

**PENGOLAHAN LIMBAH ALGA *Kappaphycus alvarezii*
MENJADI BIOSUGAR MENGGUNAKAN FUNGI
Trichoderma reesei E.G Simmons**

PROCESSING Kappaphycus alvarezii ALGAE WASTE INTO
BIOSUGAR USING *Trichoderma reesei* FUNGI E.G Simmons

KURNIA KADIR



**PROGRAM STUDI MAGISTER BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR**

2023



**PENGOLAHAN LIMBAH ALGA *Kappaphycus alvarezii*
MENJADI BIOSUGAR MENGGUNAKAN FUNGI
Trichoderma reesei E.G Simmons**

Tesis

Sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar magister

Program Studi Magister Biologi

Disusun dan diajukan oleh

KURNIA KADIR

NIM. H052211011

Kepada

**PROGRAM STUDI MAGISTER BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2023**



TESIS

**PENGOLAHAN LIMBAH ALGA *Kappaphycus alvarezii*
MENJADI BIOSUGAR MENGGUNAKAN FUNGI
Trichoderma reesei E.G SIMMONS**

**KURNIA KADIR
NIM. H052211011**

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka
Penyelesaian Studi Program Magister Program Studi Magister Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Hasanuddin
Pada tanggal 19 Desember 2023
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui

Pembimbing Utama



**Dr. Sulfahri, M. Si.
NIP. 198901262014041001**

Pembimbing Pendamping



**Dr. Elis Tambaru, M.Si.
NIP. 196301021990022001**

**Ketua Program Studi
Magister Biologi**



**Dr. Sulfahri, M.Si.
NIP. 196312311988102001**

**Dekan Fakultas Matematika dan
Ilmu Pengetahuan Alam**



**Dr. Eng. Amiruddin, M.Si.
NIP. 197205151997021002**



PERNYATAAN KEASLIAN TESIS DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, tesis berjudul Pengolahan Limbah Alga *Kappaphycus alvarezii* Menjadi Biosugar Menggunakan Fungi *Trichoderma reesei* E.G Simmons adalah benar karya saya dengan arahan dari komisi pembimbing Dr. Sulfahri, M.Si. dan Dr. Elis Tambaru, M.Si. Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka tesis ini. Sebagian dari tesis ini telah dipublikasikan di Jurnal Biofuels Taylor and Francis sebagai artikel dengan judul "Production Of Fermentable Glucose From The Hydrolysis Process Of Cellulose Algae Waste Using Microbial Cellulases".

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya berupa tesis ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 19 Desember 2023



Kurnia Kadir
NIM. H052211011



KATA PENGANTAR

Rasa syukur tidak terhingga penulis ucapkan kepada Sang Kuasa Allah subhana wa taa'ala atas izinnya sehingga tugas akhir (tesis) ini yang berjudul "Pengolahan Limbah Alga *Kappaphycus alvarezii* Menjadi Biosugar Menggunakan Fungi *Trichoderma reesei* E.G Simmons" sebagai salah satu syarat untuk meraih gelar Magister Sains (M.Si) di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan tugas akhir terdapat banyak kekurangan, hal tersebut dikarenakan keterbatasan kemampuan dari penulis. Penulis tidak dapat melakukan semuanya tanpa bantuan dari beberapa pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada keluarga besar terkhusus kedua orang tua yang telah memberikan dukungan dan mendoakan penulis sehingga dapat menyelesaikan tesis tersebut.

Penulis juga sangat mengucapkan banyak terima kasih kepada Bapak Dr. Sulfahri, M.Si. bersama Ibu Dr. Elis Tambaru, M.Si. yang senantiasa sabar membimbing dan mengarahkan penulis serta memberikan saran dan kritik sehingga tesis ini dapat terselesaikan. Penyelesaian tesis ini tidak terlepas dari peran dan bantuan dari berbagai pihak. Pada kesempatan ini penulis menyampaikan banyak terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Jamaluddin Jompa, M.Sc., selaku Rektor Universitas Hasanuddin
2. Dr. Eng. Amiruddin, M.Si., selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin beserta staf pegawainya.
3. Dr. Magdalena Litaay, M.Sc., selaku Ketua Departemen Biologi dan Andi Evi Erviani, S.Si., M.Sc., selaku Sekretaris Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin.



4. Dr. Juhriah, M.Si., selaku Ketua Program Studi Magister Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin.
5. Dr. Irma Andriani, S.Pi., M.Si., Prof. Dr. Sjafaraenan, M.Si., dan Dr. Zohra Hasyim, M.Si., selaku dosen penguji yang dengan sabar mengarahkan dan memberikan kritik dan sabar demi perbaikan tesis ini.
6. Seluruh staf dosen yang telah memberikan ilmu dan memotivasi kepada penulis mulai dari awal perkuliahan hingga saat ini.
7. PT. Bantimurung Indah Maros yang telah membantu penulis dalam proses pengerjaan penelitian.
8. Teman-teman angkata 2021 yang telah berjuang berjuang bersama hingga saat ini.
9. Kepada semua pihak yang telah membantu penulis selama proses perkuliahan hingga penyusunan tesis ini. Penulis tidak dapat membalas kebaikan Bapak/Ibu/Saudara sekalian.

Dengan penuh rasa hormat penulis mempersembahkan tesis ini dan semoga dapat bermanfaat dalam pengembangan ilmu pengetahuan.

Penulis,

Kurnia Kadir
NIM. H052211011



ABSTRAK

KURNIA KADIR. **Pengolahan limbah alga *Kappaphycus alvarezii* menjadi biosugar menggunakan fungi *Trichoderma reesei* E.G Simmons** (dibimbing oleh Dr. Sulfahri, M.Si., Dr. Elis Tambaru, M.Si.

Limbah alga memiliki kandungan selulosa yang masih sangat potensial untuk dikembangkan menjadi sebuah produk atau bahan yang dapat dimanfaatkan. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan dan mengkaji konsentrasi inokulum, konsentrasi substrat dan waktu hidrolisis yang optimal menghasilkan kadar gula, jumlah biomassa dan pengaruhnya terhadap pH substrat. Penelitian ini menggunakan beberapa variasi perlakuan diantaranya yaitu variasi konsentrasi inokulum (5%, 7.5%, dan 10%), variasi konsentrasi substrat (2.5%, 5%, 7.5%, dan 10%) dan variasi waktu hidrolisis (0,3,9, dan 15 hari). Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi yang paling optimum untuk menghasilkan kadar gula adalah pada konsentrasi substrat 2.5% dengan penambahan konsentrasi inokulum pada hari ke-9 dengan nilai kadar gula sebesar 0.693333 g/g. Berdasarkan uji ANOVA untuk semua perlakuan berpengaruh nyata terhadap kadar gula total (<0.05). pH pada semua variasi konsentrasi berkisar antara 6-7. Pada uji ANOVA untuk variasi perlakuan tidak berpengaruh nyata (>0.05) terhadap nilai pH. Pada perhitungan jumlah biomassa menunjukkan hasil tertinggi dari semua variasi konsentrasi yaitu pada konsentrasi substrat 2.5% dengan jumlah biomassa sebesar 1.08333gr/L.

Kata kunci: Limbah alga, hidrolisis, gula total, pH, biomassa



ABSTRACT

KURNIA KADIR. **Processing *Kappaphycus alvarezii* algae waste into biosugar using *Trichoderma reesei* Fungi E.G Simmons** (supervised by Dr. Sulfahri, M.Si., Dr. Elis Tambaru, M.Si.)

Algal waste contains cellulose which still has great potential to be developed into a product or material that can be utilized. This research aims to determine and study the optimal inoculum concentration, substrate concentration and hydrolysis time to produce sugar content, amount of biomass and its effect on substrate pH. This research used several variations of treatment including variations in inoculum concentration (5%, 7.5%, and 10%), variations in substrate concentration (2.5%, 5%, 7.5%, and 10%) and variations in hydrolysis time (0, 3, 9, and 15 days). The research results showed that the most optimum concentration to produce sugar content was a substrate concentration of 2.5% with the addition of the inoculum concentration on the 15th day with a sugar content value of 0.693333 g/g. Based on the ANOVA test, all treatments had a significant effect on total sugar content (<0.05). The pH at all concentration variations ranges from 6-7. In the ANOVA test for treatment variations there was no significant effect (>0.05) on the pH value. The calculation of the amount of biomass shows the highest results of all variations in concentration, namely at a substrate concentration of 2.5% with a total biomass of 1.08333gr/L.

Key words: Algal waste, hydrolysis, total sugar, pH, biomass



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGAJUAN.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS.....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
ABSTRAK.....	vi
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	6
1.3 Tujuan Penelitian.....	6
1.4 Kegunaan Penelitian.....	7
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	8
2.1 Alga <i>Kappaphycus alvarezii</i>	8
2.2 Selulosa	11
2.3 Pretreatment	15
2.4 Hidrolisis	22
2.5 <i>Trichoderma reesei</i>	26
2.6 Kerangka Pikir.....	30
BAB III METODE PENELITIAN.....	31
3.1 Jenis dan Pendekatan	31
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	31
3.3 Alat dan Bahan.....	31
3.3.1 Alat Penelitian	31
3.3.2 Bahan Penelitian	31
3.4 Prosedur Penelitian	32
3.5 Kultur <i>Trichoderma reesei</i>	32
3.6 Pretreatment Limbah Pengolahan Alga.....	32



3.4.3 Proses Aktivasi <i>Trichoderma reesei</i>	32
3.4.4 Hidrolisis Menggunakan <i>Trichoderma reesei</i>	33
3.4.5 Pengukuran Kadar Gula Total dan pH meter.....	33
3.4.6 Pengukuran Biomassa Sel	33
3.4.7 Analisis Data	34
3.5. Rancangan Penelitian.....	34
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	36
4.1 Kadar Gula Total pada Konsentrasi Inokulum <i>Trichoderma reesei</i>	36
4.2 Derajat keasaman (pH) Substrat pada Konsentrasi Inokulum <i>Trichoderma reesei</i>	40
4.3 Jumlah Biomassa pada Beberapa Konsentrasi Inokulum <i>Trichoderma reesei</i>	42
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	46
5.1 Kesimpulan	46
5.2 Saran	46
DAFTAR PUSTAKA	47
LAMPIRAN.....	59
RIWAYAT HIDUP.....	74



DAFTAR TABEL

Nomor urut	Halaman
1. Komposisi kimia <i>K. alvarezii</i>	11
2. Rancangan penelitian hidrolisis menggunakan <i>T. reesei</i>	35
3. Rerata Kadar Gula Total (g/g) Pada Beberapa Konsentrasi Substrat Limbah Alga dengan Penambahan Beberapa Konsentrasi Inokulum.....	39
4. Rerata Jumlah Biomassa Pada Beberapa Konsentrasi Substrat Limbah dengan Penambahan Beberapa Konsentrasi Inokulum.....	44



DAFTAR GAMBAR

Nomor urut	Halaman
1. <i>Kappaphycus alvarezii</i>	9
2. Komposisi dan struktur dinding sel biomassa lignoselulosa	12
3. Struktur Selulosa.	13
4. Metode pretreatment.....	16
5. Proses produksi degradasi selulosa.....	24
6. Degradasi selulosa oleh enzim selulase.....	25
7. Mekanisme hidrolisis selulosa dengan enzim selulase.....	26
8. Jamur <i>T.reesei</i>	27
9. Kerangka Pikir	30
10. Kadar gula pada konsentrasi substrat.....	37
11. pH pada konsentrasi substrat.....	41
12. Jumlah biomassa pada konsentrasi substrat.....	43



DAFTAR LAMPIRAN

Nomor urut	Halaman
1. Skema Kerja.....	59
2. Hasil uji statistik kadar gula total pada konsentrasi substrat 2.5%	60
3. Hasil uji statistik kadar gula total pada konsentrasi substrat 5%	60
4. Hasil uji statistik kadar gula total pada konsentrasi substrat 7.5%.	61
5. Hasil uji statistik kadar gula total pada konsentrasi substrat 10%.	61
6. Hasil uji statistik pH pada konsentrasi substrat 2.5%.	62
7. Hasil uji statistik pH pada konsentrasi substrat 5%.	62
8. Hasil uji statistik pH pada konsentrasi substrat 7.5%.	63
9. Hasil uji statistik pH pada konsentrasi substrat 10%	63
10. Hasil uji statistik jumlah biomassa konsentrasi substrat 2.5%.....	64
11. Hasil uji statistik jumlah biomassa konsentrasi substrat 5%	64
12. Hasil uji statistik jumlah biomassa konsentrasi substrat 7.5%.....	65
13. Hasil uji statistik jumlah biomassa konsentrasi substrat 10%.....	65
14. Prosedur kerja	66



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara maritim terbesar di dunia yang memiliki kekayaan sumber daya alam (SDA) yang besar dan beragam salah satu diantaranya adalah alga. Alga merupakan sumber daya alam yang memiliki nilai ekonomis tinggi. Berdasarkan data laporan tahunan Kementerian Kelautan dan Perikanan tahun 2020 bahwa jumlah produksi alga sebanyak 9.923.259 ton (KKP, 2020). Sulawesi Selatan merupakan provinsi dengan potensi budidaya alga terbesar di Indonesia (BPS, 2021). Jumlah produksi tambak alga di Provinsi Sulawesi Selatan adalah 1.009.275,2 juta ton. Sedangkan jumlah produksi budidaya laut yang mencakup alga *Eucheuma cottoni* dan *Spinosum* sp. yaitu 2.431.863,5 ton. Kedua spesies alga tersebut merupakan komoditas unggulan di Sulawesi Selatan. *E. cottoni* merupakan spesies alga yang memiliki jumlah terbanyak yaitu 2.140.678,7 ton dan *Spinosum* sp. sebanyak 291.184,8 ton. (DKPSULSEL, 2021).

Kappaphycus alvarezii merupakan makroalga merah dan salah satu *carrageenophytes* tropis terbesar yang dibudidayakan secara komersial di Indonesia, Malaysia, Mikronesia, Filipina dan Tanzania (Adnan & Porse, 1987; Guerrero, 2001; Meinita *et al.*, 2012; Meinita *et al.*, 2012). Laju pertumbuhannya sangat cepat dan produktivitasnya tinggi (12-18 ton kering/ha/tahun) (Meinita, *et al.*, 2012). Selain itu, *K. alvarezii* dianggap sebagai bahan baku yang murah karena hanya membutuhkan air laut, sinar matahari dan karbondioksida untuk budidaya. Selain itu, seperti seperti dilansir (Borines, De Leon, & McHenry, 2011) laju pertumbuhan alga sangat tinggi dan berpotensi untuk bahan baku.



Makroalga merah terdiri dari hampir 6000 spesies yang memiliki karakteristik warna merah atau merah muda yang berasal dari pigmen *phycoocyanin* dan *phycoerythrin* yang memungkinkan pertumbuhan di perairan yang relatif dalam. Komposisi makroalga merah bervariasi dari satu spesies ke spesies lainnya, tetapi umumnya terdiri dari selulosa, glukosa dan galaktan. Dinding sel alga laut merah tersusun dari selulosa dan dua jenis polisakarida struktural rantai panjang yang dinilai kemampuannya membentuk gel yaitu agar dan karagenan (Goh & Lee, 2010; Horn *et al.*, 2000).

Industri alga telah berkembang pesat selama beberapa dekade terakhir dan karagenan adalah hidrokoloid terkemuka dalam industri alga. Salah satu industri pengolahan alga laut yaitu PT. Bantimurung Indah Kab Maros Sulawesi Selatan jenis *Euchema cottonii* atau *K. alvarezii*. Karagenan merupakan salah satu produk hasil olahan alga laut dari salah satu jenis alga merah yaitu *K. alvarezii*. Sekitar 57.500 ton karagenan diproduksi setiap tahun di seluruh dunia. Sebagai konsekuensi dari peningkatan produksi karagenan, limbah yang dihasilkan dari industri karagenan dalam jumlah yang sangat besar juga meningkat (Meinita *et al.*, 2019). Pada pengolahan alga di PT. Bantimurung Indah, terdapat 2 jenis limbah yang dihasilkan yaitu limbah cair yang berasal dari proses pencucian alga dan limbah padat yang tidak terolah dengan baik dan bercampur dengan pasir, batu, tali dan karang (Yustin dkk, 2005).

Jumlah total keseluruhan alga yang diolah menjadi karagenan hanya 35% sedangkan 65% sisanya adalah limbah sehingga potensi limbah industri karagenan mencapai lebih dari 60.000 ton pertahun. Limbah hasil ekstraksi karagenan terdiri dari 2 jenis yaitu limbah padat dengan kandungan berupa dan limbah cair dengan kandungan senyawa alkali, organik serta zat-zat pengotor lainnya. Limbah hasil an alga tersebut hanya dibuang sehingga dapat oatkan terjadinya pencemaran lingkungan. Padahal



pada limbah tersebut masih mengandung polisakarida berupa selulosa mencapai 71,38% dan hemiselulosa yang potensial untuk dimanfaatkan (Bixler & Johndro, 2000; Fithriani *et al.*, 2007; Wekridhany *et al.*, 2012; Hadayati *et al.*, 2021). Pengelolaan limbah alga yang tidak ditangani dengan baik maka dapat berdampak bagi lingkungan sehingga merugikan kehidupan manusia. Maka perlu dilakukan suatu usaha untuk memanfaatkan limbah tersebut sehingga mengurangi terjadinya pencemaran lingkungan dan dapat diolah menjadi produk yang memiliki nilai tambah (Assadad, 2009).

Limbah hasil pengolahan karagenan merupakan bahan lignoselulosa yang dapat menjadi berbagai senyawa organik berharga seperti gula, bioetanol, asam amino, asam organik dan bahan tambahan makanan. Selain itu juga dapat digunakan sebagai substrat untuk produksi banyak enzim industri (Sun, 2002; Lee, 1997; Hill *et al.*, 2006; Hahn *et al.*, 2006; Gupta *et al.*, 2012). Selulosa adalah polimer linier dari unit anhidro- β -D-glukosa yang dihubungkan oleh ikatan β -(1-4)O-glikosidik mulai dari 800-100000 unit membentuk rantai dengan berat molekul rata-rata 100000 Da (Saxena *et al.*, 2009; Harmsen *et al.*, 2010; Shahzadi *et al.*, 2014; Maki *et al.*, 2009; Lynd *et al.*, 2002). Polimer selulosa memiliki dua daerah yaitu daerah kristal yang bandel terhadap hidrolisis enzimatik dan daerah amorf yang mudah diakses oleh hidrolisis enzimatik (Moon *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2008; Anwar *et al.*, 2014). Untuk digunakan dalam berbagai aplikasi industri seperti bioetanol, selulosa pertama-tama harus dipecah menjadi gula sederhana yang difermentasi yaitu glukosa. Di alam, degradasi selulosa dimesiasi oleh aksi gabungan dari tiga enzim individu yang disebut sebagai *endoglucanase* (*1,4- β -D-glucan hydrolase* EC 3.2.1.4), *glucanase* (*1,4- β -D-glucan glucohydrolase* EC 3.2.1.74) dan *glucosidase* (*β -D-glucosida glucohidrolase* EC 3.2.1.21) (Saxena *et al.*, 2009; Harmsen *et al.*, 2010; Lynd *et al.*, 2002; Moon *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2008; Anwar *et al.*, 2014; Seo *et al.*, 2013; Lambertz *et al.*, 2014; Maki *et al.*, 2009). Pertama-tama, *endoglucanase* secara



acak menyerang dan menghidrolis ikatan glikosidik dibagian dalam molekul terutama di daerah amorf yang menghasilkan rantai oligosakarida dengan panjang yang berbeda. Diikuti oleh *exoglucanase/cellobiohydrolase* yang secara proses menghidrolisis rantai ini pada ujung reduksi dan non reduksinya melepaskan glukosa, selobiosa dan oligosakarida pendek. Kedua enzim bekerja secara sinergis dan biasanya dihambat oleh selobiosa. Akhirnya β -glucosidase memecah selobiosa dan oligosakarida pendek menjadi unit glukosa sehingga menghilangkan penghambatan selobiosa pada endoglucanase dan selobiohidrolase (Kumar *et al.*, 2008; Tiwari *et al.*, 2013; Sukumaran *et al.*, 2005; Mussatto, 2010; Kostylev, 2012; Gaur, 2015; Aga, 2013; Gao *et al.*, 2012).

Kumar *et al.* (2013) melaporkan bahwa dari 100% bahan baku alga segar yang diolah menjadi agar-agar maka dapat dihasilkan limbah olahan dengan kandungan holoselulosa sekitar 62-68%. Limbah hasil olahan alga menjadi agar-agar tersebut masih mengandung selulosa (Marinho-Soriano *et al.* 2001;2005) dan kadar selulosa yang terdapat pada limbah mencapai 40%. Proses hidrolisis dilakukan dengan menggunakan enzim selulase yang berasal dari *Trichoderma reesei* (ATCC 26921) dan β -glukosidase *Aspergillus niger* kemudian menghasilkan produk hidrolisis sebesar 0,43 g/g gula (Kumar *et al.*, 2013).

Beberapa Penelitian di Indonesia telah mengkaji limbah padat agar-agar dari pengolahan skala usaha kecil dan menengah (UKM) di Brebes. Pada hasil pengolahan tersebut ditemukan limbah memiliki kadar selulosa 18,83% dan lignin 15,625%. Limbah tersebut diberi perlakuan awal menggunakan 0,5% H₂SO₄ kemudian digunakan sebagai substrat oleh isolat bakteri selulolitik SGS-2609 menghasilkan aktivitas selulase 0,0549 U/mL dan aktivitas spesifik 0,011 U/mg wati, 2012). Pada penelitian lain memberikan perlakuan alkali 4% NaOH pada limbah pengolahan alga skala li Pameumpeuk Garut dan menghasilkan konsentrasi gula



lebih besar dari pada perlakuan menggunakan 1% H₂SO₄ yaitu sebesar 40,25 g/L dan 25,48 g/L. Setelah perlakuan asam dan basa, dilakukan proses hidrolisis menggunakan enzim komersial dan pada penelitian lain menggunakan penambahan biakan khamir *Trichoderma reesei* (Martosuyono *et al.*, 2016; John *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2013; Yanagisawa *et al.*, 2011; Ruiz *et al.*, 2013).

Hidrolisis enzimatik adalah proses katalitik heterogen yang kompleks melibatkan beberapa proses terutama kinetika perpindahan massa molekul dan kinetika reaksi. Dalam beberapa tahun terakhir, para peneliti telah melakukan banyak studi eksperimental sebagai dasar untuk mengoptimalkan proses hidrolisis sehingga dapat meningkatkan efisiensi konversi dan mengurangi biaya. Saat ini enzim selulase yang paling sering dipelajari dan digunakan dalam industri adalah *Trichoderma reesei* (Zhang *et al.*, 2021).

Trichoderma reesei adalah jamur ascomycete yang telah dikenal karena kapasitas produksi selulasenya yang luar biasa selama lebih dari 60 tahun, Saat ini *T. reesei* digunakan untuk produksi industri enzim selulase karena kapasitas produksi proteinnya yang tinggi dengan nilai hingga 80 g/L (Fonseca *et al.*, 2020)

Sejak awal diisolasi sebagai pengurai selulosa, *Trichoderma reesei* telah berkembang menjadi salah satu produsen selulase paling produktif di industri. Kapasitasnya yang tinggi untuk mengeluarkan sejumlah besar enzim ligno selulosa yang melepaskan gula yang dapat difermentasi dari dinding sel tanaman. Campuran selulase *T. reesei* telah terbukti terdiri dari setidaknya tiga jenis enzim yang bekerja pada substrat yang tidak larut untuk mencapai konversi yang efisien dari selulosa menjadi glukosa. *T. reesei* memiliki enzim selulase hingga 80%. (Lynd *et al.*, 2002).



hidrolisis selulosa menjadi glukosa secara konsisten dua tahap penting dalam sistem enzimatik, yaitu

pemecahan ikatan glukosidik pada selulosa menjadi selobiosa oleh β -1,4-glukanase dan pemecahan ikatan β -1,4-glukosidik pada selobiosa menjadi glukosa oleh β -glukosidase. Enzim selulase yang berasal dari *T. reesei* memiliki kemampuan yang tinggi di dalam memecahkan ikatan pada struktur selulosa, sehingga mampu menghasilkan glukosa yang lebih tinggi (Kodri *et al.*, 2013 dalam Megawati, 2020).

1.2 Rumusan Masalah

1. Berapa jumlah konsentrasi inokulum *Trichoderma reesei* dan konsentrasi substrat yang optimal untuk produksi kadar gula total?
2. Berapa lama waktu inkubasi atau hidrolisis limbah alga yang optimal untuk produksi kadar gula total?
3. Berapa nilai pH pada substrat limbah alga setelah dilakukan proses hidrolisis?
4. Berapa jumlah biomassa yang dihasilkan dari proses hidrolisis limbah alga dengan menggunakan inokulum *T. reesei*?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Menentukan dan mengkaji jumlah konsentrasi inokulum *Trichoderma reesei* dan konsentrasi substrat yang optimal untuk produksi kadar gula total
2. Menentukan dan mengkaji lama waktu inkubasi yang optimal untuk produksi kadar gula total.
3. Menentukan dan mengkaji nilai pH pada substrat limbah alga setelah dilakukan proses hidrolisis.
4. Menentukan dan mengkaji jumlah biomassa yang dihasilkan dari proses hidrolisis limbah alga dengan menggunakan inokulum *T. reesei*.



1.4 Kegunaan Penelitian

1. Memberikan informasi bahwa limbah hasil pengolahan alga masih berpotensi untuk dikembangkan.
2. Salah satu alternatif untuk mencegah terjadinya pencemaran lingkungan.
3. Sebagai acuan bagi peneliti selanjutnya terkait dengan pengembangan limbah hasil olahan alga.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Alga *Kappaphycus alvarezii*

Kappaphycus merupakan salah satu genus alga yang tergolong dalam kelompok carragenofit karena ditemukan kandungan karaginan yang sangat penting sebagai bahan baku industri. Alga ini menjadi komoditas unggulan budidaya karena mempunyai nilai ekonomis yang tinggi. *Eucheuma cottonii* merupakan salah satu jenis makro alga merah (Rhodophyceae) dan saat ini lebih sering disebut *Kappaphycus alvarezii* karena keraginan yang dihasilkan termasuk fraksi kappa-karaginan (Kasim, 2016). Secara taksonomi, jenis ini disebut *K. alvarezii*. Nama daerah "*Cottonii*" umumnya lebih dikenal dan biasa dipakai dalam dunia perdagangan nasional maupun internasional. Adapun klasifikasi *K. alvarezii* menurut Doty (1985) adalah sebagai berikut.

Regnum : Plantae
 Divisio : Thallophyta
 Subdivisio : Algae
 Classis : Rhodophyceae
 Ordo : Gigartinales
 Familia : Solieracea
 Genus : *Kappaphycus*
 Species : *Kappaphycus alvarezii*

Kappaphycus alvarezii mempunyai talus utama berbentuk silindris gemuk dan mengilap. Talus utama dari tumbuhan ini berukuran relatif besar dengan diameter talus mencapai 3 cm. Pada tiap talus utama muncul talus cabang yang tersebar tidak merata dan menutupi setiap sisi dari talus utama. Pada talus akan tumbuh talus cabang dan pada tiap talus cabang talus anakan yang tersebar tidak merata, tetapi relatif menghadap ke atas. Talus *K. alvarezii* mempunyai 3



warna yang berbeda, antara lain coklat tua kehijauan, kuning kecokelatan dan hijau cerah. Setiap warna yang berbeda mempunyai pertumbuhan yang berbeda tergantung pada topografi dan faktor fisika kimia perairan. Terdapat perbedaan warna disebabkan karena suatu proses adaptasi kromatik yaitu penyesuaian antara proporsi pigmen dan berbagai kualitas pencahayaan (Rachmat, 1999 dalam Nurhayati, 2019). Alga merah mempunyai kemampuan adaptasi kromatik artinya bahwa talus alga ini memiliki kemampuan penyesuaian warna atas kualitas sinar yang memaparnya. *K. alvarezii* sebagai salah satu jenis alga merah yang memiliki adaptasi kromatik yang berbeda dibanding dengan rumput laut merah lainnya, seperti kandungan klorofil a sekitar 74,92%, turunan klorofil a sekitar 16,42%, karoten sekitar 0,95%, xantofil sekitar 0,73% dan lutein sekitar 6,99% (Firdaus, 2019). Alga ini dapat tumbuh pada kedalaman mencapai 18 m selama cahaya matahari masih tersedia dengan baik (Kasim, 2016).



Gambar 1. *Kappaphycus alvarezii* (Kasanah et al., 2021).

Kappaphycus alvarezii mempunyai pola reproduksi vegetatif atau fragmentasi yang sangat baik, sehingga jarang melakukan proses reproduksi generatif atau seksual. Jika terjadi patahan sekecil apapun dengan kondisi lingkungan yang sangat baik, maka tumbuhan ini akan dapat membentuk individu dan baru yang cukup cepat. Pada talus utama terdapat kecil yang merupakan tempat pengeluaran gametosit dan betina. Menurut Luhut dan Sollesta (2010) bahwa



alga jenis *K. alvarezii* akan mengalami perubahan bentuk morfologi yaitu terjadi penonjolan kecil pada talus utama selama masa pelepasan gametosit jantan dan betina. Hal tersebut merupakan strategi reproduksi generatif yang dikembangkan oleh jenis tumbuhan ini. Bentuk morfologi dari jenis ini akan sangat tergantung pada kondisi lingkungan. Kondisi lingkungan dengan tingkat kecerahan yang cukup tinggi serta ketersediaan nutrien yang cukup akan memberikan peluang tumbuh yang baik bagi jenis alga ini. Bentuk morfologi yang sehat dari jenis adalah warna cerah dengan talus sangat banyak tumbuh di sekitar talus induk atau utama (Trona, 1992;1997). Umumnya *K. alvarezii* tumbuh dengan baik di daerah pantai terumbu (*reef*). Habitat khasnya adalah daerah yang memperoleh aliran air laut yang tetap, variasi suhu harian yang kecil, dan substrat batu karang mati (Kasim, 2016).

Kappaphycus alvarezii memiliki struktur dinding sel tumbuhan terdiri atas lamela tengah, dinding primer, dan dinding sekunder. Dinding sel alga mengandung selulosa dan polisakarida. Karagenan terdapat pada bagian lamela tengah. Lamela tengah pada rumput laut membentuk suatu bahan yang kental. Warna kemerah-merahan pada alga merupakan karbohidrat hasil fotosintesis yang bermanfaat sebagai cadangan makanan. Alga merah tersebut mengandung 70% karagenan dari berat kering dinding selnya (Nurhayati *et al.*, 2019).

Spesies alga merah kebanyakan memiliki kandungan protein yang tinggi bahkan bisa mencapai di atas 40% tergantung lokasi hidupnya (Nurhayati, 2019). Pada *K. alvarezii* terdapat beberapa kandungan diantaranya polisakarida, pigmen (klorofil a dan d, fikoeritrin, fikosianin, lutein, α dan β -karoten), karaginan serta trace element (Yanti *et al.*, 2001) (Lee, 2008).



Anggadiredja *et al* (2006) bahwa pada *K. alvarezii* lung mineral berupa Ca, Fe, Cu, riboflavin, vitamin C, araginan. *K. alvarezii* memiliki komposisi karbohidrat 57, 52% (Yunizal, 2004 *dalam* Nurhayati, 2019).

Tabel 1. Komposisi kimia *K. alvarezii*

Komposisi	Jumlah
Air	13,90%
Protein	2,69%
Lemak	0,37%
Abu	17,09%
Serat kasar	0,95%
Mineral Ca	22,39 ppm
Mineral Fe	0,121 ppm
Mineral Cu	2,763 ppm
Mineral Pb	0,040 ppm
Thiamin	0,14 mg/100 gram
Riboflavin	2,7 mg/100 gram
Vitamin	12 mg/100 gram
Karagenan	61,52%

Sumber: Istini dkk (1986).

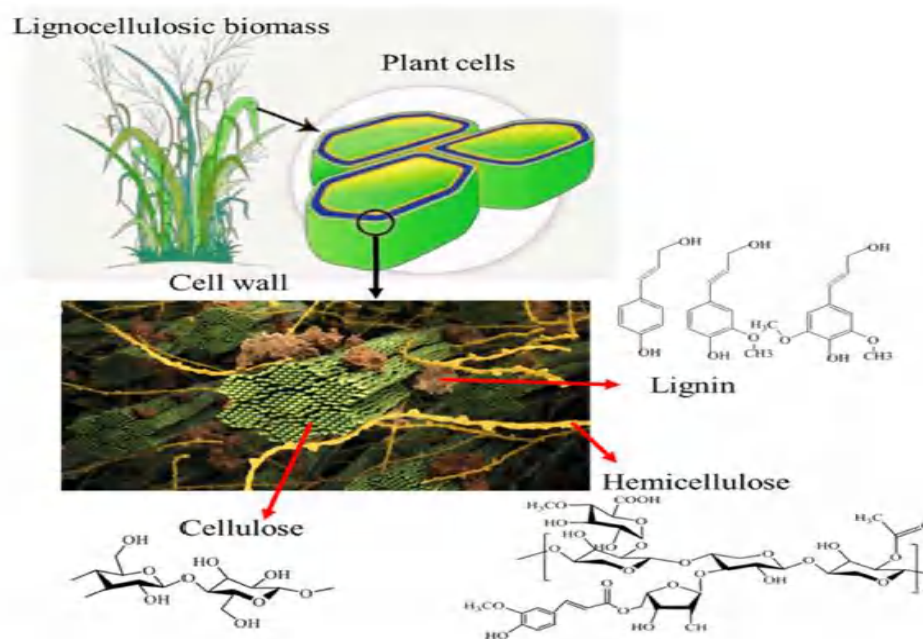
Budidaya *K. alvarezii* semakin berkembang secara meluas di beberapa negara, seperti: Denmark, Irlandia, Selandia Baru, Nova Scotia, Cina, Jepang, dan Mozambik yang merupakan produsen karagenan utama di dunia dan setiap tahunnya menghasilkan nilai ekonomi yang mencapai US\$ 240 juta. Produksi alga sebesar 80% berasal dari hasil budidaya di negara-negara seperti Filipina, Indonesia dan Tanzania, total produksi diperoleh dari stok alga alami (Rosmawaty dkk, 2013). Lokasi budidaya alga jenis ini di Indonesia antara lain terdapat di daerah Lombok, Sumba, Sulawesi Tenggara, Sulawesi Selatan, Sulawesi Tengah, Lampung, Kepulauan Seribu, dan Perairan Pelabuhan Ratu (Atmadja, 1996).

2.2 Selulosa



omassa lignoselulosa adalah polimer heterogen ; yang terutama terdiri dari selulosa, hemiselulosa, dan Menurut laporan, selulosa menyumbang 38-50% dari

komponen, hemiselulosa menyumbang 23-32% dan lignin adalah 15-25% (Wyman *et al.*, 2017; Alonso *et al.*, 2017). Komponen-komponen ini saling terkait erat satu sama lain dan membentuk struktur dinding sel berpori yang berada dalam keadaan metastabil yang bandel.



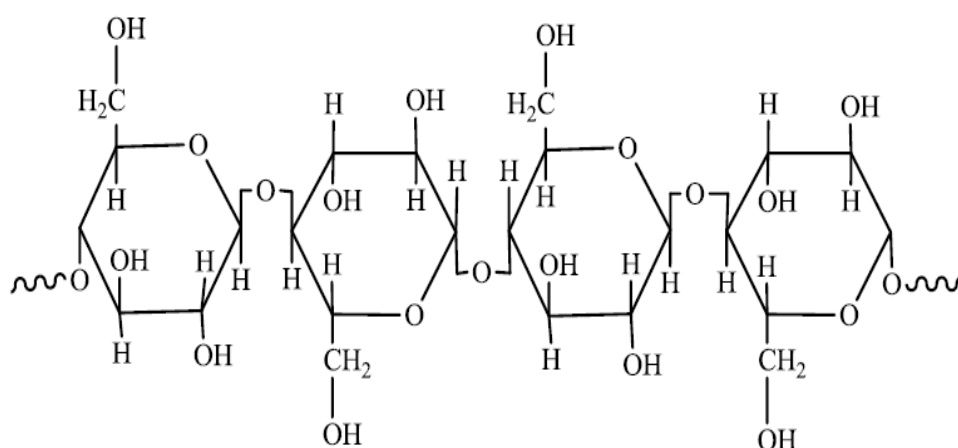
Gambar 2. Komposisi dan struktur dinding sel biomassa lignoselulosa (Petridis, 2018; Chiaramonti, 2007).

Selulosa adalah salah satu komponen karbohidrat yang terdapat pada limbah dari proses produksi agar-agar. Selulosa merupakan bagian utama dinding sel tumbuh-tumbuhan yang tersusun hingga 10.000 unit glukosa dalam bentuk unit-unit hidroglikopiranosida dengan rumus $[C_6H_{10}O_5]_n$. Selulosa terdiri atas monomer glukosa yang dihubungkan dengan ikatan β -1,4-glikosida (Ramanathan *et al.*, 2010; Ja'afaru *et al.*, 2010). Menghidrolisis ikatan glikosida maka dapat diperoleh glukosa yang diharapkan dapat digunakan untuk berbagai tujuan, misalnya untuk memproduksi sirup gula dan asam organik (Cai *et al.*, 2006). Jalinan antara kelompok hidroksil pada

dari satu rantai ikatan hidrogen dengan molekul oksigen antai lainnya, mengakibatkan rantai terikat dengan kuat tiap sisinya dan membentuk mikrofibril dengan daya



rentang yang tinggi. Daya rentang tersebut sangat penting untuk dinding sel, dimana ikatan rantai yang kuat membentuk sebuah matriks karbohidrat pada sel tanaman (Brown, 2003; Park *et al.*, 2010) (Munifah, 2021).



Gambar 3. Struktur Selulosa (Mulyadi, 2019).

Selulosa memiliki sifat diantaranya yaitu tidak berasa, tidak mempunyai bau, bersifat hidrofobik dan tidak larut dalam air. Selulosa berbentuk kristal, sehingga untuk memecahkannya sampai menjadi tak beraturan (amorphous) dalam air diperlukan suhu 320°C dan tekanan 25 Mpa. Secara kimia, selulosa dapat dipecah menjadi glukosa dengan perlakuan asam pada suhu tinggi (Ariffin, 2006). Senada dengan peneliti sebelumnya, selulosa dapat dikonversi menjadi glukosa, etanol atau produk yang berekonomis tinggi lainnya dengan cara menghidrolisis selulosa dengan bantuan enzim selulase sebagai biokatalisator atau dengan hidrolisis secara asam atau basa (Siddhanta *et al.*, 2009).

Selulosa merupakan polimer glukosa yang memiliki ikatan β -1,4 glikosida yang terhubung secara bersama melalui ikatan hidrogen. Konfigurasi β inilah yang membuat selulosa keras, sukar larut dalam air dan tidak manis. Ikatan β -1,4 elulosa dapat dipecah menjadi monomer glukosa dengan drolisis enzimatik. Ikatan glikosida yang dimiliki monomer



glukosa dalam selulosa membuat struktur selulosa linier dan teratur. Keteraturan struktur tersebut menimbulkan ikatan hidrogen secara intra dan intermolekuler (Yu *et al.*, 2008). Selulosa secara alami diikat oleh hemiselulosa dan dilindungi oleh lignin. Adanya ikatan arilalkil dan ikatan eter senyawa pengikat lignin ini menyebabkan bahab-bahab lignoselulosa sulit untuk dihidrolisis (Iranmahboob *et al.*, 2022; Sun *et al.*, 2002). Lignin merupakan senyawa kompleks yang tersusun dari unit fenilpropana yang terikat di dalam struktur tiga dimensi dan merupakan material yang paling kuat di dalam biomassa. Lignin mengandung karbon yang relatif tinggi sehingga resisten terhadap degradasi. Oleh karena itu, lignin harus dipecah agar hemiselulosa dan selulosa dapat dihidrolisis (Handoko dkk, 2012).

Selulosa terbagi menjadi tiga bagian yaitu tidak larut dalam sodium hidroksida (NaOH) 17,5% pada suhu 20°C disebut α cellulose (yang biasa disebut sebagai selulosa). Pada perlakuan dengan pelarut asam (*Acidification*) bagian yang terekstrak (larut) dan mengendap adalah β cellulose sedangkan bagian yang larut pada bagian dasar namun tidak mengendap dengan asam adalah γ cellulose (Trivedi *et al.*, 2011). Selulosa dapat diuji dengan menggunakan metode asam, serat dilarutkan dalam asetat dan asam nitrat untuk menghilangkan lignin, hemiselulosa, dan xilosan. Sisanya dibiarkan bereaksi dengan anthron dalam asam sulfat. Senyawa berwarna yang dihasilkan diukur dengan spektrofotometri pada panjang gelombang 635 nm (Munifah, 2021).

Alga merah menjadi bahan dasar pengolahan agar-agar karena memiliki komposisi dinding sel berupa selulosa, agar-agar, xilan, dan keragenan (Wijengsihe dan Jeon, 2012). Hal

yang membedakannya dari tumbuhan darat dan an alga sebagai sumber selulosa yang potensial (2021).



2.3 Pretreatment

Pretreatment merupakan suatu proses untuk memudahkan senyawa dalam mengakses selulosa. Pretreatment dilakukan untuk memecah struktur ikatan pada selulosa yaitu memisahkan lignin dan hemiselulosa yang dapat mengganggu atau membuat selulosa sulit untuk diakses (Mosier *et al.*, 2005).

Terdapat sejumlah fitur kunci untuk pretreatment efektif biomassa lignoselulosa. Proses pretreatment harus memiliki modal dan biaya operasional yang rendah. Ini harus efektif pada berbagai dan pemuatan bahan lignoselulosa dan harus menghasilkan pemulihan sebagian besar komponen lignoselulosa dalam bentuk yang dapat digunakan dalam fraksi terpisah. Kebutuhan akan langkah-langkah persiapan/penanganan atau prakondisi sebelum perlakuan awal seperti pengurangan ukuran harus diminimalkan. Ini harus menghasilkan tidak ada atau jumlah terbatas produk degradasi gula dan lignin yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme fermentasi atau aksi enzim hidrolitik (Chandra *et al.*, 2007).

Pretreatment biomassa lignoselulosa merupakan kunci untuk disintegrasi ketiga komponennya dan konversi selanjutnya menjadi bioenergi dengan efisiensi tinggi. Faktor-faktor seperti konsumsi energi dan ekonomis dari proses pretreatment juga merupakan kriteria utama untuk mendefinisikan kelayakan industri dari proses ini. Penting juga bahwa struktur asli komponen biomassa lignoselulosa tidak boleh diganggu dalam proses pretreatment. Misalnya struktur asli lignin biasanya diubah selama proses delignifikasi, sehingga membuat lignin rentan terhadap valorisasi. Selain itu, aksesibilitas enzim terhadap fraksi selulosa juga dipengaruhi karena penurunan

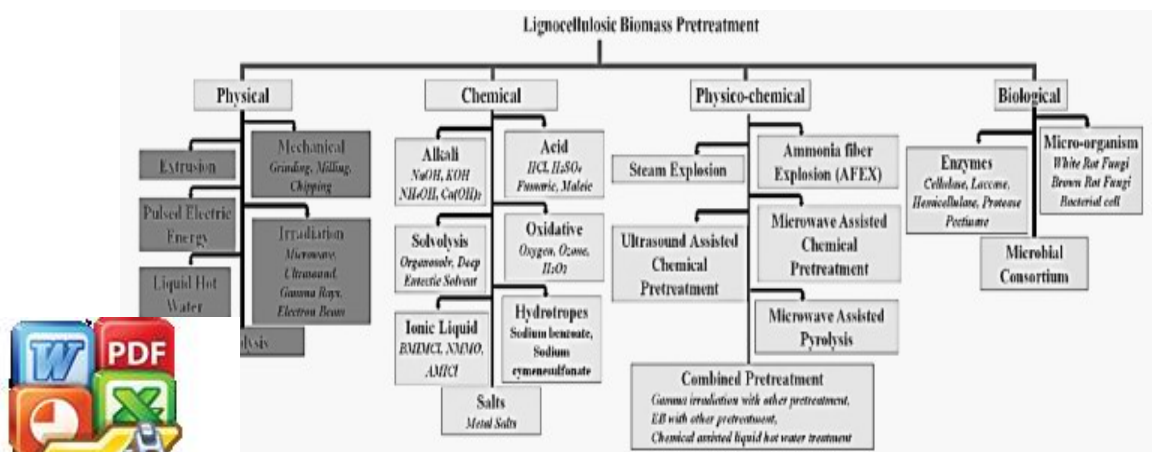


asnya selama proses pretreatment (Zakaria *et al.*, 2014; *et al.*, 2014).

kompleksitas dan variabilitas biomassa lignoselulosa harus dipertimbangkan dalam mengembangkan metode

pretreatment optimal yang tidak menghambat sifat struktural dan komposisi masing-masing komponen. Penting untuk memastikan efektivitas proses pretreatment dengan menjaga berbagai aspek dekonstruksi biomassa lignoselulosa yang efisien seperti yang dibahas di atas. Dalam hal ini, efektivitas metode pretreatment tergantung pada kemampuannya untuk mendelegitimasi biomassa lignoselulosa tanpa banyak perubahan dalam struktur lignin asli, konsumsi energi yang rendah, operasi yang hemat biaya, mengurangi indeks kristalinitas selulosa, mengurangi ukuran partikel biomassa lignoselulosa untuk meningkatkan hidrolisis enzimatik, pretreat berbagai jenis bahan baku biomassa lignoselulosa, menghindari produksi inhibitor enzim, dan menggunakan bahan kimia yang ramah lingkungan (Mankar *et al.*, 2021).

Secara umum pendekatan pretreatment dapat dikategorikan menjadi Pretreatment Biomassa Lignoselulosa dan fisikokimia. Metode pretreatment fisik umumnya digunakan untuk mengurangi partikel biomassa. Alat dan teknik seperti penggilingan, penggiling, sekrap, radiasi ultraviolet atau microwave umumnya digunakan selama perlakuan awal fisik. Selain itu, pada proses pretreatment juga menggunakan bahan kimia baik itu asam ataupun alkali, organozolv, pelarut atau enzim juga digunakan untuk memfasilitasi proses tersebut (Mankar *et al.*, 2021).



Gambar 4. Metode pretreatment (Mankar *et al.*, 2021).



Pretreatment dengan cara penggilingan merupakan teknik yang sering digunakan untuk mengurangi ukuran partikel biomassa. Hal ini dapat dilakukan dengan berbagai cara seperti penggilingan, pencacahan, chipping dan cara penggilingan lainnya. Namun, ukuran akhir partikel tergantung pada jenis metode yang digunakan, misalnya menggiling atau penggilingan hasil biomassa dalam ukuran partikel 0,2-2 mm sedangkan partikel 10-30 mm diperoleh pada chipping (Veluchamy *et al.*, 2018). Beberapa keuntungan utama yang ditawarkan oleh proses ini adalah pengurangan tinggi kristal selulosa, peningkatan permukaan yang tersedia untuk hidrolisis enzimatik, pengurangan tingkat polimerisasi selulosa dan peningkatan perpindahan massa karena pengurangan ukuran partikel. Beberapa kelompok telah melaporkan metode penggilingan untuk pretreatment biomassa yang berbeda. Dalam sebuah studi oleh Zakaria *et al.* (2014) pretreatment tandan kosong kelapa sawit (TKKS) dengan teknik penggilingan (120 menit) mengakibatkan penurunan indeks kristalinitas dari 56,1% (tidak diolah) menjadi 9,3% (digiling). Akibatnya hasil glukosa/xilosa yang lebih tinggi (67,5%/80,1%) dilaporkan setelah hidrolisis enzimatik (50°C, 72 jam) untuk sampel yang digiling dibandingkan dengan sampel yang tidak diberi perlakuan (15,9%/5,4%). Kelemahan utama dari teknik penggilingan adalah konsumsi energi yang tinggi yaitu sekitar 33% dari total energi yang dibutuhkan untuk keseluruhan proses. Hambatan utama lainnya adalah tidak adanya penghilangan lignin selama proses berlangsung. Lignin yang ada dalam biomassa menyebabkan berkurangnya aksesibilitas enzim untuk menghidrolisis selulosa.

Pretreatment asam pada biomassa lignoselulosa terutama digunakan untuk menghilangkan hemiselulosa.



awal biomassa dengan pendekatan asam akan meningkatkan aksesibilitas enzim terhadap selulosa (Veluchamy *et al.*, 2018). Asam yang paling umum digunakan untuk pretreatment adalah asam sulfat, asam asetat, dan asam

fosfat (Rezania *et al.*, 2020). Perlakuan awal menggunakan asam dapat dilakukan dengan dua cara yang berbeda yaitu perlakuan pendahuluan asam encer (0,1%) pada suhu yang lebih tinggi (>200°C), dan perlakuan pendahuluan asam pekat (30-70%) pada suhu yang relatif lebih rendah (<50°C) (Den *et al.*, 2018). Kedua pendekatan pretreatment asam memiliki kelebihan dan kekurangan masing-masing. Pretreatment asam encer memiliki konsumsi asam yang lebih rendah tetapi energi yang dibutuhkan untuk proses keseluruhan lebih tinggi karena suhu yang lebih tinggi. Di sisi lain, menggunakan asam pekat mengurangi konsumsi energi karena suhu reaksi yang lebih rendah, tetapi keasaman yang lebih tinggi menghasilkan produksi inhibitor fermentasi (furfural, 5-hydroxymethylfurfural). Inhibitor memiliki efek yang parah pada mikroorganisme yang digunakan untuk proses fermentasi termasuk pemecahan DNA dan pengurangan sintesis RNA yang mengakibatkan aktivitas enzim terhambat (Lorenci *et al.*, 2020). Selain itu, selalu ada risiko korosi yang tinggi pada bejana reaksi karena konsentrasi yang lebih tinggi. Prasad *et al.* (2018) menyelidiki perlakuan awal jerami gandum pada 180° C selama 10 menit menggunakan 2% asam sulfat encer dan 43,1% dari total gula terlarut diperoleh kembali.

Santos *et al.* (2018) mempelajari pengaruh pretreatment asam (20% asam sulfat) pada seluruh tanaman rumput gajah dan fraksi terpisahnya (batang, daun). Hasil glukosa yang tinggi sebesar 43% (batang), 76% (seluruh tanaman) dan 89% (daun) dilaporkan setelah perlakuan awal pada 121°C selama 30 menit dibandingkan dengan 20% untuk biomassa yang tidak diberi perlakuan. Hasil glukosa yang lebih rendah untuk fraksi batang disebabkan oleh rekalsitran yang lebih tinggi terhadap hidrolisis karena kandungan ligninnya yang lebih tinggi. Jerami yang diolah sebelumnya (20% b/v) pada 180°C selama 10 dengan larutan asam sulfat 1%. Jerami lobak yang diberi asam dihidrolisis secara enzimatik menggunakan



enzim dosis 13% (b/b) dari Ctec2: Htec2 (90:10) pada 50° C selama 48 jam dan 84,6% dari total hasil gula tercapai (Kuglarz *et al.*, 2018). Meskipun hasil yang menjanjikan, pretreatment asam dikaitkan dengan kerugian seperti korosi bejana reaksi dan pembentukan inhibitor fermentasi.

Metode pretreatment alkali melibatkan penggunaan hidroksida kalium, natrium, amonium dan kalsium untuk pretreatment biomassa (Veluchamy *et al.*, 2018). Selama pretreatment ini, pemutusan ikatan (ester, aril-eter, alkil-aril) yaitu lignin karbohidrat kompleks terjadi melalui reaksi saponifikasi dan penyelamatan dan selanjutnya penghapusan gugus asetil dan asam uronat dalam hemiselulosa juga terjadi (Kumar *et al.*, 2020). Akibatnya akseibilitas enzim terhadap fraksi selulosa ditingkatkan sehingga membantu dalam fermentasi gula (Cheah *et al.*, 2020; Den *et al.*, 2018). Mirmohamadsadeghi *et al.* (2016) melaporkan bahwa perlakuan awal dari tiga bahan baku yang berbeda, menggunakan 0,5 M Na₂CO₃ dalam kondisi reaksi ringan (80°C, 3 jam). Setelah perlakuan awal, kandungan lignin masing-masing berkurang 15,9%, 9,7%, dan 13,7% untuk miskantus, brangkasan jagung dan *switchgrass*. Hidrolisis enzimatik dari sampel biomassa pretreatment memberikan hasil glukosa 62,3% (miskantus), 95,1% (brangkasan jagung), dan 81,3% (*switchgrass*), sehingga menunjukkan Na₂CO₃ ringan efektif dalam mengurangi kekambuhan bahan baku biomassa. Sejak bertahun-tahun, natrium hidroksida (NaOH) telah digunakan sebagai alkali yang efektif untuk pengolahan awal biomassa. NaOH mendukung pemutusan ikatan ester/eter pada lignin karbohidrat kompleks. Selama pretreatment, NaOH terdisosiasi menjadi Na⁺ dan OH⁻ yang selanjutnya meningkatkan laju hidrolisis. Haque *et al.* (2012) melaporkan pretreatment NaOH encer dari jerami barley menjadi metode efektif memberikan hasil gula pereduksi 86,7% setelah hidrolisis enzimatik. Perlakuan awal dilakukan pada suhu 105°C selama 10 menit menggunakan NaOH 2% yang menghasilkan



penyisihan lignin sebesar 84,8%. Selain itu, sampel yang diberi perlakuan sebelumnya menunjukkan peningkatan indeks kristalinitas sebesar 71,5% dibandingkan dengan indeks kristalinitas yang lebih rendah sebesar 45,1% untuk sampel yang tidak diberi perlakuan, sehingga mengkonfirmasi penghilangan lignin. Kerugian utama dari proses pretreatment alkali termasuk biaya pasca-treatment tinggi yang terlibat untuk netralisasi bubuk, waktu tinggal yang lebih lama, dan ketidakmampuannya untuk mengolah bahan baku biomassa dengan kandungan lignin tinggi (Kumar et al., 2020).

Metode pretreatment *ammonia fiber explosion* (AFEX) melibatkan perlakuan biomassa lignoselulosa dengan amonia cair anhidrat (1:1 b/b) di bawah suhu reaksi sedang (60 hingga 170° C) dan tekanan tinggi (15-30 bar) untuk waktu yang singkat (5-60 menit) (Teymouri et al., 2005; Uppugundla et al., 2014). Metode AFEX menawarkan banyak keuntungan seperti peningkatan luas permukaan biomassa lignoselulosa serta ekseibilitas enzim untuk hidrolisis, produksi inhibitor (produk degradasi gula) yang dapat diabaikan, suhu sedang, waktu tinggal singkat, retensi tinggi kandungan selulosa/hemiselulosa. Selain itu, proses AFEX dapat dioptimalkan untuk mendapatkan hasil glukosa dan xilan maksimum dengan memvariasikan lima parameter utama yaitu suhu, waktu tinggal, tekanan, kadar air dan kadar amonia (Da Costa Sousa et al., 2016). Dalam sebuah studi oleh Teymouri et al. (2005) ketika perlakuan awal AFEX dilakukan pada suhu sedang 90°C dengan pemuatan amonia ke brangkas jagung 1:1 (b/b) selama 5 menit, hidrolisis enzimatis dari sampel yang diberi perlakuan awal memberikan hasil teoritis glukosa (100%) dan xilosa (80%). Hasil serupa dalam hidrolisis enzimatis dari AFEX poplar yang telah dirawat sebelumnya n oleh Balan et al. (2009) dimana konversi glukosa at dari 10% menjadi 22% karena kadar air meningkat % menjadi 233%. Metode AFEX juga memiliki beberapa an, dimana kelemahan utamanya adalah biaya modal



peralatan yang tinggi untuk menahan tekanan tinggi yang terlibat dalam proses. Selain itu, tingginya biaya amonia dan peningkatan kebutuhan energi untuk daur ulang amonia adalah beberapa masalah yang terkait dengan proses komersialisasi (Rezania *et al.*, 2020). Selain itu, proses AFEX kurang efektif untuk pretreatment biomassa dengan kandungan lignin tinggi. Misalnya, hasil hidrolisis yang lebih rendah dari 40-50% dilaporkan untuk AFEX-pretreated aspen chips dan koran (kandungan lignin 25%) dibandingkan dengan hasil hidrolisis tinggi 90% untuk ampas tebu (15% kandungan lignin) dan *bermudagrass* (5% kandungan lignin) (Kumar *et al.*, 2020).

Berbeda dengan strategi pretreatment fisik dan kimia, metode pretreatment biologi diakui sebagai proses konsumsi energi yang efektif, ramah lingkungan dan proses konsumsi energi yang sangat rendah (Alio *et al.*, 2019). Perlakuan ini dilakukan oleh mikroba seperti jamur pelapuk lunak, jamur tanah coklat, dan jamur putih yang sebagian besar menghancurkan hemiselulosa, lignin dan jumlah selulosa yang sangat sedikit (Zhang *et al.*, 2012; Kazemi, 2020). Suhara dkk melakukan pra perlakuan bundel bambu dengan jamur seperti *Punctularia* sp. Setelah pretreatment, total hasil gula (60,3%) ditingkatkan dan kandungan lignin berkurang (Abbott *et al.*, 2004). Pada pretreatment biologi juga menggunakan produk berbasis bio (enzim) yang secara selektif mendegradasi lignin dan hemiselulosa (Kumar *et al.*, 2020). Telah dilaporkan bahwa berbagai spesies jamur pelapuk putih yang secara efektif mendegradasi lignin melalui produksi peroksidase dan lakase (Alvira *et al.*, 2010; Sun, *et al.*, 2002; Sindhu *et al.*, 2016). Parameter utama yang mempengaruhi pretreatment berbasis mikroba adalah ukuran partikel, kelembaban kandungan, suhu pH, dan kebutuhan nutrisi (karbon, nitrogen, fosfor).



dan biaya utama yang terkait dengan pretreatment jamur rendah, konsumsi bahan kimia, kebutuhan energi, dan timbulan air, timbulan sampah dan timbulan penghambat

serta proses hilir yang mudah. Namun pengobatan jamur terbatas karena pemanfaatan kandungan karbohidrat biomassa untuk pertumbuhan, sehingga mempengaruhi secara keseluruhan hasil dari proses. Kelemahan utama lainnya yang terkait dengan jamur pengobatan adalah waktu inkubasi yang lama (Zabed *et al.*, 2019; Zheng *et al.*, 2014; Wan *et al.*, 2012; Rouches *et al.*, 2016). Hal tersebut bisa diatasi dengan memanfaatkan bakteri pendegradasi lignin selektif. Efisiensi pendegradasi lignin yang rendah dari bakteri membatasi aplikasinya untuk perawatan biomassa yang dibantu mikroba. Namun, bakteri relatif mudah untuk dimodifikasi secara genetik dan sangat mudah beradaptasi sehingga dapat digunakan untuk delignifikasi (Zabed *et al.*, 2019; Carrillo *et al.*, 2016; Yan *et al.*, 2017; Shi *et al.*, 2017).

Aplikasi enzim untuk menghilangkan komponen biomassa secara selektif sesuai kebutuhan adalah salah satu pendekatan yang sangat populer. Isolasi komponen selulosa dan hemiselulosa untuk degradasi lignin agar meningkatkan aksesibilitas polimer karbohidrat ke enzim hidrolisis (Romano *et al.*, 2009; Bhardwaj *et al.*, 2019; Agrawal *et al.*, 2019). Satu-satunya batasan yang terkait dengan enzim adalah biaya untuk produksi, stabilitas, umur simpan, dan kemampuan untuk digunakan kembali (Kumar *et al.*, 2018).

2.4 Hidrolisis

Proses pemecahan biomassa lignoselulosa yang berupa selulosa dan hemiselulosa menjadi monomer gula penyusunnya disebut dengan hidrolisis. Pada hidrolisis selulosa akan terurai menjadi glukosa, sedangkan hemiselulosa akan terurai menjadi beberapa monomer gula pentose (C₅) dan heksosa (C₆) (Seftian 2).



Proses hidrolisis dapat dilakukan dengan cara hidrolisis yaitu menggunakan asam sulfat (H₂SO₄) atau dengan menggunakan asam klorida (HCl) (Broto, 2010). Pada hidrolisis

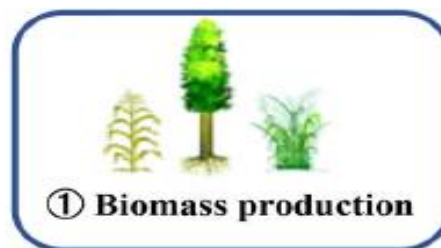
dengan asam, untuk asam pekat membutuhkan temperatur yang lebih rendah dibandingkan dengan asam encer. Konsentrasi asam yang digunakan yaitu 10-30% (Zimbardi *et al.*, 2010). Hidrolisis asam sulfat membutuhkan waktu reaksi antara 2-6 jam dengan temperatur reaksi 100° C. Temperatur yang lebih rendah akan meminimalisasi terjadinya degradasi gula. Penggunaan asam pekat memiliki keuntungan yaitu menghasilkan konversi gula yang tinggi hingga mencapai 90%. Sedangkan kekurangan pada hidrolisis ini yaitu membutuhkan waktu yang lebih lama untuk bereaksi dan membutuhkan proses pencucian yang baik untuk mencapai pH reaksi sebelum ditambahkan dengan mikroba (Badger, 2002).

Hidrolisis dapat juga dilakukan secara enzimatik yaitu menggunakan enzim berupa enzim selulase untuk menghidrolisis selulosa atau dapat juga dengan menggunakan mikroba penghasil selulase. Hidrolisis dengan metode ini memiliki keuntungan yaitu efisiensi reaksi tinggi karena enzim bersifat selektif sehingga pembentukan produk samping bisa diminimalisasi, kondisi reaksi temperatur dan tekanan tidak tinggi bahkan biasanya dilakukan pada temperatur ruang dan tekanan atmosfer sehingga tidak membutuhkan peralatan khusus. Sedangkan kekurangan dari hidrolisis enzimatik ini yaitu waktu reaksi yang dibutuhkan lebih lama hingga mencapai 72 jam (Broto, 2010).

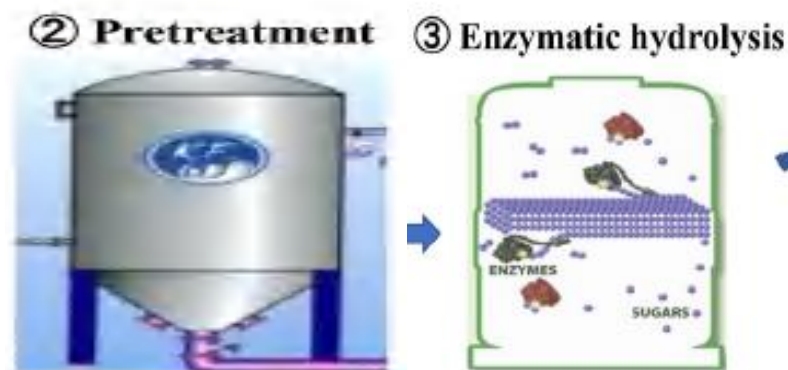
Biomassa lignoselulosa mengandung selulosa (berlignoselulosa) yang terbentuk dari tiga komponen utama yaitu selulosa, hemiselulosa dan lignin bersama dengan sejumlah kecil senyawa lain seperti protein, abu, dan pektin (Akhtar *et al.*, 2016). Selulosa merupakan komponen utama yang terkandung dalam dinding sel yang terbungkus oleh lignin ikatan yang cukup kuat. Lignin dan hemiselulosa an penghalang sehingga selulosa sulit diakses oleh selulase Untuk memecah struktur kuat ini maka diperlukan i perlakuan awal (pretreatment) agar lignoselulosa



pecah. Pemecahan lignoselulosa akan mengakibatkan selulosa lebih mudah untuk diakses oleh enzim agar dapat memecah polimer polisakarida menjadi gula pada proses hidrolisis. Apabila tidak dilakukan pretreatment terlebih dahulu maka lignoselulosa sulit untuk dihidrolisis karena lignin sangat kuat melindungi selulosa sehingga sangat sulit melakukan proses hidrolisis (Seftian dkk, 2012).



Biomassa dipanen dan dikirim



Biomassa diolah terlebih dahulu untuk membuat selulosa dapat diakses oleh enzim

Rantai selulosa dipecah menjadi gula

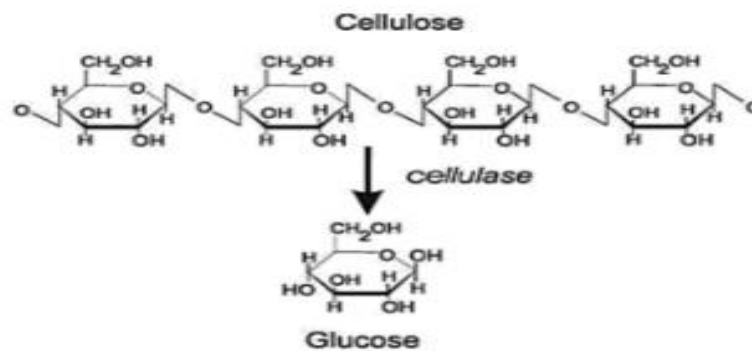
Gambar 5. Proses produksi degradasi selulosa (Zhang *et al.*, 2021).

Enzim selulase merupakan enzim yang mampu memutuskan ikatan glikosidik β (1,4) pada selulosa, selodektrin, selobiosa dan turunan selulosa lainnya. Selulase merupakan enzim kompleks yang mempunyai peran penting dalam proses

Selulase terdiri dari eksoselulase atau drolase, endoselulase atau endo- β -1,4-glukanase dan glukosidase atau selobiase. Endoglukanase berfungsi memecah polisakarida selulosa menjadi rantai yang lebih



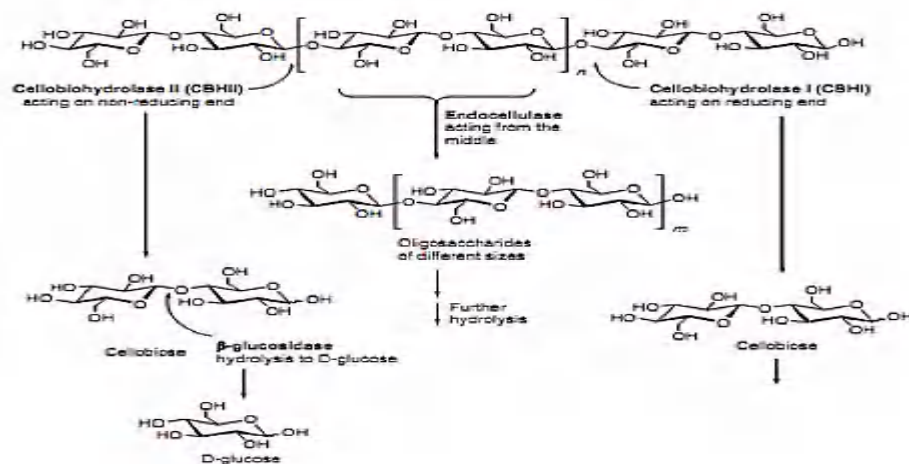
pendek yaitu oligosakarida. Endoglukanase bekerja pada wilayah serat selulosa yang mempunyai kristalinitas rendah untuk memecah selulosa secara acak dan membentuk ujung rantai yang bebas. Eksoglukanase (cellobiohidrolase) berfungsi mengubah satuan oligosakarida menjadi molekul-molekul disakarida. Sedangkan β -glukosidase berfungsi untuk mengonversi atau memecah satuan disakarida menjadi dua molekul glukosa yang merupakan gula sederhana yang dapat diubah menjadi etanol.



Gambar 6. Degradasi selulosa oleh enzim selulase

Ekso- β -1,4 glukanase atau selobiohidrolase bekerja dengan cara melepas unit-unit selobiosa dari ujung rantai selulosa. Endo- β -1,4-glukanase mampu menghidrolisis selulosa secara acak menghasilkan selodextrin, selobiosa dan glukosa. Enzim ini sangat aktif memutus ikatan selulosa yang dapat larut (*amorf*). Secara umum selulase perlu diserap kepermukaan selulosa yang tidak larut sebelum hidrolisis, dengan demikian melonggarkan daerah padat tidak dapat diakses untuk membuka rantai selulosa terkubur dalam mikrofibril (Velmuguran dan Incharoensakdi, 2017). Enzim selulase dapat mengubah selulosa tak tersubstitusi menjadi selobiosa yang kemudian dihidrolisis lebih lanjut dengan β -glukosidase. Pemutusan ikatan an menghasilkan oligosakarida turunan selulosa yang diubah menjadi monomer glukosa. Nama sistematik ase adalah β -1,4-D-glukan-glukano hidrolase.





Gambar 7. Mekanisme hidrolisis enzimatis selulosa dengan enzim selulase (Amarasekara, 2014 dalam Bambang *et al.*, 2017).

2.5 *Trichoderma reesei*

Trichoderma reesei merupakan jamur yang dikenal karena memiliki kemampuan untuk menghasilkan sejumlah besar enzim pendegradasi selulosa dan hemiselulosa ekstraseluler (Havukainen *et al.*, 2021). *T. reesei* dianggap sebagai juara yang tak terbantahkan dalam memproduksi selulase diantara jamur pendegradasi biomassa, sehingga tidak mengherankan bahwa sebagian besar proyek R&D pada produksi bioetanol dari lignocellulosics didasarkan pada penggunaan *T. reesei* (Gusakov, 2011). Adapun klasifikasi dari *T. reesei* (Schmol, 2022).

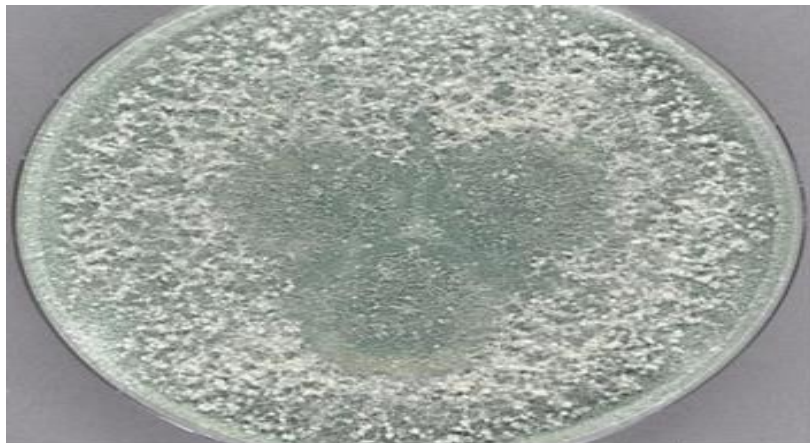
Regnum : Fungi
 Divisio : Ascomycota
 Classis : Ascomycetes
 Ordo : Hypocreales
 Familia : Hypocreaceae
 Genus : *Trichoderma*
 : *Trichoderma reesei* E.G Simmons.



Trichoderma reesei merupakan raja dari jamur selulolitik. Jamur ini berawal dari Peran Dunia II, ketika pasukan di Pasifik Selatan mengalami kehancuran cepat dari

pakaian dan tenda kapas. 'Musuh' yang tak terlihat diidentifikasi sebagai jamur mikroskopis *T.viride* strain QM6a (Eveleigh, 1998). Studi ekstensif jamur ini dilakukan, menghasilkan pemilihan mutan jamur hiperselulotik termasuk galur hasil tinggi *T.vride* QM9414 dan MCG77. Pada tahun 1977, jamur itu berganti nama menjadi *T. reesei* untuk menghormati ET.Reese yang menemukannya pada tahun 1940-an (Eveleigh, 1998). Laporan Mandels dan Sternberg (1976) merangkum data lebih dari 14000 jamur yang dikumpulkan dan disaring dari sudut pandang aktivitas selulasenya, tidak ada yang mampu menandingi *T.reesei* yang ditemukan. 'Raja' jamur selulotik akhirnya dinobatkan. Strain hiperproduksi selulase yang berbeda dari *T.reesei* telah dikembangkan, galur RUT C30 adalah salah satu galur yang paling kuat dan berkarakteristik terbaik dan telah menjadi galur referensi diantara produsen selulase tinggi *T.reesei* (Le Crom, 2009).

Gambar *T.reesei* dalam cawan petri pada umur 7 hari dalam medium CYA (*Czapek Yeast Agar*).



Gambar 8. Jamur *T.reesei* (Frisvad *et al.*, 2018).

Selulase dari jamur telah menerima lebih banyak penelitian dari pada kelompok fisiologis lainnya dan selulase dari saat ini mendominasi dunia industri. Secara khusus sistem *T.reesei* awalnya disebut *T.viride* telah menjadi fokus selama 50 tahun. *T. reesei* menghasilkan setidaknya



dua eksoglukanase (CBHI dan CBHII), lima endoglukanase (EGI, EGII, EGIII, EGIV, dan EGV), dan dua glukosidase (BGLI dan BGLII). Menghasilkan strain untuk meningkatkan hasil selulase yaitu hingga 0,33 g protein/ g karbohidrat yang dapat digunakan. Struktur tiga dimensi CBHI menegaskan bahwa selobiosa adalah produk hidrolitik utama ketika rantai selulosa melewati terowongan. Kadang-kadang, selotriosa atau glukosa dilepaskan selama tahap awal hidrolisis. Struktur EGI (Secara struktural terkait dengan CBHII) juga telah diselesaikan untuk mengungkapkan adanya loop yang lebih pendek yang menciptakan alur daripada terowongan (Lynd *et al.*, 2002).

Aktivitas selobiohidrolase sangat penting untuk hidrolisis selulosa mikrokristalin. CBHI dan CBHII adalah komponen utama dari sistem selulase *T.reesei* masing-masing mewakili 60 dan 20% dari total protein selulase yang diproduksi secara massal oleh jamur. Peran penting CBM untuk kedua enzim memastikan pengikatan dan proses telah ditunjukkan dengan jelas. Namun, kedua selobiohidrolase sangat lambat dalam menurunkan derajat polimerisasi selulosa. Endoglukanase dianggap terutama bertanggung jawab untuk menurunkan derajat polimerisasi dengan memutus rantai selulosa secara internal di daerah yang relatif amorf, sehingga menghasilkan ujung rantai selulosa baru yang rentan terhadap aksi selobiohidrolase. Kebutuhan lima spesies endoglukanase dalam sistem selulase *T.reesei* belum dijelaskan dengan jelas, terutama mengingat endoglukanase (dengan EGI dan EGII sebagai spesies utama) mewakili kurang dari 20% dari total protein selulase *T.reesei*.

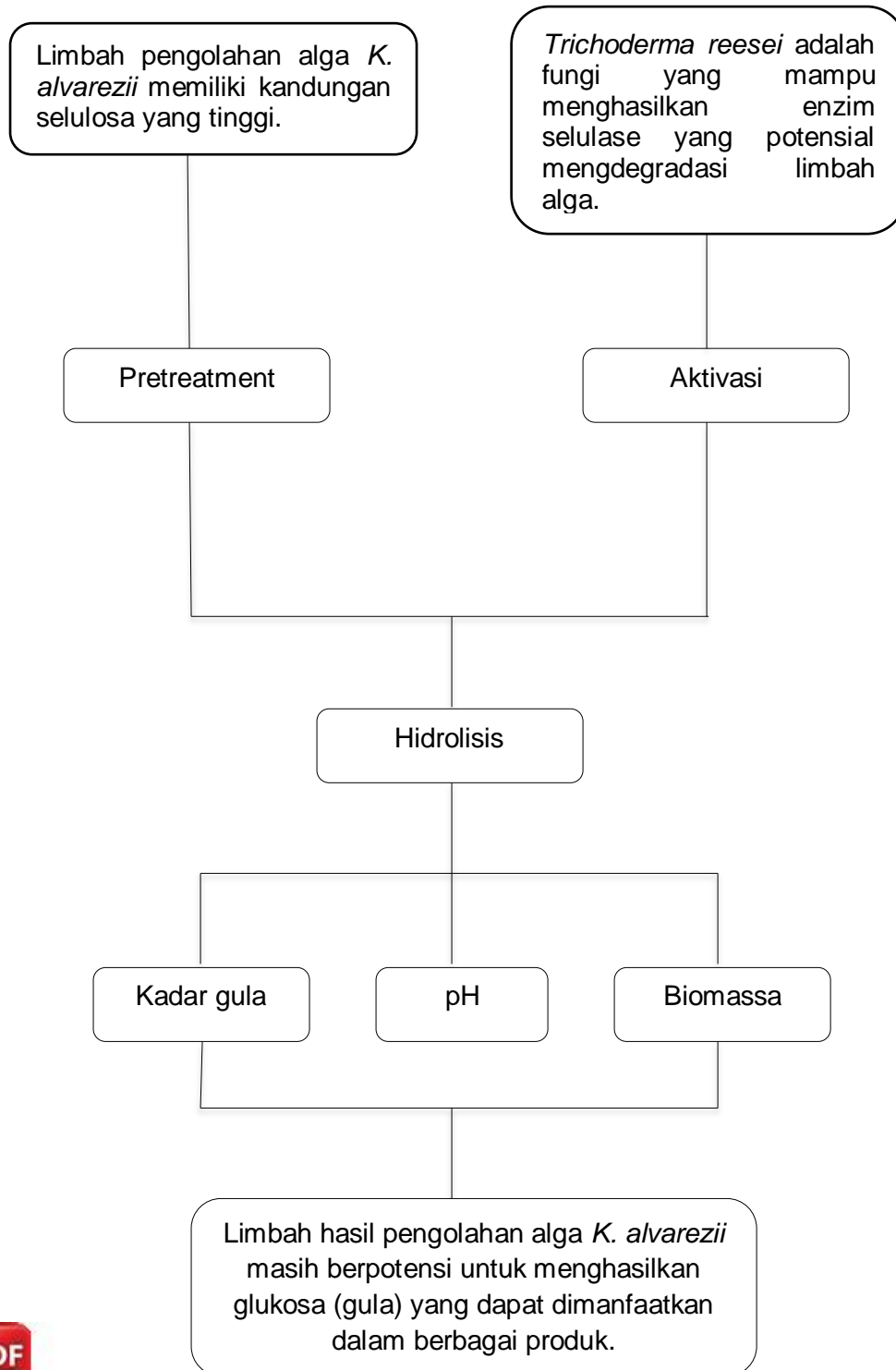
Sinergi antara endoglukanase dan selobiohidrolase telah ditunjukkan untuk EGI, dan EGII. Namun, sinergi antara anase belum ditunjukkan dengan jelas. Sebagian dari nya mungkin bahwa substrat selulosa alami tidak n untuk percobaan laboratorium karena sifatnya yang i dan fungsi sebenarnya dari endoglukanase yang



berbeda mungkin tidak diamati pada selulosa yang dimurnikan. Pada beberapa endoglukanase, seperti EGI memiliki spesifitas substrat yang luas (misalnya, aktivitas xilanase). Kehadiran CBM tidak penting untuk aktivitas endoglukanase atau untuk sinergisme endo-ekso. Selobiosa, produk utama aktivitas CBHI dan CBHII menghambat aktivitas selobiohidrolase dan endoglukanase. Produksi setidaknya dua glukosidase oleh *T. reesei* memfasilitasi hidrolisis selobiosa dan oligosakarida kecil menjadi glukosa, baik BGLI dan BGLII telah diisolasi dari supernatan kultur tetapi sebagian besar enzim ini tetap terikat pada dinding sel (Lynd *et al.*, 2002).



2.6 Kerangka Pikir



Gambar 9. Kerangka Pikir

