APLIKASI ENZIM SELULASE DARI *Trichoderma reesei* QM 9414 UNTUK PENINGKATAN PRODUKSI ETANOL DARI SINGKONG MELALUI PROSES SAKARIFIKASI FERMENTASI SIMULTAN

Siti Maemunah, Theo A. Priatna, Achmad Ali Sjamsuriputra^{*}
Departemen Teknik Kimia, Fakultas Teknologi Industri ITB
Jl. Ganesha 10 Bandung
maepsv81@yahoo.com

Naskah diterima 13 Januari 2005, dinilai 2 Februari 2005, dan disetujui 24 Agustus 2005

Abstrak

Enzim selulase merupakan kompleks enzim yang dapat mengkatalisis penguraian selulosa. Penggunaan enzim selulase pada tepung singkong melalui proses sakarifikasi fermentasi secara simultan diharapkan dapat merusak sebagian besar dinding sel singkong yang masih utuh yang tersusun dari selulosa sehingga membebaskan lebih banyak pati dari dalam sel. Usaha ini dilakukan untuk meningkatkan konversi etanol dari tepung singkong melalui proses sakarifikasi dan fermentasi simultan. Proses produksi etanol melalui proses sakarifikasi dan fermentasi simultan (SFS) dilakukan dengan komposisi tepung singkong 20%(b/b), kadar air medium SFS 80%, pH 5 dan temperatur 30°C. Aktivitas glukoamilase yang digunakan adalah 0,632 unit/g_{TSK} dan jumlah ragi *Saccharomyces cerevisiae* $2,6 \times 10^7$ sel/g_{TSK}. Hasil percobaan menunjukkan produksi etanol pada SFS dengan perendaman selulase sebesar 5%(v/v) (0,63 UA/g_{TSK}) terlebih dulu selama 7 hari, akan meningkatkan konversi etanol dari tepung singkong hingga 48,6% dengan kadar etanol 9,88%(b/b). Konversi etanol dari tepung singkong pada SFS dengan penambahan langsung enzim selulase sebesar 75%(v/v) (8,37 UA/g_{TSK}) tanpa direndam terlebih dulu, adalah 42,07% dengan kadar etanol 7,8%(b/b). Sedangkan pada SFS tanpa penambahan selulase sama sekali, hanya diperoleh konversi etanol dari tepung singkong sebesar 25% dengan kadar etanol 5,6%(b/b).

Kata Kunci : Selulase, SFS, Tepung Singkong, Konversi, Etanol

Abstract

Cellulase enzyme is a complex enzyme which catalyzes the degradation of cellulose. The use of cellulase enzyme on the pretreatment of cassava powder to produce ethanol before saccharified and fermented simultaneously have done in order to destroy most of the cell wall which comprise mostly of cellulose so more starch grain were available from the cell. The simultaneous saccharification and fermentation process were carried out at 30°C and at pH of 5 with 0,632 unit/g of rice brand koji as glucoamylase and $2,6 \times 10^7$ cell/g_{substrate} of *Saccharomyces cerevisiae* yeast. The result showed that, the SSF process gave higher ethanol conversion from starch in cassava powder when the substrate had been pre-treated with cellulase enzyme. Ethanol was obtained with the conversion of 48,6% from starch in cassava powder with 9,88%(wt) in concentration by previously soaking the cassava powder in 5 % v/v cellulase enzymes for 7 days before SSF process carried out. Ethanol was obtained with the conversion of 42,07% from raw cassava starch and 7,8%(wt) in concentration by carried out SSF process with 75 % v/v cellulase enzymes directly. While the SSF process without cellulase enzymes only gave 5,6% (wt) of ethanol with 25% conversion.

Keywords: Cellulase, SFS, Cassava Starch, Conversion, Ethanol

^{*} Penulis Penanggung Jawab

1. Pendahuluan

Etanol merupakan produk industri kimia yang kebutuhannya diperkirakan akan semakin meningkat di masa mendatang. Perkembangan industri etanol dapat dilihat dari pemanfaatan etanol yang cukup besar. Etanol mempunyai kegunaan yang penting dalam industri minuman, bahan kimia, industri farmasi dan juga sebagai bahan bakar bebas polusi (Bailey, J.E., dan Ollis, D.F., 1986).

Proses pembuatan etanol dapat dilakukan dengan menggunakan bahan baku berpati. Salah satu bahan berpati yang potensial dikembangkan di Indonesia adalah singkong. Kandungan pati dalam singkong menempati urutan tertinggi setelah padi dan jagung (Direktorat Gizi, 1967). Produksi etanol dari singkong ini dapat dilakukan melalui proses enzimatik konvensional ataupun dengan proses sakarifikasi dan fermentasi simultan (SFS).

Pada proses konvensional setiap reaksi berlangsung secara bertahap. Cara ini dinilai kurang efisien karena diperlukan jumlah peralatan yang banyak dan spesifik untuk masing-masing proses sehingga mengakibatkan biaya produksi yang tinggi. Sedangkan pada proses pembuatan etanol dengan metode SFS, proses berlangsung hanya dalam satu tahap saja.

Pada proses SFS terjadi 2 reaksi secara sekaligus dalam satu reaktor, yaitu perubahan pati menjadi glukosa oleh glukoamilase dan fermentasi glukosa oleh ragi menjadi etanol. Proses baru ini lebih efisien dibandingkan dengan proses enzimatik biasa karena dalam proses SFS terjadi pengurangan jumlah reaktor, peralatan dan kontrol proses yang dibutuhkan. Terlebih penting lagi adalah peristiwa inhibisi produk pada proses sakarifikasi dan inhibisi substrat pada proses fermentasi etanol yang disebabkan glukosa dapat dikurangi. Glukosa yang dihasilkan proses sakarifikasi akan langsung difermentasi oleh ragi *S. cerevisiae* menjadi etanol dan CO_2 sehingga tidak menyebabkan terjadinya akumulasi glukosa dalam fermentor (Ueda, S., *et al.*, 1984).

Konversi etanol maksimum yang bisa didapatkan dari glukosa oleh *S. cerevisiae* adalah 51% (Shuler, M.L., dan Kargi, F., 1992). Sedangkan konversi maksimum etanol dari tepung singkong tergantung dari kadar pati yang dikandung tepung singkong tersebut.

Pada produksi etanol secara SFS yang dilakukan plant pilot UPT-EPG BPPT di Lampung (Tim Bioteknologi-LPM-ITB, 2001) dihasilkan 1 liter etanol dari 6 kg singkong. Biokonversi singkong menjadi etanol pada proses ini hanyalah sekitar 16.2% dengan kadar etanol sebesar 9%-v/v.

Konversi tepung singkong menjadi etanol yang belum maksimal ini diduga karena masih banyak pati yang terperangkap dalam sel singkong yang dindingnya masih utuh. Dinding sel tersebut tersusun dari zat selulosa yang tidak dapat dipenetrasi oleh enzim glukoamilase. Karena glukoamilase tidak dapat berinteraksi dengan pati yang masih terjebak dalam dinding sel, maka konversi pati menjadi glukosa rendah dan akhirnya perolehan etanol pun menjadi rendah pula.

Upaya untuk meningkatkan jumlah pati yang dapat berinteraksi dengan glukoamilase adalah dengan diaplikasikannya enzim selulase pada proses SFS. Enzim selulase merupakan enzim yang dapat mengkatalis penguraian selulosa. Perendaman singkong dalam enzim selulase dapat menguraikan selulosa yang menyusun dinding sel singkong, sehingga diharapkan butir-butir pati yang masih terkurung dalam sel yang belum hancur akan keluar dan berinteraksi dengan enzim glukoamilase. Semakin banyak butir-butir pati yang dihasilkan, semakin banyak pula glukosa yang bisa dihasilkan yang berakibat juga pada peningkatan produksi etanol.

Pada proses SFS, akan terjadi interaksi kerja antara enzim selulase, glukoamilase dan ragi pada saat yang bersamaan. Walaupun pada penelitian yang dilakukan oleh Ueda (1984) telah diketahui komposisi optimum penambahan glukoamilase dan ragi pada SFS, dengan hadirnya selulase pada SFS mungkin akan merubah kesetimbangan reaksi yang terjadi pada proses SFS. Diperkirakan penghambatan terhadap kinerja enzim glukoamilase, selulase, dan ragi akan tetap ada. Untuk meminimalisasi terjadinya hambatan substrat maupun produk tersebut, harus ditentukan jumlah enzim selulase optimum, sehingga proses penguraian selulase dinding sel singkong dapat semaksimal mungkin.

Jumlah penambahan selulase yang berlebihan selain tidak efisien dan tidak ekonomis juga dapat menghasilkan glukosa berlebih. Glukosa yang berlebihan malah akan menghambat kerja dari selulasenya sendiri (Wiseman, 1985). Sedangkan jumlah selulase yang tidak mencukupi tidak akan memberikan peningkatan konversi.

Selain pengaruh komposisi selulase, perlakuan berbeda dalam mengaplikasikan selulase SFS perlu diteliti pengaruhnya sehingga didapat perlakuan yang tepat dalam menggunakan selulase pada SFS.

2. Fundamental

Proses produksi etanol dari pati dapat dilakukan dengan jalan fermentasi menggunakan ragi *S. cerevisiae*. Pembuatan etanol menggunakan ragi ini hanya dapat dilakukan secara langsung pada bahan yang mengandung gula. Hal ini disebabkan karena ragi *S. cerevisiae* tidak dapat menghasilkan enzim amilase. Oleh karena itu, bahan pati seperti yang terdapat pada tepung singkong, harus diubah dahulu menjadi glukosa. Konversi pati menjadi glukosa dapat dilakukan dengan menghidrolisa pati menggunakan enzim.

Proses enzimatik pati menjadi alkohol melalui proses pemasakan diperlihatkan dalam Gambar 1. Tahap pertama dalam proses

pemasakan adalah gelatinasi yaitu proses pemanasan pada temperatur tinggi (110-120°C) hingga butir pati mengembang membentuk gel. Kemudian enzim α -amilase ditambahkan sehingga terjadi liquefaksi. Proses liquefaksi yaitu proses pemutusan ikatan α ,1-4 glikosidik ditengah-tengah molekul pati hingga terbentuk dekstrin.

Proses enzimatik dilanjutkan dengan sakarifikasi yaitu pemutusan ikatan α ,1-6 dan sisa ikatan α ,1-4 glikosidik pati menjadi glukosa oleh glukamilase. Glukosa hasil sakarifikasi kemudian diubah menjadi etanol melalui proses fermentasi oleh ragi.

Gambar 1. Tahapan Proses Enzimatik pada Proses Produksi Etanol

Proses sakarifikasi dan fermentasi simultan (SFS) mempersatukan tahap sakarifikasi dan tahap fermentasi menjadi satu tahap saja. Dengan demikian berkurangnya tahapan proses, banyak hal yang bisa dihemat, seperti berkurangnya jumlah reaktor serta proses pengendalian (Wyman, C., 1991). Salah satu keuntungan lainnya menggunakan proses SFS adalah berkurangnya kemungkinan terjadi inhibisi produk terhadap kinerja enzim. Ketika gula dihasilkan oleh enzim, ragi akan segera mengkonversi gula tersebut menjadi etanol (Philippidis and Smith, 1995).

Pada sel tumbuhan, butiran-butiran pati terletak di dalam sel pada jaringan parenkim yang dilingkupi oleh dinding sel. Salah satu komponen utama pembangun dinding sel adalah selulosa. Selulosa merupakan polimer dari glukosa dengan struktur yang mirip dengan amilosa.

Selulosa dapat diuraikan oleh enzim selulase. Enzim selulase sendiri sebenarnya merupakan sebuah kompleks enzim yang terdiri atas tiga komponen utama (Kennedy, *et al.*, 1990), yaitu: Endo-1,4--glukanase, disebut juga faktor C₁, enzim Ekso-1,4--glukanase/Selobiohidrolase disebut juga faktor C₂, serta -glukosidase.

Penambahan enzim selulase ke dalam proses SFS akan memecah dinding sel singkong yang terbentuk dari selulosa sehingga pati yang bebas untuk disakarifikasi lebih banyak. Selain membantu membebaskan pati, enzim selulase juga mengkonversi selulosa menjadi glukosa sehingga dapat difermentasi oleh ragi (Kennedy, *et al.*, 1990).

Enzim selulase akan terbentuk jika diinduksi oleh selulosa, laktosa, dan soforosa pada beberapa organisme (Kadam, 1996). Kinerja enzim selulase akan terinhibisi oleh kehadiran glukosa pada konsentrasi tinggi (Wiseman, 1985). Ooshima *et al.* (1985) juga melaporkan terjadinya inhibisi proses sakarifikasi oleh etanol, setidaknya pada konsentrasi 0,2M. Kondisi optimum aktifitas selulase menurut Mandels (Wilke, 1975) adalah pada kisaran pH 4,5- 6,0 dan temperatur 50°-60°C. Berdasarkan data yang sudah disebutkan, maka proses perendaman tepung singkong dengan enzim selulase dilakukan pada temperatur 60°C dan pada pH 5.

3. Metodologi

Bahan baku yang digunakan pada penelitian ini tepung singkong dengan kadar air kurang dari 7% dan kadar pati sekitar 80%. Untuk pembuatan koji sebagai sumber enzim glukamilase digunakan jenis jamur *Aspergillus niger* L74 yang dikembangkan pada koji dedak padi 50%. Ragi yang digunakan untuk fermentasi adalah *S. cerevisiae* A3. Mikroorganisme yang digunakan untuk menghasilkan enzim selulase adalah jenis jamur *Trichoderma reesei* QM9414. Ketiga macam biakan ini diperoleh dari koleksi laboratorium Mikrobiologi dan Teknologi Bioproses, Departemen Teknik Kimia ITB. Komposisi Medium yang akan digunakan untuk memproduksi enzim selulase diperlihatkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi Medium untuk Produksi Enzim Selulase¹⁴⁾ (Medium Mandels)

Komponen	Jumlah
Avicell(Selulosa kristalin sebagai sumber karbon)	0.25%
KH ₂ PO ₄	2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,4 g
Urea	0,3 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,3 g
CaCl ₂	0,3 g
Larutan Trace Element*	1 mL
Air destilasi	1000 mL

* 5 g FeSO₄·5H₂O, 1,4 g ZnSO₄·7H₂O, 1,56 g MnSO₄·7H₂O
2 g, CoCl₂ dalam 1000 mL

Komposisi medium untuk produksi enzim glucoamilase dengan metode koji dilakukan berdasarkan referensi dari penelitian Sjamsuriputra (1986). Enzim glucoamilase yang dihasilkan selama 4 hari memiliki aktifitas tertinggi sebesar 1.227 unit/g.koji.

Aktifitas enzim glucoamilase dinyatakan dalam unit/g yang didefinisikan sebagai banyaknya mg glukosa yang dihasilkan pada hidrolisa pati dengan katalisa enzim glucoamilase yang berasal dari 1 g sumber enzim dalam 1 menit (Sjamsuriputra, A.A., *et al.*, 1986). Kadar glukosa ditentukan dengan metoda Somogyi Nelson (Somogyi, S. 1952).

Aktifitas enzim selulase yang diteliti adalah aktivitas selulase C_x. Satu satuan Unit C_x adalah jumlah enzim yang dapat membebaskan 1,0 µmol glukosa dari 1% CMC (*Carboxy Methyl Cellulose*) dalam satu menit pada suhu 42°C dan pH 5. Kadar glukosa ditentukan dengan metoda SomogyiNelson. Pengukuran kadar glukosa dilakukan dengan spektrometer, panjang gelombang yang digunakan 520 nm (Somogyi, S. 1952).

Laju produksi etanol ditentukan dengan menimbang pengurangan berat fermentor akibat pelepasan gas CO₂ yang terbentuk selama proses fermentasi berlangsung. Sesuai dengan stoikiometri, terbentuknya CO₂ adalah sebanding dengan jumlah etanol yang dihasilkan. Reaksi kimia yang terjadi pada fermentasi adalah sebagai berikut:

Penentuan kadar etanol yang dihasilkan dengan menggunakan metode *Specific Gravity* (AOAC, cit Sudarmadji *et al.*, 1981). Caranya yaitu dengan mendestilasi 50 mL campuran dari

25 mL medium fermentasi yang telah dinetralkan dengan NaOH 1 N serta aquades. Destilat sebanyak 23 mL yang dicampur 2 mL aquades diukur *specific gravity*-nya dengan menggunakan pikonometer. Kadar alkohol berdasarkan *specific gravity* kemudian didapatkan dari Tabel Referensi AOAC.

Percobaan ini bertujuan untuk mengetahui penambahan enzim selulase yang optimum pada proses perendaman substrat dengan enzim selulase. Optimasi ini berdasarkan pada hasil tertinggi rata-rata kandungan glukosa sebagai hasil hidrolisa selulosa pada substrat oleh enzim selulase menjadi glukosa. Percobaan perendaman substrat dilakukan dengan menggunakan enzim selulase dengan aktivitas keseluruhan medium 28.05 UA yang divariasikan pada 0, 0.21, 0.42, 0.63, 0.85, 1.05, 1.27, dan 1.5 UA/g_{TSK}. Substrat yang digunakan dalam percobaan adalah 40 g tepung singkong kering (TSK) dengan kadar air medium 80%, pH 5 yang dijaga dengan menggunakan larutan buffer asetat dan temperatur inkubasi yaitu 60°C. Enzim selulase yang digunakan merupakan kultur *T. reesei* QM 9414 dalam medium produksi selulase yang telah mencapai produksi selulase tertinggi. Kultur ini digunakan sebagai sumber enzim selulase tanpa dilakukan proses pemisahan apapun. Variasi optimal enzim selulase yang diperoleh, selanjutnya digunakan untuk percobaan SFS berikutnya.

Percobaan dilakukan untuk mengetahui pengaruh enzim selulase terhadap *yield* etanol akhir dari singkong melalui proses SFS. Variasi substrat ada dua macam, yaitu substrat yang melalui perendaman dalam enzim selulase dan yang tidak melalui perendaman dalam enzim selulase. Skema percobaan bisa dilihat pada Gambar 2.

(a)

Gambar 2. (a) Proses SFS Biasa (RUN 5); (b) Proses SFS dengan perendaman (RUN 1,2,3,4); (C) Proses SFS Langsung (RUN 6,7,8,9,10,11)

Cara pengerjaannya adalah sebagai berikut: 1 labu Erlenmeyer yang berisi substrat tepung singkong 20% (40 g), selanjutnya dilakukan pre-treatment seperti tempuhan yang akan dilakukan dan dijaga kadar air medium SFS nantinya tetap 80%. Kemudian pada setiap labu yang telah diperlakukan seperti diatas, ditambahkan koji dengan aktivitas glukamilase 0.632 unit/g_{TSK} dan jumlah ragi 2.6×10^7 sel/g_{TSK}. SFS mulai berlangsung ketika ragi mulai ditambahkan. Proses SFS dijaga pada pH5 dan suhu 30°C. Tempuhan percobaan yang dilakukan dalam penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 2.

Pengukuran etanol yang terbentuk adalah dengan menimbang berat total labu pada jam ke 0, jam ke 24 dan seterusnya sampai tidak terjadi pengurangan berat labu karena terbentuknya gas CO₂ yang keluar melalui leher angsa. Pengamatan

dilakukan terhadap jumlah etanol dan CO₂ yang terbentuk. Dari data yang diperoleh dibuat grafik dalam hubungan antara jumlah CO₂ yang terbentuk terhadap waktu dan antara jumlah etanol yang terbentuk terhadap waktu sehingga dari grafik dapat ditentukan variasi yang menghasilkan etanol optimal.

Tabel 2. Tempuhan Penelitian

Run	Selulase(UA/g substrat)	% vol selulase	Waktu Perendaman
1	0	0	7 hari
2	0,63	5%	7 hari
3	0	0	4 hari
4	0,63	5%	4 hari
5	0	0	SFS biasa
6	0,21	1,50%	tanpa perendaman
7	0,63	5%	tanpa perendaman
8	1,12	10%	tanpa perendaman
9	2,85	30%	tanpa perendaman
10	6,7	60%	tanpa perendaman
11	8,37	75%	tanpa perendaman

4. Hasil dan Pembahasan

Perkembangan jumlah glukosa yang dihasilkan selama perendaman meningkat (Gambar 3), hingga jam ke-96 kemudian terjadi penurunan. Enzim selulase yang ditambahkan pada substrat tepung singkong kering(TSK) akan menguraikan selulosa yang terdapat pada dinding sel singkong, sehingga menghasilkan glukosa. Tetapi aktivitas selulase akhirnya menurun mulai pada jam ke-96, dimana kandungan glukosa hasil hidrolisis selulosa yang terdapat pada medium substrat mulai menginhibisi kinerja selulase.

Gambar 3. Konsentrasi Gula Pereduksi Selama Perendaman Tepung Singkong dalam Berbagai Konsentrasi Selulase

Bentuk kurva yang diperoleh menunjukkan adanya penurunan glukosa setelah mencapai puncaknya. Peristiwa tersebut mungkin disebabkan enzim selulase yang digunakan adalah *crude enzyme* dan respon yang dihasilkan merupakan resultan berbagai macam enzim yang terkandung didalam kompleks enzim selulase.

Waktu optimum perendaman ditentukan dari waktu dimana perbandingan kadar produk glukosa hasil perendaman dengan selulase dengan yang tidak ditambahkan selulase, memiliki nilai tertinggi. Pada penelitian ini, didapatkan waktu optimum perendaman adalah pada jam ke-76, dimana glukosa yang dihasilkan pada proses perendaman dengan selulase 2.3 kali lebih besar dibandingkan kadar glukosa pada perendaman tanpa enzim selulase. Perbandingan jumlah glukosa yang dihasilkan antara proses perendaman dengan selulase dengan perendaman tanpa selulase dapat dilihat pada Gambar 4 berikut ini.

Gambar 4. Pengaruh Jumlah Enzim Selulase terhadap Konsentrasi Glukosa yang Dihasilkan pada Perendaman Substrat Selama 76 Jam

Jumlah enzim yang meningkat hingga 0.63 UA/g. $_{TSK}$ akan menaikkan produksi glukosa. Pemakaian jumlah enzim selulase lebih besar dari 0.63 UA/g. $_{TSK}$ malah mengalami penurunan. Hal ini bisa terlihat pada Gambar 4. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa jumlah enzim selulase optimum untuk proses perendaman tepung pati singkong pada kondisi pH 5, temperatur 60 °C adalah 0.63 UA/g. $_{TSK}$. Jumlah optimal ini selanjutnya diterapkan pada proses SFS dengan perlakuan awal perendaman.

Tabel 3. Konsentrasi Glukosa yang Dihasilkan pada Berbagai Jumlah Enzim dengan Waktu Perendaman 76 Jam

Jumlah	0	0,21	0,42	0,63	0,85	1,05	1,27	1,5
Glukosa(ug/g)	1830	2654	2621	4154	2934	2835	2522	2538

Perkembangan pembentukan gas CO₂ yang dihasilkan pada proses SFS dapat dilihat pada Gambar 5 dan jumlah etanol yang diproduksi dapat dilihat pada Gambar 6. Hasil percobaan menunjukkan produksi etanol pada SFS tanpa selulase (RUN 5), hanya diperoleh konversi etanol dari tepung singkong sebesar 25,01% dengan kadar etanol 5,01%(b/b). Pada SFS tanpa perendaman dengan jumlah enzim selulase 75% (v/v) (8,37 UA/g. $_{TSK}$) dihasilkan konversi etanol dari tepung singkong sebesar 42,08% dengan kadar etanol 7,88%(b/b) (RUN 11). Pada SFS dengan perendaman selulase sebesar 5%(v/v) (0,63 UA/g. $_{TSK}$) terlebih dulu selama 7 hari akan menghasilkan konversi etanol dari tepung singkong sebesar 48,6% dengan kadar etanol 9,33%(b/b) (RUN 2 pada kondisi optimum SFS yang sama). Data ini dapat dilihat pada Tabel 4.

Gambar 5. Laju Produksi CO₂ pada Proses SFS (lihat Tabel 2)

Pada percobaan dimana enzim selulase langsung digunakan secara simultan dengan glucoamilase dan ragi (SFS langsung), tepung pati singkong tidak mengalami perendaman terlebih dulu. Pada percobaan ini divariasikan jumlah enzim selulase 0; 0,21; 0,63; 1,12; 2,85; 6,67, dan 8,37 UA/g. $_{TSK}$. Hasil percobaan menunjukkan bahwa jumlah enzim selulase yang semakin tinggi akan meningkatkan jumlah produksi alkohol. Produksi alkohol tertinggi dicapai ketika jumlah selulase berada dalam jumlah terbesar yaitu 8,37 UA/g. $_{TSK}$ (Tabel 4).

Gambar 6. Produksi Etanol Maksimum pada Proses SFS Tepung Singkong dalam Berbagai Variasi Kadar Enzim Selulase

Pada percobaan dimana enzim selulase langsung digunakan secara simultan dengan glukamilase dan ragi (SFS langsung), tepung pati singkong tidak mengalami perendaman terlebih dulu. Pada percobaan ini divariasikan jumlah enzim selulase 0; 0,21; 0,63; 1,12; 2,85; 6,67; dan 8,37 UA/g_{TSK}. Hasil percobaan menunjukkan bahwa jumlah enzim selulase yang semakin tinggi akan meningkatkan jumlah produksi alkohol. Produksi alkohol tertinggi dicapai ketika jumlah selulase berada dalam jumlah terbesar yaitu 8,37 UA/g_{TSK} (Tabel 4).

Tabel 4. Data Perolehan (Yield), Biokonversi dan Kadar Etanol Hasil SFS

RUN	Jumlah enzim selulase (UA/g)	Waktu Perendaman	etanol %b/b	etanol dari singkong(%)	Yield
1	0	7 hari	8,28	44,69	90,88
2	0,63	7 hari	9,33	48,61	98,85
3	0	4 hari	9,39	47,05	95,66
4	0,63	4 hari	9,20	44,69	90,88
5	0	Tanpa perendaman	5,01	25,01	50,22
6	0,2075	Tanpa perendaman	5,88	35,55	72,27
7	0,63	Tanpa perendaman	5,88	36,85	74,93
8	1,12	Tanpa perendaman	6,47	25,88	52,61
9	2,85	Tanpa perendaman	7,43	35,55	72,28
10	6,67	Tanpa perendaman	5,29	27,70	56,33
11	8,37	Tanpa perendaman	7,88	42,08	85,56

Kenyataan ini menunjukkan bahwa pada proses SFS didahului perendaman dengan enzim selulase 0,63 UA/g_{TSK} selama 7 hari pada suhu 60°C akan meningkatkan konversi etanol singkong sebesar 94,4% dibandingkan produksi etanol melalui SFS biasa. Sedangkan pada proses SFS yang ditambahkan selulase sebesar 8,37 UA/g_{TSK} secara langsung (tanpa perendaman) pada suhu 30°C, akan meningkatkan konversi tepung singkong menjadi etanol sebesar 68,28% dibandingkan dengan produksi etanol pada SFS biasa. Hal ini bisa dilihat pada Gambar 7.

Gambar 7. Pengaruh Perlakuan Awal Pemakaian Selulase pada Produksi Etanol secara SFS

Secara umum, aplikasi enzim selulase dari *Trichoderma reesei* QM9414 dapat meningkatkan produksi etanol karena hidrolisa dinding selulosa oleh enzim selulase telah meningkatkan jumlah pati yang dapat dikonversi glukamilase menjadi glukosa.

Pada hasil percobaan, tepung singkong yang direndam dulu dalam enzim selulase 0,63 UA/g_{TSK} selama 7 hari pada 60°C (RUN 2), akan memberikan jumlah etanol yang lebih tinggi dibandingkan dengan tepung singkong yang tidak direndam terlebih dulu tapi langsung direaksikan pada jumlah enzim yang sama yaitu 0,63 UA/g_{TSK}. Hal ini bisa dilihat pada Gambar 6. Hal ini mungkin disebabkan menurunnya aktivitas selulase ketika berinteraksi dengan pati singkong pada saat kondisi kerja selulase tidak pada kondisi optimumnya. Kondisi optimum kerja selulase adalah pada suhu 60°C sedangkan ketika selulase digunakan langsung pada SFS, selulase harus menyesuaikan diri dengan suhu optimum ragi pada 30°C.

5. Kesimpulan

Proses perendaman tepung singkong pada berbagai variasi jumlah larutan enzim selulase dari *Trichoderma reesei* QM9414 dengan kondisi perendaman dijaga pada pH 5 dan suhu 60°C,

diperoleh hasil konsentrasi glukosa tertinggi pada jumlah larutan enzim selulase 0,63 UA/g^{-TSK} (5%(v/v)) dengan masa perendaman selama 4 hari. Pada kondisi ini, jumlah glukosa mencapai 2,3 kali lebih besar dibandingkan rendaman tepung singkong tanpa selulase pada kondisi perendaman yang sama.

Penelitian diteruskan dengan melakukan proses SFS. Proses SFS pertama dilakukan tanpa menggunakan selulase dengan komposisi medium yaitu tepung singkong 20%(b/b), kadar air medium SFS 80%, pH 5 dan temperatur 30°C. Aktivitas koji yang digunakan adalah 0,632 UA/g^{-TSK} (11% berat) dan jumlah ragi *S. cerevisiae* 2,6x10⁷ sel/g^{-TSK}, hanya diperoleh konversi etanol dari tepung singkong sebesar 25% dengan kadar etanol 5,6%(b/b).

Produksi etanol pada SFS dengan perendaman menggunakan selulase sebesar 5%(v/v) (UA/g^{-TSK}) terlebih dulu selama 7 hari akan meningkatkan konversi etanol dari tepung singkong hingga 48,6% dengan kadar etanol 9,88%(b/b). Penambahan selulase dengan cara ini pada proses SFS akan meningkatkan konversi etanol dari tepung singkong sebesar 94,4% dibandingkan dengan produksi etanol melalui SFS biasa dengan kondisi optimum yang sama.

Konversi etanol dari tepung singkong pada SFS tanpa perendaman dengan jumlah enzim selulase 75%(v/v) (8,37 UA/g^{-TSK}) adalah 42,07% dengan kadar etanol 7,8 %(b/b). Penambahan selulase dengan cara ini pada proses SFS akan meningkatkan konversi etanol dari tepung singkong sebesar 68,28% dibandingkan dengan produksi etanol pada SFS biasa.

Daftar Notasi

TS =Tepung singkong,
GA =Enzim glukamilase
SL =Enzim Selulase

Daftar Pustaka

- [1] Bailey, J.E., and Ollis, D.F., (1986) "Biochemical engineering Fundamentals", 2nd ed., McGraw-Hill, Inc., Singapore
- [2] Direktorat Gizi, Departemen Kesehatan RI, (1967) "Daftar Komposisi Bahan Makanan" Jakarta
- [3] Gauss, et al., (1976) U.S. Patent No. 3.990.944, November 9
- [4] Huff, et al, (1976) U.S. Patent No. 3.990.945, November 9
- [5] Kadam, Kiran L., (1996) "Cellulase Production", In *Handbook On Bioethanol: Production and Utilization* (Charles E. Wyman, ed.), Taylor & Francis Ltd
- [6] Kennedy, et al., (1990) "Cellulose Sources and Exploitation : Industrial Utilization, Biotechnology, and Physico-chemical Properties", Ellis Horwood Limited, England, hal.391
- [7] Ooshima, et al., (1985) "Simultaneous Saccharification and Fermentation of Cellulose : Effect of Ethanol on Enzymatic Saccharification of Cellulose", *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 27, pp.389-397
- [8] Philippidis, G.P., T.K. Smith., (1995), "Limiting Factors in the Simultaneous Saccharification and Fermentation Process for Conversion of Cellulosic Biomass to Fuel Alcohol", *Appl. Biochem. Biotech.* 51/52
- [9] Shuler, M.L., Kargi, F., (1992) "Bioprocess Engineering : Basic Concepts " Prentice-Hall Inc., New Jersey, hal. 208
- [10] Sjamsuriputra, A.A., et al., (1986) "Pemanfaatan Limbah Padat Industri Tapioka untuk Produksi Etanol dengan cara Sakarifikasi-Fermentasi Simultan Tanpa Perlakuan Pemasakan", Departemen Pendidikan dan Kebudayaan
- [11] Somogyi, S. (1952) : J. Biol. Chem., 195, 19
- [12] Suga, Kenichi, (1979) "Production of Cellulase In Fed Batch System", Annual Report of ICME, Vol.2, pp.381-396
- [13] Sudarmadji, S. et al., "Prosedur Analisa Untuk Bahan Makanan dan Pertanian", Liberty, Jogjakarta, hal. 133, 1981
- [14] Tim Bioteknologi-LPM-ITB, (2001) "Bioteknologi untuk Industri Etanol", Departemen Perindustrian dan Perdagangan, Bandung, Indonesia
- [15] Ueda, S., et al., (1984) "Energy Saving Ethanol Fermentation With Starchy Materials Without Cooking", Research on Energy From Biomass, The Ministry of Education Science and Culture, Spey 7, Japan, hal.229-234
- [16] Wilke, C.R., (1975) "Cellulase As A Chemical and Energy Resource", Celulase Conference Proceedings, John Wiley & Sons, New York
- [17] Wiseman, Alan (ed.), (1985) "Handbook of Enzyme Biotechnology", 2nd ed., Ellis Horwood Ltd
- [18] Wyman, C., (1991) "Overview of the Simultaneous Saccharification and Fermentation Process for Etahanol Production from Cellulosic Biomass", In *Ethanol Annual Report FY 1990*, (Texeira, R.; Goodman, B., Eds), Solar Energy