

PENGARUH PENAMBAHAN NaOH-NH₄OH UNTUK PRODUKSI BIOETANOL DARI AMPAS TEBU DENGAN METODE *SIMULTANEOUS SACCHARIFICATION FERMENTATION (SSF)*

Melysa Putri, Marniati Salim, Elida Mardiah

Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA, Universitas Andalas

e-mail : bo_cha27@yahoo.com

Jurusan Kimia FMIPA Unand, Kampus Limau Manis, 25163

Abstract

Bagasse can be used as a basic ingredient in the manufacture of bio-ethanol and cellulose in bagasse first should be released from lignin by using pretreatment method. Pretreatment was done by using a mixture of 2% NaOH with NH₄OH concentrations that varied from 2% to 10%. The solids ratio variation (bagasse): liquid (NaOH-NH₄OH) pretreatment was 1:10, 1:15, and 1:20. Pretreatment condition which provided the optimum sample weight reduction was at concentration of 2% NaOH and 2% NH₄OH with a ratio of 1:20. The results of bagasse saccharification using cellulase enzyme crude extract of *Trichoderma viride* strain T1 sk against CMC pure substrates showed enzyme activity of 0,188 units. Saccharification was also done to the variation of the amount of bagasse substrate 0,1g to 1 g and the variations of the time of saccharification from 30 min to 120 min. The maximum glucose concentration was 1528.57 µg / mL which obtained at 0.6 g substrate of bagasse with a long of saccharification 60 minutes. Bio-ethanol obtained by the method of SSF for 84 hours with 30 mL inoculum of *Saccharomyces cerevisiae* and 10 mL of crude extract of the enzyme cellulase was determined by using gas chromatography, is equal to 0,4278 mL.

Keywords: *bagasse, pretreatment, SSF*

I. Pendahuluan

Pada saat ini, bioetanol merupakan bahan bakar mobil terbarukan yang paling umum digunakan sesuai dengan PP No. 5 tahun 2006 tentang kebijakan energi nasional. Sebagian besar bioetanol dihasilkan dari fermentasi gula atau bahan makanan yang mengandung pati, seperti tebu, jagung, dan gandum¹.

Menurut Anwar (2008), ampas tebu memiliki komposisi kimia yang terdiri dari 3,82% abu, 22,09% lignin, 37,65% selulosa, 1,81% sari, 27,97% pentosan, dan 3,01% SiO₂³. Menurut Samsuri (2007), ampas tebu merupakan bahan baku potensial untuk produksi bioetanol. Teknik produksi bioetanol terdiri dari empat jalur, yaitu *pretreatment*, hidrolisis, fermentasi, dan

destilasi. *Pretreatment* alkali dapat memberikan efektifitas delignifikasi dan depolimerisasi selulosa, serta biaya dan energi yang dibutuhkan cukup kecil. Alkali yang paling sering digunakan adalah NaOH dan NH₄OH^{4,5}.

Penggunaan NaOH encer dapat meningkatkan luas permukaan internal bahan dengan pembesaran permukaan. Pembesaran permukaan menyebabkan terjadinya penurunan derajat polimerisasi, pemisahan ikatan struktur lignin dan karbohidrat, serta merusak struktur lignin. Ammoniak efektif dalam menghilangkan lignin dari biomassa dengan reaksi utama menghidrolisis ikatan eter. Keuntungan dari penggunaan ammoniak adalah

mempunyai selektifitas yang tinggi terhadap lignin, mempertahankan karbohidrat dalam bentuk aslinya, memperlihatkan efek pengembangan lignoselulosa yang signifikan, interaksi yang sangat sedikit dengan hemiselulosa, dan sangat volatil. Ammoniak sangat efektif untuk bahan dengan kandungan lignin yang rendah^{6,7}.

Pada penelitian sebelumnya, pembuatan bioetanol dari tongkol jagung dengan metode SSF. *Pretreatment* dilakukan dengan menggunakan NaOH 1%, NH₄OH 4% dan 8% dengan variasi konsentrasi cairan *pretreatment* 1% NaOH, 8% NH₄OH, 1% NaOH + 4% NH₄OH, dan 1% NaOH + 8% NH₄OH selama 48 jam. Berdasarkan variasi konsentrasi tersebut, cairan dengan konsentrasi 1% NaOH + 8% NH₄OH memberikan hasil pengurangan lignin yang lebih baik. Pada proses SSF, enzim selulase yang digunakan adalah selulase murni dengan mikroorganisme *Pichia stipitis* CBS 6054. Produksi bioetanol dengan metode SSF menghasilkan etanol sebesar 36,1 g/L dengan fermentasi selama 72 jam⁸.

Dengan mengamati kandungan selulosa (37,65%) yang terdapat pada ampas tebu sebagai bahan dasar bioetanol, peneliti ingin melakukan "Pengaruh Penambahan NaOH-NH₄OH Untuk Produksi Bioetanol Dari Ampas Tebu Dengan Metode *Simultaneous Saccharification Fermentation* (SSF)", dengan variasi konsentrasi NH₄OH pada suhu *pretreatment* 50°C dan jamur *Trichoderma viride* strain T1 sk.

II. Metode Penelitian

2.1. Bahan, peralatan dan instrumentasi

Bahan yang digunakan adalah sampel ampas tebu yang diambil di Pasar Raya Padang, kertas saring, ammonium hidroksida (Merck), natrium hidroksida (Merck), jamur *Trichoderma viride* strain T1 sk, *Saccharomyces cerevisiae*, akuades, glukosa (Merck), medium andreoti, buffer sitrat, buffer asetat, dan PDA (Merck). Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah spektrofotometer UV-Vis (*Genesys20*), Kromatografi Gas (GC 2010 *Shimadzu*), autoklaf, inkubator, peralatan gelas.

2.2. Prosedur penelitian

a. *Pretreatment sampel*

Sampel ampas tebu dipotong menjadi potong-potongan kecil. Kemudian sampel tersebut dijemur dan dihaluskan dengan menggunakan gerinda. *Pretreatment* dilakukan dengan menggunakan campuran larutan NaOH 2% dengan NH₄OH dengan variasi konsentrasi 2%, 4%, 6%, 8%, dan 10%. Sebanyak 10 g sampel direndam dalam campuran larutan ammonium hidroksida (NH₄OH) dan natrium hidroksida (NaOH) dengan variasi perbandingan padatan (sampel) : cairan (campuran NH₄OH dengan NaOH) 1:10, 1:15, dan 1:20 dengan volume cairan 100 mL untuk (1:10), 150 mL untuk (1:15), dan 200 mL untuk (1:20). *Pretreatment* dilakukan selama 24 jam pada suhu 50°C. Kemudian, hasil *pretreatment* disaring dan dicuci dengan menggunakan akuades sampai pH netral (pH 7). Endapan yang diperoleh dikeringkan pada suhu 50°C dalam oven selama lebih dari 24 jam. Sampel ini siap untuk produksi bioetanol^{8,9,10}.

b. Uji kualitatif lignin

Uji lignin dilakukan dengan beberapa tetes air hasil saringan *pretreatment* yang ditambahkan dengan larutan FeCl₃. Uji positif adanya lignin pada air sisa saringan ditandai dengan perubahan warna larutan menjadi merah bata pada larutan sampel¹¹.

c. Pengujian aktivitas enzim selulase

Biakan jamur *Trichoderma viride* strain T1 sk diremajakan terlebih dahulu dengan cara menginokulasikan biakan murni *Trichoderma viride* ke dalam medium agar miring (PDA) secara aseptik. Kemudian 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

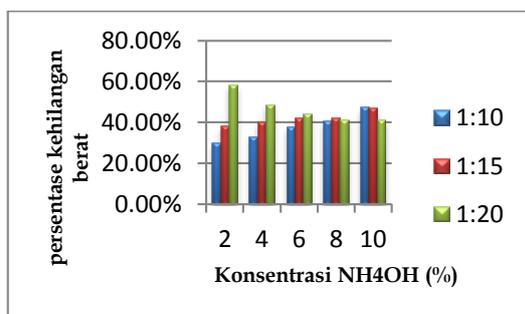
aktivitas enzim selulase ditentukan dengan menggunakan metode Somogy-Nelson dengan variasi jumlah ampas tebu dengan lama sakarifikasi.

d. Produksi bioetanol

Sebanyak 0,6 g ampas tebu 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 30 mL inokulum *Saccharomyces cerevisiae*, disuspensikan ke dalam medium dan diinkubasi dalam *water-bath shaker* 110 rpm pada suhu kamar selama 84 jam. Hasil fermentasi disaring dan supernatan yang diperoleh didestilasi. Destilat disimpan untuk analisis etanol pada kromatografi gas¹².

III. Hasil dan Pembahasan

a. Pretreatment sampel



Gambar 1. Kurva pengaruh konsentrasi NH₄OH terhadap persentase pengurangan berat ampas tebu

- Perbandingan berat ampas tebu dengan volume larutan perendam 1:10
- Perbandingan berat ampas tebu dengan volume larutan perendam 1:15
- Perbandingan berat ampas tebu dengan volume larutan perendam 1:20

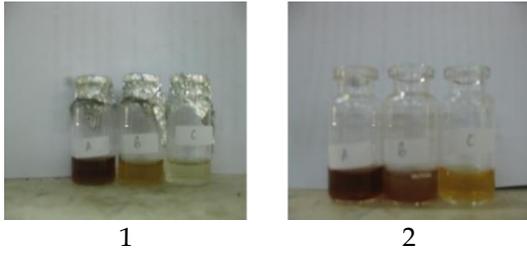
Gambar 1 menunjukkan pengurangan berat ampas tebu setelah dipretreatment dengan berbagai variasi konsentrasi dan perbandingan padatan (ampas tebu) : cairan (NaOH-NH₄OH). Dengan menggunakan senyawa alkali seperti NaOH dan NH₄OH dapat meningkatkan daya cerna terhadap selulosa dan sangat

efektif dalam menghilangkan lignin, kelarutan selulosa dan hemiselulosa sangat kecil jika dibandingkan dengan asam. Hal ini disebabkan oleh fungsi utama dari NaOH adalah mendegradasi lignin dengan memutus ikatan eter, sehingga menciptakan porositas biomassa serta meningkatkan luas permukaan ampas tebu, penurunan derajat polimerisasi, penurunan kristalinitas, pemisahan hubungan struktural antara lignin dan karbohidrat, dan gangguan struktur lignin. Sedangkan NH₄OH dapat menyebabkan terjadinya pembengkakan, menurunkan derajat polimerisasi dan kristalinitas selulosa, sehingga menyebabkan terganggunya struktur lignin^{13,14}.

Semakin tinggi konsentrasi NH₄OH dan semakin tinggi rasio perbandingan padatan : cairan yang diberikan, semakin tinggi pengaruhnya terhadap kehilangan berat ampas tebu. Namun terdapat beberapa hasil yang menunjukkan adanya penurunan pada proses delignifikasi. Penurunan terjadi pada perbandingan (1:20). Adanya sampel yang terapung setelah ditambahkan dengan larutan NaOH-NH₄OH menyebabkan luas permukaan kontak antara sampel dengan larutan tidak sempurna sehingga kontak antara sampel dengan larutan dalam proses delignifikasi tidak optimal. Hal ini menyebabkan berkurangnya lignin yang dapat dilepaskan dari sampel¹⁵.

b. Uji kualitatif lignin

Uji kualitatif terhadap lignin dilakukan pada cairan hasil saringan *pretreatment* 1:20. Pada pengujian ini menunjukkan bahwa cairan yang telah ditetesi dengan FeCl₃ berubah warnanya menjadi merah bata. Hal ini membuktikan bahwa lignin telah larut dalam cairan tersebut. Gambar 2 menunjukkan bahwa cairan hasil *pretreatment* positif mengandung lignin.



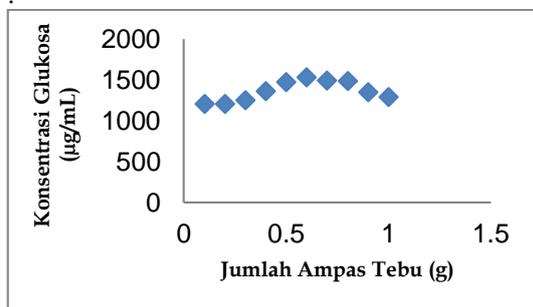
Gambar 2. 1. Sebelum ditetesi FeCl_3 dan 2. Setelah ditetesi FeCl_3

- A. Hasil penyaringan setelah 2 hari
- B. Hasil penyaringan setelah 5 hari
- C. Hasil penyaringan setelah 7 hari

c. Pengujian aktivitas enzim

Sebelum ekstrak enzim digunakan dalam proses SSF, ekstrak enzim tersebut harus diuji terlebih dahulu terhadap substrat CMC. Substrat CMC yang digunakan adalah substrat CMC 0,1 %. Konsentrasi gula reduksi maksimum yang diperoleh setelah sakarifikasi selama 30 menit adalah sebesar 1528,57 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dengan aktivitas enzim sebesar 0,188 unit.

Setelah dilakukan pengujian aktivitas ekstrak enzim terhadap substrat murninya, selanjutnya aktivitas ekstrak enzim diuji terhadap sampel ampas tebu dengan variasi jumlah ampas tebu 0,1 g hingga 1 g dengan volume ekstrak enzim tetap yaitu sebesar 3 mL. Pengaruh jumlah ampas tebu terhadap konsentrasi glukosa yang dihasilkan dapat dilihat pada kurva berikut :

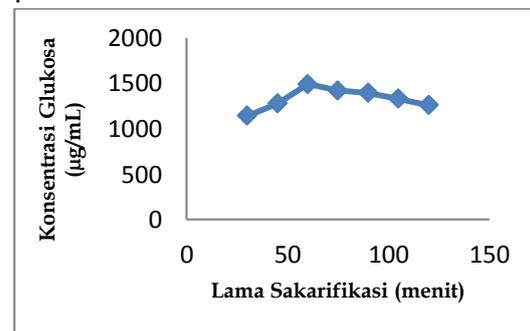


Gambar 3. Kurva hubungan jumlah ampas tebu terhadap konsentrasi glukosa yang dihasilkan

Gambar 3 menunjukkan kemampuan dari enzim selulase dalam menghidrolisis selulosa menjadi glukosa. Semakin besar sampel yang diberikan, semakin besar pula konsentrasi glukosa yang dihasilkan seperti ditunjukkan pada berat sampel 0,6 g

menghasilkan glukosa sebesar 1528,57 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Semakin besar jumlah ampas tebu yang diberikan, aktivitas enzim juga akan semakin meningkat karena sisi aktif enzim makin banyak mengikat substrat. Namun, pada berat sampel tertentu (0,7 g - 1 g), terjadi penurunan konsentrasi glukosa yang dihasilkan. Hal ini dapat terjadi karena sisi aktif enzim selulase telah membentuk kompleks enzim-substrat sehingga tidak ada lagi sisi aktif enzim yang bebas. Jadi, semakin besar sampel yang diberikan, tidak akan meningkatkan konsentrasi glukosa yang dihasilkan¹⁶.

Pengaruh lama sakarifikasi terhadap konsentrasi glukosa dapat dilihat gambar 4 :

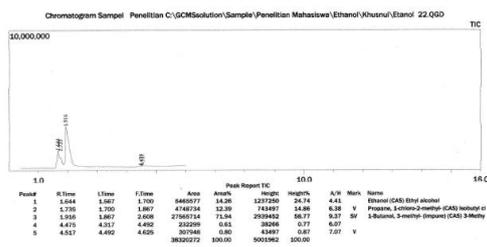


Gambar 4. Kurva pengaruh lama sakarifikasi terhadap konsentrasi glukosa yang dihasilkan

Variasi lama sakarifikasi dilakukan terhadap ampas tebu 0,6 g selama 30, 45, 60, 75, 90, 105, dan 120 menit. Variasi lama sakarifikasi dilakukan dengan tujuan untuk menentukan waktu yang optimum untuk enzim menghidrolisis selulosa supaya menghasilkan konsentrasi glukosa yang optimum. Pada penelitian ini didapatkan waktu optimum untuk sakarifikasi adalah pada menit ke 60. Dari gambar di atas terlihat bahwa semakin lama waktu sakarifikasi yang diberikan juga menurunkan konsentrasi glukosa yang dihasilkan karena stabilitas dan ketahanan ekstrak enzim menurun.

d. Produksi bioetanol

Pada penelitian ini, etanol yang dihasilkan selama 84 jam dengan 30 mL inokulum *Saccharomyces cerevisiae* adalah sebesar 0,4278 mL dengan persen area 14,26%, seperti yang ditunjukkan pada gambar 5 :



Gambar 5. Kromatogram bioetanol

Produksi etanol ditentukan oleh banyaknya glukosa yang dikonversi oleh enzim invertase yang dihasilkan oleh inokulum *Saccharomyces cerevisiae*. Semakin besar jumlah glukosa yang dikonversi, maka akan semakin besar pula jumlah etanol yang dihasilkan. Namun, kinerja dari enzim invertase akan terhambat jika jumlah glukosa yang dihasilkan selama proses sakarifikasi terlalu tinggi. Konsentrasi substrat yang tinggi akan mengurangi jumlah oksigen terlarut sehingga kehidupan *Saccharomyces cerevisiae* akan terganggu¹⁴.

Jika dibandingkan dengan penelitian Zhuang Zuo (2011), hasil yang diperoleh sangat sedikit. Hal ini dapat disebabkan oleh kondisi *pretreatment* dan enzim yang digunakan berbeda. Pada penelitian ini, enzim yang digunakan berupa ekstrak kasar enzim sehingga tidak hanya selulosa yang akan dikonversi menjadi glukosa tetapi juga dihasilkan enzim hemiselulase yang dapat mendegradasi hemiselulosa menjadi glukosa dan enzim endo-1,4- β -xilanas yang dapat mendegradasi xilan. Sehingga jumlah glukosa yang dihasilkan selama proses sakarifikasi akan semakin banyak. Banyaknya glukosa yang dihasilkan menghambat kerja enzim invertase sehingga etanol yang dihasilkan sedikit. Selain itu, dapat juga disebabkan oleh kondisi *pretreatment* yang diberikan.

Hal ini juga dapat disebabkan karena waktu fermentasi yang terlalu lama yang telah melebihi dari fasa eksponensial. Fasa eksponensial untuk *Saccharomyces cerevisiae* terjadi pada 36 jam hingga 72 jam. Pada fasa tersebut, terjadi pembelahan sel yang sangat cepat sehingga membutuhkan gula sederhana dalam jumlah yang banyak juga.

Sehingga pada saat dilakukan fermentasi bioetanol hingga 84 jam, tidak lagi terjadi pembelahan sel, namun jumlah nutrisi yang semakin berkurang sehingga terjadi kompetisi nutrisi yang menyebabkan beberapa sel mati¹⁷.

IV. Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa lignin dapat dilepaskan dari ampas tebu dengan menggunakan metode *pretreatment* alkali (NaOH 2%-NH₄OH 2%) dengan persentase penurunan berat sampel sebesar 58,16%, dengan perbandingan padatan (ampas tebu) : cairan (NaOH-NH₄OH) (1:20) selama 24 jam pada 50°C. Konsentrasi glukosa maksimum yang dihasilkan oleh enzim selulase dari *Trichoderma viride* strain T1 sk adalah sebesar 1528,57 μ g/mL dari 0,6 g ampas tebu dengan lama sakarifikasi 60 menit. Aktivitas enzim selulase itu sendiri terhadap substrat murni CMC 0,1% adalah 0,188 unit. Sedangkan etanol yang dihasilkan dengan metode SSF adalah sebesar 14,26% persen area dengan rendemen sebesar 0,4278 mL.

V. Ucapan terima kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada analis Laboratorium Biokimia FMIPA Universitas Andalas 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. Alriksson, B., H. Rose, S., H. Van, Z.W., Sjode, A., Nilvebrant, N., and J. Jonsson, L., **2009**, Cellulase Production from Spent Lignocellulose Hydrolysates by Recombinant *Aspergillus niger*, *Appl. Environ. Microbiol*, 75(8) : 2366.
2. Peraturan Presiden Republik Indonesia No. 5 Tahun 2006 Tentang Kebijakan Energi Nasional.
3. Samsuri, M., Gozan, M., Prasetya, B., and Nasikin, M., **2009**, Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosic Bagasse

- for Bioethanol Production, *Journal of Biotechnology Research in Tropical Region*, 2 (2).
4. A. Silva, K., H.M. Godoy, P., Cardoso, J., P. P. Mendes, T., A. Seolatto, A., and F. Freitas, F, **2013**, Study of Orange Bagasse Digestibility by Chemical Pretreatments, *Chemical Engineering Transactions*, 35.
 5. Gede, W. I., **2011**, Proses Fermentasi Limbah Rumpun Laut *Eucheuma Cottonii* Sebagai Tahap Awal Pembuatan Etanol Generasi Kedua, *Tesis Magister*, Jurusan Teknik Mesin, Fakultas Teknik, Universitas Udayana, Denpasar.
 6. Octavia, S. H, S, T. Purwadi, R. I. D. G. Putrawan, A., **2011**, Pengolahan Awal Lignoselulosa Menggunakan Amoniak Untuk Meningkatkan Perolehan Gula Fermentasi, *Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia "Kejuangan"*, Yogyakarta.
 7. Zuo, Z., Tian, S., Chen, Z. And Li, J., **2012**, Soaking Pretreatment oh Corn Stover for Bioethanol Production Followed by Anaerobic Digestion Process, *Appl Biochem Biotechnol*, 167, 2088-2102.
 8. Wyman, C.E., **1994**, Ethanol from Lignocellulosic Biomass: Technology, Economics, and Opportunities, *Bioresource Technology*, 50, 3-16.
 9. N. Chinedu, S., C. Yah, S., C. Nwinyi, O., I. Okochi, V., A. Okafor, U., and M. Onyegeme- Okerenta, B., **2008**, Plant Waste Hydrolysis by Extracellular Enzymes of *Aspergillus niger* and *Penicillium chrysogenum*: Effect of Ammonia Pretreatment, *Nigerian Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 23 (1), 1-7.
 10. Bagus, W.G.I., Redi, A.W dan Bagus, N.S.D., **2011**, Produksi Selulase Kasar dari Kapang *Trichoderma viride* dengan Perlakuan Konsentrasi Substrat Ampas Tebu dan Lama Fermentasi, *Jurnal Biologi*, XV (2), 29 - 33.
 11. S.Rosdiana, N., R.Sarjono, P., S. Mulyani, N., **2013**, Aktivitas *Fusarium oxysporum* Dalam Menghidrolisis Enceng Gondok (*Eichhornia crassipes*) Dengan Variasi Temperatur, *Chem Info*, 1 (1), 220-225.
 12. Setyawati, H., Astuti R.N., Bioetanol dari Kulit Nanas Dengan Variasi Massa *Saccharomyces cerevisiae* dan Waktu Fermentasi, <http://ejournal.upnjatim.ac.id/index.php/tekkim/article/download/76/60>. 07/14/2013.
 13. Irfan, M., Gulsher, M., Abbas, S., Syed, Q., Nadeem, M., and Baig, S., 2011, Effect of Various Pretreatment Conditions on Enzymatic Saccharification, *Songklanakarin J. Sci. Technol*, 33 (4), 397-404.
 14. Cao, S., **2012**, Effect of Surfactants on The Pretreatment of Sugarcane Bagasse With Dilute Ammonia, *A Thesis Submitted to the Graduate Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science in The Department of Food Science*, Henan University.
 15. Rachmaniah, O., Krishnanta W.A., and Ricardo, D., Acid Hydrolysis Pretreatment of Bagasse-Lignocellulosic Material for Bioethanol Production, *Jurnal ITS*.
 16. Masfufatun., Isolasi dan Karakterisasi Enzim Selulase, [http://fk.uwks.ac.id/archieve/jurnal/Vol Edisi Khusus Desember 2009/](http://fk.uwks.ac.id/archieve/jurnal/Vol%20Edisi%20Khusus%20Desember%202009/).
 17. Permata, S. D., Wuryanti, Anam, K., **2013**, Isolasi, Purifikasi dan Karakterisasi α -amilase dari *Saccharomyces cerevisiae* FNCC 3012, *Chem Info*, 1 (1), 337-344.