

PRODUKSI BIOETANOL DARI SAMPAH DEDAUNAN SEKITAR KAMPUS UNAND DENGAN METODE SSF (*SIMULTANEOUS SACHARIFICATION FERMENTATION*)

Marniati Salim, Elida Mardiah, Yollanda Atmelwidia
Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA, Universitas Andalas
Jurusan Kimia FMIPA Unand, Kampus Limau Manis, 25163
e-mail : bundosalim@gmail.com

ABSTRACT

In this research, cellulose from waste leaves are converted into ethanol by SSF technology using cellulase from *Trichoderma viride* strain T1 sk. In saccharification process, cellulase breaks cellulose polymer into glucose. Simultaneously, the formed glucose is converted into ethanol by invertase produced by *Saccharomyces cerevisiae* which is grown on YPD medium. Waste leaves are pretreated using basic solutions : basic NaOH 1 %, NH₄OH 8 %, NaOH 1 % + NH₄OH 4 % and NaOH 1 % + NH₄OH 8 % with ratio of solid matter (sample) : liquid (basic solution) 1:10 (w/v) with volume of basic solution 100 mL. Immersion time is varied for 24, 48 and 72 hours on 50°C. The result of research shows that the use of NaOH 1% + NH₄OH 4% gives the highest glucose concentration 933,75 µg/mL with immersion time for 72 hours on 50°C. After being pretreated, sample of 0,4 g waste leaves produce the highest glucose concentration. Measurement by GC/MS shows ethanol concentration 62,41% on fermentation time 96 hours with volume of ethanol 2,45 mL for 0,4 g sample.

Keywords : Waste leaves, Pretreatment, *Trichoderma viride* strain T1 sk, SSF, Bioethanol

PENDAHULUAN

Cadangan minyak Indonesia saat ini hanya tinggal 18 tahun lagi setelah itu kemungkinan besar akan habis. Untuk itu diperlukannya suatu energi alternatif sebagai sumber bahan bakar pengganti minyak bumi. Minat untuk mendapatkan bahan bakar alternatif di Indonesia akhir-akhir ini juga meningkat, karena Indonesia adalah negara penghasil sekaligus pengimpor minyak bumi. Penelitian mengenai energi terbarukan terus dikembangkan, bahkan menjadi salah satu program pemerintah untuk mengurangi ketergantungan terhadap bahan bakar minyak yang ketersediaannya terus berkurang. Saat ini produk energi alternatif yang berpeluang untuk dikembangkan adalah bioetanol dan biodiesel. Bioetanol memiliki beberapa kelebihan dibandingkan energi alternatif

lainnya. Etanol memiliki kandungan oksigen yang tinggi sehingga terbakar lebih sempurna, bernilai oktan lebih tinggi, dan ramah lingkungan. Disamping itu substrat untuk produksi bioetanol cukup melimpah di Indonesia. Produk ini diharapkan nantinya bisa menggantikan bahan bakar minyak kendaraan bermotor dan mesin industri, serta dapat mengurangi polusi udara yang sebelumnya ditimbulkan oleh penggunaan bahan bakar fosil^[1].

Bahan baku yang banyak diteliti untuk produksi bioetanol diantaranya adalah singkong dan tetes tebu (molase). Namun, belakangan harga singkong di pasaran terus merambat naik seiring tingginya minat pabrik dan produsen bioetanol untuk mengolah singkong dan juga tetes tebu menjadi bioetanol. Sehingga perlu dicari bahan baku

lain pengganti singkong tersebut. Salah satu substrat yang potensial untuk dijadikan bahan baku adalah limbah sampah dedaunan yang berhubungan erat dengan pencemaran lingkungan yaitu sebagai sumber pencemaran^[2,3].

Berbagai upaya dilakukan untuk menangani permasalahan sampah tersebut, diantaranya dengan mengurangi volume sampah secara langsung menggunakan metode *incineration* (pembakaran). Metode ini dapat mengurangi volume sampah 75% hingga 80% dari sampah awal yang datang tanpa proses pemisahan, tetapi masih ada permasalahan dalam penanganan sisa hasil pembakaran berupa abu dan gas^[4].

Sehubungan dengan hal tersebut, maka dilakukan penelitian pemanfaatan sampah daun sebagai substrat untuk produksi bioetanol. Diharapkan dengan menggunakan jamur *Trichoderma viride* strain T1 sk sebagai penghasil enzim selulolitik dan xyloglukanolitik untuk sakarifikasi, dan *Saccharomyces cerevisiae* untuk konversi gula menjadi etanol, dapat memperoleh hasil bioetanol dengan baik. Metode ini dikenal dengan sakarifikasi dan fermentasi serentak atau SSF (*Simultaneous Sacharification and Fermentation*)^[5].

METODOLOGI PENELITIAN

Bahan Kimia, Peralatan Dan Instrumentasi

Bahan yang digunakan adalah sampel sampah daun yang diperoleh dari daun-daun kering yang bertebaran disekitar kampus Universitas Andalas, kertas saring, ammonium hidroksida, natrium hidroksida, jamur *Trichoderma viride* strain T1 sk (laboratorium Parafitologi Fakultas Pertanian Universitas Andalas), ragi dari fermipan, natrium karbonat, natrium tartarat, asam sulfat pekat, natrium tungstat, asam molibdat, asam pospat, KH_2PO_4 , Carboxymethyl Cellulose (CMC), zink sulfat, asam klorida, Tween 80, pepton, ekstrak ragi, glukosa, dan PDA (Merck). Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah spektrofotometer UV-Vis (*GENESYS20*), Kromatografi Gas (GC

2010 *SHIMADZHU*), autoklaf, inkubator, timbangan analitis, *hot plate*, peralatan gelas, oven, *laminar air flow* dan *water-bath shaker*.

Perlakuan Awal Sampel

Sampel dari sampah dedaunan sekitar kampus dikeringkan, lalu dipotong kecil-kecil dan dihaluskan dengan menggunakan gerinda. Untuk memperoleh ukuran sampel lebih kecil dilakukan pengayakan. Sampel daun halus sebanyak 10 g direndam dengan berbagai variasi larutan basa NaOH 1%, NH_4OH 8%, NaOH 1% + NH_4OH 4% dan NaOH 1% + NH_4OH 8% dengan perbandingan padatan (sampel) : cairan (larutan basa) 1:10 (w/v) dengan volume larutan basa 100 mL. Variasi lama perendaman selama 24, 48 dan 72 jam pada suhu 50°C. Hasil perlakuan awal ini 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. Sampel daun halus sebanyak 10 g direndam dengan berbagai variasi larutan basa NaOH 1%, NH_4OH 8%, NaOH 1% + NH_4OH 4% dan NaOH 1% + NH_4OH 8% dengan perbandingan padatan (sampel) : cairan (larutan basa) 1:10 (w/v) dengan volume larutan basa 100 mL. Variasi lama perendaman selama 24, 48 dan 72 jam pada suhu 50°C. Hasil perlakuan awal 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. Sampel ini siap untuk produksi bioetanol.

Produksi Enzim Selulase

Sebanyak 2 tabung reaksi biakan *Trichoderma viride* strain T1 sk yang ditambahkan masing-masingnya 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 berat sampah daun dan lama sakarifikasi.

Produksi Bioetanol Dengan SFF

Sebanyak 0,4 g sampel 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 dengan variasi fermentasi 72, 96, 120, 144 dan 168 jam. Hasil fermentasi disaring dan supernatan disentrifus 10000 rpm selama 10 menit pada suhu kamar. Supernatan yang diperoleh didestilasi. Destilat disimpan untuk analisis etanol pada kromatografi gas.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Perlakuan Awal Sampel Sampah Daun

Pada proses perlakuan awal sampah daun dengan larutan basa, diperoleh kondisi optimum pada konsentrasi campuran basa NaOH 1% + NH₄OH 4% dengan lama perendaman selama 72 jam (Gbr. 1)

Pada variasi larutan basa NaOH 1% + NH₄OH 4%, terlihat kehilangan jumlah sampel lebih banyak dibandingkan pada larutan basa lainnya. Dapat disimpulkan bahwa kombinasi kedua larutan basa tersebut mendegradasi lignin paling banyak pada sampah daun. Naiknya jumlah sampel yang hilang disebabkan oleh hilangnya lignin di jaringan pembuluh daun. Jaringan pembuluh daun mengandung lignin karena merupakan lanjutan dari jaringan batang yang terdapat di dalam tulang daun dan urat-urat daun. Lignin yang hilang adalah sebesar 38,851%.

Sedangkan waktu optimum yang diperoleh pada variasi 72 jam dengan pemakaian suhu 50°C. Suhu disini dapat mempercepat reaksi. Jika suhu yang digunakan terlalu tinggi, menyebabkan terdegradasi karbohidrat yang

akan dipecah menjadi gula fermentasi. Pada variasi lama perendaman dibawah 72 jam belum maksimal melepaskan lignin.

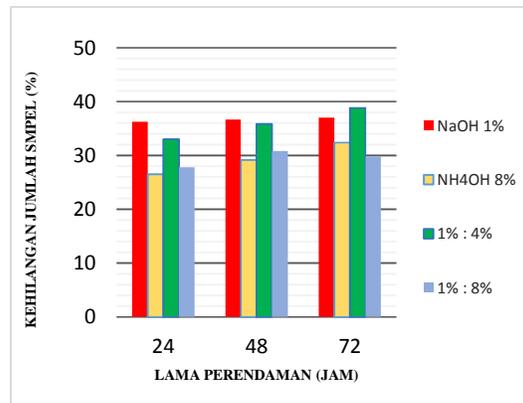
Hasil Aktivitas Enzim dengan Substrat CMC

Proses sakarifikasi dilakukan dengan bantuan ekstrak kasar enzim selulase dari *Trichoderma viride* strain T1 sk. Pengujian aktifitas enzim dilakukan 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. Hasil pengukuran absorbansi cukup besar yaitu >2,000 nm untuk sakarifikasi enzim selulase terhadap CMC 0,1%. Hal ini dikarenakan semakin tinggi kandungan glukosa dalam bahan maka semakin tinggi nilai yang terbaca pada spektrofotometer. Untuk mengatasi hal tersebut dilakukan pengenceran terhadap bahan yang akan diukur sehingga absorbansinya sesuai dengan sensitivitas alat. Pengenceran dilakukan sebanyak 5 kali diperoleh absorbansi 0,751 nm. Aktivitas enzim yang diperoleh terhadap substrat CMC 0,1% ini yaitu 0,1716 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 berwujud amorf (endoglukanase), kristalin (eksoglukanase) dan selubiosa (β -glukosidase)^[6].

Pengaruh Berat Substrat Sampah Daun Terhadap Kadar Glukosa

Kemampuan enzim selulase *Trichoderma viride* strain T1 sk dalam menghasilkan glukosa dari substrat sampah daun dilihat dengan memvariasikan berat sampah daun 0,1 hingga 1 g (Gambar 2). Pada variasi ini diperoleh penyerapan tertinggi pada berat 0,4 g sampah daun yang di beri perlakuan awal dengan kadar glukosa 933,75 μ g/mL. Dapat dilihat pada Gambar 2.



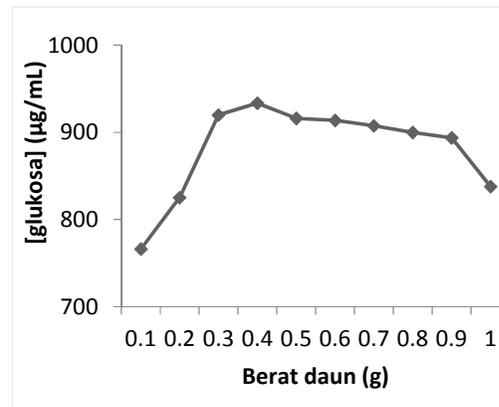
Gambar 1. Kurva kehilangan berat sampah daun setelah *pretreatment* basa NaOH dan NH₄OH

Dari gambar 2 dapat dilihat pada berat sampah daun 0,1 g hingga 0,4 g terjadi kenaikan konsentrasi glukosa karena bertambahnya jumlah substrat yang bereaksi dengan enzim. Pada berat substrat 0,4 g berarti jumlah substrat yang terlibat dengan reaksi enzim mencapai maksimum pada lama inkubasi yang digunakan, sehingga dengan penambahan jumlah substrat konsentrasi glukosa tidak lagi meningkat.

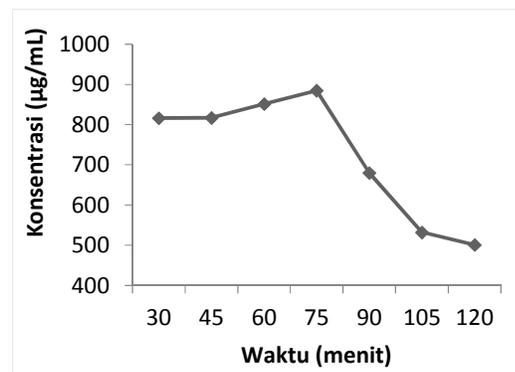
Pengaruh Lama Sakarifikasi Terhadap Konsentrasi Glukosa

Proses sakarifikasi juga dipengaruhi oleh lamanya waktu hidrolisis. Pengaruh lama sakarifikasi dapat dilihat pada gambar 3.

Pada gambar 3 lama sakarifikasi yang optimum terdapat pada waktu 75 menit. Pada waktu dibawah 75 menit jumlah substrat sampah daun belum sempurna dihidrolisis menjadi glukosa. Kelihatan dengan bertambahnya lama waktu sakarifikasi glukosa yang dihasilkan masih meningkat. Namun pada waktu 90 hingga 120 menit mengalami penurunan kadar glukosa. Enzim yang digunakan masih berupa ekstrak kasar yang masih tercampur dengan protein dari enzim lainnya. Pada waktu inkubasi yang terlalu lama mengakibatkan aktifnya enzim yang merubah glukosa sehingga konsentrasi glukosa menurun.



Gambar 2. Grafik hubungan berat sampah daun *pretreatment* terhadap konsentrasi glukosa.



Gambar 3. Grafik hubungan lama sakarifikasi terhadap konsentrasi glukosa

Produksi Bioetanol dengan SSF

Selama fermentasi akan terjadi perubahan selulosa menjadi glukosa oleh enzim selulase dari *Trichoderma viride* strain T1 sk. Glukosa yang terbentuk akan diubah menjadi etanol dengan bantuan enzim invertase yang dihasilkan oleh *Saccharomyces cerevisiae* yang telah ditumbuhkan pada medium YPD. Konsentrasi etanol ditentukan dengan menggunakan GC-MS (kromatografi gas-spektroskopi massa). Hasil pengukuran dengan GC/MS menghasilkan kadar etanol 62,41% pada lama fermentasi 96 jam. Dapat diperoleh etanol yang dihasilkan secara teoritis pada lama fermentasi 96 jam etanol sebanyak 2,45 mL untuk sampel 0,4 g.

Hal tersebut menunjukkan bahwa sampah daun bisa difermentasi menjadi etanol. Diperkirakan pada waktu 96 jam adalah

kondisi yang sesuai untuk *Saccharomyces cerevisiae* mengkonversi glukosa menjadi etanol. Pada saat jumlah substrat sesuai dengan jumlah enzim yang bereaksi.

Dengan demikian lama fermentasi berpengaruh nyata terhadap kadar alkohol yang dihasilkan. Ada banyak faktor yang mempengaruhi fermentasi antara lain substrat, suhu, pH, oksigen, dan mikroba yang digunakan. Berbeda kondisi akan memberikan hasil yang berbeda pula. Senyawa yang diperoleh dari hasil pengukuran GC/MS pada masing-masing lama fermentasi terdapat jenis alkohol lain seperti metanol dan butanol pada lama fermentasi 168 jam^[7].

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. Juga bisa dikarenakan nutrien saat kerja enzim pada *Saccharomyces cerevisiae* di dalam medium sudah habis dan energi cadangan di dalam sel juga ikut habis.

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, metode SSF cocok digunakan untuk produksi bioetanol dari sampel sampah daun. Penggabungan proses sakarifikasi dan fermentasi mendapatkan hasil bioetanol yang tinggi. Karena glukosa yang dihasilkan dari hasil sakarifikasi enzimatis oleh enzim selulase *Trichoderma viride* strain T1 sk tidak melampaui batas toleran untuk *Saccharomyces cerevisiae* terhadap pertumbuhan dan kerja enzim *Saccharomyces cerevisiae* untuk produksi bioetanol.

KESIMPULAN

Dari penelitian yang telah dilakukan, disimpulkan bahwa sampah dari dedaunan sekitar kampus Unand dengan metoda SSF memperoleh hasil:

1. Perlakuan awal optimum adalah pada konsentrasi NaOH 1% + NH₄OH 4%

dengan lama perendaman selama 72 jam dengan suhu 50°C.

2. Aktifitas enzim selulase dari *Trichoderma viride* strain T1 sk dengan substrat CMC adalah 0, 1716 unit.
3. Enzim selulase dari *Trichoderma viride* strain T1 sk dapat mengkonversi selulosa menjadi glukosa dan diperoleh kadar glukosa tertinggi 933,75 µg/mL pada berat 0,4 g sampah daun.
4. Waktu optimum untuk sakarifikasi diperoleh pada 75 menit.
5. Pengukuran dengan GC/MS menghasilkan kadar etanol 62,41% pada lama fermentasi 96 jam dengan volume 2,45 mL untuk sampel 0,4 g.

DAFTAR PUSTAKA

1. Handayani SU. Pemanfaatan Bioetanol Sebagai Bahan Bakar Pengganti Bensin. *Jurnal Teknik UNDIP*, 99-102, (2008).
2. Kusnadi, Syulasmii, Ammi, Adisenjaya, dan Yusuf Hilmi. Pemanfaatan Sampah Organik Menjadi Bahan Baku Produksi Bioetanol Sebagai Energi Alternatif. Laporan Penelitian Strategis Nasional. Universitas Pendidikan Indonesia, (2009).
3. Duwi Suksewati, Dini. Karakterisasi Sifat Fisik dan Kimia Minyak Hasil Pirolisis Lambat Campuran Sampah Kertas dan Daun. Tugas Akhir Jurusan Teknik Mesin Universitas Sebelas Maret; Surakarta, (2010).
4. Rizaldi, Rizky. Pengelolaan Sampah Secara Terpadu di Perumahan Dayu permai Yogyakarta. Tugas Akhir Jurusan Teknik Lingkungan Universitas Islam Indonesia; Yogyakarta, (2008).
5. Z. Zuo, S. Tian, Z. Chen, and J. Li, Soaking Pretreatment on Corn Stover for Bioethanol Production Followed by Anaerobic Digestion Process. *Appl Biochem Biotechnol*, 167: 2088-2102. (2012).
6. S.S. Pramono, Studi Mengenai Komposisi Sampah Perkotaan di Negara-negara Berkembang. Universitas Gunadarma; Jakarta, (2004).
7. Ida Bagus W G, W R A, Ida Bagus N S D. Produksi Selulase Kasar dari Kapang

- Trichoderma viride* dengan Perlakuan Konsentrasi Substrat Ampas Tebu dan Lama Fermentasi. *Jurnal Biologi*, XV(2): 29-33, (2011).
8. H McNair, M & E J Bonelli. Dasar Kromatografi Gas. Penerbit ITB: Bandung.
 9. Nugraha N. Pengaruh Penambahan Inokulum Jamur Hasil Isolasi dari Sampah Organik terhadap Kecepatan Waktu Pengomposan Sampah Organik Secara Aerobik. Skripsi sarjana pada FPMIPA UPI Bandung: tidak diterbitkan, (2008).
 10. Octavia S, Tatang H, Soerawidjaja, Purwadi R dan IDG Arsa Putrawan. Pengolahan Awal Lignoselulosa Menggunakan Amoniak untuk Meningkatkan Perolehan Gula Fermentasi. *Jurnal ISSN*, B13(2)-B13(6): 1693 – 4393, (2011)
 11. Kumar R, dan Wyman C E. Cellulase Adsorption and Relationship to Feature of Corn Stover Solid Produce by Leading Pretreatment. *Biotechnology and Bioengineering*, 103: 252-267, (2009)
 12. Alriksson, Bjorn. Ethanol From Lignocellulose: Alkali Detoxification of Dilute-Acid Spruce Hydrolysates. Sweden: Karlstad University Faculty of Technology and Science Biochemistry, (2006).
 13. Graeme, M. Walker. Bioethanol: Science and Technology of Fuel Alcohol. Scotland: University of Abertay, (2010).
 14. E. Susanti. Komparasi Teknik Sakarifikasi dan Fermentasi Simultan (SFS) dengan Hidrolisi dan Fermentasi Terpisah (HFT) pada Pembuatan Bioetanol dari Ubi Jalar Putih (*Ipomoea Batatas L*). Universitas Malang, (2008).