



Aktivitas *Trichoderma viride* Fnc6013 dalam Menghidrolisis Kulit Pisang Raja (*Musa Paradisiaca L. Var. Sapientum*) dengan Variasi Waktu Fermentasi

Sandi Sutopo Aribowo^a, Purbowatiningrum Ria Sarjono^{a*}, Nies Suci Mulyani^a

^a Biochemistry Laboratory, Chemistry Department, Faculty of Sciences and Mathematics, Diponegoro University, Jalan Prof. Soedarto, Tembalang, Semarang

* Corresponding author: purbowatining@live.undip.ac.id

Article Info	Abstract
<p>Keywords: <i>Trichoderma viride</i>, plantain peel, cellulose, cellulase enzyme</p>	<p><i>Trichoderma viride</i> is a cellulolytic fungus that produces a cellulase complex enzyme that can hydrolyze chemical bonds from cellulose to glucose. <i>Trichoderma viride</i> activity is affected by fermentation time. This study aims were to obtain <i>Trichoderma viride</i> which has been adapted to the banana peel fermentation media and to obtain data of reducing sugar content from <i>Trichoderma viride</i> activity in hydrolyzing banana peel at variation of fermentation time. The research stages consisted of delignification of banana peel, tool and material sterilization, preparation of fermentation media, <i>Trichoderma viride</i> mushroom rejuvenation, and <i>Trichoderma viride</i> activity test in hydrolyzing banana peel with variation of fermentation time. <i>Trichoderma viride</i> could grow on the banana skin fermentation medium. <i>Trichoderma viride</i> activity in hydrolyzing banana peel reached optimum at 7 day fermentation time with reducing sugar content 41.40 mg/L</p>
<p>Kata kunci: <i>Trichoderma viride</i>, kulit pisang raja, selulosa, enzim selulase</p>	<p>Abstrak</p> <p><i>Trichoderma viride</i> merupakan jamur selulolitik yang menghasilkan enzim kompleks selulase yang dapat menghidrolisis ikatan kimia dari selulosa menjadi glukosa. Aktivitas <i>Trichoderma viride</i> dipengaruhi oleh waktu fermentasi. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan <i>Trichoderma viride</i> yang telah diadaptasikan pada media fermentasi kulit pisang raja dan memperoleh data kadar gula pereduksi dari aktivitas <i>Trichoderma viride</i> dalam menghidrolisis kulit pisang raja pada variasi waktu fermentasi. Tahapan penelitian terdiri dari delignifikasi kulit pisang raja, sterilisasi alat dan bahan, pembuatan media fermentasi, peremajaan jamur <i>Trichoderma viride</i>, dan uji aktivitas <i>Trichoderma viride</i> dalam menghidrolisis kulit pisang raja dengan variasi waktu fermentasi. <i>Trichoderma viride</i> dapat tumbuh pada media fermentasi kulit pisang raja. Aktivitas <i>Trichoderma viride</i> dalam menghidrolisis kulit pisang raja optimum pada waktu fermentasi hari ke-7 dengan kadar gula pereduksi sebesar 41,40 mg/L</p>

1. Pendahuluan

Selulosa adalah karbohidrat paling melimpah dan sering ditemukan di alam [1]. Selulosa sebagai komponen utama dinding sel tumbuhan, yang merupakan polisakarida yang dapat dipakai sebagai sumber bioenergi yang hampir tidak pernah habis dan mudah diperbarui [2]. Komposisi selulosa dalam tumbuhan dapat mencapai 40-50% dari masa tumbuhan [3].

Selulosa terdiri atas monomer glukosa yang dihubungkan dengan ikatan β -1,4-glikosida; [1, 2, 4]. Dengan menghidrolisis ikatan glikosida dapat diperoleh glukosa yang kemudian diharapkan dapat digunakan untuk berbagai tujuan, seperti produksi sirup gula, asam organik [5].

Salah satu tanaman yang mengandung selulosa adalah kulit pisang. Berdasarkan data produksi pisang

dari BPS menunjukkan peningkatan produksi pisang yang meningkat secara signifikan dari tahun 2003 sampai 2011 dengan jumlah 4.177.155 ton menjadi 6.132.695 ton per tahun (BPS, 2012) dan kira-kira 1/3 dari bobot tersebut merupakan limbah kulit pisang. Pisang raja mempunyai kulit yang tebal dibandingkan kulit pisang yang lain, sehingga memiliki potensi pati yang cukup besar. Pemanfaatan buah pisang raja di masyarakat hanya sebatas pada daging buahnya saja, padahal kulit pisang juga mempunyai potensi yang cukup besar. Pada umumnya kulit pisang belum dimanfaatkan secara nyata, hanya dibuang sebagai sampah. Kandungan kulit pisang raja adalah sebagai berikut: air 11,46%, selulosa 13,53%, lignin 32,24% [6].

Proses hidrolisis selulosa dapat dilakukan dengan hidrolisis asam encer (dilute-acid hydrolysis), hidrolisis asam pekat (concentrated acid hydrolysis), dan hidrolisis enzimatis (enzymatic hydrolysis) [7]. Hidrolisis dengan asam memiliki kelemahan karena bersifat sangat korosif. Hidrolisis enzimatis lebih menguntungkan karena kondisi proses lebih lunak (temperatur rendah, pH netral) selain itu berpotensi memberikan hasil yang tinggi, dan biaya pemeliharaan peralatan relatif rendah karena tidak ada bahan yang korosif [8]. Hidrolisis selulosa secara enzimatis dapat dilakukan dengan bantuan mikroorganisme selulolitik salah satunya adalah *Trichoderma viride*.

Trichoderma viride merupakan jamur selulolitik yang menghasilkan enzim kompleks selulase yang dapat menghidrolisis ikatan kimia dari selulosa menjadi glukosa. Enzim ini berfungsi sebagai agen pengurai yang spesifik untuk menghidrolisis ikatan kimia dari selulosa dan turunannya. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Kamara dkk. [9], *Trichoderma viride* mampu menghidrolisis selulosa pada batang pisang dan menghasilkan glukosa dalam jumlah yang tinggi sebesar 0,5676 mg/mL. *Trichoderma viride* mampu menghidrolisis selulosa pada media modifikasi eceng gondok menghasilkan glukosa dalam jumlah yang tinggi pada jam ke-96 sebesar 1,3864 mg/mL pada temperatur fermentasi 35°C [10].

Dalam melakukan aktivitasnya, *Trichoderma viride* sebagai penghasil enzim selulase dipengaruhi oleh faktor lingkungan seperti temperatur, pH, kandungan nutrisi, agitasi dan waktu fermentasi. Waktu fermentasi merupakan waktu yang diperlukan oleh *Trichoderma viride* untuk menghasilkan enzim selulase dan membentuk produk hidrolisis. Berdasarkan penjelasan tersebut maka diperlukan waktu fermentasi optimum bagi *Trichoderma viride* yang aktivitasnya ditandai dari produk gula pereduksi yang dihasilkan. Penelitian yang dilakukan Kamara dkk. [9], kondisi optimum *Trichoderma viride* menghidrolisis selulosa pada batang pisang ditunjukkan pada konsentrasi substrat 6% dengan temperatur ruang, ukuran partikel 100 mesh dan waktu fermentasi selama 9 hari akan menghasilkan glukosa paling tinggi. Iyayi dan Aderolu [11] telah mendapatkan peningkatan kadar glukosa pada substrat dedak beras setelah dikulturkan pada *Trichoderma viride* selama 14 hari.

Substrat yang berbeda dapat mempengaruhi kondisi optimum dari aktivitas *Trichoderma viride*. Untuk mengetahui konsentrasi substrat dan waktu fermentasi optimum aktivitas *Trichoderma viride* pada kulit pisang maka dilakukan uji aktivitas dengan range waktu fermentasi 1 sampai 11 hari dengan ukuran partikel 100 mesh, temperatur dan pH yaitu 35°C, pH 5.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan *Trichoderma viride* yang telah diadaptasikan pada media fermentasi kulit pisang raja. Memperoleh data kadar gula pereduksi dari aktivitas *Trichoderma viride* dalam menghidrolisis kulit pisang raja pada variasi waktu fermentasi.

2. Metode Penelitian

Alat dan Bahan

Erlenmeyer (Pyrex), tabung reaksi (Pyrex), gelas ukur (Pyrex), gelas beker (Pyrex), micropipette (Ependorf), lampu spiritus; autoklaf (Clinical Autoclave Prestige Medical Series 2100), autoklaf (Napco model 8000-DSE autoclave), penangas air, pengaduk, aluminium foil, neraca analitis (Mettler Toledo JL602-G/L), shaker; pH stick, kertas saring, lemari pendingin (Sanyo SR-LV 239 N), spektrometer UV-VIS (Spectrophotometer UV-1601 shimadzu), waterbath, inkas, ballmilled, pipet tetes, dan kawat ose.

Bahan-bahan yang digunakan dalam percobaan ini meliputi jamur *Trichoderma viride* FNCC6013, Kulit pisang raja, kentang, dekstrosa, akuades, CMC (Carboxymethylcellulose) teknis, alkohol 70%, Reagen Asam 3,5-Dinitrosalisilat (Merck, p.a), Kalium Natrium Tartarat, NaOH teknis, buffer asetat 0,05 M pH 5, FeCl₃ (Merck, p.a), MgSO₄, yeast, pepton (Conda, p.a), (NH₄)₂SO₄, CaCl₂, FeSO₄.S

Delignifikasi

Delignifikasi dilakukan sebagai *pretreatment* awal terhadap kulit pisang raja untuk mengurangi kandungan lignin di dalamnya. Kulit pisang raja yang telah dikeringkan dilarutkan dalam NaOH 2 % (w/v), kemudian dilakukan pemanasan pada suhu 90°C selama 3 jam [12]. Tahap selanjutnya, larutan yang didapat disaring dengan kertas saring kemudian dilakukan pencucian dengan akuades sampai pH residu menjadi netral. Kulit pisang raja yang telah netral kemudian dikeringkan dan dihaluskan menggunakan *ballmilled* hingga berbentuk serbuk. Serbuk kulit pisang raja yang bebas lignin ini digunakan untuk tahap selanjutnya. Larutan dari hasil delignifikasi, kemudian di uji menggunakan larutan FeCl₃. Senyawa fenolat yang terdapat pada larutan hasil delignifikasi bila diuji menggunakan larutan FeCl₃ memberikan perubahan warna Merah hingga keunguan [13].

Adaptasi Jamur *Trichoderma viride* pada Media CMC

Sebanyak satu jarum ose jamur *Trichoderma viride* yang berasal dari inokulum media PDA (*Potato Dextrose Agar*) ditempatkan secara aseptik pada 100 mL media cair CMC dengan penambahan mineral yang telah disterilkan dan dikocok menggunakan *shaker* pada suhu ruang

selama 9 hari sampai jamur tumbuh. Komposisi media CMC dengan penambahan mineral yang digunakan terdapat pada tabel 1. Setelah *Trichoderma viride* mampu tumbuh pada media CMC kemudian diadaptasikan pada media kulit pisang raja.

Tabel 1: Komposisi media modifikasi CMC

Bahan Media	Jumlah (dalam 100 mL Media)
Yeast Extract	3 gram
Pepton	2 gram
CMC	1 gram
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,2 gram
CaCl ₂	0,2 gram
MgSO ₄	0,05 gram
FeSO ₄	0,01 gram
Buffer Asetat	Sampai 100 mL
Akuades	60 mL

Adaptasi Jamur *Trichoderma viride* pada Media Kulit Pisang Raja

Sebanyak 1 mL jamur *Trichoderma viride* yang berasal dari inokulum media CMC ditempatkan secara aseptik pada 100 mL media cair kulit pisang raja dengan penambahan mineral yang telah disterilkan dan dikocok menggunakan *shaker* pada suhu ruang selama 9 hari sampai jamur tumbuh. Komposisi media kulit pisang raja dengan penambahan mineral yang digunakan terdapat pada tabel 2.

Tabel 2 Komposisi media modifikasi kulit pisang raja

Bahan Media	Jumlah (dalam 100mL Media)
Yeast Extract	3 gram
Pepton	2 gram
Kulit Pisang Raja	1 gram
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,2 gram
CaCl ₂	0,2 gram
MgSO ₄	0,05 gram
FeSO ₄	0,01 gram
Buffer Asetat	Sampai 100 mL
Akuades	60 mL

Penentuan Jumlah Gula Pereduksi dengan Metode DNS

Penentuan jumlah gula pereduksi dilakukan dengan menggunakan metode DNS. Langkah awal, 3 mL larutan glukosa standart dengan berbagai variasi konsentrasi (0,1 mg/L-50 mg/L) dilakukan penambahan 3 mL larutan DNS. Setelah dilakukan penambahan DNS, kemudian dipanaskan selama 15 menit. Tahap berikutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum (498,5 nm), kemudian dilanjutkan pembuatan kurva standart absorbansi versus konsentrasi glukosa.

Penentuan Waktu Fermentasi Optimum *Trichoderma viride* dalam Menghidrolisis Kulit Pisang Raja

Penentuan pengaruh waktu fermentasi pada aktivitas hidrolisis selulosa pada kulit pisang raja oleh jamur *Trichoderma viride*, dengan waktu fermentasi 0 sampai 11 hari pada konsentrasi substrat kulit pisang raja

1 %. Langkah pertama, 2 erlenmeyer yang masing-masing berisi 100 mL media kulit pisang raja yang sudah disterilkan. Inokulum sebanyak 1 mL ditempatkan secara aseptik ke dalam erlenmeyer kemudian dikocok menggunakan *shaker* pada suhu ruang. Setiap 24 jam sekali hasil fermentasi diambil dan diuji gula pereduksi dengan metode DNS.

3. Hasil Dan Pembahasan

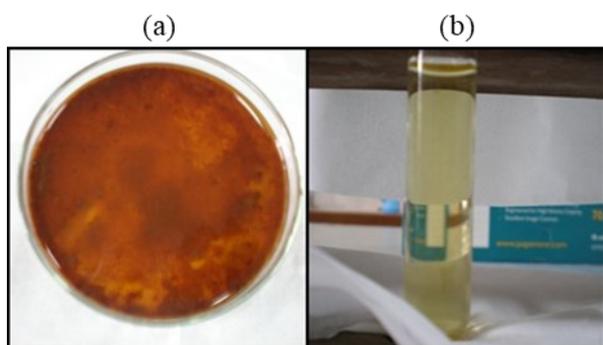
Penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan data aktivitas mikroorganisme dalam menghidrolisis selulosa menjadi gula pereduksi dengan pengaruh variasi waktu fermentasi dan konsentrasi substrat. Mikroorganisme yang digunakan adalah *Trichoderma viride*, yang telah diketahui memiliki aktivitas selulolitik. Pembahasan dalam bab ini meliputi penjelasan mengenai delignifikasi kulit pisang raja, pengadaptasian *Trichoderma viride*, dan uji aktivitas *Trichoderma viride* dalam menghidrolisis kulit pisang raja dengan variasi waktu fermentasi dan konsentrasi substrat.

Delignifikasi

Selulosa di alam ini tidak pernah ditemukan dalam keadaan murni melainkan berikatan dengan lignin dan hemiselulosa membentuk suatu lignoselulosa. Lignin akan menghambat proses hidrolisis selulosa oleh enzim selulase karena lignin merupakan molekul kompleks yang terdiri atas unit-unit fenilpropana yang umumnya sulit didegradasi oleh enzim selulase [8]. Lignin membentuk ikatan yang kuat dengan selulosa sehingga memberikan bentuk yang kokoh pada dinding sel tanaman. Lignin yang melindungi selulosa bersifat tahan terhadap hidrolisis enzim selulase karena adanya ikatan aril eter.

Lignin dapat dihilangkan atau dikurangi salah satunya dengan penambahan alkali menggunakan NaOH. Penambahan NaOH dapat melarutkan lignin dari selulosa. Selulosa dapat mengendap pada kondisi alkali sehingga dengan penambahan NaOH selulosa akan mengendap [14]. Lignin dalam NaOH akan membentuk garam fenolat yang larut dalam air. Garam fenolat terbentuk maka ikatan selulosa dan lignin akan lepas sehingga akan diperoleh selulosa dalam keadaan bebas lignin.

Filtrat dari hasil delignifikasi di uji secara kualitatif. Uji tersebut dengan menambahkan FeCl₃ ke dalam filtrat hasil delignifikasi. Penambahan FeCl₃ untuk mendeteksi adanya senyawa dengan gugus fenol. Senyawa yang mengandung gugus fenol bila diuji menggunakan larutan FeCl₃ memberikan perubahan warna merah hingga keunguan [13]. Hasil uji lignin pada delignifikasi kulit pisang raja menggunakan FeCl₃ pada filtrat hasil pencucian pH 14 dan pH 7 dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil uji lignin menggunakan FeCl_3 pada saat (a) pH awal (pH 14) dan (b) pH netral (pH 7)

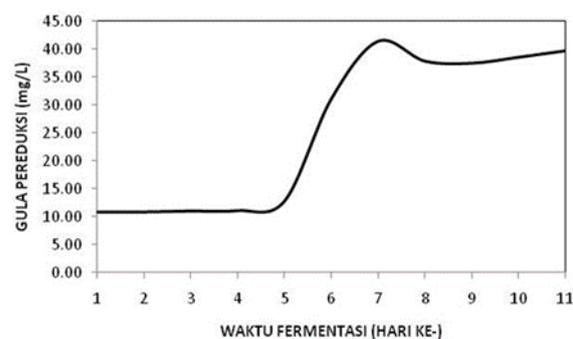
Sampel yang digunakan adalah air hasil penyaringan pertama dengan filtrat pH 14 dan filtrat yang telah dicuci dengan aquadest hingga pH 7. Hasil uji lignin menggunakan FeCl_3 mengalami perubahan warna dari hitam menjadi merah bata pada pH 14 dan pada pH 7 tidak memberikan perubahan warna (tetap kuning jernih). Perubahan warna pada filtrat hasil pencucian dengan akuades pH 14 menunjukkan bahwa senyawa lignin telah lepas dari selulosa, sedangkan filtrat hasil pencucian pada pH 7 tidak terjadi perubahan warna, menunjukkan bahwa substrat kulit pisang raja telah bebas lignin.

Pengadaptasian *Trichoderma viride*

Pengadaptasian *Trichoderma viride* diawali dengan menginokulasikan inokulum dari media PDA (Potato Dextrose Agar) ke media cair CMC (Carboxymethylcellulose) yang telah ditambah mineral-mineral. Tahap ini dilakukan untuk mengaktifkan *Trichoderma viride* sehingga perannya maksimal pada proses selanjutnya. Media awal dari biakan murni *Trichoderma viride* adalah PDA, kemudian diadaptasikan ke media CMC dengan penambahan mineral. CMC digunakan sebagai sumber karbon untuk pertumbuhan *Trichoderma viride* sebelum digunakan pada media bersubstrat. Substrat yang digunakan adalah kulit pisang raja hasil delignifikasi, yang merupakan selulosa kompleks. Hasil peremajaan ini akan diperoleh *Trichoderma viride* yang hanya menghasilkan enzim selulase. *Trichoderma viride* yang telah diremajakan tersebut digunakan untuk menghidrolisis selulosa menjadi gula pereduksi.

Uji Aktivitas *Trichoderma viride* dalam Hidrolisis Kulit Pisang Raja dengan Variasi Waktu Fermentasi

Aktivitas *Trichoderma viride* dalam menghidrolisis selulosa dipengaruhi oleh waktu fermentasi dan konsentrasi substrat. Waktu fermentasi merupakan waktu yang diperlukan mikroorganisme dalam melakukan sintesis enzim sehingga berpengaruh pada proses reaksi untuk menghasilkan produk. Hasil kadar gula pereduksi dari berbagai waktu fermentasi kulit pisang raja yang diambil setiap 24 jam sekali ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Grafik waktu fermentasi *Trichoderma viride* dalam menghasilkan gula pereduksi

Gambar 2 menunjukkan mulai awal fermentasi kadar gula pereduksi terus meningkat sampai hari ke-7, dan pada hari ke-8 sampai hari ke-11 kadar gula pereduksi yang dihasilkan *Trichoderma viride* hampir sama. Grafik tersebut menunjukkan, mulai awal fermentasi sampai hari ke-5 terjadi pembelahan sel jamur *Trichoderma viride* yang cepat. Pembelahan sel jamur *Trichoderma viride* yang cepat memerlukan energi yang banyak. Peningkatan jumlah energi untuk pembelahan sel jamur *Trichoderma viride* menyebabkan konsumsi gula pereduksi meningkat, sehingga kadar gula pereduksi sisa yang dihasilkan sedikit. Hari ke-5 sampai hari ke-7 jamur *Trichoderma viride* telah bekerja menghasilkan gula pereduksi. Meningkatnya kadar gula pereduksi sebanding dengan jumlah sel sehingga aktivitas *Trichoderma viride* dalam menghidrolisis selulosa meningkat. Hari ke-8 sampai hari ke-11 kadar gula pereduksi tidak terjadi peningkatan yang disebabkan oleh gula pereduksi yang dihasilkan digunakan untuk metabolisme *Trichoderma viride*, selain itu nutrisi didalam media mulai berkurang. Dari data yang dihasilkan dapat diketahui bahwa waktu fermentasi optimum *Trichoderma viride* untuk menghasilkan gula pereduksi terjadi pada hari ke-7.

4. Kesimpulan

Trichoderma viride mampu tumbuh pada media modifikasi kulit pisang raja. Aktivitas *Trichoderma viride* dalam menghidrolisis kulit pisang raja optimum pada waktu fermentasi hari ke-7 dengan kadar gula pereduksi sebesar 41,40 mg/L.

5. Daftar Pustaka

- [1] G Ramanathan, S Banupriya, D Abirami, Production and optimization of cellulase from *Fusarium oxysporum* by submerged fermentation, (2010)
- [2] Mohammed Inuwa Jarsquo, Obasola Ezekiel Fagade, Optimization studies on cellulase enzyme production by an isolated strain of *Aspergillus niger* YL128, *African Journal of Microbiology Research*, 4, 24, (2010) 2635-2639
- [3] MA Milala, A Shugaba, A Gidado, AC Ene, JA Wafar, Studies on the use of agricultural wastes for cellulase enzyme production by *Aspergillus niger*, *Res. J. Agric. Biol. Sci*, 1, 4, (2005) 325-328

- [4] Hai-Yan Sun, Juanhua Li, Pingjuan Zhao, Ming Peng, Banana peel: A novel substrate for cellulase production under solid-state fermentation, *African Journal of Biotechnology*, 10, 77, (2011) 17887-17890
- [5] Xue-Cai Hao, Xiao-Bin Yu, Zhong-Li Yan, Optimization of the medium for the production of cellulase by the mutant *Trichoderma reesei* WX-112 using response surface methodology, *Food Technology and Biotechnology*, 44, 1, (2006) 89-94
- [6] Hery Murphi, Pemanfaatan Kulit Buah Pisang untuk Produksi Enzim Selulase oleh *Trichoderma viride*, *Aspergillus niger* dan *Aspergillus Oryzae*, Fakultas Teknologi Pertanian, Institute Pertanian Bogor, Bogor
- [7] Carlo N Hamelinck, Geertje Van Hooijdonk, Andre PC Faaij, Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term, *Biomass and bioenergy*, 28, 4, (2005) 384-410 <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2004.09.002>
- [8] Mohammad J Taherzadeh, Keikhosro Karimi, Enzymatic-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review, *BioResources*, 2, 4, (2007) 707-738
- [9] SD Kamara, SD Rachman, S Gaffar, Degradasi Enzimatik Selulosa dari Batang Pisang untuk Produksi Glukosa dengan Bantuan Aktivitas Selulolitik *Trichoderma viride*, in: FMIPA, Universitas Padjadjaran, Bandung, 2006.
- [10] W. S. Setyani, Uji Aktivitas *Trichoderma viride* dalam Hidrolisis Selulosa Eceng Gondok (*Eichhornia crassipes*) dengan Variasi Temperatur dan Waktu Inkubasi, Skripsi, Departemen Kimia, Universitas Diponegoro, Semarang
- [11] Eustace A Iyayi, Zaid A Aderolu, Enhancement of the feeding value of some agro-industrial by-products for laying hens after their solid state fermentation with *Trichoderma viride*, *African Journal of Biotechnology*, 3, 3, (2004) 182-185
- [12] AF Hamisan, S Abd-Aziz, K Kamaruddin, UK Md Shah, N Shahab, MA Hassan, Delignification of oil palm empty fruit bunch using chemical and microbial pretreatment methods, *Int. J. Agric. Res*, 4, (2009) 250-256
- [13] R. Orchidea, Andi K.W., Dedy R.P., Lisa F.S., Khoir L., Pengaruh Metode Pretreatment pada Bahan Lignoselulosa terhadap Kualitas Hidrosilat yang Dihasilkan, Seminar Nasional Teknik Kimia Soeardjo Brothohardjono, (2010).
- [14] Nur Richana, Tun Tedja Irawadi, M Anwar Nur, Illah Sailah, Khaswar Syamsu, Yandra Arkenan, Ekstraksi xilan dari tongkol jagung, *J. Pascapanen*, 4, 1, (2007) 38-43