

PRODUKSI BIOETANOL DARI AMPAS SAGU (*Metroxylon sp*) MELALUI PROSES *PRETREATMENT* DAN METODE *SIMULTANEOUS SACCHARIFICATION FERMENTATION (SSF)*

Khairunnisah, Marniati Salim, Elida Mardiah

Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA, Universitas Andalas

e-mail : justuun@gmail.com

Jurusan Kimia FMIPA Unand, Kampus Limau Manis, 25163

Abstract

Sago waste is one of biomass lignocellulose that potential to produce bioethanol. Lignocellulose material consist of three major component such as cellulose, hemicellulose and lignin. The available of lignin become inhibitor for enzymatic process it must removed by pretreatment. Research for bioethanol production from sago waste through pretreatment process by using a variation of alkaline solution; 1% NaOH, 8% NH₄OH, 1% NaOH + 4% NH₄OH and 1% NaOH + 8% NH₄OH with a ratio solid to liquid 1:10 (w/v) after that, followed by SSF method involved two kind of fungi like *Trichoderma viride* strain T1 sk for saccharification and *Saccharomyces cerevisiae* for fermentation process. The optimum conditions for the reduction of samples obtained after pretreatment at concentration of 1% NaOH + 8% NH₄OH at 49,3017% with a long incubation period of 3 days with a temperature 50°C. Result of determination cellulase enzyme activity from *Trichoderma viride* strain T1 sk by 0.1% CMC is 0,1144 unit and the highest glucose yield is 921,25 µg/mL from 0,9 gram substrate of sago waste while the optimum time for the saccharification process obtained in 75 minutes. Ethanol content was analyzed by GC/MS resulted 12.99% (% area) or equal with 0,38 mL ethanol yield for 168 hours of fermentation .

Keywords : Sago waste, bioethanol, alkaline pretreatment, SSF

I. Pendahuluan

Bioetanol (C₂H₅OH) merupakan etanol hasil fermentasi biomassa yang hadir sebagai bahan bakar alternatif, memiliki keunggulan karena mampu menurunkan emisi CO₂ hingga 18% dibandingkan dengan emisi bahan bakar fosil seperti minyak tanah. Bioetanol dapat dibuat dari bahan nabati yang mengandung gula (nira tebu, aren, molases), pati (ubi kayu, ubi jalar, sorgum, jagung) atau lignoselulosa (jerami padi, tongkol jagung, tandan kosong kelapa sawit, bambu, kayu).¹

Salah satu biomassa lignoselulosa yang berpotensi sebagai *biofuel* yaitu tanaman sagu (*Metroxylon sp*) yang sudah berupa ampas. Ampas sagu terdiri dari serat-serat

empulur yang diperoleh dari hasil pemarkatan atau pemerasan isi batang sagu. Ampas sagu belum banyak dimanfaatkan sampai saat ini, sehingga banyak yang dibuang begitu saja sebagai limbah. Ketersediaan ampas sagu pada tahun 2006 di daerah Mentawai, Sumatera Barat cukup melimpah yaitu sebesar 14.000 ton yang diperkirakan dari produksi tepung sagu 3500 ton (ratio tepung sagu dan ampas sagu adalah 1 : 4) yang kondisinya telah mencemari lingkungan. Di daerah Sumatera Barat selain di daerah mentawai, ampas sagu juga banyak ditemukan di daerah Pesisir Selatan dan Pariaman. Pada tahun 2003 di daerah Pesisir Selatan terdapat ampas sagu sebanyak 3000 ton.

Semakin banyak produksi tepung sagu, semakin banyak pula ampas sagu yang dihasilkan.²

Ampas sagu mengandung 58.21% pati, 22.45% selulosa, 11.8% hemiselulosa, 1.6% senyawa ekstraktif, dan 8.95% lignin. Berdasarkan komposisi ini ampas sagu masih banyak kandungan senyawa lain seperti hemiselulosa, lignin dan senyawa ekstraktif yang harus dihilangkan untuk memaksimalkan produksi bioetanol dengan cara melakukan proses perlakuan awal (*pretreatment*).³

Pretreatment terhadap ampas sagu untuk menghilangkan senyawa-senyawa yang tidak diperlukan seperti, pati, lignin, hemiselulosa dan senyawa ekstraktif lainnya dengan menggunakan larutan basa NaOH dan NH₄OH.⁴

Proses sakarifikasi dan fermentasi dalam penelitian ini akan dilakukan secara serentak dalam satu *batch* dengan melibatkan jamur *Trichoderma viride* strain T1 sk sebagai penghasil enzim selulolitik dan xyloglukanolitik untuk sakarifikasi dan *Saccharomyces cerevisiae* untuk konversi gula menjadi bioetanol metode ini dikenal dengan metode SSF.

II. Metode Penelitian

2.1. Bahan, peralatan dan instrumentasi

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah sampel ampas sagu yang dibuat dari perasan empulur sagu diperoleh dari penjual sagu potong kelurahan kapalo koto Padang. Bahan lain kertas saring, akuades, akuabides, FeCl₃, jamur *Trichoderma viride* strain T1 sk (Laboratorium Fitopatologi Fakultas Pertanian Universitas Andalas), ragi dari fermipan yang dibeli di Pasar Raya Padang, ammonium hidroksida, natrium hidroksida, pepton, ekstrak ragi, glukosa, dan PDA keluaran Merck.

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah spektrofotometer UV-Vis (*Genesys20*), Kromatografi Gas (*GC-MS 2010 Shimadzu*), *laminar air flow*, autoklaf, inkubator, neraca analitik, *hot plate*, peralatan gelas, cawan petri, jarum ose, spiritus, penggiling, oven, ayakan, sentrifus

dan *water-bath shaker*.

2.2. Prosedur penelitian

a. *Pretreatment sampel*

Sampel ampas sagu halus direndam berbagai variasi larutan basa NaOH 1%, NH₄OH 8%, NaOH 1% + NH₄OH 4% dan NaOH 1% + NH₄OH 8% dengan perbandingan padatan (sampel) : cairan (larutan basa) 1:10 (w/v). Variasi lama perendaman selama 1, 2 dan 3 hari pada suhu 50°C. Hasil *pretreatment* disaring dengan kertas saring dan dicuci dengan menggunakan akuades sampai pH netral (pH 7). Endapan yang diperoleh dikeringkan pada suhu 50°C dalam oven selama 2 hari.

b. Uji kualitatif lignin

Uji lignin dilakukan dengan mengambil beberapa tetes air hasil saringan/filtrat *pretreatment* kemudian ditambahkan dengan larutan FeCl₃. Uji positif adanya lignin pada air sisa saringan ditandai dengan perubahan warna larutan menjadi merah bata pada larutan sampel⁵.

c. Pengujian aktivitas enzim selulase

Biakan jamur *Trichoderma viride* strain T1 sk yang telah diremajakan, diinkubasi pada suhu kamar selama 7 hari dan biakan siap digunakan

Sebanyak 2 tabung reaksi biakan *Trichoderma viride* strain T1 sk yang ditambahkan dengan 10 mL akuades steril, disuspensikan ke dalam 100 mL medium produksi enzim dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 7 hari. Setelah 7 hari, ke dalam medium tersebut ditambahkan 0,2 mL tween 80 0,1% dan disaring. Kemudian, hasil supernatan disentrifus 4000 rpm pada suhu 5°C, selama 30 menit. Supernatan yang diperoleh digunakan sebagai ekstrak kasar enzim. Uji aktivitas enzim selulase ditentukan dengan menggunakan metode Somogy-Nelson dengan variasi jumlah ampas tebu dengan lama sakarifikasi.

d. Produksi bioetanol

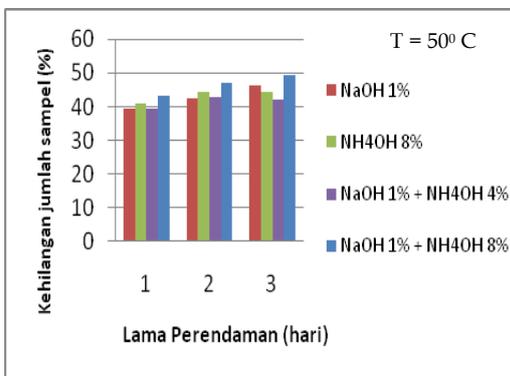
Sebanyak 0,9 g ampas sagu ditambahkan dengan 1 g ekstrak ragi dan 2 g pepton, ditempatkan dalam erlenmeyer 250 mL. Selanjutnya 80 mL buffer sitrat 50 mM pH 5

dimasukkan ke dalam erlenmeyer tersebut dan disterilisasi pada 121°C selama 15 menit. Setelah medium dingin, 10 mL ekstrak kasar enzim selulase dan 10 mL inokulum *Saccharomyces cerevisiae*, disuspensikan ke dalam medium dan diinkubasi dalam *water-bath shaker* 110 rpm pada suhu kamar selama 168 jam. Hasil fermentasi disaring dan supernatan yang diperoleh didestilasi. Destilat yang didapatkan diukur dengan kromatografi gas.

III. Hasil dan Pembahasan

a. Pretreatment sampel

Dari hasil *pretreatment* yang telah dilakukan diperoleh data tabel pengurangan jumlah ampas sagu dengan penambahan berbagai variasi konsentrasi larutan basa NaOH dan NH₄OH.



Gambar 1. Kurva persentase kehilangan jumlah sampel setelah *pretreatment*

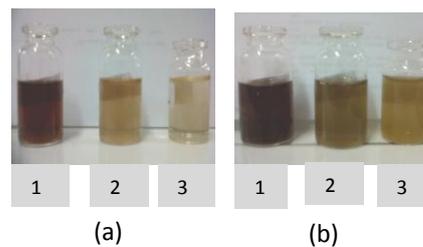
Lama perendaman ampas sagu dengan NaOH dan NH₄OH ini dibuat variasi waktu selama 1, 2 dan 3 hari dengan suhu 50°C. Suhu disini juga dapat bertindak sebagai katalis untuk mempercepat reaksi karena dibandingkan dengan asam, *pretreatment* basa membutuhkan waktu proses yang lama. Akan tetapi, jika suhu yang digunakan terlalu tinggi akan menyebabkan terdegradasinya gula fermentasi (gula sederhana). Semakin lama waktu perendaman tekstur dari ampas sagu semakin encer dan warna juga menjadi lebih gelap. Tekstur yang semakin encer dapat diasumsikan dengan semakin meluasnya permukaan sampel akibat telah terjadinya pemutusan beberapa ikatan yang kompleks dalam lignoselulosa seperti ikatan eter atau dikenal dengan *lignin*

carbohydrate complexes (LCC) yang terdapat pada hemiselulosa dan selulosa.⁶

Dari gambar 1, dapat dilihat kondisi optimum *pretreatment* ampas sagu pada variasi konsentrasi campuran basa NaOH 1% + NH₄OH 8% dengan lama perendaman selama 3 hari pemakaian suhu 50°C dan pengurangan jumlah sampel sebesar 49,3017%.

b. Uji kualitatif lignin

Analisis keberadaan lignin dengan penambahan larutan FeCl₃.



Gambar 2. Uji Kualitatif Lignin dengan Variasi pH (a) sebelum ditetesi FeCl₃ (b) setelah ditetesi dengan FeCl₃.

1. Hasil penyaringan dan pencucian endapan setelah 2 hari pH 10
2. Hasil penyaringan dan pencucian endapan setelah 4 hari pH 8
3. Hasil penyaringan dan pencucian endapan setelah 6 hari pH 7

Lignin yang bereaksi dengan basa membentuk garam fenolat (pH 11) dibuang dengan melakukan pencucian dengan akuades hingga pH netral pencucian diharapkan dapat menghilangkan pengotor agar tidak menghambat proses enzimatik selanjutnya. Penyaringan dan pencucian hasil *pretreatment* ampas sagu ini kemudian hanya menyisakan sebagian hemiselulosa dan selulosa yang tidak dapat larut dalam air. Lignin yang terlarut ditandai dengan warna coklat kehitaman pada larutan (*black liquor*) hal itu menunjukkan keberadaan senyawa lignin yang memiliki gugus kromofor, yaitu etilena dan karbonil, serta gugus aoksokrom yang dapat meningkatkan intensitas warna, yaitu alkoksil dan hidroksil.⁷

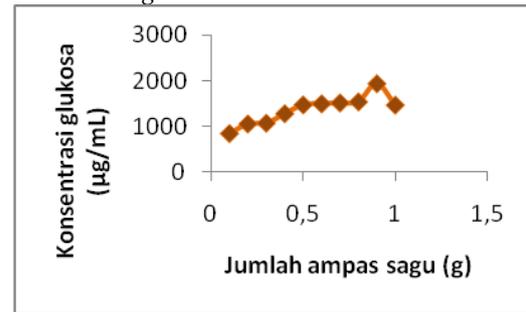
Reaksi positif filtrat mengandung lignin jika filtrat yang ditambahkan FeCl_3 memberikan perubahan warna merah hingga keunguan. Hasil yang diperoleh pada filtrat dengan pH 10 terjadi perubahan warna yang semula berwarna coklat pekat menjadi merah bata (gambar. 2.b.1) sedangkan pada filtrat dengan pH 7 terjadi perubahan warna yang semula bening menjadi kuning (gambar. 2.b.3) setelah ditambahkan larutan FeCl_3 . Hal ini disebabkan pada filtrat pH 10, garam fenolat bereaksi dengan FeCl_3 dan membuktikan bahwa lignin telah larut bersama air hasil penyaringan sedangkan, pada filtrat pH 7 tidak ada garam fenolat yang bereaksi dengan FeCl_3 karena hanya terdapat akuades tidak ada lagi garam fenolat yang terlarut dari hasil pencucian endapan.⁵

c. Pengujian aktivitas enzim

Untuk pengujian aktifitas enzim dilakukan proses sakarifikasi dengan bantuan ekstrak kasar enzim selulase dari *Trichoderma viride* strain T1 sk yang kemudian dilakukan pengujian terhadap substrat CMC 0,1% dalam buffer asetat 0,1 M pH 5,0. Konsentrasi glukosa ditentukan dengan cara memasukkan nilai absorbansi yang terukur ke dalam persamaan regresi yang diperoleh dari perhitungan kurva standar glukosa. Aktivitas enzim yang diperoleh terhadap substrat CMC 0,1% ini yaitu 0,1144 Unit.

Aktivitas enzim yang diperoleh sangat kecil karena CMC merupakan substrat yang hanya memiliki sifat amorf saja sehingga bagian enzim selulase yang bekerja hanya endoglukanase sementara enzim selulase dari *Trichoderma viride* strain T1 sk tergolong enzim lengkap untuk mendegradasi substrat berbahan amorf (endoglukanase), kristalin (eksoglukanase) dan selubiosa (β -glukosidase).⁸

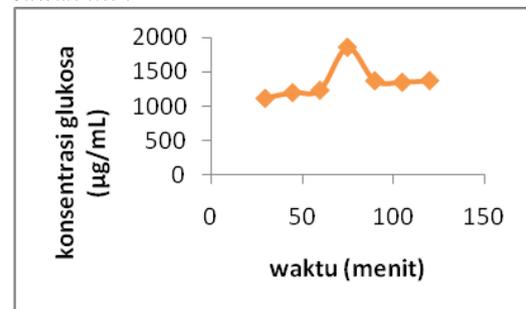
Pengaruh jumlah ampas sagu terhadap konsentrasi glukosa



Gambar 3. Kurva hubungan jumlah ampas sagu terhadap konsentrasi glukosa yang dihasilkan

Kemampuan enzim selulase *Trichoderma viride* strain T1 sk menghasilkan glukosa dari substrat ampas sagu telah dilakukan dengan membuat variasi jumlah ampas sagu 0,1 hingga 1 gram. Pada variasi ini diperoleh penyerapan tertinggi pada berat 0,9 gram dengan kadar glukosa 921,25 µg/ml dan menurun kembali pada berat 1 gram (Gambar.3). Hal ini dikarenakan sifat kerja enzim yang spesifik, pada jumlah ampas sagu 0,1 gram hingga 0,9 gram mengalami peningkatan glukosa dikarenakan jumlah enzim selulase yang bekerja sesuai dengan banyaknya substrat sedangkan pada jumlah ampas sagu 1 gram mengalami penurunan disebabkan jumlah substrat terlalu banyak dari enzim selulase yang tersedia untuk mengkonversi selulosa menjadi glukosa.

Hubungan lama sakarifikasi terhadap konsentrasi glukosa dapat dilihat pada kurva di bawah ini :



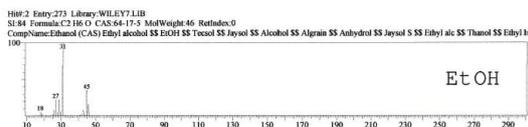
Gambar 4. Kurva pengaruh lama sakarifikasi terhadap konsentrasi glukosa yang dihasilkan

Proses sakarifikasi juga dipengaruhi oleh lamanya waktu hidrolisis. Lama sakarifikasi dibuat variasi 0, 30, 45, 60, 75, 90, 105 dan 120 menit. Lama sakarifikasi yang optimum terdapat pada waktu 75

menit dengan konsentrasi glukosa tertinggi 882,50 µg/mL (Gambar.4). Pada waktu 0 hingga 75 menit jumlah substrat ampas sagu masih cukup banyak sehingga dengan semakin lamanya waktu hidrolisis, glukosa yang dihasilkan juga meningkat selain itu juga dapat disebabkan gula sebagai sumber nutrisi masih banyak tersedia sehingga memungkinkan peningkatan kerja enzim untuk terjadi peningkatan kadar glukosa, namun pada waktu 80 hingga 120 menit mengalami penurunan kadar glukosa dikarenakan semakin lamanya waktu hidrolisis jumlah substrat ampas sagu akan semakin berkurang karena telah banyak yang terhidrolisis sehingga glukosa yang dihasilkan cenderung menurun atau konstan.

d. Produksi bioetanol

Konsentrasi etanol ditentukan dengan menggunakan GC-MS (kromatografi gas-spektroskopi massa). Sebelum sampel diukur dengan GC-MS, hasil fermentasi yang telah disentrifus didestilasi terlebih dahulu agar mendapatkan etanol yang murni. Hasil pengukuran dengan GC-MS diperoleh rendemen etanol dalam 12,99% (% area) sebesar 0,38 mL pada lama fermentasi 168 jam (Gambar.5).



Gambar 5. Spektrum GC-MS menunjukkan identifikasi senyawa etanol

Pada waktu inilah kondisi sesuai untuk *Saccharomyces cerevisiae* mengkonversi glukosa jadi etanol. Saat jumlah substrat sebanding dengan jumlah enzim. Menurut Kunaepah (2008), ada banyak faktor yang mempengaruhi fermentasi antara lain substrat, suhu, pH, oksigen, dan mikroba yang digunakan. Berbeda kondisi akan menghasilkan hasil yang berbeda pula.

Senyawa yang diperoleh dari hasil pengukuran GC-MS pada masing-masing lama fermentasi terdapat jenis alkohol lain seperti metanol, butanol dan isopropanol. Menurut literatur, *Saccharomyces cerevisiae* bersifat homofermentatif yang

menghasilkan produk fermentasi dominan berupa alkohol saja, dan apabila waktu fermentasi ditambah akan semakin banyak alkohol terbentuk. Selain itu, dihasilkannya jenis alkohol lain diduga selama proses destilasi terjadi kelebihan suhu pemanasan yang menyebabkan terbawanya senyawa-senyawa yang memiliki titik didih diatas etanol begitupula senyawa-senyawa dibawah titik didih etanol juga ikut terdeteksi seperti CO₂ dan metanol.⁹

Kadar etanol yang terlalu rendah bisa disebabkan karena proses fermentasi terlalu lama menghasilkan senyawa-senyawa asam organik seperti asam asetat, asam karbamat, asam format dan gas CO₂ yang merupakan senyawa samping hasil fermentasi etanol sehingga senyawa-senyawa ini akan menghentikan kerja enzim invertase dari *saccharomyces cerevisiae* untuk memproduksi etanol lebih banyak. Selain itu, bisa juga dipengaruhi oleh kondisi *pretreatment* yang diberikan penelitian ini.

IV. Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa lignin dapat dilepaskan dari ampas sagu dengan menggunakan metode pretreatment alkali NaOH 1% + NH₄OH 8% dengan persentase penurunan berat sampel sebesar 49,3017%, dengan perbandingan padatan (ampas sagu) : cairan (NaOH-NH₄OH) (1:10) selama 3 hari pada 50oC. Konsentrasi glukosa maksimum yang dihasilkan oleh enzim selulase dari *Trichoderma viride* strain T1 sk adalah sebesar 921,25 µg/mL dari 0,9 g ampas sagu dengan lama sakarifikasi 75 menit. Aktivitas enzim selulase itu sendiri terhadap substrat murni CMC 0,1% adalah 0,1144 unit. Sedangkan etanol yang dihasilkan dengan metode SSF dalam 12,99% persen area sebesar 0,38 mL.

V. Ucapan terima kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada analis Laboratorium Biokimia FMIPA Universitas Andalas dan Laboratorium Kesehatan Padang yang telah membantu dalam menyelesaikan penelitian ini. Rekan-rekan dan semua pihak yang telah membantu dan memberikan dukungan

sepenuh hati kepada penulis dalam menyelesaikan penelitian ini.

Referensi

1. Komarayati, S., dan Gusmailina, **2010**, Prospek Bioetanol sebagai Pengganti Minyak Tanah. *Pusat Penelitian dan Pengembangan Hasil Hutan*.
2. De, I.D., Salim, M., dan Mardiah, E., **2012**, Produksi Bioetanol dari Ampas Sagu dengan Proses Hidrolisis Asam dan Menggunakan *Saccharomyces cerevisiae*. *Jurnal Kimia Unand*, 1(1), 34-39.
3. Hisyam, **2012**, Isolasi Selulosa Ampas Sagu dengan Delignifikasi Menggunakan Hidrogen Peroksida. *Skripsi Sarjana Sains*, Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
4. Zuo, Z., Tian, S., Chen, Z. and Li, J., **2012**, Soaking Pretreatment on Corn Stover for Bioethanol Production Followed by Anaerobic Digestion Process. *Appl Biochem Biotechnol*, 167, 2088-2102.
5. Trisianti, S.Y. Sarjono, P.R dan Mulyani, N.S., **2013**, Aktivitas *Fusarium Oxysporum* dalam Menghidrolisis Eceng Gondok (*Eichhornia Crassipes*) dengan Variasi Waktu Fermentasi. *Jurnal Chem Info*, 1(1), 265 - 274.
6. Octavia. S. H. Soerawidjaja, T., Purwadi, R dan I.D.G. Putrawan, A., **2011**, Pengolahan Awal Lignoselulosa Menggunakan Amoniak untuk Meningkatkan Perolehan Gula Fermentasi. *Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia "Kejuangan"*, Yogyakarta, B13(2)-B13(6), 1693 - 4393.
7. Julfana, S.R., Anita, Z.T., dan Idiawati, N., **2007**, Hidrolisis Enzimatik Selulosa dari Ampas Sagu Menggunakan Campuran Selulase dari *Trichoderma Reesei* dan *Aspergillus Niger*. *JKK*, 2(1), 52-57.
8. Bagus, W. G. I., Redi, A.W., dan Bagus N. S. D.I., **2011**, Produksi Selulase Kasar dari Kapang *Trichoderma viride* dengan Perlakuan Konsentrasi Substrat Ampas Tebu dan Lama Fermentasi. *Jurnal Biologi*, XV(2), 29-33.
9. N. Azizah., A.N. Al- baarri dan S.Mulyani., **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*, 1(2), 72-77.