BSA) 0; 100; 200; 300; 400; dan 500 $\mu\text{g/mL}$.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Perlakuan awal (*pretreatment*) fisik pada jerami padi sebelum akhirnya didapatkan bubuk jerami padi ukuran 100 mesh bertujuan agar kadar air dalam jerami berkurang (hingga kisaran 4%) sehingga jerami awet disimpan serta memudahkan *treatment* selanjutnya yaitu degradasi selulosa ke dalam monomer gula penyusunnya.

Enzim selulase yang dihasilkan pada penelitian ini berupa cairan berwarna coklat pekat dan berbau sangat menyengat yang menyerupai cairan di dalam rumen sapi. Sarma (2005) mengemukakan bahwa mikroba di dalam rumen sapi mensekresikan enzim – enzim pencernaan ke dalam cairan rumen untuk membantu degradasi partikel makanan. Enzim – enzim tersebut adalah enzim selulase, xilanase, amilase, pektinase, lipase, dan protease.

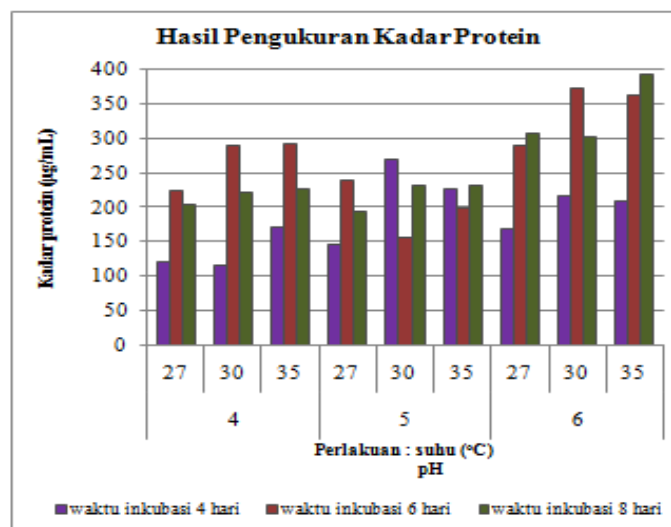
Aktivitas enzim yang merupakan indikator efektivitas kerja enzim yang diuji menggunakan metode CMCase. Hasil uji aktivitas menunjukkan nilai yang fluktuatif antar tiap perlakuan suhu, pH, dan waktu inkubasi. Hasil pengujian aktivitas enzim pada berbagai perlakuan dapat dilihat pada Gambar 1 berikut.



Gambar 1. Hasil Uji Aktivitas Enzim pada Berbagai Kombinasi Perlakuan

Aktivitas enzim yang dihasilkan berada pada kisaran 0,3464 – 1,0313 IU/mL, aktivitas terbesar diperoleh pada perlakuan suhu 35 °C, pH 6, dan waktu inkubasi 8 hari yaitu sebesar 1,0313 IU/mL.

Kadar protein yang merupakan indikator jumlah mikroba yang terkandung di dalam enzim. Uji kadar protein menggunakan metode Biuret. Hasil pengukuran kadar protein pada masing – masing kombinasi perlakuan tersaji pada Gambar 2.



Gambar 2. Hasil Pengukuran Kadar Protein pada Berbagai Kombinasi Perlakuan

Kadar protein tertinggi diperoleh pada perlakuan suhu 35 °C, pH 6, dan waktu inkubasi 8 hari yaitu sebesar 393,178 µg/mL.

Hasil *Analysis of Variance* (ANOVA) menggunakan software Minitab.15 dengan menetapkan standar (α) sebesar 5 % maka didapatkan adanya pengaruh nyata antar perlakuan pH larutan nutrisi dan waktu inkubasi terhadap aktivitas enzim dan kadar protein yang dihasilkan. Sedangkan untuk perlakuan suhu, memberi pengaruh nyata terhadap aktivitas enzim namun tidak memberi pengaruh nyata pada kadar protein yang dihasilkan.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa produksi enzim selulase dari mikrofungi *Trichoderma reesei* dengan substrat bubuk jerami padi terdiri dari beberapa tahapan diantaranya *pretreatment* fisik pada jerami padi hingga diperoleh bubuk jerami lolos ayakan 100 mesh, pemilihan dan pengembangbiakan *Trichoderma reesei*, proses inkubasi, serta pemanenan enzim dengan sistem sentrifugasi. Kondisi optimal produksi enzim selulase diperoleh pada perlakuan suhu 35 °C, pH 6, dan waktu inkubasi 8 hari. Aktivitas enzim pada perlakuan ini sebesar 1,0313 IU/mL dengan kadar protein sebesar 393,178 µg/mL.

DAFTAR PUSTAKA

- Anwar, N., Arief W., dan Sugeng W. 2010. *Optimasi Produksi Enzim Selulase untuk Hidrolisis Jerami Padi*. Diakses pada tanggal 12 Agustus 2011 (www.digilib.its.ac.id/public/ITS-Research-11652-195209161980031002-Paper4.pdf)
- Apriyanto, A., Dedi F., Ni Luh P, Sedarnawati, Slamet Budiyo. 1989. *Petunjuk Laboratorium Analisa Pangan*. Institut Pertanian Bogor : Bogor
- Fox, P.F. 1991. *Food Enzymology*, vol 1, Elsevier Applied Science Ltd., New York
- Ghose, T.K. 1987. *Measurement of Cellulase Activities*. Biochemical Engineering Research Center : New Delhi – India
- Lynd, L.R., Weimer P.J., Van Zyl W.H., and Pretorius IS. 2002. *Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology*. Microbiol. Mol.Biol. Rev., 66: 506-577.
- Miller, G L. *Use Of Dinitrosalicylic Acid Reagent For Determination Of Reducing Sugar*. Anal Chem.1959;31:426–428.
- Rachmania, F. dan Lazuardi.2009. *Pengaruh Liquid Hot Water terhadap Perubahan Struktur Sel Bagas*. Jurusan Teknik Kimia Fakultas Teknolohi Industri, Institut Teknologi Sepuluh Nopember.
- Sarma. 2005. *Identifikasi Enzim Pencernaan pada Rumen Domba*. Institut Pertanian Bogor : Bogor.
- Taherzadeh, M.J. dan Karimi, K. *Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review*, 2007, BioResources, Vol. 2, pp. 707-738.