

PENGARUH *PRETREATMENT* JERAMI PADI PADA PRODUKSI ENZIM TERMOSTABIL MENGGUNAKAN ISOLAT BAKTERI TERMOFILIK

(The Effect of Rice Straw Pretreatment on Thermostable Enzyme Production Using Thermophilic Bacteria Isolate)

Sunrixon Carmando Yuansah^{1*)}, Darmawan¹⁾, Nurdian Fitriana¹⁾, Amran Laga²⁾

^{1*)} Mahasiswa Program Studi Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Pertanian, Universitas Hasanuddin, Makassar, Indonesia

²⁾ Dosen Program Studi Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Pertanian, Universitas Hasanuddin, Makassar, Indonesia

^{*)} email Penulis Korespondensi: sunrixoncy@gmail.com

ABSTRAK

Jerami padi merupakan salah satu substrat lignoselulosa yang belum dimanfaatkan secara optimal dan kebanyakan hanya menjadi limbah pertanian apabila tidak ditangani dengan baik. Kandungan selulosa dan hemiselulosa dalam struktur lignoselulosa jerami padi memiliki potensi yang besar untuk produksi enzim termostabil dari bakteri termofilik. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pretreatment substrat jerami padi terhadap pola pertumbuhan bakteri selulolitik-hemiselulolitik dan aktivitas enzim yang dihasilkan. Metode yang dilakukan dalam penelitian ini meliputi pembuatan tepung jerami, isolasi dan seleksi sistem batch bertingkat, produksi enzim termostabil, pengukuran total bakteri serta pengukuran aktivitas enzim. Hasil yang diperoleh yaitu perlakuan kombinasi delignifikasi basa dan pemanasan uap bertekanan menghasilkan pola pertumbuhan mikroba yang lebih tinggi daripada perlakuan pemanasan uap bertekanan saja. Pengamatan pH menunjukkan penurunan pH setiap perlakuan. Aktivitas enzim yang diperoleh menunjukkan hasil yang fluktuatif akibat adanya fenomena diauksik.

Kata Kunci : bakteri, enzim, jerami padi, pretreatment, termostabil.

ABSTRACT

Rice straw is one of the lignocellulosic substrate that has not been used optimally and mostly just become an agricultural waste if not handled properly. Cellulose and hemicellulose content in lignocellulose structures of rice straw has great potential for thermostable enzymes production from thermophilic bacteria. The purpose of this study were to determine the effect of pretreatment in rice straw substrate on the total number of bacteria and its enzyme activity. The method used in this study include straw flour production, bacteria isolation and multi-level batch selection system, thermostable enzyme production, total bacteria and enzyme activity measurement. The results obtained were combination of alkaline delignification and pressurized steam heating treatment resulting higher microbial growth pattern than the pressure steam heating only. Observation of pH showed pH decreasing in each treatment. The enzyme activity obtained showed fluctuating results due to the presence of diauxie phenomenon.

Keywords : bacteria, enzyme, pretreatment, rice straw, thermostable.

I. PENDAHULUAN

Lignoselulosa merupakan salah satu komponen organik yang menarik banyak perhatian di dunia karena sumberdayanya

yang melimpah di alam. Lignoselulosa telah dikembangkan dalam berbagai keperluan seperti produksi bahan bakar dan energi, pakan ternak, produksi bahan kimia hingga bahan pangan (Betts et al., 1991).

Lignoselulosa banyak menyusun kompleks seluler pada dinding sel tumbuhan dimana lignoselulosa terdiri dari komponen selulosa yang diselubungi oleh hemiselulosa dan lignin (Mussatto & Teixeira, 2010). Beberapa sumber lignoselulosa berasal dari limbah pertanian seperti jerami padi, bagasse tebu dan tongkol jagung, hasil hutan, rumput gajah dan gandarusa (Kumar et al., 2009). Komposisi dari jerami padi adalah 32,15% selulosa, 28% hemiselulosa dan 19,64% lignin (Shawky et al., 2011). Kandungan selulosa dan hemiselulosa dari jerami padi memiliki potensi pengembangan yang sangat besar apabila dapat dikonversi menjadi produk yang memiliki nilai tambah dan kebaruan. Akan tetapi, untuk mengkonversi komposisi tersebut, *pretreatment* dan hidrolisis enzimatis dilakukan sebagai salah satu strategi pemanfaatan limbah lignoselulosa.

Proses delignifikasi merupakan usaha yang dilakukan untuk mengubah struktur kimia dari lignoselulosa dengan mendegradasi lignin. Proses ini mengakibatkan ikatan kovalen, hidrogen dan van der Waals pada lignoselulosa terurai sehingga komponen selulosa dan hemiselulosa terlepas dari struktur lignoselulosa (Agustini & Efiyanti, 2015). Delignifikasi dapat dilakukan secara kimia, fisiko-kimia, biologi dan *thermal* (panas), dimana proses ini dilakukan untuk mengefisienkan kerja enzim dengan memberikan akses lebih mudah terhadap substrat selulosa dan hemiselulosa (Agustini & Efiyanti, 2015; Rosgaard et al., 2007; Sun & Cheng, 2002). Pretreatment delignifikasi basa juga memiliki efek untuk meningkatkan tingkat pertumbuhan dan densitas sel maksimal mikroba (Han & Callihan, 1974).

Kemudahan akses terhadap komponen selulosa dan hemiselulosa dalam substrat lignoselulosa, mengakibatkan bakteri secara simultan mengsekresikan enzim, yang dimana enzim ini akan menghidrolisis komponen selulosa dan

hemiselulosa sebagai sumber karbon dalam pertumbuhan bakteri. Pemanfaatan enzim dalam produksi gula fermentasi dari biomassa lignoselulosa menjadi strategi pemanfaatan limbah yang sangat tepat karena lebih ramah lingkungan. Enzim bekerja secara spesifik pada substrat dan tidak menimbulkan hasil samping. Pengembangan pemanfaatan enzim tidak hanya sampai disitu, penggunaan enzim meluas untuk mengoptimalkan hasil yang didapatkan, salah satunya dengan menggunakan enzim termostabil.

Berdasarkan uraian di atas, tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pretreatment substrat jerami padi terhadap pola pertumbuhan bakteri selulolitik-hemiselulolitik dan aktivitas enzim yang dihasilkan.

II. METODOLOGI PENELITIAN

2.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu cawan petri (Anumbra), mikropipet (Eppendorf), pipet ukur (Pyrex), autoklaf (Yamato SM-510), Erlenmeyer (Pyrex), *hot plate stirrer* (Stuart CB302), neraca analitik (Satorius), bulb (Eppendorf), *laminar air flow* (AdvancedLab ADV 02V), incubator (Quincy Lab Model 10-140), tabung reaksi (Pyrex), *waterbath shaker* (Julabo SW-22), rak tabung reaksi.

2.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu Kertas pH (), NaCl (Merck), media *GrancuCult*TM *Nutrient Agar* (Merck), *yeast extract* (Merck), *meat extract* (Merck), pepton (Merck), KH₂PO₄ (Merck), MgSO₄ (Merck), CaCl₂ (Merck), FeCl₃ (Merck), CMC *foodgrade*, Titriplex I teknis, CaCl₂·2H₂O (Merck), MgSO₄·7H₂O (Merck), KCl (Merck), NH₄Cl (Merck), metionin (Sigma-Aldrich), kasein (Merck), H₃PO₄ 85% (Merck), FeCl₃ (Merck), MnSO₄ (Merck), H₃BO₃ (Merck), ZnSO₄ (Merck), CoCl₂·6H₂O (Merck), Na₂MoO₄ (Merck), CuSO₄ (Merck), H₂SO₄ 98%

(Merck), *deionized water* (OneMed). CMC (food grade), Fenol (Merck), Glukosa (Merck), dan Asam 3,5-dinitrosalisilat (Merck).

2.3 Prosedur Penelitian

2.3.1 Pembuatan Tepung Jerami

Bahan jerami padi dipreparasi menjadi potongan dengan ukuran kecil (5-10 cm) kemudian dikeringkan dibawah sinar matahari langsung. Potongan jerami yang telah kering digiling dan diayak hingga diperoleh tepung jerami. Tepung jerami selanjutnya dilakukan proses *pretreatment*. Proses *Pretreatment* dilakukan dengan 2 perlakuan, perlakuan pertama tepung jerami ditimbang sebanyak 20g dan dilarutkan dengan NaOH 1M sebanyak 200 mL (rasio 1:2), ke dalam erlenmeyer ukuran 500 mL, dipanaskan dengan uap bertekanan (T:121°C, 1 atm, t:30 menit). Selanjutnya, disaring dan dibilas dengan air hingga pHnya netral. Perlakuan kedua dilakukan dengan cara tepung jerami ditimbang sebanyak 20g dan dilarutkan dengan akuades sebanyak 200 mL (rasio 1:2), ke dalam erlenmeyer ukuran 500 mL, dipanaskan dengan uap bertekanan (T:121°C, 1 atm, t:30 menit). Bahan hasil perlakuan masing-masing dikeringkan dalam oven blower pada suhu 60°C selama 4-5 jam, kemudian digunakan sebagai media pengembangan inokulum dan media produksi enzim dan sakarifikasi.

2.3.2 Isolasi dan Seleksi Sistem *Batch* Bertingkat

Isolat bakteri selulolitik-hemiselulolitik termofilik diperoleh pada tumpukan jerami yang mengalami pelapukan pada bagian tengah tumpukan. Isolat bakteri selulolitik-hemiselulolitik termofilik dibiakkan pada media *nutrient broth* sebelum digunakan pada tahap isolasi dan seleksi. Tahap isolasi dan seleksi dilakukan dengan menginokulasikan 1 mL isolat bakteri selulolitik-hemiselulolitik termofilik ke dalam 25 mL medium isolasi sistem batch bertingkat dalam erlenmeyer

100 mL dengan komposisi media per 200 mL yaitu *yeast extract* 0.4 g, beef extract 0.8g, pepton 1g, KH₂PO₄ 0.2g, MgSO₄ 0.04g, CaCl₂ 0.6g, FeCl₃ 0.056g, dan CMC 1g (Azhari et al., 2010) dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 60°C. Hasil inkubasi kemudian diipipet kembali sebanyak 1 mL dan diinokulasikan pada medium seleksi yang sama sebanyak 25 mL dalam erlenmeyer 100 mL dengan 3 kali tingkatan hingga diperoleh isolat bakteri termofilik. Isolat bakteri selulolitik-hemiselulolitik termofilik hasil seleksi kemudian diremajakan pada media agar miring NA (*Nutrient Agar*) dan disimpan sebelum digunakan pada tahap produksi enzim termostabil.

2.3.3 Produksi Enzim Termostabil

Isolat bakteri selulolitik-hemiselulolitik termofilik hasil seleksi diinokulasikan sebanyak 1 mL kedalam 100 mL medium produksi enzim yang terdiri atas tepung jerami 1% dan larutan mineral sebagai *nutrient* tambahan. Larutan mineral dibuat dari 0.1 g asam nitro-3-asetat, 0.05 g CaCl₂.2H₂O, 0.1 g MgSO₄.7H₂O, 0.01 g NaCl, 0.01 g KCl, 0.3 g 2NH₄Cl, 0.005 g metionin, 0.2 g *yeast extract*, 0.01 g asam kasamino, 1.8 g H₃PO₄ 85%, 1 ml larutan FeCl₃ 0.03%, and 1 ml larutan Nitsch's *trace* dalam volume 1 L (Rastogi et al., 2010). Medium kemudian difermentasi pada suhu 50°C pada kecepatan 150 rpm selama 10 hari. Pengambilan sampel sesuai perlakuan diukur pola pertumbuhan mikroba, pH, dan aktivitas enzim. Enzim hasil produksi dipisahkan dari biomassa dan filtrat secara sentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit.

2.3.4 Desain Penelitian

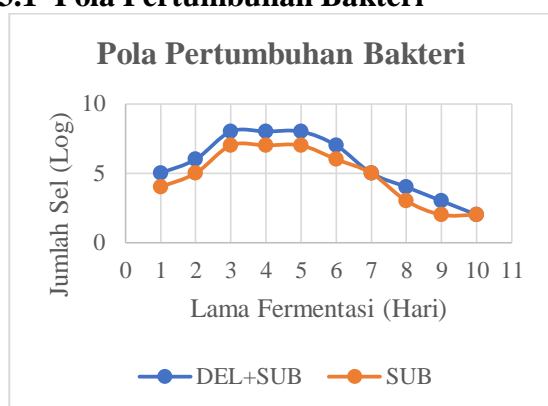
Desain penelitian ini meliputi optimalisasi produksi enzim selulolitik-hemiselulolitik dari pengaruh *pretreatment* substrat tepung jerami dengan lama fermentasi, dengan perlakuan (A) *pretreatment* dan (B) lama fermentasi.

A1 : Delignifikasi (Larutan NaOH 1M)
Sistem Uap Bertekanan

A2 : Pemanasan Sistem Uap Bertekanan
 B : Lama fermentasi selama 10 hari dengan pengambilan sampel setiap 24 jam

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Pola Pertumbuhan Bakteri



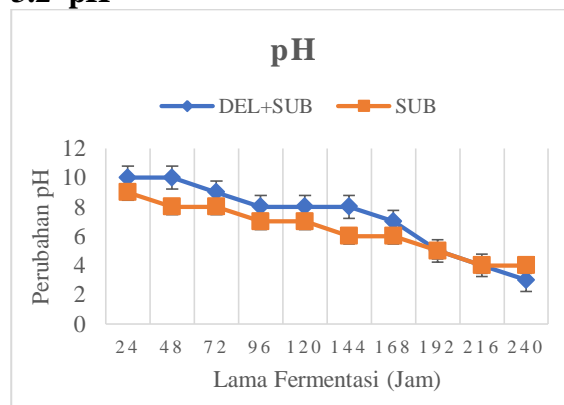
Gambar 01. Pengaruh *Pretreatment* dan Lama Fermentasi Terhadap Pola Pertumbuhan Bakteri (a) DEL+SUB = Delignifikasi Basa+Pemanasan Uap Bertekanan), (b) SUB = Pemanasan Uap Bertekanan

Pada Gambar 01 menunjukkan bahwa perlakuan *pretreatment* dan lama fermentasi memiliki pengaruh terhadap pola pertumbuhan bakteri selulolitik dan hemi-selulolitik termofilik yang diinokulasikan ke dalam substrat jerami padi. Perlakuan *pretreatment* jerami padi dengan kombinasi delignifikasi basa dan pemanasan uap bertekanan (DEL+SUB) memiliki pola pertumbuhan bakteri yang cenderung lebih tinggi daripada perlakuan pemanasan uap bertekanan (SUB). Perbedaan tingkat pertumbuhan bakteri ini dapat disebabkan oleh peningkatan daya cerna (digestibilitas) bakteri terhadap substrat. Menurut Han & Callihan (1974), *pretreatment* meningkatkan digestibilitas dari substrat yang ditandai dengan peningkatan jumlah sel dan penurunan konsentrasi substrat tidak larut selama fermentasi. Selain itu, perlakuan delignifikasi basa juga menghilangkan kandungan lignin yang menghambat pertumbuhan bakteri. Jönsson & Martín

(2016), menyatakan bahwa perlakuan basa dapat menghilangkan lignin dan meningkatkan digestibilitas selulosa. Sedangkan, substrat jerami padi yang diberi perlakuan pemanasan uap bertekanan (SUB) lebih rendah daripada perlakuan kombinasi delignifikasi basa dan pemanasan uap bertekanan (DEL+SUB). Pertumbuhan sel bakteri cenderung lebih lambat pada jerami padi yang diberi perlakuan pemanasan uap bertekanan (SUB) dapat disebabkan karena perlakuan pemanasan uap bertekanan (SUB) hanya membuat sedikit kandungan lignin hilang dan melarutkan kebanyakan kandungan hemiselulosa dari jerami. Kandungan lignin yang tinggi menghambat bakteri untuk dapat menjangkau substrat selulosa dan hemiselulosa sehingga pertumbuhan bakteri menjadi terhambat. Menurut Jönsson & Martín (2016), proses hidrotermal seperti pemanasan uap bertekanan mengakibatkan uap air menembus biomassa, menghidrasi selulosa serta menghilangkan kebanyakan kandungan hemiselulosa dan sedikit bagian dari lignin.

Gambar 01 juga menggambarkan pola pertumbuhan bakteri dimana lama fermentasi hari ke-1 sampai hari ke-3 merupakan fase eksponensial, sedangkan pada lama fermentasi hari ke-3 sampai hari ke-5 telah memasuki fase stasioner dan lama fermentasi hari ke-6 dan seterusnya telah memasuki fase kematian.

3.2 pH

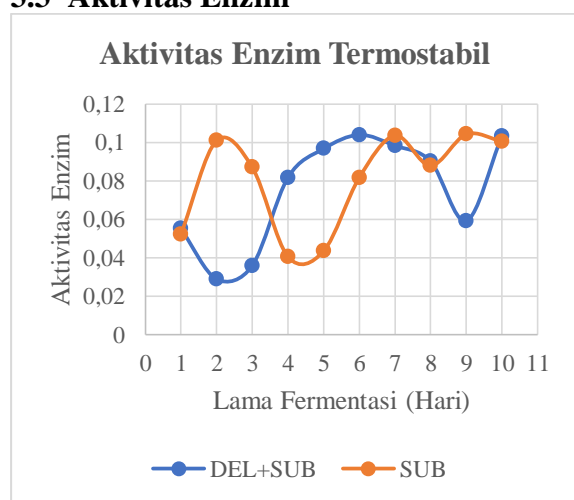


Gambar 02. Pengaruh Lama Fermentasi dan *Pretreatment* Terhadap Perubahan pH (a)

DEL+SUB = Delignifikasi Basa +
Pemanasan Uap Bertekanan), (b) SUB =
Pemanasan Uap Bertekanan

Lama fermentasi substrat jerami padi akan mempengaruhi pH media fermentasi. Hal ini ditunjukkan pada Gambar 02, dimana pH mengalami penurunan secara bertahap seiring dengan semakin lamanya proses fermentasi berlangsung. Penurunan pH yang terjadi disebabkan karena adanya aktivitas metabolisme mikroba yang menghasilkan enzim untuk memecah substrat menjadi gula. Gula yang dihasilkan beberapa dikonversi menjadi asam akibat proses ini. Perlakuan *pretreatment* yang dilakukan baik dengan kombinasi delignifikasi basa dan pemanasan uap bertekanan (DEL+SUB) serta dengan pemanasan uap bertekanan saja (SUB), mengalami penurunan pH selama fermentasi berlangsung.

3.3 Aktivitas Enzim



Gambar 03. Pengaruh *Pretreatment* dan Lama Fermentasi Terhadap Aktivitas Enzim (a) DEL+SUB = Delignifikasi Basa+Pemanasan Uap Bertekanan), (b) SUB = Pemanasan Uap Bertekanan

Pada Gambar 03 menunjukkan bahwa perlakuan *pretreatment* jerami padi dan lama fermentasi memiliki pengaruh terhadap aktivitas enzim. Pada substrat

jerami padi yang diberi perlakuan kombinasi delignifikasi basa dan pemanasan uap bertekanan (DEL+SUB) serta pemanasan uap bertekanan (SUB) saja menghasilkan data yang fluktuatif. Hal ini dapat terjadi karena adanya fenomena diauksik. Fenomena diauksik merupakan fenomena dimana ketika terdapat dua sumber karbon yang dimana keberadaan sumber karbon satu mengakibatkan peningkatan pertumbuhan sel dan aktivitas enzim (Chu dan Barnes 2016; Loomis dan Magasanik 1967).

Pada substrat jerami padi yang diberi perlakuan kombinasi delignifikasi basa dan pemanasan uap bertekanan (DEL+SUB) menunjukkan bahwa adanya penurunan aktivitas enzim di awal fermentasi. Hal ini dapat disebabkan karena ketersediaan gula-gula sederhana yang dihasilkan dari perlakuan *pretreatment* ini mengakibatkan penurunan aktivitas enzim. Sedangkan, pada substrat jerami padi yang hanya diberi perlakuan pemanasan uap bertekanan (SUB), menunjukkan bahwa terjadi kenaikan aktivitas enzim. Hal ini disebabkan karena *pretreatment* pemanasan uap bertekanan (SUB) tidak menyediakan sumber karbon yaitu gula sederhana yang cukup sehingga memaksa enzim meningkatkan aktivitasnya memecah substrat kompleks yaitu selulosa dan hemiselulosa untuk memperoleh gula sederhana.

IV. KESIMPULAN

Perlakuan *pretreatment* kombinasi delignifikasi basa dan pemanasan uap bertekanan (DEL+SUB) serta pemanasan uap bertekanan (SUB) memiliki pengaruh terhadap total mikroba dan aktivitas enzim. *Pretreatment* kombinasi delignifikasi basa dan pemanasan uap bertekanan (DEL+SUB) memiliki pola pertumbuhan mikroba yang lebih tinggi daripada pemanasan uap bertekanan (SUB). Sedangkan pemanasan uap bertekanan memiliki pertumbuhan mikroba yang lebih rendah daripada perlakuan (DEL+SUB)

karena adanya perbedaan daya cerna (digestibilitas) substrat oleh mikroba.

Perlakuan pemanasan uap bertekanan (SUB) dan perlakuan kombinasi deliginifikasi basa dan pemanasan uap bertekanan (DEL+SUB) memiliki nilai yang fluktuatif disebabkan fenomena diauksik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kepada Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi yang telah memberi pendanaan dalam penelitian ini sehingga penelitian ini dapat terselenggara.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustini, L., & Efiyanti, L. (2015). The Effects of Delignification Treatments on Cellulose Hydrolysis and Ethanol Production from Lignocellulosic Wastes. *Jurnal Penelitian Hasil Hutan*, 33(1), 69–80.
- Betts, B., Dart, R. K., Ball, A. S., & Pedlar, S. L. (1991). Biosynthesis and Structure of Lignocellulose. In W. . Betts (Ed.), *Biodegradation*. London: Springer-Verlag London Limited. <https://doi.org/10.1007/978-1-4471-3470-1>
- Han, Y. W., & Callihan, C. D. (1974). Cellulose fermentation: effect of substrate pretreatment on microbial growth. *Applied microbiology*, 27(1), 159–165. Diambil dari <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4809907> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC379986>
- Jönsson, L. J., & Martín, C. (2016). Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource Technology*, 199, 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.009>
- Kumar, P., Barrett, D. M., Delwiche, M. J., & Stroeve, P. (2009). Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 48(8), 3713–3729. <https://doi.org/10.1021/ie801542g>
- Mussatto, S. I., & Teixeira, J. A. (2010). Lignocellulose as raw material in fermentation processes, 897–907.
- Rosgaard, L., Pedersen, S., & Meyer, A. S. (2007). Comparison of Different Pretreatment Strategies for Enzymatic Hydrolysis of Wheat and Barley Straw Comparison of Different Pretreatment Strategies for Enzymatic Hydrolysis of Wheat and Barley Straw. *Appl Biochem Biotechnol*, 143, 284–296. <https://doi.org/10.1007/s12010-007-8001-6>
- Shawky, B. T., Mahmoud, M. G., Ghazy, E. A., Asker, M. M. S., & Ibrahim, G. S. (2011). Enzymatic hydrolysis of rice straw and corn stalks for monosugars production. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 9(1), 59–63. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2011.05.001>
- Sun, Y., & Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production : a review q, 83, 1–11.