

Evaluasi Perlakuan Pendahuluan Menggunakan Kalsium Hidroksida untuk Biokonversi Jerami Padi Menjadi L-Asam Laktat oleh *Rhizopus oryzae* AT3

Evaluation of Lime Pretreatment for Bioconversion of Rice Straw to L-Lactic Acid by *Rhizopus Oryzae* AT3

Dhina Aprilia Nurani Widyahapsari¹, Retno Indrati², Sigit Setyabudi², Sardjono²

¹Program Studi Magister Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Jl. Flora No.1, Bulaksumur, Yogyakarta 55281, Indonesia

²Departemen Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Jl. Flora No.1, Bulaksumur, Yogyakarta 55281, Indonesia
 Email: dhinaaprilianurani@yahoo.co.id

Submisi: 1 Oktober 2015; Penerimaan: 18 April 2016

ABSTRAK

Polimerisasi asam laktat menjadi *polylactic acid* untuk menghasilkan *biodegradable plastic* membutuhkan asam laktat dengan isomer spesifik. *Rhizopus oryzae* adalah mikroorganisme yang spesifik menghasilkan L-asam laktat. Selain itu *Rhizopus oryzae* dapat menggunakan limbah pertanian seperti jerami padi sebagai substrat. Komponen utama jerami padi merupakan lignoselulosa yang dapat dihidrolisa secara enzimatik menjadi komponen gula sederhana penyusunnya dan selanjutnya dapat dikonversi menjadi L-asam laktat oleh *Rhizopus oryzae*. Namun struktur lignoselulosa sangat kompak dan rapat, sulit untuk dihidrolisa secara enzimatik sehingga diperlukan adanya perlakuan pendahuluan untuk merombak struktur lignoselulosa agar mudah dihidrolisa. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh perlakuan pendahuluan menggunakan kalsium hidroksida ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) terhadap biokonversi jerami padi menjadi L-asam laktat oleh *Rhizopus oryzae* AT3. Perlakuan pendahuluan pada jerami padi dilakukan menggunakan ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) disertai pemanasan suhu 85 °C selama 16 jam. Jerami padi dengan dan tanpa perlakuan pendahuluan dihidrolisa secara enzimatik menggunakan *crude enzyme* yang diproduksi oleh *Trichoderma reesei* Pk1J2. Produksi *crude enzyme* dilakukan dengan fermentasi substrat padat dengan campuran jerami padi dan dedak sebagai substrat. Hidrolisat jerami padi dengan dan tanpa perlakuan pendahuluan selanjutnya difermentasi oleh *Rhizopus oryzae* AT3 menggunakan metode *adsorbed carrier solid state fermentation* dengan *polyurethane foam* (PUF) sebagai bahan pendukung. Perlakuan pendahuluan menggunakan $\text{Ca}(\text{OH})_2$ disertai pemanasan suhu 85 °C selama 16 jam dapat merubah komposisi lignoselulosa jerami padi yaitu dengan melarutkan lignin dan hemiselulosa. Perubahan komposisi lignoselulosa memudahkan kerja *crude enzyme* dalam menghidrolisa jerami padi sehingga menghasilkan gula reduksi lebih tinggi dibandingkan jerami padi tanpa perlakuan pendahuluan. Tingginya gula reduksi tidak serta merta meningkatkan *yield* L-asam laktat yang dihasilkan. Fermentasi hidrolisat jerami padi dengan perlakuan pendahuluan oleh *Rhizopus oryzae* AT3 menghasilkan *yield* L-asam laktat lebih rendah dibandingkan hidrolisat jerami padi tanpa perlakuan pendahuluan. Namun pada jerami padi dengan perlakuan pendahuluan dihasilkan senyawa lain selain asam laktat.

Kata Kunci: *Adsorbed carrier solid state fermentation*; L-asam laktat; perlakuan pendahuluan; *Rhizopus oryzae* AT3; jerami padi

ABSTRACT

L-lactic acid can be used as a precursor of polylactic acid (PLA). PLA is a biodegradable biomaterial commonly used for biodegradable plastics. Lactic acid can be produced from lignocelluloses materials such as rice straw. Rice

straw is composed of cellulose and hemicellulose that can be hydrolyzed to fermentable sugar by cellulolytic and hemicellulolytic enzymes then converted to L-lactic acid by *Rhizopus oryzae*. As most cellulose and hemicellulose present in lignocellulose biomass are not readily accessible for these enzyme, pretreatment is required to alter the structure of lignocellulose substrates. This research aimed to investigate the effect of lime pretreatment on rice straw bioconversion to L-lactic acid by *Rhizopus oryzae* AT3. Rice straw was pretreated with lime (Ca(OH)_2) at 85 °C for 16 hours. Unpretreated and pretreated rice straw were hydrolyzed using crude enzyme that produced by *Trichoderma reesei* Pk1J2. Enzyme production was carried out by solid state fermentation using rice straw and rice brand as substrate. Enzymatic hydrolysis was carried out in flasks. Each flask was added with unpretreated or pretreated rice straw, buffer citrate solution and crude enzyme then hydrolyzed for 0-96 hours. Hydrolysate was fermented by *Rhizopus oryzae* AT3 for 0-6 days by using adsorbed carrier solid-state fermentation method with polyurethane foam as inert support material. Lime pretreatment at 85 °C for 16 hour led to significant solubilisation of lignin and hemicellulose. It involved lignocellulose structure modified that enhance enzymatic hydrolysis and resulted higher reducing sugars than unpretreated rice straw. The high reducing sugars was not related to high lactic acid yields. Fermentation of pretreated rice straw hydrolysate by *Rhizopus oryzae* AT3 did not only produce L-lactic acid but also other compound. On the other hand, fermentation of unpretreated rice straw hydrolysate only produced L-lactic acid.

Keywords: Adsorbed carrier solid-state fermentation; L-lactic acid; pretreatment; *Rhizopus oryzae* AT3; rice straw

PENDAHULUAN

Asam laktat merupakan senyawa asam organik yang dapat dipolimerisasi menjadi *polylactic acid* (PLA). PLA digunakan sebagai prekursor untuk produksi *biodegradable plastic*. *Biodegradable plastic* merupakan plastik yang dapat didegradasi secara biologis dan berpotensi untuk menggantikan plastik yang banyak digunakan saat ini seperti *polyethylene*, *polypropylene* dan *polystyrene*.

Polimerisasi asam laktat menjadi *polylactic acid* untuk menghasilkan *biodegradable plastic* membutuhkan asam laktat dengan isomer spesifik. *Rhizopus oryzae* adalah mikroorganisme yang spesifik menghasilkan L-asam laktat. Menurut Skory (2000), *Rhizopus oryzae* dapat menggunakan pati dan pentosa yang terdapat pada komoditas pertanian untuk menghasilkan L-asam laktat karena hanya memiliki L-laktat dehidrogenase sedangkan bakteri asam laktat memiliki D dan L-laktat dehidrogenase.

Beberapa tahun terakhir berkembang produksi L-asam laktat oleh *Rhizopus oryzae* menggunakan limbah pertanian sebagai substrat. Salah satu limbah pertanian yang potensial untuk produksi L-asam laktat adalah jerami padi. Menurut data yang dihimpun dari Badan Pusat Statistik tahun 2013 (Anonim, 2013), produksi padi Indonesia pada tahun 2013 mencapai 71.279.709 ton/tahun. Menurut Saha (2004) komponen jerami padi berupa lignoselulosa tersusun atas selulosa, hemiselulosa dan lignin serta zat lain. Selulosa dan hemiselulosa dapat dihidrolisa secara enzimatik menjadi komponen gula sederhana penyusunnya. Selanjutnya dapat dikonversi menjadi L-asam laktat oleh *Rhizopus oryzae*. Namun struktur lignoselulosa sangat kompak dan rapat, sulit untuk dihidrolisa secara enzimatik. Oleh karena itu dalam penggunaan bahan lignoselulosa sebagai substrat untuk

produksi L-asam laktat perlu adanya perlakuan pendahuluan yang bertujuan menghilangkan lignin, mematahkan struktur kristalin selulosa serta memutuskan ikatan antara lignin-hemiselulosa-selulosa.

Perlakuan pendahuluan yang berkembang dewasa ini antara lain: mekanis (penggilingan, pemotongan dan iradiasi), kimiawi (larutan asam, alkali dan larutan organik), fisikokimia (uap panas, hidrottermolisis, dan oksidasi) dan juga biologis serta kombinasi dari semuanya (Galbe dan Zacchi, 2007). Perlakuan pendahuluan yang menggabungkan metode kimiawi dengan menggunakan basa berupa kalsium hidroksida (Ca(OH)_2) dan pemanasan merupakan salah satu metode perlakuan pendahuluan yang potensial menghasilkan *yield* gula sederhana yang tinggi dengan pembentukan inhibitor yang minimal (Kaar dan Holtzaple, 2000). Berdasarkan penelitian Baker dkk. (2008) perlakuan pendahuluan menggunakan Ca(OH)_2 disertai pemanasan suhu 85 °C selama 16-20 jam pada jerami gandum tidak signifikan melarutkan lignin, hanya sedikit melarutkan hemiselulosa dan selulosa serta ketika dihidrolisa secara enzimatik sebanyak 93 % glukosa dan 81 % xilosa terhidrolisa menjadi gula sederhana. Selain itu tidak terbentuk furfural maupun hidroksi metil furfural (5-HMF) yang merupakan inhibitor bagi aktivitas mikrobia. Berdasarkan penelitian terdahulu, perlakuan pendahuluan menggunakan Ca(OH)_2 disertai pemanasan efektif dalam meningkatkan produksi gula sederhana dari lignoselulosa, akan tetapi belum ada *literature* yang meneliti pengaruh perlakuan pendahuluan ini pada jerami padi serta pengaruhnya terhadap produksi asam laktat oleh *Rhizopus oryzae*.

Untuk dapat menghasilkan L-asam laktat, hemiselulosa, dan selulosa perlu dihidrolisa terlebih dahulu menjadi komponen gula sederhana penyusunnya. Hidrolisa enzimatik

hemiselulosa dan selulosa dapat menggunakan enzim selulase dan hemiselulase yang dihasilkan oleh mikroorganisme. *Trichoderma reesei* merupakan mikroorganisme yang dapat mensekresikan enzim selulase, amilase, hemiselulase, pendegradasi lignin, peptidase, dan proteinase. Enzim yang paling banyak disekresikan adalah selulase dan hemiselulase (Adav dkk., 2012). Sehingga untuk hidrolisa jerami padi digunakan *crude enzyme* yang diproduksi oleh *Trichoderma reesei*.

Selain hidrolisa, faktor lain yang menjadi perhatian dalam proses biokonversi adalah fermentasi. Pada penelitian ini digunakan metode fermentasi *adsorbed carrier solid-state fermentation* (ACSSF), ACSSF merupakan metode fermentasi menggunakan media cair namun dengan mengkondisikan seperti pada fermentasi substrat padat dengan cara menyerap media cair ke dalam bahan pendukung sehingga tidak ada cairan yang mengalir. Bahan pendukung yang digunakan dalam ACSSF harus tidak berinteraksi dengan mikroorganisme dan tidak merubah karakteristik fermentasi. Salah satu bahan pendukung adalah polyuretane foam (PUF). PUF sangat cocok digunakan sebagai bahan pendukung karena memiliki porositas yang tinggi, densitas rendah, dan kemampuan menyerap air tinggi serta dapat menciptakan kondisi yang baik bagi pertumbuhan jamur (Chen, 2013). Kelebihan ACSSF adalah meningkatkan kecepatan transfer oksigen karena bahan pendukung dapat memperluas permukaan untuk pertumbuhan mikroorganisme (Chen, 2013). Sehingga metode ini sangat sesuai untuk produksi L-asam laktat oleh *Rhizopus oryzae* karena oksigen memiliki peranan sangat penting dalam produksi L-asam laktat oleh jamur seperti *Rhizopus oryzae*. Fermentasi oleh jamur sangat dibatasi oleh difusi oksigen ke dalam lapisan miselia (Zhang dkk., 2007).

Penelitian ini dimaksudkan untuk mengetahui pengaruh perlakuan pendahuluan menggunakan $\text{Ca}(\text{OH})_2$ disertai pemanasan pada suhu 85 °C selama 16 jam terhadap biokonversi jerami padi menjadi L-asam laktat oleh *Rhizopus oryzae* AT3 menggunakan metode *adsorbed carrier solid state fermentation* dengan *polyurethane foam* (PUF) sebagai bahan pendukung.

METODE PENELITIAN

Bahan

Jerami padi berasal dari padi varietas IR 64 yang diperoleh dari Dusun Celungan, Kelurahan Sumberagung, Kecamatan Moyudan, Kabupaten Sleman, Yogyakarta.

Mikroorganisme

Mikroorganisme yang digunakan adalah *Trichoderma reesei* Pk1J2 dan *Rhizopus oryzae* AT3 yang diperoleh

dari Laboratorium Bioteknologi, Departemen Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada.

Preparasi Jerami Padi

Pemotongan jerami padi dengan ukuran $\pm 0,5$ cm kemudian dilakukan pencucian serta pengeringan pada suhu 60 °C hingga kadar air kurang dari 10 %. Potongan jerami padi ini akan dianalisa kadar lignin, hemiselulosa, dan selulosa serta diberi perlakuan pendahuluan.

Perlakuan Pendahuluan

Perlakuan pendahuluan dengan menggunakan kalsium hidroksida ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) disertai pemanasan pada *mild temperature* berdasarkan metode Bakker dkk. (2008) yang dimodifikasi. Perlakuan pendahuluan dilakukan dengan mencampurkan $\text{Ca}(\text{OH})_2$ jerami padi (berdasarkan berat kering) dan aquades dengan perbandingan 1 : 6,67 : 100. Pencampuran menggunakan gelas beker 1 L yang dilengkapi dengan tutup untuk menjaga agar aquades tidak menguap selama pemanasan. Pemanasan dilakukan pada suhu 85 °C selama 16 jam disertai pengadukan setiap satu jam agar transfer panas berjalan baik. Setelah 16 jam dilakukan pencucian secara berulang dengan air mengalir dan penetralan menggunakan larutan asam sulfat 20 %. Selanjutnya dilakukan penyaringan menggunakan kain saring dan pengeringan pada suhu 60 °C hingga kadar air kurang dari 10 %. Jerami padi yang telah mengalami perlakuan pendahuluan dianalisa kadar hemiselulosa, selulosa dan lignin.

Pembuatan Starter *Trichoderma reesei* Pk1J2

Pembuatan starter diawali dengan menumbuhkan *Trichoderma reesei* Pk1J2 pada media PDA (*Potato Dextrose Agar*) pada suhu 30 °C selama 7 hari. Selanjutnya dilakukan pencampuran 100 g beras setengah matang dengan 50 g dedak dan 125 mL aquades. Campuran beras, dedak dan aquades kemudian disterilisasi sebanyak dua kali. Campuran tersebut digunakan sebagai substrat untuk pembuatan starter kering dengan menambahkan 15 mL suspensi spora *Trichoderma reesei* Pk1J2 dengan konsentrasi awal 10^7 spora/mL. Penginkubasian pada suhu 25-26 °C serta kelembaban 90-91 % selama 7 hari. Untuk mendapatkan serbuk starter, dilakukan pengeringan spora yang dihasilkan beserta medianya menggunakan sinar matahari kemudian dihaluskan. Perhitungan jumlah spora starter kering dilakukan dengan melakukan *plating* pada media DRBC (*Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol*).

Pembuatan Starter *Rhizopus oryzae* AT3

Pembuatan starter berdasarkan metode Dong dkk. (1996) yang dimodifikasi, diawali dengan menumbuhkan

Rhizopus oryzae AT3 pada media PDA pada suhu 30 °C selama 7 hari. Setelah itu jumlah spora *viable* dihitung dengan cara *plating* pada media DRBC. Pembuatan starter dilakukan dengan menumbuhkan spora *Rhizopus oryzae* AT3 yang berasal dari media PDA pada media yang dalam setiap liter terdiri atas 50 g glukosa; 2,5 g (NH₄)₂SO₄; 0,13 g MgSO₄·7H₂O; 0,045 g ZnSO₄·7H₂O; 0,3 g K₂HPO₄ dan 15 g CaCO₃. Selanjutnya dilakukan pensterilisasian sebanyak 35 ml media starter beserta 20 potongan *polyurethane foam* (PUF) dengan dimensi 1 × 1 × 1 cm dalam erlenmeyer 250 ml. Penginokulasian 6 × 10⁶ spora *Rhizopus oryzae* AT3 dalam media starter. Penginkubasian dengan *shaker* 125 rpm pada suhu ruang selama 24 jam. Penyaringan dengan kondisi aseptis dan pencucian dengan aquades steril sehingga diperoleh starter *Rhizopus oryzae* AT3 dalam potongan PUF.

Produksi Enzim

Produksi enzim berdasarkan metode Xia dan Cen (1999) yang dimodifikasi. Produksi enzim menggunakan fermentasi substrat padat dalam wadah plastik volume 250 ml dengan komposisi media terdiri atas (% berat kering): jerami padi (20 mesh) 66; dedak 30; (NH₄)₂SO₄ 2; urea 0,5; KH₂PO₄ 0,5; MgSO₄·7H₂O 0,5; CaCl₂ 0,45 dan COCl₂ 0,05. Selanjutnya pH awal media diatur pada 5 ± 0,2 dan kadar air awal 70 % kemudian disterilisasi. Penginokulasian starter kering *Trichoderma reesei* Pk1J2 sebanyak 3 × 10⁶ spora/g berat kering substrat pada media produksi enzim. Penginkubasian pada suhu 25-26 °C dan kelembaban 90-91 % selama 1-7 hari. Setiap hari dilakukan pemanenan dengan menambahkan buffer sitrat 0,05 M pH 4,8 suhu 5 °C kemudian dilakukan pengadukan perlahan selama 10 menit serta penyaringan dengan kain saring. Filtrat yang diperoleh disentrifugasi pada suhu 4 °C dan 5000 rpm selama 20 menit. Supernatan yang diperoleh merupakan *crude enzyme* yang akan dianalisa aktivitas enzim selulase dan xilanase. Selain aktivitas enzim dilakukan pula analisa laju kehilangan berat kering substrat selama fermentasi.

Hidrolisa Enzimatis

Hidrolisa enzimatis berdasarkan metode Maryna (2005) yang dimodifikasi. Hidrolisa dilakukan pada erlenmeyer 100 mL dengan menambahkan 3 g (berat kering) jerami padi dengan atau tanpa perlakuan pendahuluan yang berukuran 60 mesh dan *crude enzyme* dengan aktivitas enzim xilanase 1500 U dan aktivitas enzim selulase 1,34 U. Selanjutnya dilakukan penambahan 0,05 M buffer sitrat pH 4,8 hingga volume keseluruhan sistem 30 mL atau konsentrasi substrat dalam campuran 10 % (b/v). Penginkubasian menggunakan *waterbath shaker* 100 rpm pada suhu 50 °C selama 0, 24, 48, 72, dan 96 jam. Selanjutnya dilakukan penyaringan untuk memisahkan hidrolisat dengan substrat yang telah terhidrolisa.

Hidrolisat yang diperoleh dianalisa kandungan gula reduksi menggunakan 3,5 asam dinitrosalisilat (DNS).

Fermentasi L-Asam Laktat oleh *Rhizopus oryzae* AT3

Fermentasi asam laktat oleh *Rhizopus oryzae* AT3 menggunakan metode *adsorbed carrier solid state fermentation* dengan *polyurethane foam* (PUF) sebagai bahan pendukung. Prosedur fermentasi asam laktat berdasarkan metode Dong dkk. (1996) yang dimodifikasi. Pertama sisa substrat jerami padi dengan atau tanpa perlakuan pendahuluan yang telah terhidrolisa beserta 10 potongan PUF dengan dimensi 1 × 1 × 1 cm dimasukan dalam wadah plastik yang berukuran 250 mL kemudian disterilisasi.

Di lain sisi dilakukan penambahan mineral pada hidrolisat jerami padi dengan atau tanpa perlakuan pendahuluan dengan komposisi mineral setiap liter hidrolisat terdiri atas 1,9 g (NH₄)₂SO₄; 0,094 g MgSO₄·7H₂O; 0,03 g ZnSO₄·7H₂O; 0,23 g K₂HPO₄ dan 20 g CaCO₃. Pensterilisasian sebanyak 20 ml larutan hidrolisat serta pengkondisian agar pH awal 6. Pencampuran larutan hidrolisat dengan sisa substrat jerami padi dengan atau tanpa perlakuan pendahuluan beserta potongan PUF yang telah disiapkan sebelumnya. Penambahan starter *Rhizopus oryzae* AT3 serta penginkubasian pada suhu 27-28 °C RH 90-91 % selama 0-6 hari. Setiap hari dianalisa gula reduksi yang dikonsumsi, asam laktat yang dihasilkan dan berat kering sel pada 0, 2, 4, dan 6 hari fermentasi. Ekstraksi produk dilakukan dengan menyaring menggunakan kertas saring kemudian filtrat disentrifugasi 4000 rpm selama 10 menit.

Analisa

Analisa kandungan hemiselulosa, selulosa, dan lignin dilakukan pada jerami padi sebelum dan setelah perlakuan pendahuluan serta setelah hidrolisa enzimatis. Analisa kandungan hemiselulosa, selulosa, dan lignin dilakukan dengan menggunakan metode Chesson yang telah dimodifikasi menurut Datta (1981).

Analisa aktivitas enzim selulase dilakukan dengan Filter Paper Activity (FPA) berdasarkan metode Ghose (1987), sedangkan aktivitas enzim xilanase diukur dengan metode Bailey dkk. (1992). Selain aktivitas enzim dilakukan pula analisa kehilangan berat kering substrat. Analisa berat kering substrat dilakukan dengan menimbang substrat sebelum dan setelah fermentasi serta kadar air keduanya (Smits dkk., 1996). Kehilangan berat kering berkaitan dengan aktivitas metabolisme mikroorganisme yang didasarkan pada aktivitas degradasi bahan kering.

Analisa gula reduksi dilakukan pada hidrolisat untuk mengetahui efektifitas dari hidrolisa enzimatis. Analisa gula reduksi menggunakan 3,5 asam dinitrosalisilat (DNS)

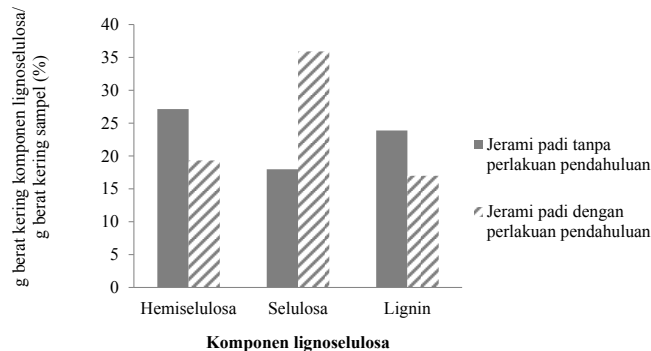
berdasarkan metode Miller (1959). Selanjutnya analisa produk hasil fermentasi dilakukan menggunakan HPLC berdasarkan metode Ahmed dkk. (2014) yang dimodifikasi. HPLC yang digunakan Shimadzu 10 A VP dengan kolom C 18 dengan fase gerak berupa campuran buffer $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-H}_3\text{PO}_4$ 50 mM pH 2,5 dan asetonitril (90:10 v/v), oven suhu 30 °C, kecepatan aliran 1 mL/menit, panjang gelombang 254 nm dan volume sampel yang diinjeksikan 20 μ L, detektor diodex 2. Selain produk hasil fermentasi dilakukan pula analisa berat kering sel *Rhizopus oryzae* AT3. Analisa berat kering sel berdasarkan metode Maas dkk. (2008a) untuk mengetahui pola pertumbuhan *Rhizopus oryzae* AT3.

$$\text{Yield asam laktat } \left(\frac{g}{g}\right) = \frac{\text{Konsentrasi produk berdasarkan HPLC} \left(\frac{g}{L}\right) \times \text{volume sampel (mL)}}{\text{berat kering awal jerami padi (g)} \times 1000 \left(\frac{mL}{L}\right)}$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Lignoselulosa Jerami Padi Sebelum dan Setelah Perlakuan Pendahuluan

Berdasarkan Gambar 1 diketahui perlakuan pendahuluan mengakibatkan perubahan komposisi lignoselulosa. Perlakuan pendahuluan mampu melarutkan lignin dan hemiselulosa dengan kelarutan masing-masing sebesar 7,68 % dan 8,68 % namun disisi lain terjadi peningkatan persentase selulosa. Larutnya lignin dan hemiselulosa akibat adanya delignifikasi dan deasetilasi selama perlakuan pendahuluan. Menurut Mosier dkk. (2005) perlakuan pendahuluan dengan menggunakan kalsium hidroksida akan berdampak signifikan pada perubahan struktur lignin. Menurut Rabelo dkk. (2009) perlakuan pendahuluan dengan kalsium hidroksida mampu melarutkan 33 % lignin dan 100 % gugus asetil. Menurut Kim dan Holtzaple (2005) larutnya lignin disebabkan oleh adanya reaksi antara ion hidroksida (OH-) dengan gugus fungsional pada lignin seperti gugus fenolik dan ester sehingga menyebabkan pemutusan ikatan rantai pada lignin dan terlarutnya lignin. Sedangkan kenaikan



Gambar 1. Pengaruh perlakuan pendahuluan terhadap komposisi lignoselulosa jerami padi

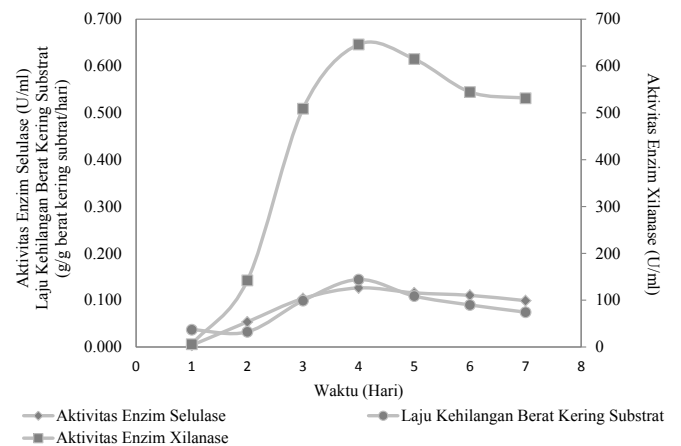
persentase komponen selulosa disebabkan keberadaannya dalam struktur lignoselulosa yang terlindungi oleh lignin dan hemiselulosa. Selain itu menurut Chum dkk. (1985) selulosa terdiri atas 85 % struktur kristalin dan 15 % struktur amorf. Struktur kristalin adalah struktur yang rapat dan teratur yang menyebabkan komponen molekul dalam mikrofibril terkemas secara rapat sehingga sulit untuk dihidrolisa. Oleh karena itu keberadaan selulosa dalam lignoselulosa dapat dipertahankan dan hilangnya bahan-bahan lain selain selulosa selama perlakuan pendahuluan memberi kontribusi yang cukup tinggi terhadap kenaikan persentase selulosa dalam bahan.

Produksi Enzim oleh *Trichoderma reesei* Pk1J2

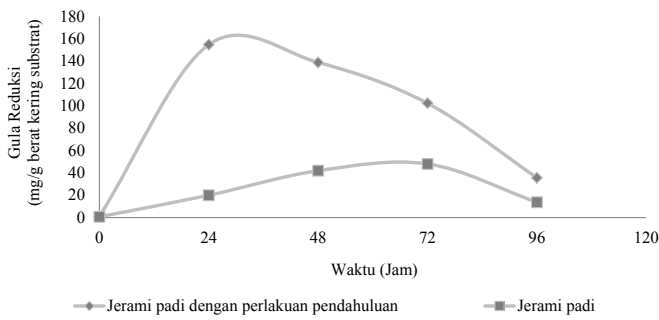
Berdasarkan Gambar 2 diketahui aktivitas enzim dan laju kehilangan berat kering substrat menunjukkan peningkatan sangat tajam mulai hari ke 2 sampai hari ke 4 fermentasi. Laju kehilangan berat kering substrat berkaitan dengan aktivitas metabolisme mikroorganisme yang didasarkan pada aktivitas degradasi bahan kering. Sehingga dapat diketahui bahwa pada hari ke 2 sampai hari ke 4 fermentasi *Trichoderma reesei* Pk1J2 berada pada fase eksponensial pertumbuhannya. Selain itu pada hari ke 4 fermentasi juga menunjukkan aktivitas enzim tertinggi dengan aktivitas enzim selulase 0,126 U/mL dan aktivitas enzim xilanase 646,21 U/mL. Menurut Kheng dan Omar (2005) serta Kulkarni dkk. (1999) produksi enzim xilanase berlangsung seiring dengan pertumbuhan jamur dan xilanase diekspresikan secara maksimal pada akhir fase eksponensial. Dengan demikian waktu yang optimum untuk produksi enzim oleh *Trichoderma reesei* Pk1J2 menggunakan substrat jerami padi dan dedak adalah selama 4 hari fermentasi.

Hidrolisa Enzimatis

Pengaruh perlakuan pendahuluan terhadap hidrolisa enzimatis jerami padi dianalisa berdasarkan kadar gula



Gambar 2. Pola produksi enzim oleh *Trichoderma reesei* Pk1J2



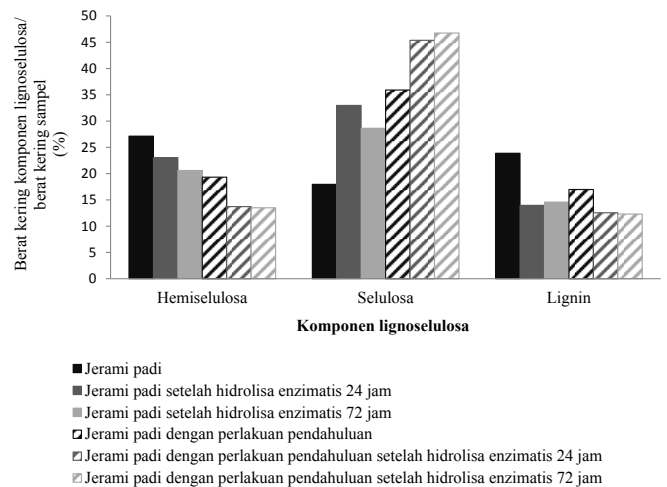
Gambar 3. Gula reduksi hasil hidrolisa enzimatik jerami padi dengan dan tanpa perlakuan pendahuluan

reduksi yang dihasilkan selama hidrolisa. Berdasarkan Gambar 3 diketahui bahwa hidrolisa enzimatik jerami padi dengan perlakuan pendahuluan menghasilkan gula reduksi tertinggi sebesar 154,74 mg/g berat kering substrat dalam waktu 24 jam. Sedangkan pada jerami padi tanpa perlakuan pendahuluan gula reduksi tertinggi yang dihasilkan sebesar 48,01 mg/g berat kering substrat dalam waktu 72 jam. Hasil tersebut menunjukkan bahwa perlakuan pendahuluan dapat meningkatkan kemampuan hidrolisa enzimatik hingga tiga kali lipat. Selain itu hasil tersebut juga menunjukkan hilangnya komponen lignin dan gugus asetil pada jerami padi dengan perlakuan pendahuluan dapat memperluas permukaan substrat sehingga mempermudah akses enzim terhadap substrat. Sedangkan pada jerami padi tanpa perlakuan pendahuluan akses enzim terhadap substrat terhambat oleh adanya komponen lignin sehingga hidrolisa enzimatik berjalan lambat. Selain itu keberadaan lignin yang dapat berinteraksi dengan protein menyebabkan terjadinya penurunan aktivitas enzim (Yang dan Wyman, 2006).

Berdasarkan Gambar 3 juga diketahui bahwa setelah gula reduksi mencapai titik optimum kemudian mengalami penurunan. Penurunan gula reduksi terjadi kemungkinan karena gula reduksi dimanfaatkan oleh mikroorganisme mengingat enzim yang digunakan pada proses hidrolisa enzimatik bukan enzim murni melainkan *crude enzyme* sehingga kemungkinan masih terdapat spora ataupun mikroorganisme didalamnya.

Lignoselulosa Jerami Padi dengan dan Tanpa Perlakuan Pendahuluan Setelah Hidrolisa Enzimatik

Berdasarkan Gambar 4 diketahui jerami padi dengan dan tanpa perlakuan pendahuluan setelah dihidrolisa secara enzimatik selama 24 jam dan 72 jam mengalami penurunan persentase hemiselulosa dan lignin. Pada hidrolisa enzimatik jerami padi tanpa perlakuan pendahuluan, *crude enzyme* lebih aktif mendegradasi komponen lignin dibandingkan komponen lignoselulosa lainnya dikarenakan kandungan lignin jerami

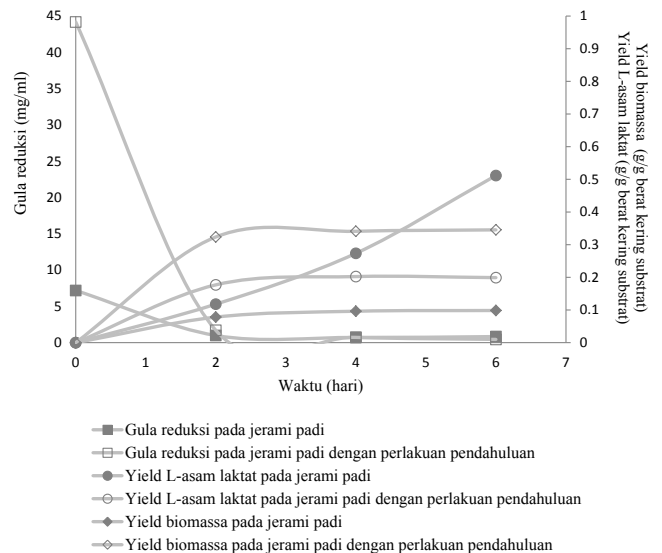


Gambar 4. Lignoselulosa jerami padi dengan dan tanpa perlakuan pendahuluan setelah hidrolisa enzimatik

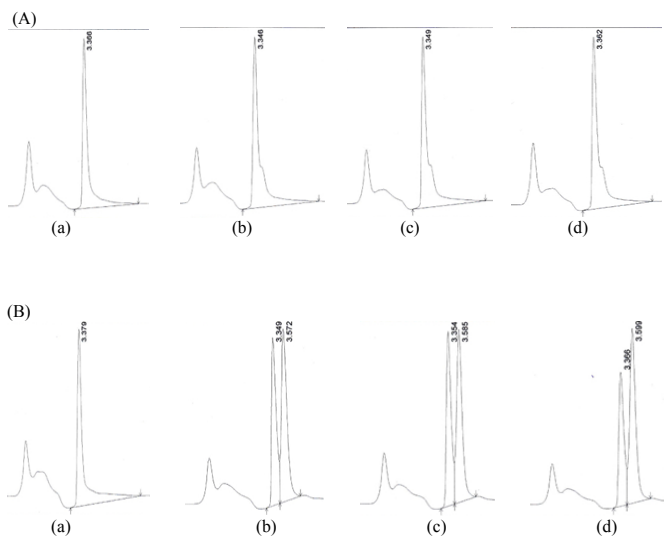
padi yang masih cukup tinggi menjadi penghambat bagi akses enzim terhadap hemiselulosa dan selulosa. Sedangkan pada hidrolisa enzimatik jerami padi dengan perlakuan pendahuluan, *crude enzyme* lebih aktif dalam mendegradasi hemiselulosa dikarenakan larutnya lignin selama perlakuan pendahuluan sehingga *crude enzyme* dapat langsung menghidrolisa hemiselulosa.

Fermentasi L-Asam Laktat oleh *Rhizopus oryzae* AT3

Berdasarkan Gambar 5 diketahui fermentasi hidrolisat jerami padi tanpa perlakuan pendahuluan oleh *Rhizopus oryzae* AT3 menghasilkan *yield* L-asam laktat lebih tinggi dibandingkan pada fermentasi hidrolisat jerami padi dengan perlakuan pendahuluan. Namun berdasarkan kromatogram (Gambar 6), fermentasi hidrolisat jerami padi dengan



Gambar 5. Kinetika fermentasi asam laktat oleh *Rhizopus oryzae* AT3



Gambar 6. Kromatogram hasil fermentasi jerami padi tanpa perlakuan pendahuluan (A) dan jerami padi dengan perlakuan pendahuluan (B). (a) fermentasi 0 hari, (b) fermentasi 2 hari, (c) fermentasi 4 hari dan (d) fermentasi 6 hari. L-asam laktat memiliki waktu retensi 3,3 menit

perlakuan pendahuluan menghasilkan senyawa lain selain L-asam laktat. Sedangkan fermentasi hidrolisat jerami padi tanpa perlakuan pendahuluan tidak dihasilkan senyawa lain. Berdasarkan kromatogram diketahui senyawa lain yang dihasilkan memiliki waktu retensi lebih lama dan luas area *peak* cukup luas namun tidak dilakukan analisa lebih lanjut untuk mengetahui jenis senyawa tersebut. Adanya senyawa lain yang dihasilkan pada fermentasi jerami padi dengan perlakuan pendahuluan kemungkinan dikarenakan penggunaan *crude enzyme* serta adanya perubahan komposisi lignoselulosa setelah perlakuan pendahuluan menyebabkan akses enzim terhadap substrat menjadi lebih mudah dan menghasilkan produk hidrolisa yang beragam. Sehingga ketika difermentasi oleh *Rhizopus oryzae* AT3 dihasilkan pula senyawa selain asam laktat.

Berdasarkan Gambar 5 juga diketahui bahwa pada fermentasi hidrolisat jerami padi tanpa perlakuan pendahuluan oleh *Rhizopus oryzae* AT3 menghasilkan pertumbuhan biomassa rendah dengan *yield* L-asam laktat tinggi. Sedangkan fermentasi hidrolisat jerami padi dengan perlakuan pendahuluan oleh *Rhizopus oryzae* AT3 menghasilkan pertumbuhan biomassa tinggi dengan *yield* L-asam laktat rendah. Hasil ini menunjukkan gula reduksi yang tinggi pada hidrolisat jerami padi dengan perlakuan pendahuluan selama fermentasi banyak terkonversi menjadi biomassa. Gula reduksi yang digunakan merupakan hasil hidrolisa enzimatis jerami padi dengan perlakuan pendahuluan oleh *crude enzyme* yang memiliki aktivitas enzim xilanase yang tinggi. Sehingga kemungkinan gula

reduksi yang dihasilkan didominasi oleh xilosa. Selain itu C/N rasio pada jerami padi dengan perlakuan pendahuluan lebih tinggi dibandingkan tanpa perlakuan pendahuluan. Menurut Maas dkk. (2008a) dan (2008b) *Rhizopus oryzae* yang ditumbuhkan pada xilosa dan C/N yang tinggi membutuhkan respirasi untuk menyeimbangkan kofaktor NADH dan NAD⁺ yang berperan dalam mengkonversi xilitol menjadi xilulosa. Kebutuhan energi respirasi yang lebih rendah dibandingkan produksi asam laktat menyebabkan sumber karbon lebih banyak mengarah pada pembentukan biomassa dibandingkan asam laktat. Menurut Maas (2008b) pertumbuhan biomassa berdampak negatif terhadap L-asam laktat yang dihasilkan seperti terlihat pada fermentasi glukosa oleh *Rhizopus oryzae* menghasilkan biomassa 0,03-0,06 g/g dan L-asam laktat 0,7-0,8 g/g. Sedangkan pada fermentasi xilosa oleh *Rhizopus oryzae* menghasilkan biomassa yang lebih tinggi dari glukosa dan L-asam laktat yang rendah 0,55-0,65 g/g.

KESIMPULAN

Perlakuan pendahuluan dengan kalsium hidroksida (Ca(OH)₂) disertai pemanasan pada suhu 85 °C selama 16 jam pada jerami padi cukup potensial dilihat dari gula reduksi yang dihasilkan selama hidrolisa enzimatis akan tetapi penggunaan *crude enzyme* serta adanya perubahan komposisi lignoselulosa setelah perlakuan pendahuluan menyebabkan akses enzim terhadap substrat menjadi mudah dan menghasilkan produk hidrolisa yang beragam. Sehingga ketika difermentasi oleh *Rhizopus oryzae* AT3 dihasilkan pula senyawa selain asam laktat sedangkan pada fermentasi hidrolisat jerami padi tanpa perlakuan pendahuluan tidak dihasilkan senyawa lain.

DAFTAR PUSTAKA

- Adav, S.S., Chao, L.T. dan Sze, S.K. (2012). Quantitative secretomic analysis of *Trichoderma reesei* strains reveals enzymatic composition for lignocellulosic biomass degradation. *Molecular and Cellular Proteomics* **11**(7): M111.012419-1.
- Ahmed, M., Qadir, M.A., Shahzad, S., Waseem, R. dan Tahir, M.S. (2014). Validation of UV-HPLC method for simultaneous quantification of organic acids in disinfectants for haemodialysis machines. *International Journal of Chemistry and Pharmaceutical Sciences* **2**(1): 536-540.
- Anonim (2013). Produksi tanaman padi seluruh Indonesia tahun 2013. www.bps.go.id. [25 Juni 2014].
- Bailey, M.J., Biely, P. dan Poutanen, K. (1992). Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology* **23**: 257-270.

- Bakker, R.R., Maas, R.H.W., Kabel, M.A., Weusthuis, R.A., Schols, H.A. dan de Jong, Ed. (2008). Mild-temperature alkaline pretreatment of wheat straw to enhance hydrolysis and fermentation. Dalam: Maas, R.H.W. *Microbial Conversion of Lignocellulose-Derived Carbohydrates into Bioethanol and Lactic Acid*, hal 29-46. Thesis Wageningen University, Netherland.
- Chen, H. (2013). *Modern Solid State Fermentation*. Springer Science Business Media.
- Datta, R. (1981). Acidogenic fermentation of lignocellulose-acid yield and conversion of component. *Biotechnology and Bioengineering* **23**: 2167-217.
- Dong, X.-Y., Bai, S. dan Sun, Y. (1996). Production of L(+)-lactic acid with *Rhizopus oryzae* immobilized in polyurethane foam cubes. *Biotechnology Letters* **18**(2): 225-228.
- Galbe dan Zacchi. (2007). Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. **108**: 41-65.
- Ghose, T.K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry* **59**(2): 257-268.
- Kaar dan Holtzaple (2000). Using lime pretreatment to facilitate the enzymic hydrolysis of corn stover. *Biomass and Bioenergy* **18**: 189-199.
- Kheng, P.P. dan Omar, I.C (2005). Xylanases production by local fungal isolate, *Aspergillus niger* USM AI 1 via solid state fermentation using palm kernel cake (PKC) as substrate. *Songklanakarinn Journal Science Technology* **27**: 325-336.
- Kim, S. dan Holtzaple, M.T. (2005). Lime pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover. *Bioresource Technology* **96**(18): 1994-2006.
- Kulkarni., N.A Shendey dan Rao, M. (1999). Molecular and biotechnology aspect xylanases. *FEMS Microbiology Review* **23**(4): 411-456.
- Maas, R.H.W., Bakker, R.R., Eggink, G. dan Weusthuis, R.A. (2008a). Lactic acid production from xylose by the fungus *Rhizopus oryzae*. Dalam: Maas, R.H.W. *Microbial Conversion of Lignocellulose-Derived Carbohydrates into Bioethanol and Lactic Acid*, hal 47-61. Thesis Wageningen University, Netherland.
- Maas, R.H.W., Springer, J., Eggink, G. dan Weusthuis, R.A. (2008b). Xylose metabolism in the fungus *Rhizopus oryzae*: effect of growth and respiration on L(+)-lactic acid production. Dalam: Maas, R.H.W. *Microbial Conversion of Lignocellulose-Derived Carbohydrates into Bioethanol and Lactic Acid*, hal 63-80. Thesis Wageningen University, Netherland.
- Maryna, L. (2005). *Seleksi Jamur Xilanolitik dan Pemanfaatannya pada Biodegradasi Tandan Kosong Kelapa Sawit untuk Produksi Xilosa*. Thesis Program Studi Ilmu dan Teknologi Pangan. Fakultas Teknologi Pertanian. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* **31**: 426-428.
- Mosier, N., Wayman, C.E., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzaple, M.T. dan Ladisch, M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource and Technology* **96**: 673-686.
- Rabelo, Sarita, C., Filho, M.R. dan Costa, A.C. (2009). Lime pretreatment of sugarcane bagasse for bioethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **153**: 139-150.
- Saha (2004). *Lignocellulose Biodegradation and Applications in Biotechnology*. Fermentation Biotechnology Research Unit, National Center for Agricultural Utilization Research, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture.
- Smits, J.P., Rinzema, A., Tramper, J., Van Sonsbeek, H.M. dan Knol, W. (1996). Solid state fermentation of wheat bran by *Trichoderma reesei* QM 3494: Substrate composition changes, C balance, enzyme production and kinetics. *Applied Microbiology and Biotechnology* **46**: 489-496.
- Skory, C.D. (2000). Isolation and expression of lactate dehydrogenase genes from *Rhizopus oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology* **66**(6): 2343-2348.
- Xia, L. dan Cen, P. (1999). Cellulase production by solid state fermentation on lignocellulosic waste from the xylose industry. *Process Biochemistry* **14**: 909-912.
- Yang, B. dan Wyman, C. (2006). BSA treatment to enhance enzymatic hydrolysis of cellulose in lignin containing substrat. *Biotechnology and Bioengineering* **94**: 611-617.
- Zhang, Z.Y., Jin, B. dan Kelly, J.M. (2007). Production of lactic acid from renewable materials by *Rhizopus* fungi. *Biochemical Engineering Journal* **35**: 251-263.