

Hidrolisis Ampas Tebu Secara Enzimatis Menggunakan *Trichoderma reesei*

Novi Lestu L Binoto, Saul Rolan, Diyono Ikhsan

Jurusan Teknik Kimia Fakultas Teknik UNDIP Semarang
Jl. Prof. Sudarto, SH Kampus Tembalang Semarang 50236

Abstract

Bagasse (bagas) is cellulose biomass which more difficult to degradation and covered material than the other material, like starch. Enzymatic hydrolysis is the most promising technology to convert biomass to sugar. The objective of this study was to investigate by laboratories how far bagasse can produce the monomer sugar and to know the optimum operation condition process of the hydrolysis of bagasse using Trichoderma reesei. Dependent variable in this research are pretreatment temperature 110°C, pretreatment time 40 minutes, pressure 1 atm, hydrolysis temperature 50°C, and bagasse 5 gr. Independent variable in this research are pH 4 and 5, enzyme-substrate ratio 1:1 and 1:1,75 which analyzed yield of glucose every 6 hr in 48 hr. Time of hydrolysis is the most influence variable. The best result achieved at 36 hr time with a hydrolysis yield of 30.4%. Hydrolysis yield equation model is $y = -0,005x^2 + 1,047x - 2,228$.

Keyword: Bagasse, biomass, Trichoderma reesei, pretreatment, enzymatic hydrolysis.

Abstrak

Ampas tebu (bagas) adalah biomassa berselulosa yang merupakan material yang lebih sulit didegradasi dan dikonversi dibandingkan material berdasar pati. Hidrolisa enzimatis merupakan teknologi yang sangat menjanjikan guna mengkonversi biomassa menjadi gula. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji secara laboratoris sampai sejauh mana ampas tebu dapat menghasilkan monomer gula dan untuk mengetahui kondisi operasi optimum proses hidrolisa ampas tebu menggunakan Trichoderma reesei. Variabel tetap dalam penelitian ini adalah suhu pretreatment 110°C, waktu pretreatment 40 menit, tekanan 1 atm, suhu hidrolisa 50°C, ampas tebu 5 gram. Parameter-parameter yang diteliti meliputi: rasio enzim-substrat pada kisaran 1:1 sampai 1:1,75, pH reaksi pada kisaran 4 sampai 5 dan waktu reaksi yang diamati perubahan kadar glukosanya selama setiap 6 jam selama 48 jam. Dari penelitian diperoleh hasil bahwa variabel yang paling berpengaruh adalah waktu hidrolisa sebab dari analisa terhadap variabel menunjukkan bahwa variabel waktu mempunyai nilai yang paling besar. Hasil terbaik dicapai pada hidrolisis yang berlangsung selama 36 jam dengan perolehan glukosa sebesar 30,4 %. Model persamaan kadar glukosa yang didapat terhadap waktu adalah $y = -0,005x^2 + 1,047x - 2,228$.

Kata kunci: Ampas tebu, biomassa, Trichoderma reesei, pretreatment, hidrolisa enzimatis

I. PENDAHULUAN

Indonesia memiliki potensi limbah biomassa / limbah pertanian yang sangat melimpah seperti ampas tebu (bagas). Berdasarkan data dari Pusat Penelitian Perkebunan Gula Indonesia (P3GI) ampas tebu yang dihasilkan sebanyak 32% dari berat tebu giling. Sebanyak

60% dari ampas tebu tersebut dimanfaatkan oleh pabrik gula sebagai bahan bakar, bahan baku untuk kertas, industri jamur, bahan baku industri kanvas rem dan lain-lain. Oleh karena itu, diperkirakan sebanyak 40% dari ampas tebu tersebut belum dimanfaatkan.

Bagas (limbah padat tebu) sebagian besar mengandung *ligno-cellulose*. Bagas mengandung air 48 – 52%, gula rata-rata 3,3%, dan serat rata-rata 47,7%. Serat bagas tidak dapat larut dalam air dan sebagian besar terdiri dari selulosa, pentosan dan lignin.

Biomassa berselulosa memiliki struktur yang kompleks. Oleh sebab itu, biomassa berselulosa merupakan material yang lebih sulit didegradasi dan dikonversi dibandingkan material berbasah dasar dari starch. Namun demikian, hidrolisis biomassa berselulosa relatif prospektif, karena juga menghasilkan monomer-monomer gula.

Hidrolisis meliputi proses pemecahan polisakarida di dalam biomassa lignoselulosa, yaitu: selulosa dan hemiselulosa menjadi monomer gula penyusunnya. Hidrolisis sempurna selulosa menghasilkan glukosa, sedangkan hemiselulosa menghasilkan beberapa monomer gula pentose (C₅) dan heksosa (C₆). Hidrolisis dapat dilakukan secara kimia (asam) atau enzimatik

Aplikasi hidrolisis menggunakan enzim secara sederhana dilakukan dengan mengganti tahap hidrolisis asam dengan tahap hidrolisis enzim selulosa. *Trichoderma reesei* adalah fungi yang menghasilkan enzim selulase dan dapat menghidrolisis selulosa (Hamelinck, Hooijdonk, & Faaij, 2005). Hidrolisis enzimatik memiliki beberapa keuntungan dibandingkan hidrolisis asam, antara lain: tidak terjadi degradasi gula hasil hidrolisis, kondisi proses yang lebih lunak (suhu rendah, pH netral), berpotensi memberikan hasil yang tinggi, dan biaya pemeliharaan peralatan relatif rendah karena tidak ada bahan yang korosif (Taherzadeh & Karimi, 2007) (Hamelinck, Hooijdonk, & Faaij, 2005). Proses enzimatik merupakan proses ramah lingkungan berbasah baku terbarukan (renewable raw material). Oleh karena itu, hidrolisis limbah pertanian dapat memberikan nilai tambah bagi petani karena prosesnya ekonomis. Saat ini, hidrolisa enzimatik merupakan teknologi yang sangat menjanjikan guna mengkonversi biomassa menjadi gula.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengadakan kajian secara laboratoris sampai sejauh mana ampas tebu dapat menghasilkan monomer gula dan untuk mengetahui kondisi operasi optimum proses hidrolisa ampas tebu menggunakan *Trichoderma reesei*.

II. METODOLOGI

Untuk menghidrolisa ampas tebu dengan menggunakan *Trichoderma reesei* dilakukan beberapa tahapan sebagai berikut:

1. Penyiapan bahan baku

Bahan baku berupa ampas tebu diperoleh dari penjual minuman sari tebu disekitar Semarang. Sebelum digunakan ampas tebu dijemur hingga kering, setelah itu ampas tebu dicacah menjadi ukuran yang lebih kecil. *Trichoderma reesei* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi MIPA UNDIP.

2. Pretreatment

5 gr ampas tebu (bagas) dihaluskan kemudian direndam dalam 2 ml larutan asam sulfat 98% yang diencerkan sampai 100 ml selama satu malam dengan konsentrasi. Slurry hasil perendaman kemudian dimasukkan kedalam labu leher tiga dan dipanaskan hingga 110°C selama 40 menit.

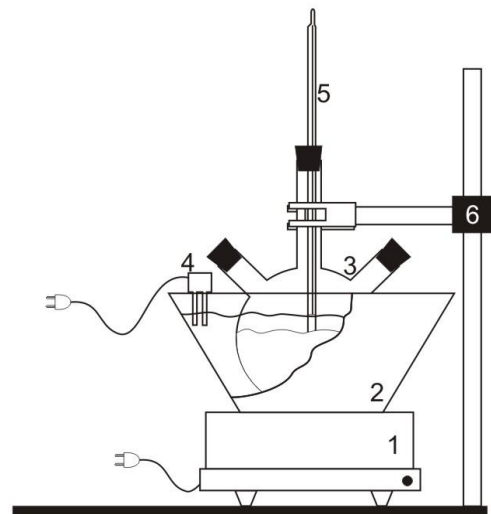
3. Hidrolisa

Slurry hasil pretreatment dihidrolisa, dengan rasio enzim substrat, pH sesuai variabel percobaan. Larutan dipreinkubasi pada suhu 50°C di dalam air menggunakan magnetic Stirer. Enzim ditambahkan untuk memulai reaksi hidrolisis segera setelah proses aklimatisasi. Sampel diambil untuk analisa kadar glukosanya setiap 6 jam selama waktu sesuai variabel pecobaan.

Gambar alat

Keterangan :

1. Magnetic Stirer
2. Water Bath
3. Labu Leher Tiga
4. Pemanas
5. Termometer
6. Statif



Gambar 3.1 Rangkaian Alat Penelitian

4. Analisa hasil kadar glukosa

- a. Sampel hidrolisa yang sudah dingin disaring dan diambil 5 mL.
- b. Kemudian diencerkan sampai 100 mL dan di netralkan dengan NaOH.
- c. Larutan netral diambil 25 mL dan dicampur dengan 5 mL fehling A dan 5 mL fehling B.
- d. Campur kemudian dididihkan 2 menit , kemudian dititrasi dengan larutan glukosa standar sampai warna biru hampir hilang.
- e. Menambah 1-3 tetes indikator metylen blue.
- f. Melanjutkan titrasi sampai warna biru berubah menjadi merah bata.

$$\text{Kadar glukosa} = \frac{(F - M) \times 0,002 \times (v \text{ total} / 5) \times 100 / 5}{w}$$

F : Larutan glukosa standar yang digunakan untuk menitrasi larutan fehling A dan fehling B.

M : Larutan glukosa standar untuk menitrasi 5 ml hasil hidrolisa.

w : Berat sampel yang dihidrolisa.

v : Volume larutan suspensi yang dihidrolisa

Pada penelitian digunakan variabel berubah rasio enzim-substrat, pH dan waktu hidrolisa.

Adapun rancangan percobaan disajikan pada tabel berikut ini :

Tabel 1. Rancangan percobaan

Run	pH	Rasio Enzim:Substrat	Waktu (Jam)
1	4 (-)	1 : 1.75 (-)	24 (-)
3	5 (+)	1 : 1.75 (-)	24 (-)
2	4 (-)	1 : 1 (+)	24 (-)
4	5 (+)	1 : 1 (+)	24 (-)
1	4 (-)	1 : 1.75 (-)	48 (+)
3	5 (+)	1 : 1.75 (-)	48 (+)
2	4 (-)	1 : 1 (+)	48 (+)
4	5 (+)	1 : 1 (+)	48 (+)

Variabel-variabel tetap dalam reaksi hidrolisa selulosa secara enzimatis pada percobaan pertama adalah:

- Konsentrasi larutan sulfat : 98%
- Suhu pretreatment : 110⁰C
- Waktu pretreatment : 40 menit
- Tekanan : 1 atm
- Bahan : ampas tebu (5 gram)
- Suhu hidrolisa : 50⁰C

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Penelitian Awal

Studi experimental design dilakukan untuk mengetahui variabel yang paling berpengaruh pada proses hidrolisa selulosa menjadi glukosa secara enzimatik. Penentuan variabel berpengaruh dilakukan dengan melakukan tempuhan berdasar rancangan percobaan sesuai metode *factorial design*. Tahap awal penggunaan metoda factorial design adalah menetapkan variabel bebas serta tetapan pada percobaan. Variabel bebas pada penelitian ini berdasarkan pada batas atas dan bawah.

Tabel 2. Kadar Glukosa (%) Hasil Percobaan

Run	pH	Rasio	Waktu (Jam)	Kadar glukosa (%)
1	4 (-)	1 : 1 (-)	24 (-)	11,2
2	5 (+)	1 : 1 (-)	24 (-)	17,6
3	4 (-)	1 : 1,75 (+)	24 (-)	12,8
4	5 (+)	1 : 1,75 (+)	24 (-)	19,2
5	4 (-)	1 : 1 (-)	48 (+)	28,8
6	5 (+)	1 : 1 (-)	48 (+)	32,8
7	4 (-)	1 : 1,75 (+)	48 (+)	32
8	5 (+)	1 : 1,75 (+)	48 (+)	35,2

Data hasil percobaan berupa kadar glukosa (%) untuk masing-masing tempuhan tersaji pada tabel diatas analisa normal probability plot dilakukan, setelah perhitungan main efek dan perhitungan interaksi. Respon yang diperoleh dari perhitungan tersebut dianalisa nilai yang paling signifikan dan merupakan variabel yang paling berpengaruh terhadap percobaan.

Tabel 3. Hasil Analisa Respon Terhadap Variabel

Variabel	Efek
A	5
B	2,2
C	17
AB	-0,2
AC	-1,4
BC	0,6
ABC	-0,2

A: adalah variabel pH; B: variabel rasio enzim-substrat; dan C: variabel waktu. Tabel diatas hasil analisa respon terhadap variabel menunjukkan bahwa variabel C mempunyai nilai

yang paling signifikan sebesar 17. Oleh karenanya dapat diambil suatu kesimpulan bahwa variabel C (waktu) merupakan faktor yang paling berpengaruh dalam percobaan ini.

3.2 Hasil Dan Pembahasan

Berikut adalah hasil kadar glukosa dalam berbagai variasi pH, waktu, rasio enzim-substrat.

Tabel 4.3 Hasil Analisa Pada Berbagai Variasi Variabel

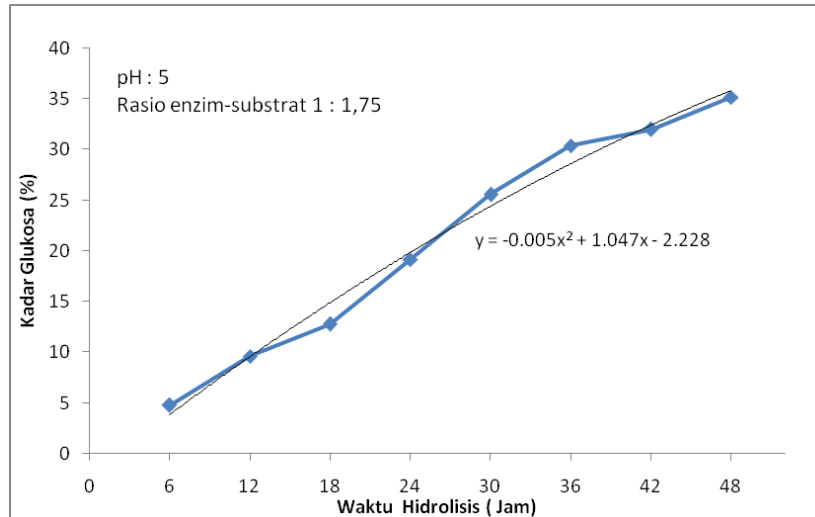
Run	pH	Rasio	Waktu (Jam)	Kadar glukosa (%)
1	4	1 : 1	6	1,6
2	5	1 : 1	30	22,4
3	4	1 : 1,75	24	12,8
4	5	1 : 1,75	18	32
5	5	1 : 1,75	48	35,2
6	4,2	1 : 1,3	36	44,8
7	4,4	1 : 1,75	36	49,6
8	4,6	1 : 1,75	36	46,4
9	4,8	1 : 1,75	36	42,4
10	4,2	1 : 1,1	36	33,6
11	4,2	1 : 1,4	36	51,2
12	4,2	1 : 1,6	36	48

3.3 Pengaruh Variabel Waktu Hidrolisis

Penelitian dilakukan pada berbagai variabel waktu dengan mengkondisikan pada pH 5 dan rasio enzim-substrat di atas 1 : 1,75. Hasil hidrolisis dianalisa pada interval waktu 6 jam (Gambar 4.1). Gambar 4.1 menunjukkan bahwa dengan semakin lamanya waktu hidrolisis, maka kadar glukosa yang dihasilkan semakin tinggi. Hal ini disebabkan peningkatan aktivitas produksi enzim selulase oleh *T. reesei* dengan semakin lama waktu hidrolisis (Xiong H, 2004).

Tabel 4. Hasil Analisa Kadar Glukosa Pada Berbagai Variasi Waktu

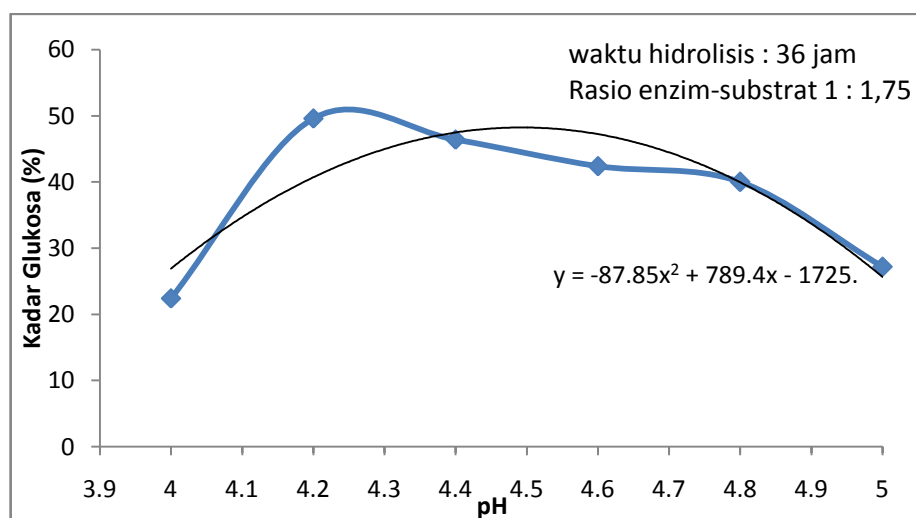
Waktu(Jam)	Kadar Glukosa (%)
0	0
6	4,8
12	9,6
18	12,8
24	19,2
30	25,6
36	30,4
42	32
48	35,2



Gambar 4.1. Grafik Hubungan Antara Waktu Hidrolisis Terhadap Kadar Glukosa

Pada saat 6 sampai 36 jam hidrolisis, terjadi peningkatan kadar glukosa yang besar dan setelah waktu hidrolisis dilanjutkan lebih dari 36 jam hanya terjadi sedikit peningkatan kadar glukosa. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa pada waktu hidrolisa 36 jam, merupakan waktu yang terbaik dalam hidrolisa menghasilkan glukosa. Model persamaan kadar glukosa yang didapat terhadap waktu adalah $y = -0,005x^2 + 1,047x - 2,228$.

3.3 Pengaruh Variabel pH

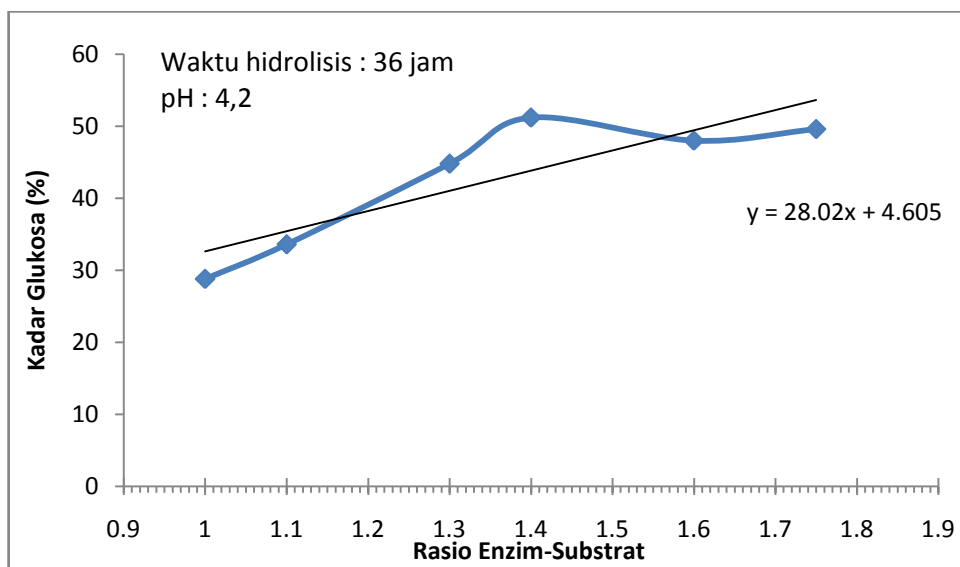


Gambar 4.2. Grafik Hubungan Antara pH Terhadap Kadar Glukosa

Penelitian ini dilakukan dengan variabel tetap waktu 36 jam dan pada rasio enzim-substrat 1:1,75. Variasi variabel proses dikondisikan pada berbagai rentang pH, yaitu antara 4 - 5. Gambar 4.2 menunjukkan peningkatan pH yang relative kecil berpengaruh relatif cukup

besar terhadap kadar glukosa yang dihasilkan. Hal tersebut menunjukkan bahwa aktivitas baik produksi enzim selulase maupun aktivitas enzim selulase sangat sensitif terhadap pH (Xiong H, 2004). Gambar 4.2 menunjukkan bahwa perolehan glukosa terbesar dicapai pada pH 4,2 dengan kadar glukosa yang dihasilkan sebesar 49,6 %. Model persamaan kadar glukosa yang dihasilkan terhadap pH adalah $y = -87.85x^2 + 789.4x - 1725$

3.4 Pengaruh Variabel Rasio Enzim-substrat



Gambar 4.3. Grafik Hubungan Antara Rasio Enzim-Substrat Terhadap Kadar Glukosa

Perolehan kadar glukosa untuk waktu hidrolisis selama 36 jam dengan pH 4,2 tersaji pada gambar 4.3. Hasil percobaan menunjukkan bahwa semakin besar rasio enzim-substrat, semakin meningkat kadar glukosanya. Hal ini terjadi karena semakin besar rasio enzim-substrat menyebabkan tumbukan antar molekul-molekul reaktan dengan enzim meningkat, sehingga penyusupan molekul enzim ke dalam substrat lebih sering terjadi. Akan tetapi, peningkatan rasio enzim-substrat di atas 1:1,4, glukosa yang diperoleh relatif mendekati konstan. Hal ini terjadi, karena penurunan energi aktivasi reaksi hidrolisa relatif kecil (Ikhsan D., Yulianto M.E., dan Hartati I., 2008). Hasil terbaik dicapai pada rasio enzim-substrat 1:1,4 sebesar 51,2 % pada hidrolisis selama 36 jam dengan pH 4,2.

IV. KESIMPULAN

Ampas tebu dapat digunakan untuk memproduksi glukosa dengan hidrolisis secara enzimatis oleh enzim selulosa dari *T. reesei*. Variabel yang paling berpengaruh terhadap reaksi hidrolisa ampas tebu secara enzimatis adalah waktu hidrolisa. Peningkatan pH berpengaruh terhadap kadar glukosa yang dihasilkan. Hasil terbaik dicapai pada rasio enzim-substrat 1:1,4 sebesar 51,2% pada hidrolisis selama 36 jam dengan pH 4,2.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Tuhan Yang Maha Esa atas anugrah, berkat, dan kekuatan yang selalu menyertai kehidupan kami.
2. Kedua orang tua dan keluarga untuk semangat dan motivasi yang selalu menguatkan kami.
3. Bapak Ir. Diyono Ikhsan, SU selaku dosen pembimbing kami, terimakasih untuk bimbingan dan masukan serta kritik dari bapak selama pembuatan proposal, penelitian dan penyusunan laporan.
4. Bapak Ir. Abdullah, MS selaku ketua jurusan Teknik Kimia UNDIP, terima kasih untuk izin penggunaan Laboratorium Bioproses selama kami melaksanakan penelitian.
5. Semua pihak yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Berita Iptek, 12 Juli 2005. <http://www.energi.lipi.go.id>
- Bin Yang dan Wyman CE., *BSA Treatment to Enhance Enzymatic Hydrolysis of Cellulose in Lignin Containing Substrates*, 2006, Wiley InterScience, DOI: 10.1002/bit.20750
- Chen M., Xia L. dan Xue P., *Enzymatic hydrolysis of corncob and ethanol production from cellulosic hydrolysate*, 2007, International Biodeterioration & Biodegradation, Vol 59, pp. 85–89
- Dewi K.H., *Hidrolisis Limbah Hasil Pertanian Secara Enzimatis*, 2002, Akta Agrosia, Vol. 5, pp. 67-71.
- Dewi K.H., *Pengaruh Pengecilan Ukuran dan Sumber Limbah Pertanian pada Hidrolisis secara Enzimatis*, 2002, Akta Agrosia, Vol. 5, pp. 14-21.
- Ikhsan D., Yulianto M.E., dan Hartati I., *Pengembangan Bioreaktor Hidrolisis Enzimatis untuk Produksi Bioetanol dari Biomassa Jerami Padi*, 2008
- Eva dan Jakobsson L., *Optimization of the pretreatment of wheat straw for production of bioethanol*, Department of Chemical Engineering, Lund University.
- Hamelinck, Carlo N, Hooijdonk, Geertje van dan Faaij, Andre PC. *Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term*, 2005, Biomass and Bioenergy, Vol. 28, pp. 384-410.
- Mosier, Nathan, et al. *Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass*, 2005, Bioresource Technology 96, pp. 673–686.

Richana Nur, *Produksi dan Prospek Enzim Xilanase dalam Pengembangan Bioindustri di Indonesia*, *Buletin AgroBio*, 2002, Vol. 5, pp. 29-36.

Sanchez, O.J. dan Cardona, C.A. Review: *Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks*, 2007, *Bioresource Technology*, p. .doi: 10.1016/j.biortech.2007.11.013 Article in Press.

Sugar Technology and Research. <http://risvank.com>

Sun Y., *Enzymatic Hydrolysis of Rye Straw and Bermudagrass for Ethanol Production*, 2002, A dissertation submitted to the Graduate Faculty of North Carolina State University

Taherzadeh, M.J. dan Karimi, K., *Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review*, 2007, *Bioresources* 2(3), pp. 472-499.

Taherzadeh, M.J. dan Karimi, K., *Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review*, 2007, *BioResources*, Vol. 2, pp. 707-738.

Xiong H, *Production and Characterization of Trichoderma Reesei and Thermomyces Lanuginosus Xylanases*, Technical Biochemistry Report 2/2004 TKK-BE.

