

Abstract

Hydrogen demand increasing both for industry and transportation lately. Hydrogen can be produced by anaerobic fermentation process. The biological pre-treatment stage in the anaerobic fermentation process has a better impact on the environmental and cost. Anaerobic fungi play active role in the degradation of plant fibers by producing hydrolytic enzymes in the rumen and have the possibility to produce hydrogen gas. Therefore, enrichment and isolation of ruminant samples are carried out to obtain the best anaerobic fungi for optimization of hydrogen-producing anaerobic fermentation.

Hungate technique was used to isolate anaerobic fungi from ruminant feces. The technique with hermetically sealed bottles with selective media with a composition of 15% clarified rumen fluid and 1% shredded rice straw is used for enrichment of anaerobic fungi.

Six anaerobic fungi isolates were isolated from ruminant fecal samples (FH cattle, Bali cattle, water buffalo, PE goats, spotted deer). Among 6 isolates, two of them produced significantly higher cellulase and hydrogen than the others. Buffalo fecal inoculum was able to produce 17.85 percent hydrogen with cellulase enzyme activity of 3,790 IU/mL on day 9, while anaerobic isolation using goat fecal inoculum produced 11.34 percent with cellulase enzyme activity of 2,242 IU/mL on day 9. These two isolates were then analyzed by metagenomic analysis and identified as a mixture dominated by *Neocallimastix californiae*, *Feramyces austinii*, *Candida tropicalis*, and *Pecoramyces ruminantium*. These two isolates may be promising options for use as co-cultures in anaerobic fermentation or biogas production.

Keywords: anaerobic mushroom, anaerobic fermentation, cellulases enzym, hydrogen production

Abstrak

Kebutuhan hidrogen makin naik baik untuk industri maupun transportasi. Hidrogen dapat diproduksi dengan teknologi fermentasi anaerobik. Tahapan *pre-treatment* secara biologis dalam proses fermentasi anaerobik memberikan dampak lebih baik dari sisi lingkungan dan biaya. Jamur anaerobik sebagai salah satu alternatif mikrobial untuk *pre-treatment* substrat limbah lignosellulosa yang efektif. Jamur anaerobik berperan aktif dalam degradasi serat tanaman dengan memproduksi enzim hidrolitik di dalam rumen dan memiliki kemungkinan untuk menghasilkan gas hidrogen. Oleh karena itu dilakukan enrichment dan isolasi dari sampel ruminansia untuk mendapatkan jamur anaerobik terbaik untuk optimalisasi fermentasi anaerobik penghasil hidrogen.

Untuk mengisolasi jamur anaerobik dari feses ruminansia digunakan teknik *Hungate*. Teknik dengan botol tertutup kedap udara dengan media selektif dengan komposisi 15% rumen fluid dan 1% jerami padi digunakan untuk enrichment jamur anaerobik. Dua tahap enrichment dilakukan dan diamati pertumbuhan, aktifitas enzim dan produksi hidrogen. Sampel yang menunjukkan nilai tertinggi kemudian dianalisa genomik untuk melihat populasi jamur yang terlibat dalam enrichment.

Dalam penelitian ini, 6 isolat jamur anaerobik diisolasi dari sampel feses ruminansia (sapi FH, sapi Bali, kerbau air, kambing PE, rusa totol). Dari 6 isolat tersebut, dua di antaranya menghasilkan selulase dan hidrogen secara signifikan lebih tinggi daripada yang lain. Inokulum feses kerbau mampu menghasilkan 17,85 persen hidrogen dengan aktivitas enzim selulase sebesar 3.790 IU/mL pada hari ke-9, sementara fermentasi anaerob menggunakan inokulum feses kambing menghasilkan 11,34 persen dengan aktivitas enzim selulase sebesar 2.242 IU/mL pada hari ke-9. Dua isolat ini kemudian dianalisis dengan analisis metagenomik dan diidentifikasi sebagai campuran yang didominasi oleh *Neocallimastix californiae*, *Feramyces austinii*, *Candida tropicalis*, dan *Pecoramyces ruminantium*. Dua isolat ini mungkin menjadi pilihan yang menjanjikan untuk digunakan sebagai kultur bersama dalam fermentasi anaerobik atau produksi biogas.

Kata Kunci: jamur anaerobik, fermentasi anaerobik, enzim selulase, produksi hidrogen

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Gas hidrogen sebagai sumber energi alternatif yang ramah lingkungan memiliki peran sangat penting. Sebagai salah satu bahan bakar terbersih, gas hidrogen tidak menghasilkan emisi gas rumah kaca atau polutan udara saat digunakan sebagai sumber energi listrik. Proses pembakarannya hanya menghasilkan air murni sebagai produk sampingan, sehingga tidak menyebabkan polusi udara yang merugikan kesehatan manusia dan lingkungan (Hamada *et al.*, 2023). Selain itu, gas hidrogen juga memiliki aplikasi dalam industri, terutama dalam produksi bahan bakar transportasi yang ramah lingkungan dan dalam berbagai proses industri lainnya. Dengan permintaan gas hidrogen yang terus meningkat, penggunaan gas hidrogen juga memiliki potensi ekonomi yang besar, baik dalam industri maupun sektor transportasi. Dengan beragam manfaat tersebut, gas hidrogen menjadi salah satu kandidat bahan bakar yang paling menjanjikan dimasa yang akan datang. Menurut Global Hydrogen Review 2023, konsumsi gas hidrogen pada tahun 2022 meningkat sekitar 45% dari tahun sebelumnya, konsumsi gas hidrogen di seluruh dunia mencapai 95 juta ton. Peningkatan ini didorong terutama oleh penggunaan yang lebih tinggi dari kendaraan berat. Penggunaan gas hidrogen pada tahun 2022 masih terkonsentrasi pada aplikasi tradisional seperti industri dan pengolahan minyak, dengan kurang dari 0,1% digunakan untuk aplikasi baru di industri berat, transportasi, atau pembangkitan listrik dan penyimpanan (Anonim, 2023). Oleh karena itu, penting untuk terus mengembangkan teknologi dan infrastruktur yang mendukung produksi,

penyimpanan, dan penggunaan gas hidrogen sebagai sumber energi yang berkelanjutan dan ramah lingkungan (Hasan & Widayat, 2022; Mazloomi & Gomes, 2012)

Gas hidrogen dapat diproduksi melalui berbagai metode, termasuk elektrolisis air, *reforming steam* dari gas alam atau biomassa, dan proses fermentasi biologis. Salah satu metode yang menjanjikan adalah produksi gas hidrogen melalui fermentasi anaerobik dari bahan organik. Proses fermentasi ini melibatkan tahap *pre-treatment*, hidrolisis, dan asidifikasi, yang menghasilkan gas biohidrogen sebagai produk utama. Metode ini dianggap ramah lingkungan karena dapat menggabungkan produksi gas hidrogen dengan pengolahan limbah, serta memanfaatkan sumber daya terbarukan. Dengan potensi energi yang tinggi dan kemungkinan aplikasi yang luas, produksi gas hidrogen dari sumber daya terbarukan seperti proses fermentasi biologis menjadi fokus penelitian yang menarik dalam upaya menuju energi bersih dan berkelanjutan (Trisakti *et al.*, 2012).

Jerami padi merupakan salah satu limbah pertanian yang memiliki potensi melimpah di Indonesia terutama saat musim panen. Bila hasil gabah rata-rata 5 ton/ha maka dalam 1 hektar diperoleh jerami $\pm 7,5$ ton dengan asumsi nisbah jerami adalah 2 : 3. Potensi tahunan jerami padi di Indonesia mencapai 48,39 juta ton (Haryanto *et al.*, 2020). Limbah jerami padi dihasilkan setelah proses panen padi dan seringkali hanya dimanfaatkan sebagai bahan bakar, pakan ternak, atau bahkan dibiarkan terbuang begitu saja. Petani padi di Indonesia belum memperlakukan jerami sebagai bagian yang menyatu dari usaha tani padi. Sekitar 75% petani membakar jerami padinya di sawah. Secara tradisional pemanfaatan jerami masih sangat terbatas untuk keperluan rumah tangga dan kegiatan usaha tani. Secara tradisional, peternak menghamparkan jerami padi kering setebal 5-10 cm di kandang sapi atau kandang kerbau yang lantainya berupa tanah (Sumardi, 2015).

Beberapa teknologi konversi energi jerami padi yang telah diaplikasikan meliputi pembakaran langsung, densifikasi, dan biogas. Pembakaran langsung terbuka di lahan masih menjadi cara yang paling umum untuk memanfaatkan jerami padi, namun teknologi ini memiliki efek negatif seperti emisi gas rumah kaca dan polutan yang mempengaruhi kualitas udara regional (Haryanto *et al.*, 2020). Namun, jerami padi sebenarnya memiliki potensi yang sangat besar untuk dimanfaatkan sebagai sumber energi terbarukan. Kandungan selulosa dan hemiselulosa yang tinggi dalam jerami padi menjadikannya sebagai bahan baku yang potensial untuk diubah menjadi gula sederhana melalui proses tertentu. Gula-gula tersebut kemudian dapat difermentasi menjadi berbagai produk, termasuk hidrogen, yang merupakan sumber energi yang bersih dan dapat digunakan sebagai alternatif untuk mengurangi ketergantungan pada bahan bakar fosil (Setiarto, 2016; Sudiyani *et al.*, 2010). Namun demikian, struktur fisik dan kimia dari jerami padi yang sulit diubah karena terlalu kuat membuat proses konversi lebih rumit dan menjadikan kurang efisien dalam proses *pre-treatment* fermentasi anaerobik.

Proses *pre-treatment* bertujuan untuk mengatasi struktur yang sulit diubah dari bahan baku biomassa, sehingga membuat selulosa lebih mudah diakses untuk proses hidrolisis enzimatis. Singh *et al.* (2015) mengungkapkan bahwa tahap *pre-treatment* dilakukan dengan menggunakan metode seperti *steam explosion*, asam, dan alkali. *Steam explosion* melibatkan perlakuan panas dan tekanan tinggi untuk memecah struktur lignoselulosa. Sementara itu, *pre-treatment* asam dan alkali melibatkan penggunaan larutan asam atau basa untuk menguraikan komponen lignoselulosa dan meningkatkan aksesibilitas selulosa. Metode-metode ini membantu dalam meningkatkan efisiensi konversi biomassa lignoselulosa.

Namun demikian, pada metode *pre-treatment steam explosion*, asam dan alkali terdapat beberapa kekurangan yang perlu diperhatikan. Metode *steam explosion* memerlukan biaya yang tinggi karena melibatkan peralatan khusus dan uap air bertekanan tinggi. Selain itu, risiko keamanan juga menjadi perhatian karena proses ini melibatkan tekanan dan suhu yang sangat tinggi. Selama proses *steam explosion*, pembentukan senyawa inhibitor seperti asam-asam organik dan furfural dapat terjadi, yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba dan mengurangi efisiensi fermentasi. Selulosa juga dapat mengalami kerusakan selama proses ini, yang dapat mengurangi efisiensi hidrolisis enzimatis dan fermentasi. Begitu juga dengan metode *pre-treatment* asam dan alkali, meskipun efektif dalam meningkatkan konversi biomassa lignoselulosa, juga memiliki beberapa kekurangan yang perlu diperhatikan. Selama proses *pre-treatment*, pembentukan senyawa inhibitor seperti asam-asam organik, furfural, dan senyawa fenolik dapat terjadi, yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba dan mengurangi efisiensi fermentasi. Selain itu, proses ini juga dapat menyebabkan korosi pada peralatan, yang dapat mengurangi umur peralatan dan meningkatkan biaya perawatan. Penggunaan bahan kimia berbahaya seperti asam sulfat, asam klorida, dan natrium hidroksida dalam proses *pre-treatment* juga menjadi perhatian karena dapat berbahaya bagi kesehatan dan lingkungan jika tidak ditangani dengan benar. Selain itu, proses *pre-treatment* asam dan alkali juga dapat mempengaruhi kualitas produk akhir, seperti warna, aroma, dan rasa, yang dapat mempengaruhi penerimaan konsumen. Oleh karena itu, solusi lain diperlukan untuk mengatasi kekurangan-kekurangan ini dan meningkatkan proses *pre-treatment* (Singh *et al.*, 2015). *Pre-treatment* secara biologis dapat menjadi solusinya. Penggunaan jamur anaerobik merupakan salah satu metode untuk *pre-treatment* bahan baku jerami padi (Ivarsson *et al.*, 2018; Kazda *et al.*, 2014).

Produksi hidrogen melalui fermentasi anaerobik dengan menggunakan inokulum jamur anaerobik adalah pendekatan yang menjanjikan dalam konteks energi terbarukan. Fermentasi anaerobik adalah proses biologis di mana mikroorganisme menguraikan bahan organik menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana tanpa menggunakan oksigen sebagai akseptor elektron (Kazda *et al.*, 2014). Dalam konteks produksi hidrogen, inokulum anaerobik, seperti bakteri atau jamur yang hidup dalam lingkungan tanpa oksigen, diintroduksi ke dalam sistem fermentasi. Mikroorganisme ini menggunakan berbagai substrat organik, seperti limbah organik, limbah pertanian, limbah industri, atau biomassa lignoselulosa, untuk menghasilkan hidrogen sebagai produk sampingan. Dalam proses ini, mikroorganisme anaerobik menghasilkan enzim-enzim yang memecah senyawa kompleks menjadi molekul-molekul sederhana, termasuk hidrogen. Penggunaan mikroorganisme yang tepat sangat penting untuk meningkatkan efisiensi produksi biohidrogen dan mengurangi dampak lingkungan dari proses fermentasi (Haitjema *et al.*, 2014).

Jamur anaerobik menjadi pilihan yang menarik untuk fermentasi anaerobik sebagai penghasil hidrogen karena beberapa alasan. Pertama, jamur anaerobik memiliki kemampuan untuk mendegradasi bahan lignoselulosa yang terdapat dalam substrat seperti rumput canary, jerami, dan limbah biomassa lainnya. Proses degradasi ini menghasilkan senyawa-senyawa organik kompleks yang dapat menjadi sumber karbon untuk produksi hidrogen. Selain itu, jamur anaerobik mampu memproduksi enzim-enzim hidrogenase yang dapat mengkatalisis reaksi produksi hidrogen dari senyawa-senyawa organik. Enzim-enzim ini memungkinkan jamur untuk menghasilkan hidrogen sebagai produk sampingan dari metabolisme anaerobik mereka. Selain itu, jamur anaerobik memiliki toleransi yang baik terhadap kondisi anaerobik, yang memungkinkan mereka untuk tetap

aktif dan menghasilkan hidrogen dalam lingkungan tanpa oksigen. Kemampuan jamur anaerobik untuk fermentasi anaerobik membuatnya menjadi kandidat yang menarik untuk dikembangkan sebagai agen fermentasi dalam proses produksi hidrogen dari substrat lignoselulosa. Dengan kombinasi kemampuan degradasi bahan lignoselulosa, produksi enzim hidrogenase, toleransi terhadap kondisi anaerobik, dan potensi sebagai agen fermentasi, jamur anaerobik menjadi pilihan yang menarik untuk digunakan dalam fermentasi anaerobik sebagai penghasil gas hidrogen (Haitjema et al., 2014).

Mikrobioma usus umumnya bersifat anaerobik, yang berarti jamur anaerob dapat menjadi komponen penting dari mikrobioma usus hewan. Dalam konteks ini, hewan herbivora seperti ruminansia (misalnya sapi, domba, dan kambing) dikenal memiliki mikrobioma usus yang kaya akan jamur anaerob. Jamur anaerobik ini membantu dalam pencernaan serat dan bahan pangan kompleks lainnya yang ditemukan dalam makanan ruminansia. Seperti kita ketahui makanan dari ruminansia adalah tumbuh-tumbuhan yang kaya akan lignoselulosa, oleh karena itu hewan ruminansia dapat dipastikan memiliki jamur atau mikroba lain di dalam saluran pencernaan yang dapat mendegradasi lignoselulosa menjadi gula sederhana sebagai sumber nutrisi hewan inang. Oleh karena itu, hewan-hewan ini sering menjadi subjek penelitian untuk mempelajari mikrobioma usus dan peran jamur anaerob dalam proses pencernaan (de Jonge *et al.*, 2022).

Jamur anaerobik lebih banyak ditemukan di ruminansia dibandingkan dengan herbivora lain karena ruminansia memiliki sistem pencernaan yang unik dan kompleks, termasuk rumen yang merupakan lingkungan yang kaya akan mikroorganisme, termasuk jamur anaerobik. Rumen menyediakan lingkungan yang ideal bagi pertumbuhan dan perkembangan jamur anaerobik karena kondisi lingkungan di dalam rumen, seperti pH, suhu, dan ketersediaan nutrisi, sangat cocok untuk pertumbuhan jamur anaerobik.

Herbivora lain, seperti herbivora non-ruminansia atau *hindgut fermenters*, memiliki sistem pencernaan yang berbeda dari ruminansia. Pencernaan herbivora non-ruminansia terutama terjadi di usus belakang, seperti pada kuda dan gajah, dan seringkali memiliki waktu retensi makanan yang lebih singkat daripada ruminansia. Hal ini dapat mempengaruhi lingkungan mikrobiota dalam sistem pencernaan herbivora non-ruminansia, termasuk jumlah dan jenis jamur anaerobik yang ditemukan. Selain itu, perbedaan dalam pola makanan dan komposisi diet juga dapat memengaruhi keberadaan jamur anaerobik dalam sistem pencernaan herbivora. Misalnya, herbivora non-ruminansia yang mengonsumsi diet dengan kandungan serat yang berbeda atau memiliki pola makanan yang berbeda dapat memiliki populasi jamur anaerobik yang berbeda pula. Selain itu, jamur anaerobik juga dapat membantu dalam pencernaan serat tumbuhan di dalam rumen, sehingga mereka memiliki peran penting dalam sistem pencernaan ruminansia. Oleh karena itu, jamur anaerobik lebih banyak ditemukan di ruminansia dibandingkan dengan herbivora lain (Trinci *et al.*, 1994).

Penelitian yang dilakukan oleh Bauchop & Mountfort (1981) menunjukkan bahwa jamur anaerobik rumen mampu memproduksi hidrogen dalam fermentasi selulosa, yang sebelumnya belum pernah dilaporkan pada jamur. Jamur anaerobik rumen diisolasi dari salah satu dari empat ruang dalam sistem pencernaan hewan ruminansia, seperti sapi, domba, dan rusa. Sistem pencernaan ruminansia, khususnya pada hewan ternak seperti sapi, dikenal sebagai lingkungan yang kaya mikroorganisme, termasuk jamur anaerobik. Mikrobiota ini telah mengalami adaptasi yang signifikan terhadap kondisi lingkungan anaerobik di dalam rumen, dan oleh karena itu dapat menjadi inokulum yang sangat efisien untuk proses fermentasi dari bahan lignoselulosa seperti jerami padi, atau limbah tongkol jagung menjadi hidrogen. Jamur anaerobik dapat digunakan dalam kombinasi dengan

mikroorganisme lain, seperti bakteri methanogen, untuk meningkatkan efisiensi produksi biohidrogen. Beberapa spesies jamur anaerobik, seperti *Pecoramyces ruminantium* strain C1A, menghasilkan biohidrogen dan biogas dari bahan lignosellulosa seperti jagung (Dewi, 2011).

Feses merupakan hasil akhir dari proses pencernaan ruminansia, dan memiliki peluang terbesar untuk sumber inokulum dari isolasi jamur anaerobik (Davies *et al.*, 1993). Keberagaman mikroorganisme dalam feses ternak ruminansia memberikan potensi tambahan dalam mengatasi kompleksitas struktur lignosellulosa, mendegradasinya menjadi komponen yang dapat diubah menjadi hidrogen, dan oleh karena itu, mempercepat produksi hidrogen yang ramah lingkungan (Trinci *et al.*, 1994). Haitjema *et al.* (2014) melaporkan jamur *Neocallimastix patriciarum* dan *Orpinomyces* sp. C1A yang diisolasi dari saluran pencernaan hewan ruminansia, seperti domba dan sapi. Kedua jenis jamur ini merupakan contoh dari jamur anaerobik yang memiliki potensi dalam produksi biohidrogen dan memiliki kemampuan untuk mendegradasi biomassa lignosellulosa seperti jerami padi atau limbah pertanian lainnya.

Dari potensi jamur anaerobik pada feses ruminansia untuk produksi hidrogen, peneliti ingin lebih mengetahui lebih dalam mengenai potensi feses ruminansia yang terdapat di sekitar area peneliti. Dengan memahami lebih lanjut peran inokulum jamur anaerobik dari feses ruminansia dalam konversi limbah jerami padi menjadi gas hidrogen, penelitian ini diharapkan dapat memberikan wawasan baru dalam pengembangan teknologi yang lebih efisien dan berkelanjutan dalam produksi gas hidrogen dari sumber biomassa jerami padi, sekaligus memberikan kontribusi terhadap upaya global untuk mencapai keberlanjutan energi.

1.2. Permasalahan Penelitian

Perumusan masalah dalam penelitian ini dapat dirumuskan sebagai berikut:

1. Feses Ruminansia apa yang lebih potensial sebagai sumber inokulum jamur anaerobik dalam konteks fermentasi jerami padi untuk menghasilkan hidrogen?
2. Apa saja anggota populasi jamur anaerobik yang terlibat dalam proses fermentasi anaerobik produksi hidrogen?
3. Bagaimana mekanisme isolat jamur anaerobik ini dapat menghasilkan hidrogen?

Perumusan masalah ini mencerminkan fokus penelitian untuk menggali potensi dan kontribusi feses ruminansia sebagai sumber inokulum jamur anaerobik dalam mengatasi masalah produksi hidrogen dari jerami padi dengan mengidentifikasi sumber inokulum, jamur anaerobik yang terlibat, dan memahami metode yang tepat untuk mendapatkan efek efisiensi proses fermentasi.