

# PEMANFAATAN LIMBAH AMPAS PATI AREN MENJADI BIOETANOL SECARA ENZIMATIS METODE KONVENSIONAL DAN SSF (*Simultaneous of saccarification and fermentation*)

Dewi Astuti Herawati<sup>1</sup>, Evelyta Kusumawardhani<sup>2</sup>, Nony Puspawati<sup>3</sup>

<sup>1,2</sup>Program Studi S1 Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Setia Budi

<sup>3</sup>Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Setia Budi

Jl. Let Jend Sutoyo, Mojosongo, Surakarta Telp 0271(852518)

Email: dewitkusb@yahoo.com (email penulis utama)

## Abstrak

Telah dilakukan Penelitian dalam menentukan perbandingan penambahan enzim selulase dari *A.niger* dan *Trichoderma sp* yang optimum dan waktu optimum hidrolisis selulosa ampas pati aren menjadi glukosa, fermentasi glukosa menjadi bioethanol dengan metode konvensional dan metode SSF (*Simultaneous of saccarification and fermentation*). Metode konvensional dilakukan dengan menghidrolisis selulosa menjadi glukosa, dilanjutkan fermentasi glukosa menjadi bioethanol. Metode SSF berlangsungnya reaksi hidrolisis dan fermentasi secara simultan. Sampel sebanyak 5 gram ditambahkan larutan buffer acetat pH 5 serta campuran enzim selulase dari *A. Niger* dan *Trichoderma sp* dengan perbandingan (0:1), (1:0), (1:1), (1:2), dan (2:1) v/v untuk memperoleh glukosa. Selanjutnya ditambahkan ragi kering untuk memproduksi bioethanol. Berdasarkan hasil penelitian, perbandingan penambahan enzim selulase dari *A.niger* dan *Trichoderma sp* optimum pada hidrolisis selulosa menjadi glukosa adalah 1:2 (V/V) dan waktu optimum 3 hari menghasilkan glukosa 7,6914. Metode SSF membutuhkan waktu fermentasi 3 hari dengan kadar bioethanol 4,3139%. Metode konvensional membutuhkan waktu lebih lama. Metode paling baik adalah dengan menggunakan metode SSF dengan lama fermentasi 3 hari.

**Kata Kunci :** ampas pati aren; glukosa; bioethanol

## Pendahuluan

Bioethanol dapat diproduksi dari bahan baku yang mengandung selulosa. Limbah ampas pati aren diketahui banyak mengandung serat kasar. Serat kasar tersebut tersusun atas senyawa lignoselulosa (senyawa kompleks lignin, selulosa, dan hemiselulosa). Produksi bioethanol dimulai dari delignifikasi, hidrolisis, dan fermentasi. Delignifikasi bertujuan untuk menghilangkan lignin. Hidrolisis bertujuan untuk menghasilkan gula dari degradasi selulosa. Fermentasi mengubah gula menjadi bioethanol. Delignifikasi dilakukan dengan metode fisika-kimia, dipanaskan pada suhu 121°C selama 30 menit dengan asam sulfat 2,5% (Permatasari dkk., 2013). Berdasarkan penelitian sebelumnya, suhu 121°C merupakan suhu optimum untuk delignifikasi (Singh & Bishnoi, 2012). Penggunaan asam dengan konsentrasi rendah karena lignin lebih mudah terurai oleh asam dan mencegah selulosa ikut terdegradasi dalam proses delignifikasi.

Hidrolisis enzimatis memerlukan enzim selulase hasil mikrobia seperti fungi (jamur), bakteri, dan protozoa. Hidrolisis secara enzimatis dapat dilakukan pada suhu kamar, meskipun yield yang diperoleh cukup tinggi, tetapi harga enzim selulase komersial mahal. Enzim selulase komersial pada umumnya dihasilkan oleh jamur *Aspergillus* dan *Trichoderma* (Wang, 2008).

*Trichoderma sp* dan *A. Niger* secara kultur tunggal sering digunakan dalam pengolahan pakan karena kemampuannya dalam degradasi selulosa maupun pati menjadi protein. *Trichoderma sp* menghasilkan enzim selulolitik yaitu endoglukanase dan eksoglukanase yang berperan untuk menghidrolisis selulosa. *A.niger* tidak hanya menghasilkan enzim selulolitik, tetapi juga enzim amilolitik seperti amylase dan glukamilase (Ratana phadit, et al., 2010). *A. Niger* juga menghasilkan enzim β-glukosidase yang kuat dimana enzim ini berperan untuk mempercepat konversi selobiosa menjadi glukosa (Juhasz, et al., 2003). Perubahan glukosa menjadi bioethanol dapat dilakukan dengan cara fermentasi menggunakan ragi kering di dalamnya terdapat *S. cerevisiae*. Penggunaan *S. cerevisiae* dalam produksi bioethanol secara fermentasi telah banyak dikembangkan di beberapa negara, seperti Brasil, Afrika Selatan, dan Amerika Serikat. Hal ini disebabkan karena *S. cerevisiae* dapat memproduksi bioethanol dalam jumlah besar dan mempunyai toleransi terhadap bioethanol yang tinggi.

Pembuatan bioetanol yang sering digunakan adalah metode konvensional. Metode konvensional adalah proses hidrolisis dan fermentasi terjadi secara terpisah. Metode SSF (*Simultaneous of saccharification and fermentation*) yaitu gabungan dari dua reaksi hidrolisis dan fermentasi berlangsung secara simultan.

Tujuan dari penelitian ini adalah menentukan perbandingan penambahan enzim selulase dari *A.niger* dan *Trichoderma sp* yang optimum dalam hidrolisis selulosa menjadi glukosa. Menentukan waktu optimum yang dibutuhkan dalam hidrolisis selulosa menjadi glukosa. Menentukan metode yang paling baik dalam pembuatan bioetanol.

### Limbah Ampas Pati Aren

Industri tepung aren di Desa Daleman, Kecamatan Tulung, Kabupaten Klaten, Jawa Tengah terdapat 137 pengrajin dengan hasil produksi berupa pati aren (onggok) rata-rata 200 ton /tahun. Pengolahan pati aren menghasilkan beberapa komponen :

Tabel 1 Komponen hasil pengolahan aren

Komposisi (%)	Limbah Ampas Pati
	Aren
Air	7,87
Lignin	14,21
Selulosa	60,61
Hemiselulosa	15,74
Glukosa Reduksi	0,5689
Lain-lain	1,00

Sumber : (Purnavita & Sriyana, 2013)

Selulosa dan hemiselulosa terikat dengan lignin membentuk kompleks lignoselulosa. Selulosa dan hemiselulosa dapat dikonversi menjadi bioetanol, tetapi lignin tidak dapat dikonversi menjadi bioetanol (Toharisman, 2008). Perlakuan pendahuluan (*pretreatment*) perlu dilakukan untuk membuka ikatan rantai polimer atau selulosa dan hemiselulosa yang biasa disebut dengan proses lignifikasi.

### Produksi Bioetanol

Bioetanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) adalah cairan biokimia hasil fermentasi glukosa dari sumber karbohidrat menggunakan bantuan mikroorganisme. Produksi bioetanol pada umumnya menggunakan metode fermentasi dan distilasi. Bahan baku pembuatan bioetanol adalah nira berglukosa (sukrosa): nira tebu, nira nipah, nira sorgum manis, nira kelapa, nira aren, nira siwalan, sari buah mete; bahan berpati: tepung-tepung sorgum biji, sagu, singkong, ubi jalar, ganyong, garut, umbi dahlia; bahan berselulosa (lignoselulosa): kayu, jerami, batang pisang, bagas dan lain-lain.

Beberapa metode dalam memproduksi bioethanol, diantaranya adalah metode konvensional dan metode SSF. Metode konvensional dilakukan dengan cara menghidrolisis sellulosa menjadi glukosa menggunakan enzim selulase dihasilkan oleh jamur *A.niger* dan *Trichoderma sp*, kemudian menfermentasikan glukosa dengan menambahkan ragi kering yang mengandung *Saccharomyces cerevisiae* menjadi bioethanol. Metode SSF (*Simultaneous of saccharification and fermentation*) adalah gabungan dari reaksi hidrolisis dan fermentasi yang dilakukan secara simultan menggunakan campuran beberapa enzim (Ferreira, *et al.*, 2010).

### Peranan Jamur dan ragi

Keberadaan jamur yang dapat mendegradasi selulosa menjadi glukosa merupakan potensi yang sangat besar dalam menyediakan substrat glukosa untuk menghasilkan bioetanol dari bahan baku serat . *Trichoderma sp*. dan *A. Niger* adalah jamur yang menghasilkan enzim ekstrak yang mengandung selulase, sehingga diharapkan di masa depan dapat digunakan dalam penyediaan glukosa untuk bahan baku produksi bioetanol.

Enzim selulase diperoleh dari campuran enzim endoglukanase, eksoglukanase dan -glukosidase. Enzim selulase dapat diproduksi oleh jamur, bakteri, tumbuhan, dan ruminansia. Salah satu mikroorganisme utama yang dapat memproduksi enzim selulase adalah jamur. Jamur berfilamen seperti *Trichoderma* dan *Aspergillus* adalah penghasil enzim selulase dan crude enzyme secara komersial (Haq, *et al.*, 2005).

*Trichoderma sp*. menghasilkan endoglukanase dan eksoglukanase sampai 80% tetapi -glukosidasenya lebih rendah sehingga produk utama hidrolisisnya bukan glukosa melainkan selobiosa (Ahmed dan Vermette, 2008; Martins,*et al.*, 2008) yang merupakan inhibitor kuat terhadap endoglukanase dan eksoglukanase. Suhu optimum untuk tumbuhnya *Trichoderma* berbeda-beda setiap spesiesnya. Kisarannya sekitar 7 °C – 41 °C. *Trichoderma* bertumbuh cepat pada suhu 25-30 °C, namun pada suhu 35 °C tidak dapat tumbuh. Perbedaan suhu memengaruhi

produksi beberapa enzim seperti karboksimetilselulase dan xilanase. Kemampuan merespon kondisi pH dan kandungan CO<sub>2</sub> juga bervariasi. Pada umumnya apabila kandungan CO<sub>2</sub> meningkat maka kondisi pH untuk pertumbuhan akan bergeser menjadi semakin basa. Di udara, pH optimum bagi *Trichoderma* berkisar antara 3-7. Faktor lain yang mempengaruhi pertumbuhan *Trichoderma* adalah kelembaban, sedangkan kandungan garam tidak terlalu berpengaruh pada pertumbuhannya. Penambahan HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> dapat menghambat mekanisme kerja *Trichoderma* (Samuels GJ, 2010), (Danielson RM, 2002).

*A. Niger* berwarna dasar putih atau kuning dengan lapisan konidiospora tebal berwarna coklat gelap sampai hitam (Madigan MT, 2006). *A. Niger* tumbuh optimum pada suhu 35-37 °C, suhu minimum 6-8 °C, dan suhu maksimum 45-47 °C. Pertumbuhan *A. Niger* memerlukan oksigen yang cukup (aerobik). *A. Niger* menghasilkan -glukosidase tinggi akan tetapi endo-1, 4-glukanase dan ekso-1,4 glukanasenya rendah (Juhasz, et al., 2003). Sehingga diperlukan adanya penambahan -glukosidase dari luar untuk mempercepat konversi selobiosa menjadi glukosa dengan cara mengkombinasikan enzim selulase dari *Trichoderma sp.* dan *A. Niger*.

*Saccharomyces cerevisiae* adalah yeast khusus yang biasa dikenal sebagai ragi roti umumnya digunakan untuk fermentasi glukosa menjadi bioetanol. Menurut teori 100 g glukosa akan menghasilkan 51,4 g bioetanol dan 48,8 g C, tetapi dalam praktek tidak dapat 100% karena sebagian glukosa juga digunakan untuk pertumbuhan mikroorganisme (Badger, 2002).

## Metodologi Penelitian

### Alat dan Bahan

Alat penelitian meliputi : autoclave, alat penggilingan, ayakan 40 mesh, centrifuge, hotplate, neraca analitik, oven, peralatan gelas, thermometer spektrofotometer UV-Vis genesis, dan kromatografi gas. Bahan yang diperlukan adalah : limbah ampas pati aren, *A. Niger*, *Trichoderma sp.*, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, PDA, larutan nutrisi (urea, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O), Tween 0,1 %, Reagen nelson A dan B, glukosa p.a, heksan, dan etanol p.a

### Cara Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan dengan mencampurkan ampas pati aren yang dihasilkan pada produksi pati aren selama satu minggu, kemudian dicuci, dikeringkan dan digiling secara bersamaan.

### Prosedur Penelitian

Prosedur yang dilakukan adalah :

#### a. Metode Konvensional

1. Persiapan bahan baku. Mencuci limbah padat yang telah diperoleh, menjemurnya hingga kering, selanjutnya digiling dan diayak dengan ayakan 40 mesh. Proses delignifikasi. Menimbang bahan baku yang sudah siap pakai sebanyak 25 g dimasukkan dalam erlenmeyer 500 mL ditambahkan 400 mL asam sulfat 2,5%. Memanaskan pada suhu 121°C selama 30 menit. Dinetralkan sampai pH 5 kemudian dikeringkan.
2. Membuat larutan nutrisi untuk *A.niger* dan *Trichoderma sp.* yang digunakan pada tahap produksi enzim selulase. Melarutkan urea (3 g/L), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10 g/L), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(3 g/L), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,5 g/L), CaCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O(0,5 g/L) dengan 1 liter akuades (Singhania, et al., 2006). Mengukur pH awal dan diatur hingga pH 5 untuk *A.niger* (Harfinda, 2011) maupun *Trichoderma sp.* (Sukardati, dkk., 2010).
3. Memproduksi enzim selulase dari *A.niger* dan *Trichoderma sp.* Menimbang 10 gram sampel yang telah melalui tahap delignifikasi, dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 500 mL dan menambahkan 100 mL larutan nutrisi kemudian ditutup. Mensterilisasi campuran dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit kemudian didinginkan. Masing-masing bibit *A.niger* dan *Trichoderma sp.* diinokulasikan pada media. *Trichoderma sp.* dan *A.niger* diinkubasi selama 14 hari pada suhu ruang.
4. Menuangkan 100 mL larutan 0,1% tween 80 ke dalam limbah padat pati aren yang sudah difermentasi dan diaduk pada 100 rpm selama 120 menit pada suhu ruang. Larutan kemudian disentrifugasi pada 3000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh digunakan sebagai ekstrak enzim kasar (Szendefy, et al., 2006).
5. Uji aktivitas enzim metode fenol-sulfat Sebanyak 1 mL buffer Na-sitrat 0,05 M pH 4,8 dan satu strip kertas saring whatman no 1 ukuran 1x6 cm dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Larutan dipanaskan pada suhu 50°C selama beberapa saat. Masing-masing ekstrak enzim kasar dari *A.niger* dan *T.sp* dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 0,5 mL, larutan dipanaskan pada suhu 50°C selama 1 jam, kemudian diambil kertas saring dari tabung reaksi (Adney & Baker, 1996). Selanjutnya ditambahkan 0,5 mL larutan fenol 5% dan 2,5 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat kemudian dihomogenkan. Larutan dilakukan pengenceran dengan penambahan buffer Na-sitrat. Diukur absorbansi pada panjang gelombang 495 nm (Dubois, et al., 1956). Aktivitas enzim selulase dihitung dengan persamaan (Kamila, 2003).

$$\text{Aktivitas enzim selulase (U/mL)} = \frac{G \times Fp}{t}$$

Keterangan: G = glukosa yang dihasilkan, Fp = Faktor pengenceran, t = waktu inkubasi.

- konsentrasi glukosa yang didapat diplot pada persamaan kurva kalibrasi.
6. Proses Hidrolisis. Enzim selulase dari *A.niger* dan *Trichoderma sp.* dicampur berdasarkan variasi 0:1, 1:2, 1:1, 2:1,1:0 berdasarkan U/mL aktivitas enzim, dimasukkan ke dalam erlenmeyer berisi 5 g sampel yang telah melalui tahap delignifikasi dan ditambahkan buffer hingga volumenya 150 mL, kemudian diaduk. Setelah itu dianalisis kadar glukosa setiap 24 jam sampai kadar glukosanya mulai turun (Anwar, *et al.*, 2011).
  7. Produksi Bioetanol. Pada waktu produksi glukosa dengan kadar tertinggi ke dalam erlenmeyer yang digunakan pada proses hidrolisis ditambahkan ragi roti sebagai fermentornya. Ragi roti ditetapkan konsentrasinya sebesar 0,8% (w/v) (Kusmiati & Arifin, 2010).
- b. Metode SSF (*Simultaneous of saccharification and fermentation*)
1. Menimbang 5 gram sampel yang telah didelignifikasi dimasukkan ke dalam erlenmeyer 500 mL, ditambahkan larutan nutrisi steril sebanyak 150 mL. Menginokulasikan *A. Niger*, *Trichoderma sp.*, dan ragi roti secara bersamaan dengan proses aseptis. Ragi roti ditetapkan konsentrasinya sebesar 0,8% (w/v) (Kusmiati & Arifin, 2010).
  2. Menganalisis kadar glukosa cara spektrofotometri metode Nelson-Somogyi (AOAC,1990) dan bioetanol yang diperoleh dengan kromatografi gas.

## Hasil dan Pembahasan

### Pretreatment dan Delignifikasi

Proses *pretreatment* dilakukan untuk mengkondisikan bahan-bahan lignoselulosa baik dari segi struktur dan ukuran. Proses perlakuan awal dilakukan karena beberapa faktor seperti kandungan lignin, ukuran partikel serta kemampuan hidrolisis dari selulosa dan hemiselulosa. Proses *pretreatment* meliputi: perlakuan secara fisik, fisik-kimiawi, kimiawi dan enzimatik (Mosier *et al.*, 2005; Sun and Cheng, 2002).

Delignifikasi pada penelitian ini menggunakan metode semikimiawi, yaitu dengan menggunakan delignifikator kimia dan di *autoclave* pada suhu tinggi secara fisik. Bagian limbah yang diambil adalah campuran serat dan ampas. Limbah padat dicuci, dijemur, dan digiling untuk mengoptimalkan penghancuran lignin. Proses ini juga termasuk salah satu cara delignifikasi, yaitu secara fisika.

Sampel yang telah menjadi serbuk, didelignifikasi dengan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> serta dipanaskan pada *autoclave* dengan suhu 121°C. Berdasarkan penelitian sebelumnya, suhu 121°C merupakan suhu optimum untuk delignifikasi (Singh & Bishnoi, 2012), jika suhu lebih rendah lignin belum terurai dan masih melindungi selulosa sehingga selulosa masih sulit untuk diakses. Sementara pada suhu yang terlalu tinggi menyebabkan kemungkinan selulosa terdegradasi lebih banyak karena pada suhu ini lignin telah habis terlarut sehingga delignifikator yang tersisa akan mendegradasi selulosa (Permatasari, dkk., 2013). Berdasarkan penelitian Oktaveni (2008) pada proses pemasakan dengan waktu yang sebentar (kurang dari 30 menit), delignifikator hanya dapat mendegradasi lignin diantara sel – sel kayu sementara lignin yang berada pada dinding sel kayu baru terlarut setelah waktu pemasakan ditingkatkan.

### Produksi Enzim Selulase

Produktivitas enzim didefinisikan sebagai aktifitas enzim per mL per hari. Enzim selulase merupakan enzim ekstraseluler yang diproduksi di luar sel mikroorganisme selulolitik. Interaksi antara substrat selulosa (S) dan enzim selulase (E) akan membentuk kompleks enzim substrat (ES) dan menghasilkan glukosa (P).

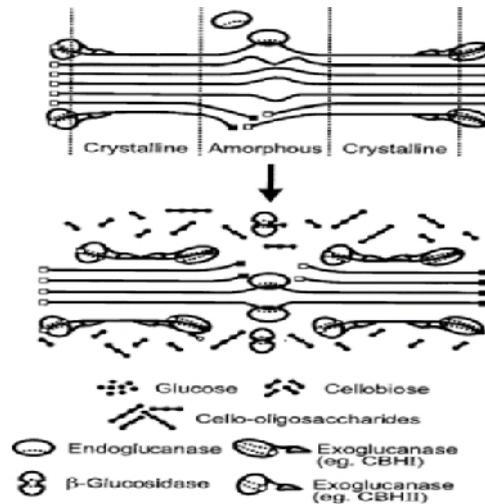
Enzim selulase diekstraksi menggunakan 100 mL larutan tween 80 0,1% (Szendefy, dkk., 2006). Tween 80 (polioksi etilen sorbitan mono-oleat) merupakan surfaktan non ionik. Sifatnya sebagai surfaktan dapat menurunkan tegangan permukaan antara air dan spora karena spora dari *A.niger* dan *Trichoderma sp* tidak larut dalam air (Jayashree & Vasudevan, 2009). Tween 80 dapat meningkatkan permeabilitas dinding sel atau kemampuan keluar masuknya air dan larutan melalui dinding sel sehingga proses keluarnya enzim dari dinding sel menjadi lebih mudah. Selain itu penggunaan tween 80 tidak mempengaruhi pH dari ekstrak enzim kasar karena bersifat non ionik.

Satu unit aktivitas enzim setara dengan satu mikromol glukosa yang dihasilkan pada proses hidrolisis tiap menit. Aktivitas enzim yang dihasilkan dari *Trichoderma sp* sebesar 1,4293 U/mL dan *A.niger* sebesar 0,9268 U/mL.

### Produksi Glukosa

Enzim selulolitik yang bekerja secara sinergis menghasilkan glukosa melalui proses hidrolisis. Sistem enzim selulolitik terdiri dari tiga kelompok utama yaitu endoglukanase, eksoglukanase, dan -glukosidase (Howard, *et al.*, 2003). Kerja sinergis dari kompleks enzim selulase dapat dilihat pada Gambar 1.

Enzim selulolitik merupakan enzim yang terdiri dari endo- -1,4-glukanase dan ekso-1,4-glukanase dan -glukosidase. Enzim endoglukanase menghidrolisis secara acak pada bagian amorf serat selulosa sehingga menghasilkan oligosakarida dengan panjang berbeda-beda dan terbentuknya unjung rantai baru selulosa (Howard, *et al.*, 2003).



Gambar 1 Skema hidrolisis enzimatik selulosa

Ekso-1,4-glukanase memotong ujung rantai selulosa menghasilkan molekul selobiosa, sedangkan β-glukosidase memotong molekul selobiosa menjadi dua molekul glukosa (Lynd, *et al.*, 2002).

Pengukuran kadar glukosa dilakukan dengan memplotkan absorbansi yang terdeteksi pada spektrometer dengan kurva standar yang telah dibuat sebelumnya. Kurva standar yang dibuat menunjukkan hubungan antara kadar glukosa dengan absorbansi yang dihasilkan. Kurva standar yang diperoleh kemudian dicari persamaannya, persamaan inilah yang akan digunakan untuk menghitung kadar glukosa sampel.

**Metode Konvensional**

Kadar glukosa yang diperoleh selama hidrolisis metode konvensional tersaji pada Tabel 2.

Tabel 2 Kadar glukosa yang dihasilkan metode Konvensional (mg/ml)

Hari	Perbandingan Enzim ( <i>A.niger</i> : <i>T.sp</i> )				
	(1:0)	(0:1)	(1:1)	(1:2)	(2:1)
0	0,8671	1,3063	1,3401	1,4640	1,205
1	0,9009	1,3514	1,2725	1,3964	0,8671
2	1,6216	0,9797	1,6779	1,1149	1,4414
3	0,8333	0,6869	0,6194	0,5405	0,8108
4	0,0676	0,4955	0,4505	0,2928	0,7545
5	0,1014	0,2252	0,1464	0,1239	0,2477
6	-0,2477	-0,0676	-0,1914	-0,1689	-0,1239
7	-0,3266	-0,1126	-0,3941	-0,2252	-0,3153

Tabel 2 memperlihatkan adanya keterkaitan produksi glukosa dengan aktifitas enzim. Hari ke-1 dan hari ke-2 menunjukkan adanya peningkatan, artinya pada hari ke 1 dan ke 2 kadar substrat untuk diubah menjadi glukosa masih tinggi. Hari ke-2 dan hari ke-3 produksi glukosa cenderung konstan meski mengalami kenaikan, hal ini menunjukkan adanya kesetimbangan antara kadar substrat yang tersedia dengan kadar glukosa yang dihasilkan. Kadar glukosa tertinggi dihasilkan pada campuran enzim selulase *A. niger* dan *Trichoderma sp* dengan perbandingan 1:2 pada hari ke-3. Ekstrak enzim kasar *A.niger* dan *Trichoderma sp* dengan perbandingan enzim (1:2) sesuai dengan literatur, hidrolisis secara enzimatik menggunakan campuran enzim dari *A.niger* dan *Trichoderma sp* dan pada substrat jerami padi juga menghasilkan konsentrasi glukosa paling tinggi pada campuran 1:2 (Anwar, dkk., 2011). Peningkatan konsentrasi glukosa yang dihasilkan pada waktu hidrolisis 3 hari menunjukkan bahwa terjadi interaksi antara enzim selulase dengan substrat yang tinggi. Interaksi antara enzim *selulase* dengan substrat selulosa akan membentuk kompleks enzim-substrat yang menghasilkan glukosa sebagai produk. Enzim memiliki interaksi dengan substrat yang semakin lama menyebabkan reaksi berjalan lebih maksimal sehingga konsentrasi glukosa yang dihasilkan menjadi lebih tinggi. Penurunan glukosa pada tabel diatas ditunjukkan pada hidrolisis hari ke-4. Penurunan ini disebabkan oleh adanya akumulasi produk yang telah terbentuk sebelumnya dan menyebabkan penghambatan bagi enzim selulase. Inhibitor enzim selulase berupa produk dari hidrolisis selulosa yaitu glukosa dan selobiosa. Selobiosa menghambat enzim eksoglukanase sedangkan glukosa menghambat enzim β-glukosidase (Ambriyanto, 2010).

**Metode SSF**

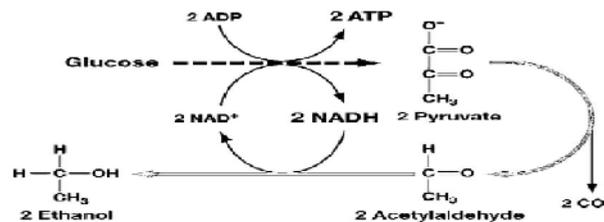
Kadar glukosa yang diperoleh selama hidrolisis metode SSF tertera pada Tabel 3 dibawah ini.  
Tabel 3 Kadar glukosa yang dihasilkan metode SSF(mg/ml)

Perbandingan Enzim (A Niger dan T sp)					
Hari	(1:0)	(0:1)	(1:1)	(1:2)	(2:1)
0	0,7432	0,9234	1,3288	1,4302	1,0698
1	1,6104	1,8468	2,5563	2,9054	2,1171
2	3,5248	3,8964	5,7658	7,0158	5,0113
3	3,8401	4,2342	6,5203	7,6914	7,0608
4	1,5653	1,1486	1,5766	2,7815	1,1374
5	1,0023	0,8446	0,7432	0,7883	0,6644
6	0,6757	0,6306	0,5068	0,6532	0,3491
7	0,4617	0,2928	0,3153	0,2365	0,1914
8	0,2140	0,1351	0,2027	0,1239	0,0676

Peningkatan kadar glukosa terlihat pada (1:0), (1:1), (2:1) hari ke-2, karena selulosa belum seluruhnya terdegradasi menjadi glukosa oleh enzim selulase, sehingga bersamaan dengan proses fermentasi terjadi pula proses hidrolisis dari sisa selulosa yang belum terdegradasi. Penurunan kadar glukosa terjadi selama proses fermentasi pada metode SSF. Penurunan jumlah glukosa pereduksi disebabkan oleh konversi glukosa pereduksi tersebut menjadi bioetanol oleh khamir *S. cerevisiae*.

**Produksi Bioetanol**

Glukosa hasil hidrolisis terlebih dahulu menjadi piruvat melalui 10 tahapan glikolisis. Piruvat dengan bantuan enzim piruvat dekarboksilase melepaskan karbondioksida (CO<sub>2</sub>) menghasilkan asetaldehid. Asetaldehid dengan alkohol dehidrogenase diubah menjadi etanol. Mekanisme reaksi ditunjukkan gambar.



Gambar 2 Produksi bioetanol

pH awal yang digunakan yaitu 5 dan pada suhu ruang. Diharapkan dengan kondisi fermentasi ini kadar bioetanol yang diperoleh tinggi. Hal ini karena keadaan lingkungan optimal untuk fermentasi oleh *S. cerevisiae* adalah pada suhu 25-30<sup>o</sup>C dengan pH 4-5.

Pengamatan pada hasil fermentasi adalah sampel memiliki aroma seperti tape dan sedikit gelembung udara pada sampel. Aroma tape ditimbulkan oleh senyawa hasil fermentasi, sedangkan gelembung udara merupakan hasil samping berupa karbondioksida. Cairan hasil fermentasi yang didapatkan dipipet guna memisahkan larutan hasil fermentasi dari sampel. Hasil larutan fermentasi kemudian diekstrak menggunakan n-heksan untuk memisahkan bioetanol dan airnya. Bioetanol yang sudah diekstrak diukur kadarnya dengan menggunakan alat kromatografi gas.

Pengukuran kadar bioetanol dilakukan dengan memplotkan luas area puncak yang terdeteksi dikomputer dengan kurva standar yang telah dibuat sebelumnya. Kurva standar yang dibuat menunjukkan hubungan antara kadar bioetanol dengan luas area yang dihasilkan. Kurva standard yang diperoleh kemudian dicari persamaannya, persamaan inilah yang akan digunakan untuk menghitung kadar bioetanol sampel.

**Metode Konvensional**

Kadar bioetanol yang diperoleh selama fermentasi metode konvensional tersaji pada tabel 4 dibawah ini.

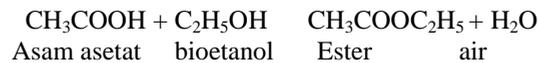
Secara umum kadar bioetanol tertinggi dihasilkan pada hari-1, sedangkan penurunan pada hari ke-3 sampai ke-4, dan mengalami peningkatan kembali pada hari ke-5. . Produksi bioetanol yang tinggi pada hari pertama disebabkan karena kadar glukosa yang tersedia masih tinggi, sehingga etanol yang dihasilkan juga tinggi.

Tabel 4 Kadar bioetanol yang dihasilkan metode Konvensional (%)

Hari	Perbandingan Enzim ( <i>A. niger</i> : T sp)				
	(1:0)	(0:1)	(1:1)	(1:2)	(2:1)
1	0,0359	0,0448	2,5606	5,6058	1,4098
2	3,6267	0,8334	0,7097	1,1035	1,3287
3	0,2353	0,4370	0,3306	0,6848	0,0325
4	0,4829	0,0482	0,0114	0,1786	0,0227
5	2,1228	2,0401	1,1734	1,3857	1,3674
6	5,0745	1,2234	1,0169	2,3834	4,5782
7	3,2362	2,6597	2,6535	1,8071	1,7316

Tabel 4 menunjukkan peningkatan produksi bioetanol pada hari ke-5. Peningkatan pada tahap ini disebabkan terjadinya fermentasi glukosa dalam 2 tahapan proses. Tahap awal terjadi oksidasi atom hidrogen sehingga terjadi penurunan aktivitas ragi. Tahap kedua terjadi proses reduksi kembali dari pada atom hidrogen yang telah dilepaskan, hal ini mengakibatkan terjadi peningkatan aktivitas ragi sehingga bioetanol yang dihasilkan mengalami peningkatan (Yuanita, dkk., 2010). Proses ini akan berhenti jika kadar bioetanol sudah meningkat sampai tidak dapat ditolerir lagi oleh mikroba (Rudy, dkk., 2013). Berkurangnya kadar bioetanol disebabkan telah dikonversi menjadi senyawa lain misalnya ester (Sari, dkk., 2008). Produksi bioetanol perbandingan (0:1), (1:0) justru baru mengalami peningkatan pada hari ke 2 hal ini kemungkinan terjadi karena glukosa belum semuanya diubah menjadi etanol (Kusmiyati & Arifin, 2010).

Produksi bioetanol yang fluktuatif seperti yang ditunjukkan pada Tabel 4 dapat terjadi karena pembentukan senyawa ester yang merupakan reaksi reversibel. Senyawa ester terbentuk melalui reaksi yang terjadi antara asam karboksilat dan alkohol, proses ini disebut esterifikasi fischer (Hart, et al., 2003). Reaksi fermentasi selain membentuk bioetanol juga membentuk asam asetat. Asam asetat merupakan asam karboksilat yang dapat bereaksi dengan alkohol membentuk senyawa ester. Mekanisme reaksinya adalah sebagai berikut :



Kadar bioetanol yang turun menunjukkan adanya reaksi pembentukan senyawa ester, peningkatan kadar etanol menunjukkan terjadinya reaksi esterifikasi bergeser ke kanan.

### Metode SSF

Kadar bioetanol yang diperoleh selama fermentasi metode SSF tersaji pada tabel 5 dibawah ini.

Tabel 5 memperlihatkan bahwa fermentasi pada hari ke-1 belum menunjukkan adanya produksi etanol, hal ini disebabkan karena *S. cerevisiae* mengalami masa adaptasi dengan lingkungan dan belum ada pertumbuhan, sehingga *S. cerevisiae* belum merombak glukosa menjadi bioetanol. Fermentasi pada hari ke-2 sampai ke-4 menunjukan adanya produksi bioethanol sangat pesat, keadaan ini membuktikan *S. cerevisiae* mengalami fase tumbuh cepat. Di dalam fase ini terjadi pemecahan glukosa secara besar-besaran. Hasil pemecahan gula oleh *S. cerevisiae* dalam keadaan anaerob menghasilkan bioetanol. Kemungkinan dihasilkan bioetanol paling tinggi pada fase ini.

Produksi bioetanol pada hari ke-4 sampai ke-5 tidak terlalu pesat, artinya *S. cerevisiae* sedang mengalami fase stationer, hal ini menunjukkan jumlah *S. cerevisiae* yang hidup sebanding dengan jumlah yang mati. Hari ke-6 sampai ke-7 mengalami penurunan, hal ini disebabkan karena nutrisi yang tersedia tidak sebanding dengan banyaknya *S. cerevisiae*, sehingga *S. cerevisiae* menggunakan substrat yang tersedia digunakan untuk bertahan hidup dari pada merombaknya menjadi bioetanol. Selain itu, dikarenakan ketersediaan nutrisi maupun substrat semakin berkurang bahkan telah habis, sehingga terjadi aktivitas *S. cerevisiae* merubah bioetanol menjadi asam-asam organik seperti asam asetat menggunakan enzim alkoholase. Penurunan kadar bioetanol yang terbentuk terjadi akibat perombakan bioetanol menjadi asam asetat. Azizah (2012) menjelaskan bahwa produk dari proses fermentasi selain bioetanol, ada produk samping yaitu karbondioksida. Selain bioetanol yang diperoleh dari hasil fermentasi ada juga asam asetat, fuel oil dan asetaldehida. Kadar etanol pada perbandingan enzim (1:1) di hari ke-7 justru mengalami peningkatan. Peningkatan kadar etanol yang terjadi menunjukkan reaksi esterifikasi bergeser ke kanan.

Lamanya waktu fermentasi juga berpengaruh pada produksi bioetanol. Waktu yang digunakan yaitu 1 sampai 7 hari hal ini didasarkan bahwa kerja optimum dari *S. cerevisiae*. Apabila waktu fermentasi yang digunakan terlalu cepat *S. cerevisiae* masih dalam tahap pertumbuhan dan apabila terlalu lama akan mati maka bioetanol yang dihasilkan tidak maksimal. *S. cerevisiae* memiliki empat fase, yaitu fase adaptasi, fase ekponensial, fase stasioner dan fase kematian hal inilah yang menjadi acuan pemilihan rentang waktu tersebut. Sama halnya dalam penelitian Hasanah Hafidatul (2012) kadar bioetanol yang diperoleh terus meningkat dari waktu fermentasi 1-7 hari, dan setelah itu kadar bioetanol menurun.

Kadar bioetanol yang dihasilkan pada penelitian ini masih sangat kecil. Kadar bioethanol metode konvensional tertinggi (1:2) hari pertama sebesar 5,75%, dan kemudian mengalami fluktuasi dalam perolehan bioetanol.

Tabel 5 Kadar bioetanol yang dihasilkan metode SSF (%)

Perbandingan Enzim ( <i>A niger</i> : T sp)					
Hari	(1:0)	(0:1)	(1:1)	(1:2)	(2:1)
1	0	0	0	0	0
2	0,3246	0,5383	0,1333	0,3259	0
3	0,9283	0,8500	0,2729	0,4344	0,2825
4	3,6830	3,0693	0,9034	3,1512	0,5999
5	3,6325	3,9824	1,2529	4,3139	4,3888
6	0,5192	1,2519	1,0405	2,4389	4,6849
7	0,3311	0,2721	2,7153	1,8492	1,7720

Metode SSF baru memproduksi etanol setah hari kedua sebesar 0,3259 % terus meningkat dengan kadar tertinggi pada hari ke-5 sebesar 4,3139 %.

### Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan, dapat disimpulkan hal-hal sebagai berikut: Perbandingan penambahan enzim selulase dari *A.niger* dan *Trichoderma sp* yang optimum dalam hidrolisis selulosa menjadi glukosa adalah 1:2 (V/V) glukosa yang diperoleh sebesar 7,6914%. Waktu optimum yang dibutuhkan dalam hidrolisis selulosa menjadi glukosa adalah 3 hari. Produksi bioethanol paling baik adalah dengan menggunakan metode SSF dengan kadar sebesar 4,3139%.

### Ucapan Terimakasih

Koordinasi Perguruan Tinggi Swasta Wilayah VI Jawa Tengah Kementerian Pendidikan Tinggi yang telah mendanai penelitian ini melalui Hibah Bersaing DIKTI Tahun 2015.

### Daftar Pustaka

- Adney, B. dan Baker, J. 1996. Measurement of Cellulose Activities. *National Renewable Energy Laboratory, report.nf NREL/TP-501-42628*.
- Ahamed, A. P. Vermette (2008), "Culture-based Strategies to Enhance Cellulase Enzyme Production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in Bioreactor Culture Conditions", *Biochemical Engineering Journal* 40, 399–407.
- Albers, E. Larsson, C. Liden, G. dan Niklasson, C. 1996. Influence of the Nitrogen Source on *Saccharomyces cerevisiae* Anaerobic Growth and Product Formation. *App. Environ. Microbiol.*
- Ambriyanto, K. S. 2010. *Isolasi dan karakterisasi Bakteri Aerob Pendegradasi Selulosa dari Serasah Daun Rumpun Gajah (Pennisetum purpureum schumm)*. Tesis Surabaya: Institut Teknologi Sepuluh November.
- Anwar, N., Arief, W., dan Sugeng, W. 2011. Optimasi Produksi Enzim Selulase untuk Hidrolisis. *Jurnal Bioproses Komoditas Tropis*.
- Azizah, N. 2012. Pengaruh Lama Fermentasi Terhadap Kadar Alkohol, pH, Dan Produksi Gas Pada Proses Fermentasi Bioetanol Dari Whey Dengan Substitusi Kulit Nanas. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*, 72-77.
- Badger, P., C. 2002. Ethanol from cellulose. In J. J. & W. A, *Trends in new crops and new uses* (pp. 17–21). Alexandria, VA: ASHS Press.
- Danielson R. M, D., C. 2002. Non nutritional factors affecting the growth of *Trichoderma* in culture. *Soil Biol Chem*, 495-504.
- Dubois, M. Gilles, K. A. Hamilton, J. K., Rebers, P., A. dan Smith, F. 1956. *Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances*.
- Ferreira, V. Faber, M., D. Mesquita, S., S. dan Junior, N., P. 2010. Simultaneous Saccharification And Fermentasi Process Of Different Cellulosic Substrat Using a Recombinant *Saccaromyces Cerevisiae* Harbouring T - Glukosidase Gene. *Elektronik Journal Of biotechnology*.
- Haq, I., U. Javed, M., M. Khan, T., S. dan Siddiq, Z. 2005. Cotton Saccharifying Activity of Cellulases Produced by Co-culture of *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride*. *Res. J. Agric & Biol. Sci*, 241-145.
- Harfinda, E.M., 2011, Pengaruh Kadar Air, pH, dan Waktu Fermentasi Terhadap Produksi Enzim Selulase oleh *Aspergillus niger* Pada Ampas Sagu, Universitas Tanjungpura, Pontianak, (Skripsi).
- Hart, H. Craine, L., E. dan Hart, D., J. 2003. *Kimia Organik Edisi 11*. Jakarta: Erlangga.

- Hasanah, H. 2012. Pengaruh Lama Fermentasi Terhadap Kadar Alkohol Tape Singkong. *Alchemy*, 69-79.
- Howard, R., L. E, A. J, E., V. dan S, H. 2003. Lignocellulose Biotechnology: Issues of Bioconversion and Enzyme Production. *Afr. J. Biotechnol.*, 602-619.
- Jayashree, R. dan Vasudevan, N. 2009. Effect Of Tween 80 and Moisture Regimes on Endosulfan Degradation by *Pseudomonas Aeruginosa*. *Applied Ecology and Environmental Research*, 35-44.
- Juhasz, T. Kozma, K. Szengyel., Z. & Reczey, K. 2003. Production of  $\alpha$ -Glucosidase in Mixed Culture of *Aspergillus niger* BKMF 1305 and *Trichoderma reesei* RUT C30. *Food Technol, J. Biotechno.*, 41 (1), 49-53.
- Kamila, L. 2003. *Pencirian Selulolitik Isolat Khamir Rhodotorula sp. Dari Tanah Taman Nasional Gunung Halimu*. Skripsi. Bogor: Jurusan Kimia, Institut Pertanian Bogor.
- Kusmiyati, Arifin, A. N. 2010. Konversi Umbi Iles-Iles Menjadi Bioetanol Dengan Metode Konvensional dan SSF (Sakarifikasi dan Fermentasi Secara Serentak). *RAPI IX* (pp. K-116 - K-123). Surakarta: Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Lynd, L., R. P, J., W. W , H., V.& I, S., P. 2002. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol*, 506-577.
- Madigan M. T, M., J. 2006. *Brock Biology of Microorganisms 11th ed*. New Jersey : Pearson Education.
- Martins, L., D. 2008. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* Cellulases in Relation to Their Activity Against Various Cellulosic Substrates. *Bioresource Technology*.
- Mosier, Nathan, et al., 2005, *Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass*, *Bioresource Technology* 96 , pp. 673–686.
- Official of the Association of Chemistry inc (AOAC)., 1990 Arlington. Virginia USA.
- Permatasari, H., R. Gulo, F. dan Lesmini, B. 2013. Pengaruh Konsentrasi  $H_2SO_4$  Dan Naoh Terhadap Delignifikasi Serbuk Bambu (*Gigantochloa Apus*). *Jurnal Kimia Terapan*, 132.
- Purnavita, S.& Sriyana, H., Y. 2013. Produksi Bioetanol Dari Limbah Ampas Pati Aren Secara Enzimatis Dengan Menggunakan Mikrobia Selulolitik Ekstrak Rayap. *Jurnal Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian*. 8(2):54-60.
- Ratanaphadit, K. Kaewjan, K. dan Plakan, S. J. 2010. *Poteintial of Glycoamylase and Cellulase Production Using Mixed Culture of Aspergillus niger TISTR 3254 and Tricoderma reesei TISTR 3081*.
- Rudy, S. Harisman, J. dan Arif, M. 2013. Analisa Pengaruh Lama Fermentasi dan Temperatur Distilasi terhadap Sifat Fisik (Spesific Gravity dan Nilai Kalor) Bioetanol Berbahan Baku Nanas (*Ananas Comosus*). *Dinamika Teknik Mesin*. 3(2). ISSN: 2008-088.
- Samuels, G. J, et. all. 2010. *Trichoderma Online, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory*.
- Sari, I., M. Noverita, dan Yuliwarni. 2008. Pemanfaatan Jerami Padi dan Alang- Alang Dalam Fermentasi Etanol Menggunakan Kapang *Trichoderma viride* dan Khamir *Saccharomyces cerevisiae*. *Vis Vitalis*, 5(2), 55-62.
- Singhanian, R., R. Sukumaran, R., K. Pillai, A. Prema, P. Szakacs, G. dan Pandey, A. 2006. *Solid State Fermentation of Lignocellulosic Substrat for Cellulase Production by Trichoderma reesei* NRRL 11460. *Indian J. Biotechnol*, 5: 332-336.
- Singh A, Bishnoi NR.,,2012 “*Optimization of enzymatic hydrolysis of pretreated rice straw and ethanol production*” *Appl Microbiol Biothechnol*.
- Sukardati, S. Kholisoh, D., S. Prasetyo, H. Santoso, P., W. dan Mursini, P., W. 2010. *Produksi Gula Reduksi dari Sabut Kelapa Menggunakan Jamur Trichoderma reesei*. Yogyakarta: Teknik Kimia, UPN Yogyakarta.
- Sun, Y., and Cheng .,J., 2002, “ *Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production*”, a review paper *Bioresources Technology*, 83, 1-11
- Szendefy, J., Szakacs , G., & Christopher, L. (2006). Potential of solid-state Fermentation Enzymes of *Aspergillus* in Biobleaching of Paper Pulp. *Enzymes and Microbial Technology* , 1354-1360.
- Toharisman, A. 2008. Sekali lagi: Etanol dari Tebu Pusat Penelitian Perkebunan Gula Indonesia (P3GI). <http://www.sugarresearch.org/wp-content/uploads/2008/12/bietanol-agroobs.pdf>
- Wang, N., S. 2008. *Experiment No. 4 Cellulose Degradation. Departement of Chemical & Biomolecular Engineering*. Maryland: University of Maryland.
- Yuanita, M. Ismayanda, H. Sofyana, dan Ningsih, Y., A. 2010. Pembuatan Bioetanol dari Jagung (*Zea Mays Saccarata Strut*) dengan Proses Fermentasi. *Chemical Engineering Science and Applications (CHESA)* (pp. 530-537). Banda Aceh: Chemical Engineering Departement Faculty Syiah Kuala University.