

PENGARUH pH DAN INOKULUM PADA PEMANFAATAN LIMBAH KULIT NENAS UNTUK PRODUKSI ENZIM SELULASE

Fransiska C Sinaga, Elvi Yenie, Sri Rezeki Muria
Jurusan Teknik Kimia, Fakultas Teknik Universitas Riau

Email : khongfaith@yahoo.com

089620577055

ABSTRACT

Utilization of waste is the best way to solve the problem of waste, in order to obtain the raw materials and to process waste into useful products which have higher added value. Pineapple waste per 100g wet weight contains of 86.7% water, 0.69% protein, 0.02% fat, 10.54% carbohydrate, 1.66% wet fiber and 0.48% ash. A large amount of carbohydrates in pineapple skin is very potential when it is used as a carbon source to produce cellulose enzymes. Cellulose enzyme is a complex of enzyme that can transform cellulose into glucose. To produce the Cellulose enzyme, fungus *Aspergillus niger* is used in solid fermentation processing. In this research, we have variations pH 4; 4.5, 5; 5.5 and 6, and the inoculum by 10%, 15%, 20%, 25% and 30% of the substrate, with 4 days fermentation. DNS method is used to test the glucose levels generated. The results obtained showed that the activity of the enzyme has the best obtained at 15% inoculum conditions and at pH 5 with the activity of the enzyme at 5.67 g / L. Enzyme with the best activity is used to hydrolyze the skin of pineapple into liquid sugar and from this process, liquid glucose concentrations obtained at 4.19 g / L

Keywords: *Aspergillus niger*, cellulose enzyme, liquid sugar, hydrolysis, pineapple skin.

Pendahuluan

Nenas merupakan salah satu komoditas non migas dari sektor agrikultural yang dihasilkan oleh hampir semua provinsi di Indonesia. Data BPS tahun 2009 mencatat bahwa produksi nenas di Riau mencapai 66.422 Ton, dengan produksi nenas Indonesia mencapai 1,558,196 Ton. Perkebunan nenas terbesar di Riau terdapat di Kabupaten Kampar menurut HUMAS Kab Kampar pada tahun 2010 luas perkebunan nenas sebesar 800 Ha.

Permintaan nenas sebagai bahan baku industri pengolahan buah-buahan juga semakin meningkat misal untuk pembuatan sirup, keripik, dan berbagai produk olahan nenas. Dengan pemanfaatan nenas yang besar, tentunya akan menghasilkan limbah kulit yang tidak sedikit pula. Pemanfaatan limbah kulit nenas selama ini belum maksimal hanya digunakan sebagai pakan ternak dan sisanya dibuang begitu saja ke lingkungan,

sehingga perlu dicari terobosan baru untuk memanfaatkan limbah kulit nenas menjadi produk yang bernilai ekonomi. Salah satu terobosan pemanfaatan limbah kulit nenas adalah dijadikan sebagai substrat untuk produksi enzim selulase.

Dalam 100 g berat basah kulit nenas mengandung 10,54% karbohidrat [Sidharta, 1989], jumlah karbohidrat yang besar inilah sangat berpotensi untuk dimanfaatkan dalam produksi enzim selulase dari jamur *aspergillus niger* dimana enzim selulase yang dihasilkan dapat digunakan untuk mengubah selulosa kulit nenas menjadi gula cair. Enzim selulase digunakan secara luas dalam industri tekstil, deterjen, pulp dan kertas.

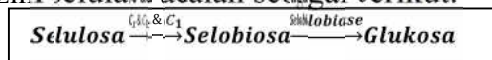
Dalam penelitian ini kulit nenas dihidrolisis secara enzimatik untuk menghasilkan enzim selulase. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk memproduksi enzim selulase dengan memanfaatkan limbah kulit nenas menggunakan

Aspergillus niger. Variabel yang dipelajari dalam penelitian ini meliputi pH dan persentase inokulum. Hasil yang diharapkan dari penelitian ini adalah kondisi hidrolisis optimum yang ditunjukkan oleh aktivitas enzim terbaik, yang selanjutnya dapat digunakan lebih lanjut untuk menghasilkan gula cair.

Landasan Teori

Karbohidrat yang terdapat pada kulit nenas berbentuk selulosa. Selulosa ($C_6H_{10}O_5$)_n adalah polisakarida karbohidrat yang terdiri atas monomer beta-glukosa. Selulosa merupakan komponen struktural utama dari tumbuhan dan tidak dapat dicerna oleh manusia. Hidrolisis selulosa oleh aktifitas tanaman sendiri sangat terbatas. Tetapi sejumlah kapang dan bakteri yang hidup dari substrat hasil-hasil pertanian dapat menghasilkan sejenis enzim selulase yang dapat menghidrolisis selulosa menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana. Enzim selulase merupakan kumpulan dari beberapa enzim yang bekerja bersama untuk hidrolisis selulosa. Mikroorganisme tertentu menghasilkan partikel yang dinamakan selulosom. Partikel inilah yang akan terdisintegrasi menjadi enzim-enzim, yang secara sinergis mendegradasi selulosa [Belitz dkk, 2008]. Sedikitnya ada tiga enzim yang terlibat dalam degradasi atau hidrolisis selulosa, yaitu endo- β -glukanase, ekso- β -glukanase, dan β -glukosidase.

Reaksi hidrolisis selulosa oleh enzim selulase adalah sebagai berikut.



Gambar 1. Reaksi Hidrolisis Selulosa Menjadi Glukosa

Enzim selulase awalnya diteliti beberapa dekade yang lalu untuk keperluan biokonversi biomassa, yang membuka peluang untuk aplikasi industrial dalam berbagai bidang. Beberapa jenis industri yang memanfaatkan enzim selulase di antaranya industri tekstil, makanan, deterjen, dan kertas.

Aspergillus niger merupakan fungi dari filum ascomycetes yang berfilamen, mempunyai hifa bersekat, dan dapat ditemukan melimpah di alam. Fungi ini biasanya diisolasi dari tanah, sisa tumbuhan, dan udara di dalam ruangan. Koloninya berwarna putih pada *Agar Dekstrosa Kentang* (PDA) 25 °C dan berubah menjadi hitam ketika konidia dibentuk. Kepala konidia dari *Aspergillus niger* berwarna hitam, bulat, cenderung memisah menjadi bagian-bagian yang lebih longgar seiring dengan bertambahnya umur. *Aspergillus niger* dapat tumbuh optimum pada suhu 35-37 °C, dengan suhu minimum 6-8 °C, dan suhu maksimum 45-47 °C. Selain itu, dalam proses pertumbuhannya fungi ini memerlukan oksigen yang cukup (*aerobik*). *Aspergillus niger* memiliki warna dasar berwarna putih atau kuning dengan lapisan konidiospora tebal berwarna coklat gelap sampai hitam.

Fermentasi berasal dari kata latin *fervere* yang berarti mendidih yang menunjukkan adanya aktivitas pada ekstrak buah-buahan atau larutan malt biji-bijian. Kelihatan seperti mendidih karena terbentuknya gelembung-gelembung CO₂ akibat dari proses katabolisme secara anaerobik dari gula yang ada dalam ekstrak. Fermentasi merupakan suatu reaksi reduksi-oksidasi dalam sistem biologi yang menghasilkan energi. Senyawa organik seperti karbohidrat merupakan donor dan aseptor pada proses fermentasi [Winarno, 1984], pada penelitian yang dilakukan senyawa organik yang digunakan adalah selulosa. Fermentasi dibagi menjadi 3, yakni: Fermentasi permukaan, sistem fermentasi cair, sistem fermentasi padat.

Penelitian yang dilakukan menggunakan metode sistem fermentasi padat. Sistem fermentasi padat umumnya diidentikkan dengan pertumbuhan mikroorganisme dalam partikel pada substrat dalam berbagai variasi kadar air. Substrat padat bertindak sebagai sumber karbon, nitrogen, mineral, dan faktor-

faktor penunjang pertumbuhan, dan memiliki kemampuan untuk menyerap air, untuk pertumbuhan mikroba [M. Saban dkk, 2007].

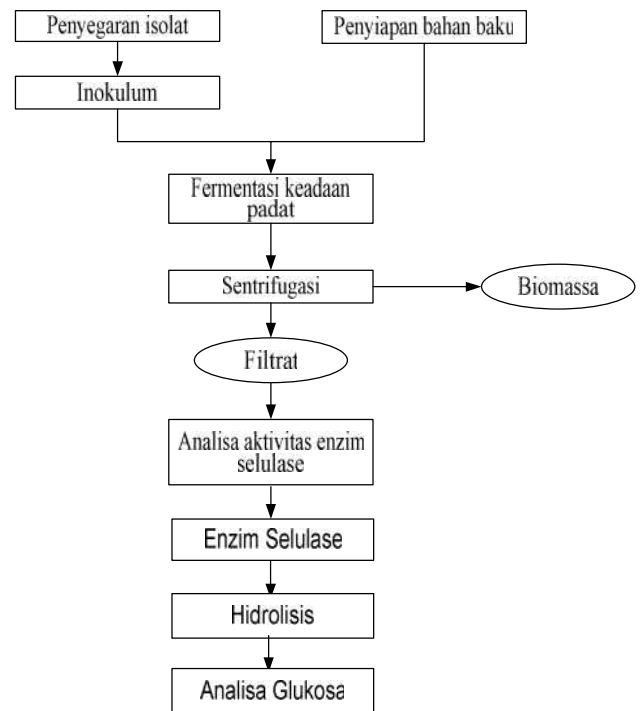
Faktor-faktor yang mempengaruhi proses pertumbuhan fungi : konsentrasi substrat, sumber nitrogen, fosfat, magnesium, aerasi, pH, temperatur inkubasi, waktu fermentasi dan moisture content.

Hidrolisis selulosa secara enzimatis dapat menggunakan enzim selulase yang berasal dari bakteri atau fungi seperti *Aspergillus*, *Rhizopus* dan *Trichoderma* [Lee dkk, 2008] atau dapat diisolasi dari hewan moluska seperti bekicot (*Achtina fulica*).

Spektrofotometer merupakan alat yang digunakan untuk mengukur absorbansi dengan cara melewatkan cahaya dengan panjang gelombang tertentu pada suatu obyek kaca atau kuarsa yang disebut kuvet. Sebagian dari cahaya tersebut akan diserap dan sisanya akan dilewatkan. Nilai absorbansi dari cahaya yang dilewatkan akan sebanding dengan konsentrasi larutan di dalam kuvet

Metodologi

Secara garis besar metodologi penelitian yang digunakan meliputi tahap persiapan bahan baku, pembuatan starter, produksi enzim selulase dan hidrolisis. Gambaran tahapan penelitian dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Diagram Alir Tahapan Penelitian

Prosedur penelitian

1. Penyiapan bahan baku

Kulit nenas diperoleh dari pasar pagi arengka, sebelum digunakan sebagai medium fermentasi kulit nenas dibersihkan, dipotong- potong kemudian diblender. *Aspergillus niger* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Riau.

2. Pembuatan Starter

Pembenihan inokulasi dilakukan pada PDA secara zig-zag dengan menggunakan kawat inokulasi di dalam cawan petri secara aseptik. Mikroba diinkubasi pada suhu ruang (27°C) selama 120 jam.

Setelah pembenihan proses selanjutnya penyiapan inokulum dilakukan dalam media cair (media cair ini terdiri dari sukrosa berupa sari kulit nenas sebanyak 12,5% dari jumlah inokulum atau sekitar 93,75 ml , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,25% (1,875 ml), KH_2PO_4 0,2% (1,5 ml). Api bunsen dan kawat ose disiapkan, pH media cair diatur dengan HCl hingga pH=3. Ujung kawat ose dicelupkan ke dalam

alkohol 96% lalu dipanaskan pada api bunsen sampai berwarna merah. Biakan *Aspergillus niger* dari media PDA diambil dengan menggunakan kawat ose hingga media cair tampak keruh. Media cair ditutup dengan kapas dan diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam (pekerjaan ini dilakukan di ruang aseptik), setelah 24 jam dilakukan pengecekan nilai optikal density (OD) sama dengan 1 dan panjang gelombang absorbansi 540 nm, dilakukan pengecekan pada OD = 1 karena pada nilai inilah fase stasioner terjadi, jumlah mikroorganisme sudah optimum [Brock dkk, 1994].

3. Produksi Enzim Selulase

Substrat kulit nenas yang digunakan dalam penelitian ini komposisinya mengacu pada komposisi yang digunakan oleh Sa'adah (2010), massa sampel (kulit nenas) 100 gram, H₂O (100 ml), Urea (30 mg), MgSO₄.7H₂O (5 mg), KH₂PO₄ (2,3 mg).

Substrat dimasukkan ke dalam *beaker glass* sesuai variabel dengan nutrisi antara lain: urea, MgSO₄.7H₂O, KH₂PO₄, dalam media cair padat. Akuades ditambahkan dalam substrat dengan perbandingan 100 gram kulit nenas dengan 100 ml akuades yang sudah mengandung substrat. pH diatur sesuai dengan variasi pH yang diinginkan 4; 4,5; 5; 5,5; 6. Media yang telah disterilkan kemudian didinginkan. Kemudian suspensi spora ditambahkan dan disebar merata pada media tersebut sesuai dengan variasi inokulum yang diinginkan yaitu 10%, 15%, 20%, 25%, 30%. 10% inokulum maksudnya adalah 10 ml spora dalam 100 gr substrat dengan waktu fermentasi selama 4 hari.

Hasil fermentasi dipisahkan dengan penambahan akuades dengan perbandingan 5 ml akuades per 1 gram massa kemudian di *centrifuge* dengan kecepatan 2500 rpm selama 15 menit. Cairan yang diperoleh kemudian diuji aktivitas enzimnya.

Untuk mengetahui aktivitas enzim yang dihasilkan digunakan kapas sebanyak

1% dari berat crude enzim kemudian dimasukkan dalam *crude* enzim, kemudian kadar glukosa dianalisa dengan metode DNS (*3,5-dinitrosalicylic acid*).

4. Hidrolisis

Sebelum melakukan proses hidrolisis terlebih dahulu dilakukan pengujian kadar glukosa pada substrat yang berupa kulit nenas yang sudah diblender hal ini dilakukan untuk mengetahui kadar glukosa awal sebelum dilakukan proses hidrolisis, setelah diketahui kadar glukosa awal kemudian dilakukan proses hidrolisis dengan cara penambahan 10 ml enzim dengan aktivitas terbaik pada 50 ml substrat kemudian dibiarkan selama 12 jam lalu di cek lagi kadar glukosanya. Pengecekan kadar glukosa menggunakan metode DNS.

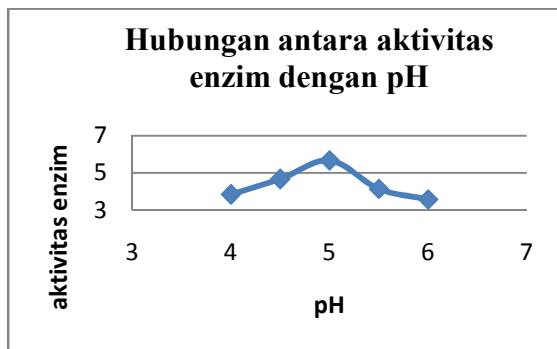
Hasil dan Pembahasan

Hubungan antara aktivitas enzim dengan pH

Penelitian ini dilakukan dengan variabel tetap massa kulit nenas 100 gr, H₂O 100 ml, nutrisi dalam media (urea 30 mg, MgSO₄.7H₂O 5 mg, KH₂PO₄ 7 mg) dengan waktu fermentasi 4 hari dan suhu fermentasi pada suhu ruang. Untuk mengetahui aktivitas enzim yang dihasilkan oleh jamur *aspergillus niger*, dapat dilihat dari kemampuannya untuk menghidrolisa selulosa menjadi glukosa, yang dianalisa dengan menggunakan metoda DNS, aktivitas enzim sebanding dengan glukosa yang dihasilkannya. Hasil secara lengkap disajikan pada tabel 1 dan gambar 3

Tabel 1 Hasil analisa aktivitas enzim pada berbagai variabel

pH	Kadar Glukosa (g/L)				
	Inokulum				
	10 %	15 %	20 %	25 %	30 %
4	3,5	3,84	2,9	2,91	3,3
4,5	4,25	4,667	4,56	4,39	4,09
5	5,27	5,667	5,4	5,33	4,85
5,5	4,2	4,14	4	3,91	3,73
6	3,42	3,58	3,76	3,77	3,91



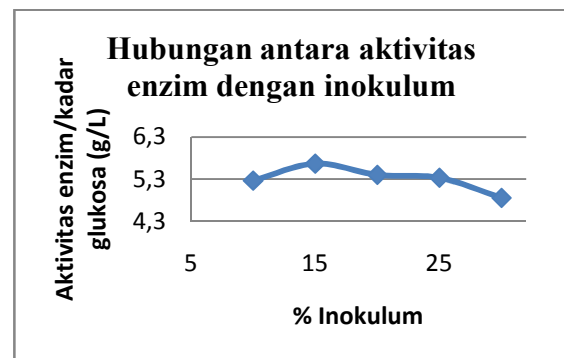
Gambar 3. Hubungan aktivitas enzim dengan pH

Dari gambar dapat dilihat bahwa aktivitas enzim terbaik itu pada pH 5 dengan aktivitas enzim sebesar 5,67 g/L, aktivitas enzim pada pH 4 sampai 5 mengalami kenaikan hal ini sesuai dengan kondisi hidup *aspergillus niger* yang menyukai pH 4,5 - 5,5 [Gandjar, 2006], dari pH 5 sampai pH 6 aktivitas enzim mengalami penurunan hal ini karena perubahan pH dapat menyebabkan terjadinya denaturasi enzim (perubahan struktur enzim) [Martoharsono, 1994]. Denaturasi enzim menyebabkan enzim tidak dapat bekerja secara optimal karena strukturnya mengalami kerusakan. Hal ini sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Lestu, dkk (2010) yang menghidrolisis ampas tebu menjadi glukosa secara enzimatis dan mendapatkan kadar glukosa optimum pada pH 5. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa gula reduksi yang dihasilkan pada pH 5 mempunyai konsentrasi tertinggi dibandingkan dengan pH yang lain. Setiap

protein enzim mempunyai titik kesetimbangan yang berbeda. Muatan enzim akan cenderung positif pada keadaan asam dan negatif pada keadaan basa, sehingga struktur enzim mengalami perubahan dan aktivitasnya menjadi berkurang atau bahkan menjadi tidak aktif. Dengan demikian, tingkat keasaman (pH) dapat mempengaruhi aktivitas enzim dalam mendegradasi substrat [Sukadarti dkk, 2010]. Dapat dikatakan bahwa pH merupakan salah satu faktor yang memiliki potensi untuk mempengaruhi aktivitas enzim, serta sangat erat kaitannya dengan fungsi aktif enzim, kelarutan substrat, dan ikatan enzim-substrat [Pelczar dan Chan, 1986]. Perubahan pH atau pH yang tidak sesuai akan menyebabkan daerah katalitik dan konformasi enzim berubah. Selain itu perubahan pH juga menyebabkan denaturasi enzim dan mengakibatkan hilangnya aktivitas enzim [Girindra,1993].

Hubungan antara aktivitas enzim dengan variasi inokulum

Hubungan antara aktivitas enzim dengan variasi inokulum dapat dilihat pada tabel 1 dan gambar 4



Gambar 4 Hubungan antara aktivitas enzim dengan inokulum pada pH 5

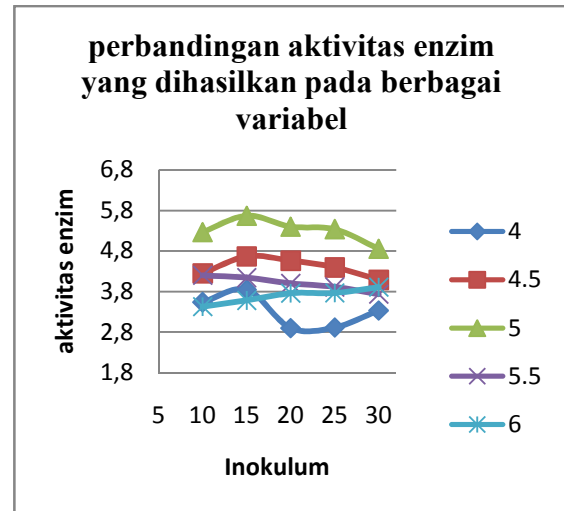
Dari gambar 4 kita dapat melihat bahwa pada inokulum 10% sampai inokulum 15% aktivitas enzim mengalami peningkatan sedangkan pada inokulum 20% sampai 30% mengalami penurunan. Dalam proses fermentasi inokulum yang lebih kecil dari 15% tidak sesuai untuk produksi enzim selulase karena inokulum

yang digunakan jumlahnya tidak optimum sehingga mikroorganisme sulit untuk beradaptasi dimana fase lag (fase penyesuaian bakteri dengan lingkungan yang baru. Lama fase lag pada bakteri sangat bervariasi, tergantung pada komposisi media, pH, suhu, aerasi, jumlah sel pada inokulum awal dan sifat fisiologis mikroorganisme pada media sebelumnya. Ketika sel telah menyesuaikan diri dengan lingkungan yang baru maka sel mulai membelah hingga mencapai populasi yang maksimum) menjadi lebih panjang, berkembang-biakan mikroorganisme menjadi lambat akibatnya biomassa sel yang terbentuk tidak maksimum dalam waktu singkat dan produksi enzim selulase menjadi terhambat. Jika jumlah inokulum lebih besar dari 15% maka akan terjadi kompetisi jamur untuk mendapatkan nutrisi didalam proses fermentasi akibatnya biomassa yang terbentuk tidak maksimum sehingga produksi selulase menjadi berkurang [Septiningrum dkk, 2011]. Dari penelitian ini jumlah inokulum lebih dari 15% menunjukkan jumlah mikroorganisme tidak sebanding dengan ketersediaan substrat hal ini mendorong mikroorganisme yang ada masuk ke fase stasioner (laju pertumbuhan bakteri sama dengan laju kematiannya). Penurunan aktivitas mungkin disebabkan karena kapang memasuki fase stasioner. Dugaan tersebut sejalan dengan pernyataan Nahas (1988) yang menyebutkan bahwa aktivitas enzim akan menurun pada saat kapang memasuki fase stasioner. Hal ini membuktikan konsentrasi inokulum memberikan pengaruh terhadap aktivitas enzim yang diproduksi. Konsentrasi inokulum merupakan faktor yang sangat penting untuk pertumbuhan sel dan pembentukan produksi enzim (Cai *et al.*, 2008).

Hidrolisa kulit nenas menggunakan Crude Enzim Selulase

Penelitian ini dilakukan dengan membandingkan setiap hasil fermentasi yang telah dilakukan, kemudian hasil yang

terbaik (enzim dengan aktivitas tertinggi) digunakan untuk menghidrolisa kulit nenas untuk menghasilkan gula cair. Perbandingan aktivitas enzim pada berbagai variabel dapat dilihat pada gambar 5



Gambar 5 Perbandingan aktivitas enzim yang dihasilkan pada berbagai variabel

Enzim dengan aktivitas yang terbaik kemudian digunakan untuk menghidrolisa substrat kulit nenas dengan penambahan 10 ml *crude* enzim dalam 50 gr substrat. Hidrolisa ini dilakukan untuk mengetahui banyaknya selulosa yang bisa dihidrolisis menjadi glukosa dari substrat kulit nenas dengan menggunakan *crude* enzim yang telah didapatkan dalam penelitian ini dengan aktivitas terbaik. Dengan kadar gula awal sebesar 2,24 gr/L setelah proses hidrolisis didapatkan kadar gula akhir sebesar 6,43 gr/L. Hasil hidrolisa selulosa kulit nenas menjadi glukosa sebesar 4,19 g/L.

Kesimpulan

1. Substrat kulit nenas dapat digunakan untuk memproduksi enzim selulase oleh *aspergillus niger*.
2. pH dan persentase inokulum sangat berpengaruh terhadap aktivitas enzim, kondisi optimum percobaan yang dicapai pada pH 5 dan

konsentrasi inokulum sebesar 15% dengan aktivitas enzim 5,67 g/L.

3. *Crude* enzim yang dihasilkan dapat menghidrolisis selulosa dari substrat kulit nenas menjadi glukosa, kadar glukosa yang dihasilkan sebesar 4,19 g/L.

Saran

Untuk penelitian selanjutnya disarankan agar menganalisa kemungkinan adanya berbagai macam enzim yang terdapat dalam sampel selain enzim selulase.

Ucapan Terimakasih

Ucapan terimakasih ditujukan kepada semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Belitz, H.D., Grosch, W., dan Schieberle, P. 2008. *Food Chemistry*, 4th ed. Berlin: Springer-Verlag. (hal: 327-337)
- Brock, T.D., M.T. Madigan, J.M. Martinko, dan J. Parker. 1994. *Biology of microorganism*. 7th ed. New Jersey: Prentice- Hall.
- Cai, C., B. Lou dan X. Zheng. 2008. Keratinase production and keratin degradation by mutant strains of *Bacillus subtilis*. *Journal of Zhejiang University Science B*. **9**, 60-67.
- Gandjar, I. 2006. *Mikologi Dasar dan Terapan*. Jakarta : Yayasan Obor Indonesia.
- Girindra. Biokimia I, PT Gramedia Pustaka, Jakarta, 1993, p. 91-113
- Lee YK, Lee JH, Lee HK. 2001. Microbial symbiosis in marine sponges. *The J Microbiol* 39:254-264.
- Martoharsono, S. (1994). Biokimia jilid 1. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta
- M. Saban Tanyildizi, Dursun Özer dan Murat Elibol. 2007. *Production of bacterial α -amylase by B. amyloliquefaciens Under Solid Substrate Fermentation*. *Biochemical Engineering Journal* Volume 37, Issue 3, 15 December 2007, Pages 294-297.
- Nahas, E. J. Gen. Mikrobiol. 134 (1988) 227.
- Septiningrum K, Chandra Apriana P. *Produksi xilanase dari tongkol jagung dengan sistem bioproses Menggunakan bacillus circulans untuk pra-pemutihan pulp*. *Jurnal Riset Industri Vol. V, No. 1, 2011*, Hal. 87-97
- Sidharta, F. M. 1989. *Pemanfaatan Limbah Pengolahan Nenas (Ananas comosus L. Merr) Sebagai Bahan Baku Pembuatan Silase Secara Biologis* Skripsi. Bogor: FATETA IPB.
- Sukadarti S, Siti Diyar Kholisoh, Heri Prasetyo, Wasis Pujo Santoso, dan Tri Mursini. 2010. *Produksi Gula Reduksi dari Sabut Kelapa Menggunakan Jamur Trichoderma reesei*. Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia “Kejuangan” Pengembangan Teknologi Kimia untuk Pengolahan Sumber Daya Alam Indonesia Yogyakarta: ISSN 1693 – 4393
- Winarno, F.G., 1984. *Kimia Pangan dan Gizi*. Gramedia. Jakarta