



Optimasi Preparasi Prekursor Bioetanol Limbah Mahkota Nanas menggunakan Enzim *Selulase* Jamur Tiram

Khayatun Nufus[✉], Sri Mursiti, dan Harjono

Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Semarang
Gedung D6 Kampus Sekaran Gunungpati Telp. (024)8508112 Semarang 50229

Info Artikel

Diterima Agustus 2017

Disetujui September 2017

Dipublikasikan November 2017

Keywords:

hidrolisis
rasio enzim substrat
waktu hidrolisis

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui rasio enzim substrat dan waktu hidrolisis α -selulosa limbah mahkota nanas dalam menghasilkan kadar glukosa yang tinggi. Hasil penelitian menunjukkan kadar glukosa tertinggi yang diperoleh adalah 838 ppm yang dilakukan pada rasio enzim substrat (1 : 2 (v/v)) dengan waktu hidrolisis 8 jam. Aktivitas enzim selulase yang diperoleh dalam penelitian ini sebesar 0,00181 U/mL. Data hasil glukosa yang diperoleh dianalisis menggunakan Anava dua jalur dengan replikasi. Hasil analisis menunjukkan bahwa rasio enzim substrat, waktu hidrolisis dan interaksi rasio enzim substrat dengan waktu hidrolisis berpengaruh secara signifikan terhadap kadar glukosa yang diperoleh. Prekursor bioetanol dengan kadar glukosa tertinggi dilakukan pengujian apakah prekursor tersebut dapat menghasilkan etanol atau tidak. Berdasarkan hasil analisis kualitatif dengan $K_2Cr_2O_7$ dan secara kuantitatif menggunakan HPLC prekursor bioetanol dengan kandungan glukosa tertinggi dapat menghasilkan etanol.

Abstract

The aim of this study is to find out the substrate-enzyme ratio and hydrolysis time of α -cellulose crown pineapple waste to produce glucose with the highest level. Based on study, the highest glucose level was 838 ppm on enzyme substrate ratio (1: 2) with hydrolysis time 8 hours. The activity of cellulase enzyme in this study is 0.00181 U/mL. Glucose levels were then tabulated by 2 way anava with replication. Data results shows that the enzyme-substrate ratio, hydrolysis time and enzyme-substrate ratio relationship with hydrolysis time significantly affect glucose levels. Precursor bioethanol with the highest glucose level is tested whether the precursor can produce ethanol or not. Based on qualitative test using $K_2Cr_2O_7$ and quantitative test using HPLC, precursor bioethanol with highest level can produce ethanol.

© 2017 Universitas Negeri Semarang

✉ Alamat korespondensi:
Gedung D6 Lantai 2 Kampus Sekaran, Gunungpati, Semarang 50229
E-mail: khayatunnufus18@gmail.com

p-ISSN 2252-6951
e-ISSN 2502-6844

Pendahuluan

Kebutuhan energi fosil seperti bensin atau solar semakin meningkat. Hal ini menjelaskan bahwa kebutuhan energi masih bergantung pada ketersediaan energi fosil, padahal ketersediaan energi fosil berbanding terbalik dengan kebutuhannya (Anuj *et al.*, 2007). Ketergantungan energi fosil dapat merugikan, karena tidak terbarukan (*non renewable*) dan menyebabkan pencemaran udara yang cukup tinggi, sehingga perlu dicari bahan bakar alternatif, salah satunya adalah bioetanol (Nurdyahastuti, 2006). Bahan baku untuk produksi bioetanol diklasifikasikan menjadi tiga kelompok, yaitu gula, pati dan selulosa. Sumber gula yang berasal dari gula tebu, gula bit dan molase dapat langsung dikonversi menjadi bioetanol. Sumber dari bahan berupa pati dan selulosa harus dihidrolisis terlebih dahulu menjadi gula (Lin *et al.*, 2006).

Mahkota nanas merupakan salah satu limbah biomassa berlignoselulosa yang keberadaannya belum banyak dimanfaatkan. Salah satu pemanfaatan selulosa adalah dengan mengkonversi menjadi bioetanol melalui proses hidrolisis kemudian dilanjutkan dengan fermentasi. Berdasarkan derajat polimerisasi dan kelarutan dalam NaOH 17,5% selulosa dapat dibedakan menjadi tiga jenis yaitu α , β , dan γ selulosa (Widodo *et al.*, 2013). Hidrolisis selulosa menjadi glukosa dapat dilakukan secara kimiawi dan enzimatik. Perbedaan mendasar dari hidrolisis kimiawi dan enzimatik terdapat pada spesifitas pemutusan rantai polimer selulosa (Setyawati *et al.*, 2011).

Enzim yang dapat digunakan untuk menghidrolisis selulosa menjadi glukosa adalah enzim *selulase*. Mikroorganisme penghasil enzim selulase dapat berupa jamur dan bakteri. Salah satu jamur yang dapat menghasilkan enzim *selulase* adalah jamur tiram. Kemampuan jamur tiram dalam menghasilkan enzim selulase dan aplikasinya sebagai biokatalisator dalam proses hidrolisis selulosa menjadi bioetanol telah dilaporkan oleh Pratomo *et al.* (2016); Setiawan *et al.* (2015); dan Habibah (2015). Sehingga, dalam penelitian ini dilakukan hidrolisis α -selulosa limbah mahkota nanas menggunakan enzim *selulase* dari jamur tiram.

Metode

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah oven *GCA Corp*, ayakan 100 mesh, Spektrofotometer UV-Vis *Genesys 10*, Spektrofotometer FT-IR *Shimadzu 8201 PC*, *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) *Shimadzu*, dan setrifugase *Centurion*. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah jamur tiram, limbah mahkota nanas, NaOH, reagen DNS, buffer fosfat pH 8, $K_2Cr_2O_7$, glukosa, urea, dan amonium sulfat dengan *grade pro analyst* (*Merck*).

Prosedur penelitian meliputi 4 tahap, yaitu ekstraksi α -selulosa limbah mahkota nanas, ekstraksi enzim *selulase* jamur tiram, optimasi rasio enzim substrat dan waktu hidrolisis α -selulosa menggunakan enzim *selulase*, dan uji prekursor bioetanol. Ekstraksi α -selulosa dilakukan dengan memodifikasi metode Bahmid (2014). Ekstraksi α -selulosa dilakukan menggunakan larutan NaOH 17,5% pada temperatur 80°C selama 30 menit. Residu yang diperoleh dicuci sampai netral dan dioven, kemudian dikarakterisasi menggunakan FT-IR.

Isolasi enzim *selulase* jamur tiram dilakukan dengan memodifikasi metode Habibah (2015). Isolasi enzim *selulase* jamur tiram dilakukan dengan menggunakan teknik sentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 30 menit. Supernatan yang diperoleh merupakan enzim *selulase* kasar yang siap diuji aktivitasnya dan digunakan sebagai biokatalisator dalam proses hidrolisis. Uji aktivitas enzim *selulase* dilakukan dengan menghitung jumlah glukosa yang diperoleh dengan metode Miller (1959) menggunakan reagen 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS). Aktivitas enzim *selulase* dinyatakan dalam satuan internasional yaitu U/mL. Satu unit aktivitas enzim *selulase* didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dibutuhkan untuk menguraikan 1 μ mol selulosa menjadi gula reduksinya per menit pada kondisi pengujian.

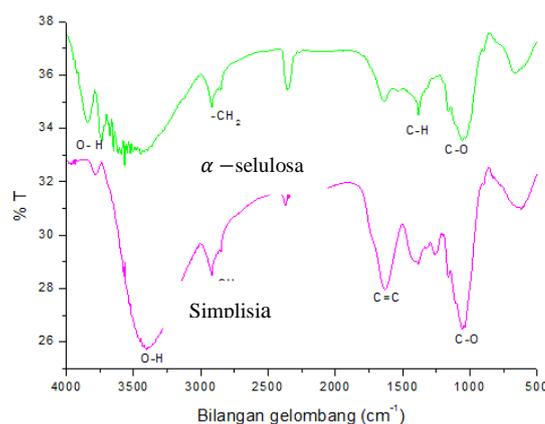
Hidrolisis substrat α -selulosa limbah mahkota nanas mengacu pada metode Habibah (2015), Aziz *et al.* (2015) yang dimodifikasi. Substrat α -selulosa limbah mahkota nanas dilarutkan dalam buffer fosfat pH 8 sampai menjadi bubur, kemudian ditambah enzim *selulase* segar sesuai dengan variasi enzim substrat yang digunakan (1: 0,5; 1: 1; 1: 1,5; 1: 2 and 1: 2,5 v/v), kemudian dilakukan hidrolisis sesuai dengan variasi waktu hidrolisis (2, 4, 6, 8, dan 10 jam) pada temperatur 30°C. Setelah selesai larutan dipanaskan untuk menghentikan aktivitas enzim. Filtrat yang diperoleh dianalisis kadar glukosanya menggunakan metode Miller (1959) dengan reagen 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS). Data kadar glukosa yang diperoleh dibulasi menggunakan *anova two way*.

Uji prekursor bioetanol dilakukan untuk membuktikan apakah glukosa yang diperoleh dapat menghasilkan etanol. Pengujian dilakukan dengan ragi roti selama 7 hari, filtrat yang diperoleh diuji secara kualitatif menggunakan $K_2Cr_2O_7$ dan secara kuantitatif menggunakan HPLC.

Hasil dan Pembahasan

Limbah mahkota nanas dalam penelitian ini diperoleh dari desa Belik, kecamatan Belik kabupaten Pemalang provinsi Jawa Tengah. Isolasi α -selulosa simplisia limbah mahkota nanas dilakukan dengan larutan NaOH 17,5%. Penggunaan NaOH 17,5% menyebabkan pembengkakan pada struktur selulosa. Pembengkakan yang terjadi akan membuka serat-serat selulosa. Struktur selulosa yang membengkak menyebabkan akseibilitas gugus -OH pada selulosa meningkat, sehingga proses penetrasi ke bagian dalam selulosa menjadi mudah. Penggunaan NaOH 17,5% tidak dapat melarutkan α -selulosa tetapi melarutkan jenis selulosa lain yaitu β -selulosa dan γ -selulosa (Bahmid, 2014).

Rosa *et al.* (2012), melaporkan bahwa keberadaan gugus C=C pada cincin aromatik lignin ditunjukkan pada bilangan gelombang 1640 cm^{-1} . Abraham *et al.* (2011), menunjukkan bahwa puncak yang muncul pada 1730-1740 cm^{-1} merupakan gugus C=O dari lignin dan hemiselulosa hal ini sesuai dengan karakteristik gugus C=O pada lignin dan hemiselulosa yang muncul pada bilangan gelombang 1765-1715 cm^{-1} . Mandal *et al.* (2011) melaporkan bahwa serapan pada bilangan gelombang 3500-3200 cm^{-1} mengindikasikan adanya gugus O-H pada selulosa, karakteristik selulosa juga ditunjukkan dengan adanya gugus C-H pada bilangan gelombang 2894 cm^{-1} . Spektrum FT-IR simplisia dan α -selulosa limbah mahkota nanas ditunjukkan pada Gambar 1.

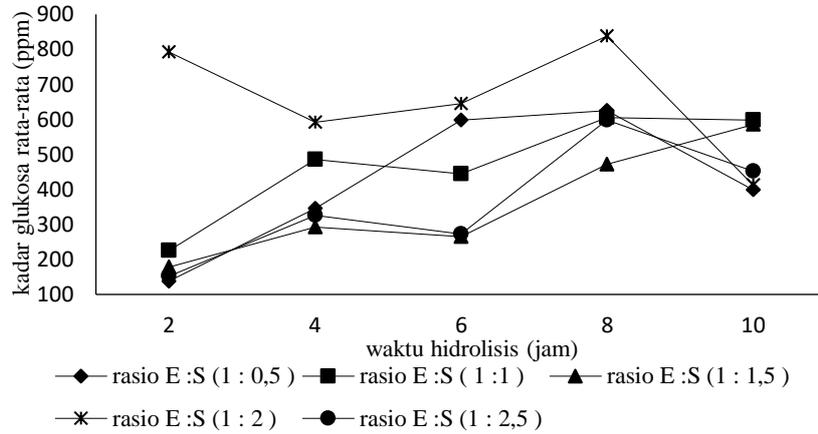


Gambar 1. Spektrum FT-IR α -selulosa dan simplisia limbah mahkota nanas

Gambar 1 menunjukkan perbandingan serapan gugus fungsi antara α -selulosa dan simplisia limbah mahkota nanas. Berdasarkan spektrum pada Gambar 1 menunjukkan serapan pada bilangan gelombang 1631,34 cm^{-1} yang merupakan serapan gugus C=C pada bilangan aromatik lignin. Pada spektrum tersebut juga muncul serapan gugus O-H pada bilangan gelombang 3401,17 cm^{-1} , serapan -CH₂ pada bilangan gelombang 2918,28 cm^{-1} , dan serapan C-O pada bilangan gelombang 1055,2 cm^{-1} . Gugus fungsi tersebut menunjukkan keberadaan selulosa. Hasil analisis spektrum simplisia limbah mahkota nanas dapat dikatakan bahwa simplisia limbah mahkota nanas mengandung selulosa, dan lignin. Spektrum α -selulosa limbah mahkota nanas sudah tidak menunjukkan adanya serapan pada bilangan gelombang 1631,34 cm^{-1} yang merupakan serapan gugus C=C dari lignin. Keberadaan selulosa ditunjukkan oleh munculnya gugus -CH₂ pada puncak 2347,29 cm^{-1} , O-H pada puncak 3736,55 cm^{-1} , C-H pada puncak 1384,52 cm^{-1} , dan C-O pada puncak 1055,74 cm^{-1} . Hasil karakterisasi gugus fungsi dapat diketahui bahwa penggunaan larutan NaOH 17,5 % tidak merusak struktur selulosa.

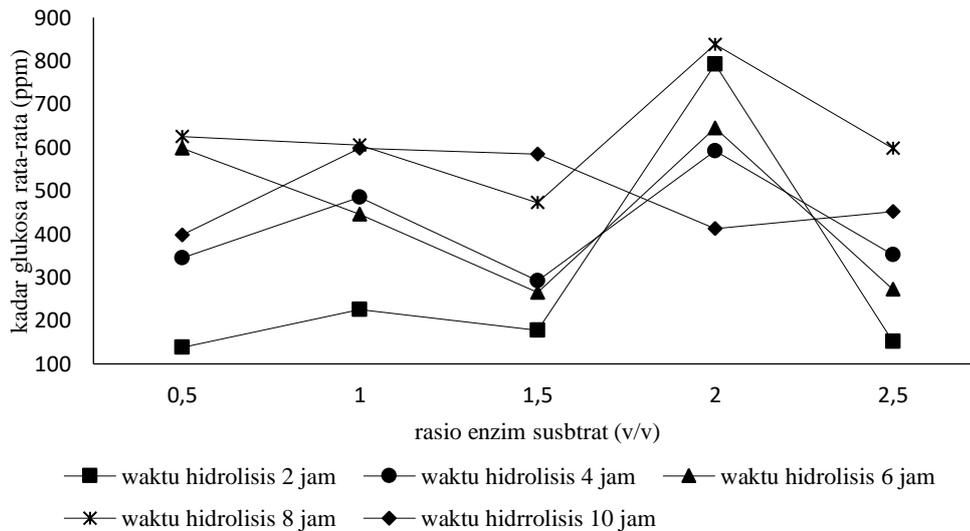
Jamur tiram yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari pasar Sekaran Gunungpati Semarang. Isolasi enzim menggunakan sentrifugase merupakan cara pemisahan enzim dari partikel-partikel lain yang tidak dikehendaki. Semakin kecil partikel, kecepatan sentrifugasi yang diperlukan semakin besar. Pemisahan yang dilakukan dengan sentrifugasi dilakukan pada kecepatan dan gaya berat tertentu sehingga sel-sel mikroorganisme mengendap dan supernatan merupakan enzim kasar. Supernatan yang diperoleh kemudian diuji aktivitasnya. Aktivitas enzim *selulase* dinyatakan dalam satuan internasional yaitu U/mL. Satu unit aktivitas enzim *selulase* didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dibutuhkan untuk menguraikan 1 μmol selulosa menjadi glukosa per menit pada kondisi pengujian. Hasil pengukuran aktivitas enzim selulase dari jamur tiram yang diperoleh dari pasar Sekaran Gunungpati Semarang adalah 0,00181 U/mL, hal ini berarti 0,00181 U/mL enzim *selulase* dapat menguraikan $6,03 \times 10^{-5}$ μmol selulosa menjadi glukosa permenit.

Proses hidrolisis substrat α -selulosa limbah mahkota nanas dilakukan dengan rasio enzim substrat (1:0,5; 1:1; 1:1,5; 1:2 dan 1:2,5 v/v) dengan waktu hidrolisis (2, 4, 6, 8 dan 10 jam). Filtrat hasil hidrolisis selanjutnya dianalisis kadar glukosanya menggunakan reagen DNS. Berdasarkan hasil pengukuran tersebut diperoleh kadar glukosa tertinggi sebesar 838 ppm. Optimasi waktu hidrolisis ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Optimasi waktu hidrolisis

Gambar 2 menunjukkan waktu hidrolisis optimum hidrolisis substrat α -selulosa limbah mahkota nanas menggunakan enzim *selulase*, waktu hidrolisis optimum yang diperoleh adalah 8 jam. Hal ini menunjukkan bahwa interaksi antara enzim dengan substrat yang semakin lama menyebabkan semakin banyak glukosa yang terbentuk. Namun, pada waktu hidrolisis tertentu konsentrasi glukosa akan mengalami penurunan. Penurunan ini disebabkan oleh adanya akumulasi produk yang telah terbentuk sebelumnya dan menyebabkan, penghambatan bagi enzim *selulase*. Inhibitor enzim *selulase* berupa produk dari hidrolisis selulosa yaitu glukosa dan selobiosa. Selobiosa menghambat enzim *eksoglukanase* sedangkan glukosa menghambat enzim β -glukosidase (Ambriyanto, 2010). Optimasi rasio enzim substrat ditunjukkan pada Gambar 3.



Gambar 3. Optimasi rasio enzim substrat

Gambar 3 menunjukkan bahwa rasio enzim substrat 1 : 2 dapat menghasilkan kadar glukosa tertinggi. Hal ini dikarenakan pada rasio substrat rendah, sisi aktif enzim hanya akan menampung sedikit substrat. Bila konsentrasi substrat diperbesar, maka semakin banyak substrat yang bergabung dengan enzim pada sisi aktif tersebut, dengan demikian konsentrasi kompleks enzim substrat makin besar, hal ini menyebabkan makin besarnya kecepatan reaksi. Namun, penambahan substrat diatas perbandingan optimum akan menyebabkan penurunan kadar glukosa yang dihasilkan. Hal ini menunjukkan bahwa semua sisi aktif enzim telah dipenuhi dengan substrat atau jenuh dengan substrat, dimana dalam keadaan ini bertambahnya jumlah substrat tidak menyebabkan bertambah besarnya konsentrasi kompleks enzim-substrat, sehingga produk yang dihasilkan justru menurun bukan bertambah.

Rasio enzim substrat, waktu hidrolisis dan interaksi antara rasio enzim substrat dengan waktu hidrolisis dianalisis pengaruhnya terhadap kadar glukosa yang diperoleh. Analisis pengaruh yang digunakan dalam penelitian ini adalah *analysis of varians* (Anava) *two-factor with replication*. Hasil analisis data dalam penelitiannya disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Pengaruh rasio enzim substrat dan waktu hidrolisis terhadap kadar glukosa

Source of variation	SS	Df	MS	F	p-value	F crit
Sample	897674,38	24	37403,10	19,19	2,16 E-34	1,59
Columns	11227755,51	2	5613877,76	2880,84	2,13E-120	3,06
Interaction	1758783,02	48	36641,31	18,80	1,56E-43	1,44
Within	292304,00	150	1948,69			
Total	14176516,91	224				

Tabel 1 menunjukkan hasil tabulasi kadar glukosa yang diperoleh menggunakan *Anova two way with replication*, dapat dilihat pada baris sample nilai *P-value* variabel rasio enzim substrat adalah 2,16E-34. Variabel rasio enzim substrat dikatakan signifikan apabila *P-value* <0,05 dari analisis diatas dapat dikatakan bahwa variabel rasio enzim substrat signifikan. Pada baris *column*, dan *interaction* nilai *P-value* yang dihasilkan juga <0,05 maka dapat disimpulkan bahwa rasio enzim substrat, waktu hidrolisis dan interaksi waktu hidrolisis dengan rasio enzim substrat berpengaruh secara signifikan.

Prekursor bioetanol dengan kadar glukosa tertinggi selanjutnya diuji apakah prekursor tersebut dapat menghasilkan etanol atau tidak. Pengujian prekursor bioetanol dilakukan menggunakan khamir *Saccharomyces cerevisiae* selama 7 hari. Filtrat yang diperoleh diduga mengandung etanol. Oleh karena itu dilakukan pengujian secara kualitatif menggunakan $K_2Cr_2O_7$ dan secara kuantitatif menggunakan HPLC. Hasil pengamatan menunjukkan perubahan warna larutan yang sebelumnya kuning menjadi biru, sehingga dapat dipastikan bahwa filtrat mengandung etanol. Hasil uji kualitatif disajikan pada Gambar 4.



Gambar 4. Hasil uji kualitatif

Berdasarkan analisis secara kuantitatif menggunakan HPLC dapat diketahui bahwa ada puncak kromatogram yang menunjukkan etanol. Hal ini diketahui dari waktu retensi yang diperoleh, pada etanol standar menunjukkan waktu retensi 4,302 menit sedangkan pada filtrat 4,254 menit.

Simpulan

Waktu hidrolisis dan rasio enzim substrat optimum yang dibutuhkan enzim *selulase* jamur tiram untuk menghidrolisis substrat α -selulosa limbah mahkota nanas sehingga menghasilkan prekursor bioetanol dengan kandungan gula reduksi tinggi adalah 8 jam dan 1 : 2 (v/v). Hasil pengujian prekursor bioetanol secara kualitatif menggunakan $K_2Cr_2O_7$ dan secara kuantitatif menggunakan HPLC menunjukkan prekursor bioetanol dalam penelitian ini dapat menghasilkan etanol.

Daftar Pustaka

- Abraham, E., B. Deepa., L.A. Pothan., M. Jacob., S. Thomas., U. Cvelbar., R. Anadjwala. 2011. Extraction of Nanocellulose Fibrils From Lignocellulosic Fibres: A Novel Approach. *Carbohydrate Polymers*
- Ambriyanto, K.S. 2010. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Aerob Pendegradasi Selulosa dari Serasah Daun Rumpuk Gajah *Pennisetum Purpureum Schaum.* *Skripsi.* Surabaya: Insitut Teknologi Sepuluh November
- Anuj, K.C., Rundravarana, R., Narasu, M.L., Rao, L.R., dan Ravinda, P. 2007. Economic and Environmental Impact of Bioethanol Production Technology. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 2(1): 14-32
- Aziz, M., F. Husson., dan S. Kermasha. 2015. Optimization of the Hydrolysis of Safflower Oil for the Production of Linoleic Acid used as Flavor Precursor. *International Journal of Food Science*
- Bahmid, N.A. 2014. Pengembangan Nanofiber Selulosa Asetat dari Selulosa Tandan Kosong Kelapa Sawit untuk Pembuatan Bioplastik. *Tesis.* Bogor: Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor
- Habibah, F. 2015. Produksi Substrat Fermentasi Bioetanol dari Alga Merah *Gracilaria verrucosa* melalui Hidrolisis Enzimatis dan Kimiawi. *Skripsi.* Semarang: Jurusan Kimia FMIPA Universitas Negeri Semarang
- Lin, Y., dan S. Tanaka. 2006. Ethanol Fermentation from Biomass Resources: Current State and Prospect. *Applied Microbiology Biotechnology*, 69: 627-642
- Mandal, A., dan D. Chakrabarty. 2011. Isolation of Nanocellulose from Waste Sugarcane Bagasse (SCB) and Its Characterization. *Carbohydrate Polymers*
- Miller, G.L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Journal Analytical Chemistry*, 32(3): March 1959
- Nurdyastuti, I. 2006. *Teknologi Proses Produksi Bioetanol.* Jakarta: Agromedia Pustaka
- Pratomo, J., Supartono., E. Cahyono. 2015. Pengaruh *Selulase* Berbagai Jamur pada Hidrolisis Enzimatis Kulit Pisang dalam Pembuatan Bioetanol. *Indonesian Journal of Chemical Science*, 5(1): 78-80
- Rosa, M.L.S., N. Rehman., Maria, I.G., De, M., Sonia, M.B.N., Nachtigall., Clara, I.D., dan Bica. 2012. Chlorine-Free Extraction of Cellulose From Rice Husk and Whisker Isolation. *Carbohydrate Polymers*, 87: 1131-1138
- Setiawan, H., dan E. Kusumo. 2015. Pembuatan Bioetanol dari Jerami Padi dengan Bantuan Enzim *Selulase* dari Jamur Tiram. *Indonesian Journal of Chemical Science*, 4(2): 132-137
- Setyawati, H., dan N.A., Rahman. 2011. Pemanfaatan Kulit Pisang Bahan Baku Bioetanol dengan Proses Hidrolisis Enzimatis. *Jurusan Teknik Kimia*, 5(2): 105-111
- Widodo, U, L., K. Sumada., C. Pujiastuti., dan N. Karaman. 2013. Pemisahan Alpha-Selulosa dari Limbah Batang Ubi Kayu menggunakan Larutan Natrium Hidroksida. *Jurnal Teknik Kimia*, 7(2): 43-47