

PENGARUH SUHU DAN WAKTU FERMENTASI BIOETANOL DARI TONGKOL JAGUNG DENGAN PERLAKUAN AWAL STEAM EXPLOSION

Delfhia Rasubala, Anita Yuliviana, Ery Susiany Retnoningtyas*, Aylianawati
Laboratorium Teknologi Bioproses, Jurusan Teknik Kimia, Fakultas Teknik
Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya
Jalan Kalijudan 37, Surabaya 60114
Email:ery.srt@gmail.com

Abstrak

Tongkol jagung merupakan limbah pertanian dengan kandungan selulosa yang cukup tinggi, sehingga dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku pembuatan bioetanol. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pengaruh suhu dan waktu fermentasi terhadap jumlah bioetanol yang dihasilkan. Ada 3 tahap proses dalam penelitian ini, yaitu: (1) perlakuan awal serbuk tongkol jagung, (2) pembuatan *crude enzyme* dan (3) fermentasi pembentukan bioetanol. Tongkol jagung sebagai bahan baku dihancurkan dan dikeringkan hingga mencapai ukuran 12/20 mesh, kemudian diberi perlakuan awal dengan *steam explosion* disertai perendaman HCl 1%. Fermentasi pembentukan bioetanol dilakukan dengan metode *simultaneous saccharification and fermentation* (SSF) menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* pada suhu 30, 35, dan 40°C, sedangkan waktu fermentasi 24, 48, 72, 96 dan 120 jam. Hasil penelitian menunjukkan bahwa bioetanol yang dihasilkan pada suhu fermentasi 35 °C lebih tinggi (0,214 g bioetanol/g tongkol jagung) dibandingkan dengan pada suhu 30 °C (0,190 g bioetanol/g tongkol jagung) dan 40 °C (0,129 g bioetanol/g tongkol jagung) pada waktu fermentasi 120 jam.

Kata kunci: bioetanol, tongkol jagung, perlakuan awal, SSF, suhu fermentasi, waktu fermentasi

Abstract

EFFECTS OF TEMPERATURE AND FERMENTATION TIME TO PRODUCE BIOETHANOL FROM PRETREATED CORN COBS BY STEAM EXPLOSION. Bioethanol is one type of biofuel that can be produced from high cellulose materials. Corn cobs is an agricultural waste which contains high cellulose. Therefore, it can be used as raw material for bioethanol production. The aim of this research is to study the effect of fermentation temperature on the amount of bioethanol production. There are 3 main stages in this study, i.e. (1) pretreatment of corn cobs, (2) hydrolisis with crude enzyme and (3) fermentation of bioethanol. Corn cobs were dried and crushed up to size of 12/20 mesh, then pretreated with steam explosion after immersed in HCl 1% solution. The fermentation was conducted by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) using *Saccharomyces cerevisiae* at 30, 35, and 40 °C. The result showed that the concentration of ethanol produced by fermentation at 35 °C (0,214 g ethanol/g corn cobs) was higher compared to the fermentation at 30 °C (0,190 g ethanol/g corn cobs) and 40 °C (0,129 g ethanol/g corn cobs).

Keywords: bioethanol, corn cobs, pretreatment, SSF, fermentation time and temperature

*penulis korespondensi

PENDAHULUAN

Di Indonesia jagung merupakan bahan makanan pokok kedua setelah padi. Banyak daerah di Indonesia yang berbudaya mengkonsumsi jagung, diantaranya madura, Yogyakarta, Sulawesi Selatan, Maluku Utara, dan Nusa Tenggara Timur. Seiring dengan kebutuhan jagung yang cukup tinggi, maka bertambah pula limbah yang dihasilkan dari industri pangan dan pakan berbahan baku jagung. Limbah yang dihasilkan diantaranya adalah tongkol jagung yang biasanya tidak digunakan lagi ataupun nilai ekonominya sangat rendah. Kandungan senyawa berkarbon pada tongkol jagung, yaitu selulosa (41%), hemiselulosa (36%), air (9,6%), abu (1,5%), lignin (8,9%) dan pektin (3%) (Fengel dan Wegener, 1984). Kandungan selulosa yang tinggi mengindikasikan bahwa tongkol jagung berpotensi sebagai bahan baku pembuatan bioetanol. Oleh sebab itu, pada penelitian ini digunakan tongkol jagung sebagai bahan baku pembuatan bioetanol.

Sebenarnya sudah cukup banyak penelitian mengenai hal tersebut, tetapi pada penelitian ini digunakan *crude* enzim selulase yang dihasilkan oleh *Trichoderma reesei* hasil regenerasi menggunakan media *potato dextrose agar* (PDA) untuk proses hidrolisis dalam pembuatan bioetanol. Oleh sebab itu, bioetanol yang dihasilkan menjadi lebih murah dibandingkan dengan membeli enzim seperti pada penelitian-penelitian terdahulu. Kebanyakan penelitian terdahulu dilakukan dengan memproduksi bioetanol menggunakan enzim komersial (Sovorawet dan Kongkiattikajorn, 2012), namun beberapa tahun belakangan ini cukup sering dijumpai penelitian yang dimulai dengan pembuatan *crude* enzim selulase hingga dihasilkan bioetanol (Fatma dkk., 2010).

Penelitian ini dilakukan dengan memproduksi *crude enzyme* selulase dengan bantuan *Trichoderma reesei*. Enzim selulase dapat diproduksi dari mikroba selulolitik baik kapang maupun bakteri. Kapang selulolitik yang biasa digunakan dari jenis *Trichoderma*, *Aspergillus* dan *Penicillium*. Pada jenis bakteri yang dapat menghasilkan selulase adalah *Pseudomonas*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Cellovibrio*, dan *Sporosphytophaga*. Diantara semua jenis kapang selulolitik, *Trichoderma reesei* adalah kapang yang paling banyak diteliti karena mampu mensekresikan selulase sekitar 80% (Wahyuningtyas dkk., 2013).

Crude enzyme selulase yang dihasilkan digunakan untuk hidrolisis selulosa menjadi glukosa. Selanjutnya, glukosa yang dihasilkan akan diubah oleh *Saccharomyces cerevisiae* menjadi bioetanol. Fermentasi etanol merupakan aktivitas penguraian gula/karbohidrat menjadi senyawa etanol dengan mengeluarkan gas CO₂, fermentasi ini dilakukan dalam kondisi anaerob atau tanpa adanya oksigen (Hamelinck dkk., 2005). Umumnya produksi bioetanol menggunakan mikroba *Saccharomyces cerevisiae*. Mikroba ini dapat digunakan untuk konversi gula menjadi etanol dengan kemampuan konversi yang baik, tahan terhadap etanol kadar tinggi, tahan pH rendah, dan tahan temperatur tinggi (Minarni dkk., 2013).

Proses pembuatan bioetanol dilakukan dengan metode *Simultaneous Saccharification and Fermentation* (SSF). SSF adalah kombinasi antara hidrolisis menggunakan enzim selulase dan ragi *S. cerevisiae* untuk fermentasi gula menjadi etanol secara simultan. Proses SSF sebenarnya hampir sama dengan dengan proses yang terpisah antara hidrolisis dengan enzim dan proses fermentasi, hanya saja dalam proses SSF, hidrolisis dan fermentasi dilakukan dalam satu reaktor. Keuntungan dari proses ini adalah meningkatkan kecepatan hidrolisis, mengurangi kebutuhan enzim, meningkatkan rendemen produk, mengurangi kebutuhan kondisi steril, waktu proses yang lebih pendek (Sun dan Cheng, 2002). Menurut Öhgren dkk. (2006), kekurangan dari metode ini adalah perbedaan suhu optimum ragi (35 °C) dan enzim (40-50 °C). Produksi etanol dari lignoselulosa bergantung pada beberapa faktor yaitu, konsentrasi glukosa mula-mula hasil hidrolisis, *strain* yang digunakan untuk fermentasi, dan kehadiran komponen-komponen inhibitor (Chandel dkk., 2011).

Penelitian ini bertujuan untuk mencari pengaruh suhu dan waktu fermentasi terhadap jumlah bioetanol yang dihasilkan, karena adanya perbedaan antara suhu fermentasi pembentukan bioetanol dan suhu hidrolisis selulosa menjadi glukosa oleh enzim selulase. Fermentasi pembentukan bioetanol dilakukan dengan metode SSF menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* pada suhu 30, 35, dan 40 °C. Hal ini disebabkan oleh suhu optimal hidrolisis adalah 40-50 °C sedangkan suhu optimal fermentasi adalah 30-35 °C (Sun dan Cheng, 2002).

METODE

Bahan

Bahan baku pembuatan bioetanol, yaitu tongkol jagung diperoleh dari limbah pasar Gubeng Surabaya. Bahan kimia yang digunakan spesifikasi analisis seperti HCl, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Tween 80, $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, CH_3COOH , $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, Potato Dextrose Agar (PDA) dari Merck dan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dari Sigma sedangkan ekstrak ragi dari Difco. Semua bahan kimia tersebut langsung digunakan tanpa ada perlakuan tambahan.

Mikroorganisme

Mikroba *Trichoderma reesei* Bio N 579 dan *Saccharomyces cerevisiae* Bio 370 et diperoleh dari Jurusan Biologi Universitas Airlangga Surabaya. *Trichoderma reesei* Bio N 579 digunakan untuk pembuatan *crude* enzim selulase dari tongkol jagung sedangkan *Saccharomyces cerevisiae* Bio 370 et digunakan untuk produksi bioetanol dari tongkol jagung.

Preparasi Bahan Baku

Tongkol jagung dipotong dan dikeringkan dengan dijemur di bawah sinar matahari. Setelah kering, dihancurkan dengan blender (Miyako, BL-152GE) hingga ukurannya cukup kecil menggunakan ayakan (Retsch, AS-200) untuk mendapatkan serbuk jagung dengan ukuran 12/14 dan 14/20 mesh. Ukuran serbuk tongkol jagung untuk fermentasi enzim adalah 12/14 mesh, karena ukuran tersebut merupakan hasil terbanyak saat pengayakan. Ukuran serbuk tongkol jagung untuk fermentasi bioetanol adalah 14/20 mesh. Digunakan ukuran yang lebih kecil untuk fermentasi bioetanol karena fermentasi bioetanol dilakukan dengan metode terendam, sehingga luas permukaan serbuk dengan ukuran 14/20 mesh lebih besar dibandingkan dengan 12/14 mesh. Serbuk tongkol jagung dengan ukuran 12/14 mesh dan 14/20 mesh dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer 250 mL. Sebelum diberi perlakuan *steam explosion*, serbuk tongkol jagung direndam dengan larutan HCl 1%. Serbuk tongkol jagung yang telah diberi larutan HCl langsung dimasukkan ke dalam autoklaf (All American, 25X) pada suhu 121°C dan tekanan 15 psi selama 1 jam. Setelahnya, serbuk tongkol jagung dikeringkan menggunakan oven non vakum yang telah

diatur 60 °C selama 1 hari (Mommert, INB-500).

Pembuatan *Crude* Enzim Selulase

Serbuk tongkol jagung berukuran 12/14 mesh yang telah mendapat perlakuan awal sebanyak 1 g dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer 250 mL, dan ditambahkan 4 mL nutrisi enzim dengan komposisi 10 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3 g KH_2PO_4 , 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dalam 1 L aquades. Selanjutnya ditambahkan 1 mL ($1,9 \times 10^8$ sel/mL) suspensi *Trichoderma reesei* yang ditumbuhkan pada media PDA (24 g dalam 1 L aquades) secara aseptik, lalu diinkubasi pada suhu 30 °C selama 96 jam. Pembuatan *crude* enzim selulase ini dilakukan dengan fermentasi padat. Hasil fermentasi selama 4 hari tersebut ditambahkan 40 mL Tween 80 0,1% dan ditempatkan pada *shaker* (Heidolph DUOMAX, 2030) selama 1 jam. Hal tersebut dilakukan untuk mengekstrak enzim selulase hasil fermentasi. Padatan kemudian dipisahkan (1 g serbuk tongkol jagung dan $1,9 \times 10^8$ sel *Trichoderma reesei*) dari cairannya (4 mL nutrisi enzim dan 40 mL Tween 80 0,1%) menggunakan corong Buchner. Filtrat dipisahkan lagi menggunakan *centrifuge* dengan kecepatan 5000 rpm selama 40 menit untuk menghasilkan cairan *crude* enzim selulase yang lebih jernih. *Crude* enzim selulase disimpan di dalam lemari es untuk menjaga enzim tetap dalam kondisi steril.

Pembuatan Bioetanol

Pembuatan bioetanol dilakukan dengan langkah-langkah berikut. Serbuk tongkol jagung berukuran 14/20 mesh yang telah mendapat perlakuan awal sebanyak 3 g dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer 250 mL. *Crude* enzim selulase sebanyak 30 mL ditambahkan ke 15 mL nutrisi bioetanol dengan komposisi 1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,05 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g ekstrak ragi dalam 1 L aquades, serta 2 mL buffer asetat dengan komposisi 27,2 g $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ dan 11,55 mL Asam Asetat pekat dalam 1 L aquades. Selain itu juga ditambahkan 10 mL inokulum ragi yang ditumbuhkan dalam medium dengan komposisi 10 g glukosa, 0,1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g Ekstrak ragi, 0,1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g KH_2PO_4 dalam 1 L aquades. Labu ditutup dengan leher angsa. Inkubasi (WTB Binder, 17115099003120) dilakukan pada suhu 30, 35, dan 40 °C selama 24 jam, 48 jam, 72 jam, 96 jam, dan 120 jam. Setelah inkubasi,

padatan dan cairan dipisahkan dengan corong Buchner.

Analisis

Kadar glukosa filtrat hasil pemisahan diuji dengan metode DNS (Goldbeck dkk., 2012) dan kadar bioetanol diuji dengan metode dikromat (Anwar dkk., 2012) menggunakan Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu, UV-1201).

Variabel yang dipelajari

Penelitian ini dilakukan dengan metode SSF, sehingga suhu dan waktu fermentasi pembentukan bioetanol merupakan salah satu variabel yang penting untuk dicari kondisi optimumnya. Kondisi optimum yang dimaksud adalah suhu dan waktu pembentukan bioetanol maupun hidrolisis selulosa menjadi glukosa berlangsung secara seimbang. Hal tersebut ditandai dengan proses fermentasi pada satu suhu dan waktu yang menghasilkan yield bioetanol tertinggi. Hal ini disebabkan oleh suhu optimal hidrolisis adalah 40-50 °C sedangkan suhu optimal fermentasi adalah 30-35 °C (Sun dan Cheng, 2002) sedangkan waktu fermentasi yang diperlukan sangat tergantung dari karakteristik substrat yang digunakan. Oleh sebab itu, pada penelitian ini dipilih variabel suhu 30, 35, dan 40 °C sedangkan waktu fermentasinya adalah 24, 48, 72, 96, dan 120 jam.

HASIL DAN PEMBAHASAN

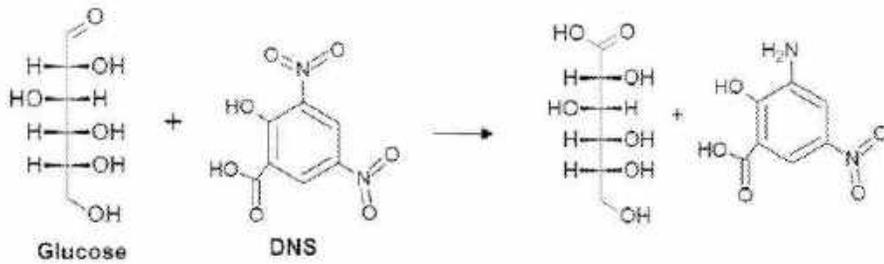
Pada penelitian ini tongkol jagung digunakan sebagai bahan pembuatan *crude enzyme* selulase maupun pembuatan bioetanol. *Crude* enzim selulase yang dihasilkan diuji dengan metode *Carboxymethyl Cellulase assay* (CMCase) dan *Filter Paper assay* (FPase) (Shofiyanto, 2008) dengan hasil CMCase = 0,0219 IU/mL dan FPase = 0,0424 IU/mL. Uji CMC menyatakan aktivitas dari endo- β -1,4-glukanase dalam memecah struktur amorf pada selulosa, sedangkan uji FPase digunakan untuk penentuan aktivitas enzim lengkap. Setelah *crude* enzim selulase diperoleh, fermentasi pembentukan bioetanol dilakukan pada variasi suhu 30, 35, dan 40 °C. Hasil fermentasi pembentukan bioetanol kemudian diuji konsentrasi glukosa sisa fermentasi dan kadar bioetanol yang dihasilkan.

Pengujian glukosa sisa fermentasi dilakukan dengan metode DNS, reaksi yang

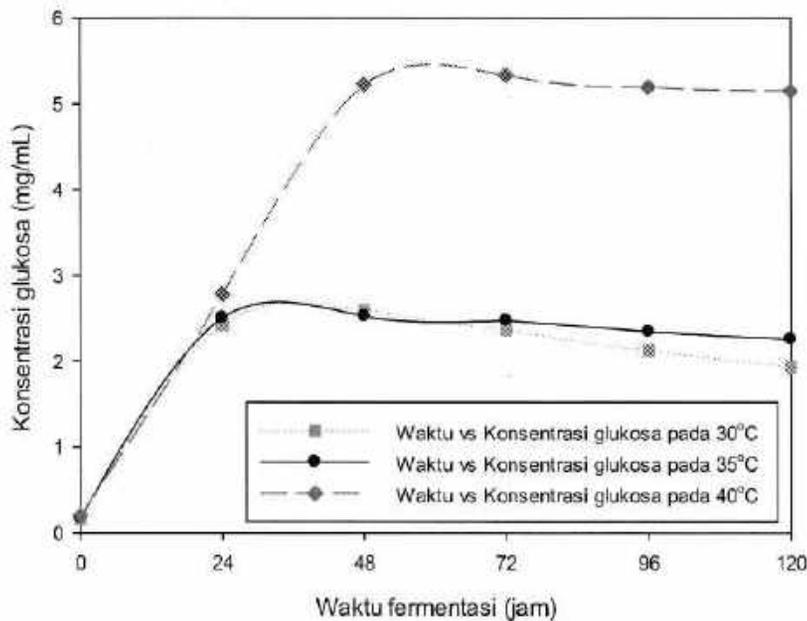
terjadi dapat dilihat pada Gambar 1. Pada gambar tersebut ditunjukkan bahwa pengujian gula reduksi menggunakan metode DNS yang terukur adalah konsentrasi glukosa, bukan seluruh gula reduksi yang terdapat pada sampel. Perolehan konsentrasi glukosa ini didapat dengan membuat kurva baku glukosa terlebih dahulu dengan metode DNS, kemudian dilakukan uji sampel dengan metode yang sama untuk mendapatkan absorbansi sampel. Konsentrasi glukosa dapat dihitung pada sampel menggunakan persamaan linier yang didapat dari kurva baku glukosa.

Pada Gambar 2 dapat dilihat bahwa glukosa sisa fermentasi pada percobaan dengan suhu fermentasi 40 °C menunjukkan konsentrasi tertinggi, karena suhu optimum untuk hidrolisis adalah sekitar 40-50 °C. Perbedaan konsentrasi glukosa antara suhu fermentasi 30 °C dan 35 °C tidak jauh berbeda, hal ini dapat terjadi karena pada suhu tersebut enzim selulase belum aktif bekerja untuk hidrolisis selulosa menjadi glukosa. Jika dibandingkan konsentrasi glukosa sisa fermentasi antara suhu fermentasi 30 °C dan 35 °C terhadap suhu fermentasi 40 °C perbedaannya cukup drastis, karena pada suhu 40 °C sudah mendekati kondisi optimum enzim selulase untuk melakukan hidrolisis. Oleh sebab itu, kinerja enzim dalam hidrolisis selulosa menjadi glukosa pada suhu fermentasi 40 °C meningkat, ditandai dengan tingginya konsentrasi glukosa yang dihasilkan.

Pembentukan glukosa hasil hidrolisis pada suhu 40 °C pada Gambar 2 menunjukkan kenaikan konsentrasi glukosa pada jam ke-0 hingga jam ke-48 cukup signifikan, sedangkan pada suhu 30 dan 35 °C menunjukkan bahwa kenaikan konsentrasi glukosa pada jam ke-0 hingga jam ke-24 yang cukup signifikan. Kenaikan yang cukup signifikan ini dapat disebabkan oleh adanya bagian amorf (selulosa yang dapat larut) pada selulosa yang mudah didegradasi oleh enzim selulase. Ini mengakibatkan terbentuknya glukosa hasil hidrolisis dari bagian amorf tersebut terbentuk dengan cepat pada awal fermentasi, sedangkan pada jam ke-48 (pada 30 dan 35 °C) dan pada jam ke-72 (pada 40 °C) hingga jam ke-120 konsentrasi glukosa sisa fermentasi cenderung menurun. Hal ini dapat disebabkan karena hidrolisis yang dilakukan oleh enzim selulase bukan lagi pada bagian amorf, melainkan pada bagian kristal selulosa



Gambar 1. Reaksi glukosa dan reagen DNS (Miloski dkk., 2008)



Gambar 2. Hubungan antara konsentrasi glukosa dan waktu fermentasi pada suhu 30, 35, dan 40 °C

pada tongkol jagung, di mana bagian kristal selulosa ini lebih sukar untuk dihidrolisis oleh enzim selulase. Dengan demikian, konsentrasi glukosa yang terbentuk dari proses hidrolisis cenderung menurun secara perlahan. Hal tersebut juga dialami oleh peneliti sebelumnya yang menggunakan kulit kentang sebagai bahan baku pembuatan bioetanol. Pada penelitian tersebut, konsentrasi glukosa setelah hari ke-2 mengalami penurunan oleh karena pembentukan bioetanol yang terjadi (Mudawamah dan Umi, 2012).

Fase hidrolisis selulosa menjadi glukosa dapat dilihat pada Gambar 2 adalah ketika kenaikan konsentrasi glukosa meningkat secara signifikan pada awal fermentasi. Pada suhu fermentasi 40 °C proses hidrolisis terjadi lebih lama, yaitu pada jam

ke-0 hingga jam ke-48, kinerja enzim untuk mendegradasi selulosa menjadi glukosa lebih baik pada suhu ini, karena suhu fermentasinya mendekati kisaran suhu optimum enzim selulase untuk proses hidrolisis. Kemudian pada jam ke-48 hingga jam ke-120, grafik menunjukkan bahwa konsentrasi glukosa sudah konstan dan sedikit demi sedikit menurun. Kondisi ini mengindikasikan bahwa laju pembentukan glukosa mulai sejalan dengan produksi bioetanol. Dalam produksi bioetanol, *Saccharomyces cerevisiae* menggunakan glukosa yang terbentuk dari proses hidrolisis untuk diubah menjadi bioetanol pada keadaan anaerob, sehingga pada Gambar 2 terlihat bahwa konsentrasi glukosa pada fermentasi yang berlangsung mulai menurun.

Pada suhu fermentasi 30 dan 35 °C proses hidrolisis terjadi pada jam ke-0 hingga jam ke-24, di mana waktu hidrolisis lebih singkat dibandingkan pada suhu 40 °C, karena proses hidrolisis yang dilakukan oleh enzim selulase tidak pada kisaran suhu optimumnya, sehingga kinerjanya dalam hidrolisis tidak sebaik pada kondisi fermentasi yang bersuhu 40 °C. Kemudian pada jam ke-24 hingga jam ke-72 untuk suhu 35 °C konsentrasi glukosa pada proses fermentasi mulai konstan. Glukosa yang dihasilkan pada proses hidrolisis dipakai untuk menghasilkan bioetanol oleh *Saccharomyces cerevisiae*, sehingga konsentrasi glukosa yang cenderung konstan mengindikasikan kondisi di mana proses hidrolisis selulosa menjadi glukosa terjadi sejalan dengan glukosa yang diubah menjadi bioetanol, sedangkan pada jam ke-72 hingga jam ke-120, konsentrasi glukosa sudah semakin menurun dengan perlahan. Penurunan konsentrasi glukosa disebabkan oleh laju pembentukan glukosa yang mulai menurun akibat persediaan bahan selulosa pada substrat tongkol jagung mulai berkurang dan dapat juga disebabkan oleh laju pembentukan bioetanol yang terjadi lebih cepat pada jam ke-72 hingga jam ke-120, seperti yang terlihat pada Gambar 2.

Fermentasi yang dilakukan pada jam ke-24 hingga jam ke-72 untuk variasi suhu 30 °C, konsentrasi glukosa cenderung konstan, karena laju pembentukan glukosa dan laju pembentukan bioetanol seimbang dalam arti jumlah glukosa yang dihasilkan dan jumlah glukosa yang dimakan oleh *Saccharomyces cerevisiae* untuk menghasilkan bioetanol dapat dikatakan sama, sedangkan pada jam ke-72 hingga jam ke-120 konsentrasi glukosa menurun yang disebabkan laju pembentukan bioetanol yang lebih cepat dibandingkan proses hidrolisis yang berlangsung, karena pada suhu 30°C merupakan kisaran suhu optimum *Saccharomyces cerevisiae* dalam proses fermentasi pembentukan bioetanol.

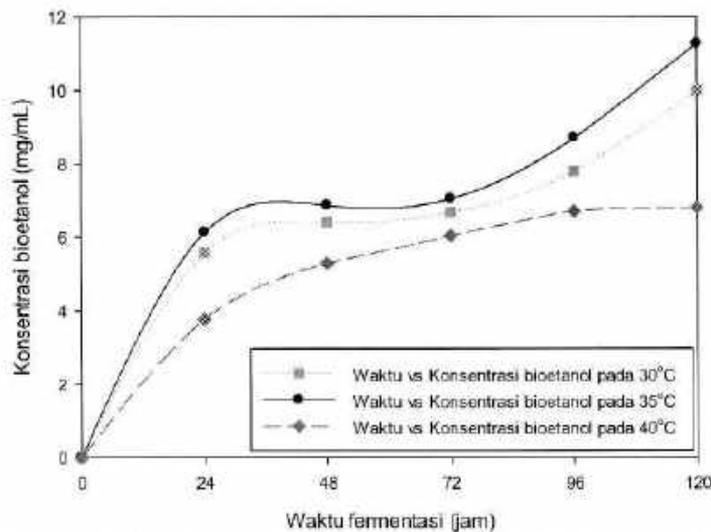
Fenomena yang terjadi pada suhu fermentasi 30 dan 35 °C untuk konsentrasi glukosa sisa fermentasi sekilas terlihat mirip, dibandingkan dengan suhu 40 °C yang cukup jauh berbeda. Namun, jika lebih diperhatikan untuk suhu 30 dan 35 °C, konsentrasi glukosa pada 35°C untuk jam ke-72 sampai jam ke-120 lebih konstan dibandingkan dengan pada suhu 30 °C yang sudah mulai menurun. Hal tersebut disebabkan suhu 35 °C lebih mendekati suhu optimum dari enzim selulase

untuk hidrolisis selulosa menjadi glukosa, sehingga pada suhu 35 °C proses hidrolisis yang terjadi bisa lebih baik dibandingkan dengan suhu fermentasi 30 °C.

Setelah membahas mengenai hubungan antara konsentrasi glukosa sisa fermentasi terhadap waktu fermentasi, selanjutnya akan dibahas mengenai pengaruh konsentrasi bioetanol terhadap waktu fermentasi. Perolehan konsentrasi bioetanol pada Gambar 3 didapat dengan membuat kurva baku etanol (menggunakan Etanol PA 99%) terlebih dahulu dengan metode dikromat, kemudian dilakukan uji sampel dengan metode yang sama untuk mendapatkan absorbansi dari sampel. Setelah diketahui absorbansi dari sampel, konsentrasi bioetanol pada sampel dapat dihitung menggunakan persamaan linier yang didapat dari kurva baku etanol.

Jika diperhatikan pada jam ke-48, konsentrasi glukosa sisa fermentasi untuk suhu 30 °C sedikit lebih tinggi dibandingkan pada suhu 35 °C, namun pada jam ke-24 maupun jam ke-72 dan seterusnya, konsentrasi glukosa untuk suhu 30 °C lebih rendah dibandingkan pada suhu 35 °C. Hal tersebut dapat disebabkan oleh enzim selulase pada suhu 30 °C belum aktif sepenuhnya untuk melakukan hidrolisis, oleh sebab itu pada awal hidrolisis enzim bekerja sedikit lebih lambat untuk hidrolisis selulosa terutama melambat pada jam ke-24 sampai jam ke-48, sedikit kenaikan glukosa yang terjadi pada jam ke-48 terjadi karena konsumsi glukosa dalam pembentukan bioetanol masih sedikit, dapat dilihat pada laju pembentukan bioetanol di Gambar 3.

Bioetanol yang terbentuk dari proses fermentasi dapat dilihat pada Gambar 3. Bioetanol yang diproduksi oleh *Saccharomyces cerevisiae* pada suhu 40 °C adalah yang paling rendah. Rendahnya konsentrasi bioetanol yang terbentuk disebabkan oleh suhu optimum dari *Saccharomyces cerevisiae* adalah antara 30-35 °C, sedangkan pada suhu 40 °C atau lebih, *Saccharomyces cerevisiae* akan menjadi tidak aktif (Taherzadeh dan Karimi, 2007). Pada suhu fermentasi 40 °C kenaikan konsentrasi bioetanol pada tiap satuan waktu terjadi secara perlahan dan terlihat mulai konstan pada jam ke-96 hingga jam ke-120, serta menghasilkan konsentrasi yang terendah dibandingkan dengan suhu 30 dan 35 °C. Suhu 40 °C sudah merupakan suhu yang melampaui kondisi optimum *Saccharomyces cerevisiae*



Gambar 3. Hubungan Antara Konsentrasi Bioetanol dan Waktu Fermentasi pada suhu 30, 35, dan 40 °C

untuk pembentukan bioetanol, sehingga *Saccharomyces cerevisiae* bekerja lebih keras untuk menghasilkan bioetanol pada suhu 40 °C, dengan demikian kenaikan jumlah bioetanol yang dihasilkan tiap waktu naik sedikit demi sedikit.

Fermentasi yang dilakukan pada suhu 30 °C cenderung menghasilkan glukosa dengan konsentrasi yang lebih kecil dibandingkan pada suhu 35 °C. Hal ini dapat disebabkan oleh pada suhu 30 °C *S. cerevisiae* belum mencapai suhu optimumnya dalam memproduksi bioetanol, sehingga glukosa yang dihasilkan tidak digunakan secara maksimal untuk menghasilkan bioetanol. Pernyataan ini didukung oleh hasil penelitian yang dapat dilihat pada Gambar 3, bahwa bioetanol yang diproduksi pada suhu 30 °C konsentrasinya lebih rendah dibandingkan pada suhu 35 °C.

Pada suhu 30 dan 35 °C konsentrasi bioetanol yang dihasilkan cenderung meningkat seiring berjalannya waktu. Fenomena tersebut terjadi karena pada suhu 30 dan 35 °C merupakan kisaran suhu optimum dari *S. cerevisiae* dalam menghasilkan bioetanol, sedangkan pada suhu 40 °C *S. cerevisiae* berada pada lingkungan yang kurang sesuai sehingga perlu untuk menyesuaikan diri akibatnya pembentukan bioetanol terjadi secara perlahan.

Suhu fermentasi 30 dan 35 °C memiliki tren kenaikan konsentrasi bioetanol yang mirip, dari awal pembentukan bioetanol pada

jam ke-0 sampai jam ke-24 di mana kenaikan yang terjadi secara signifikan, karena seiring dengan meningkatnya jumlah glukosa hasil hidrolisis pada Gambar 1 dan juga karena faktor suhu fermentasi yang cocok untuk *Saccharomyces cerevisiae*, meningkatnya jumlah glukosa mengakibatkan meningkat pula terbentuknya bioetanol pada jam ke-0 hingga jam ke-24 secara signifikan, sedangkan pada jam ke-24 hingga jam ke-72, konsentrasi etanol yang dihasilkan cenderung konstan sebelum meningkat kembali secara signifikan pada jam ke-72 hingga jam ke-120. Adanya kondisi konstan tersebut disebabkan oleh laju pembentukan glukosa pada Gambar 2 dan laju pembentukan bioetanol pada Gambar 3 seimbang, seperti yang sudah dijelaskan sebelumnya. Kenaikan konsentrasi bioetanol yang terjadi pada jam ke-72 hingga jam ke-120 disebabkan oleh pada jam ke-24 sampai jam ke-72 *Saccharomyces cerevisiae* sedang dalam tahap penyesuaian diri terhadap jumlah glukosa hasil hidrolisis, sehingga pada jam ke-72 merupakan titik di mana *Saccharomyces cerevisiae* sudah mulai terbiasa dengan jumlah glukosa yang ada, sehingga memulai kembali pembentukan bioetanol dengan cepat.

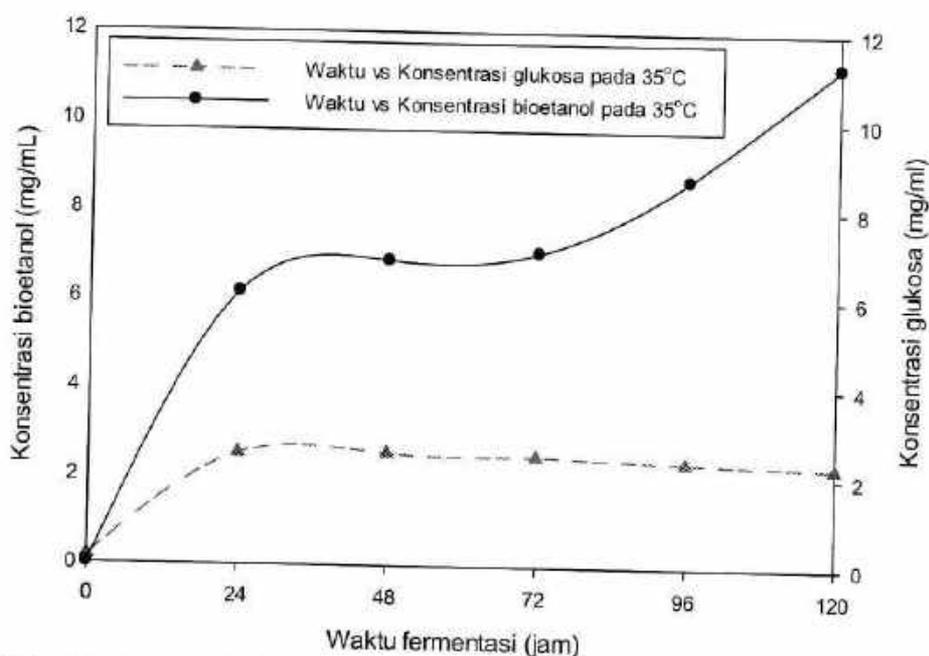
Seiring dengan pembentukan bioetanol yang tinggi pada jam ke-72 hingga jam ke-120, jumlah glukosa pun semakin menurun pada jam tersebut, namun memang tidak sejauh kenaikan konsentrasi bioetanol yang terbentuk. Untuk dapat melihat dengan jelas

hubungan antara konsentrasi glukosa sisa fermentasi dan konsentrasi bioetanol yang terbentuk pada suhu 35 °C, dibuat grafik penyatuan antara konsentrasi glukosa hasil fermentasi dan konsentrasi bioetanol yang terbentuk terhadap waktu fermentasi yang dapat dilihat pada Gambar 4.

Berdasarkan hasil percobaan yang dilakukan dapat diketahui bahwa suhu optimum dari proses fermentasi dengan metode SSF ini adalah 35 °C. Merujuk pada Gambar 4, jika dilihat secara menyeluruh, pada awal fermentasi konsentrasi gula reduksi naik bersamaan dengan naiknya produksi bioetanol, sedangkan pada jam ke-24 hingga jam ke-72 konsentrasi glukosa cenderung konstan, begitu pula dengan konsentrasi bioetanol yang terbentuk. Pada jam ke-72 hingga jam ke-120, pembentukan bioetanol lebih tinggi dan konsentrasi glukosa sisa fermentasi cenderung menurun. Untuk fase awal (jam 0-24) *S. cerevisiae* memproduksi bioetanol dengan cepat karena adanya pembentukan glukosa yang cukup melimpah, sedangkan pada fase ke-2 (jam 24-72) *S. cerevisiae* kembali menyesuaikan diri dengan keadaan glukosa yang pembentukan-

nya mulai konstan, dan pada fase ke-3 (jam 72-120) pembentukan bioetanol kembali naik karena *S. cerevisiae* sudah dapat beradaptasi dengan jumlah glukosa yang ada, di samping itu suhu fermentasi yang mendukung (pada kisaran suhu optimumnya) membuat bioetanol yang dihasilkan lebih tinggi.

Pada Gambar 4, bioetanol yang terbentuk lebih tinggi dari glukosa sisa fermentasi, hal ini disebabkan oleh metabolisme *S. cerevisiae* pada kondisi anaerob adalah dengan mengubah 1 mol glukosa ($C_6H_{12}O_6$) menjadi 2 mol karbon dioksida (CO_2) dan 2 mol etanol (C_2H_5OH), sehingga 1 mol glukosa dapat menghasilkan 2 mol etanol. Namun, hal ini tidak dapat dibuktikan dengan perhitungan, karena metode yang digunakan merupakan metode SSF di mana proses hidrolisis selulosa menjadi glukosa dan pembentukan glukosa menjadi bioetanol terjadi secara bersamaan sehingga tidak diketahui secara jelas berapa jumlah glukosa yang dihasilkan dan berapa jumlah glukosa yang dipakai untuk menghasilkan bioetanol.



Gambar 4. Hubungan Antara Waktu Fermentasi Terhadap Konsentrasi Bioetanol dan Glukosa Sisa Fermentasi Pada Suhu 35 °C

Penjelasan yang telah dipaparkan sebelumnya mengenai hubungan antara konsentrasi glukosa sisa fermentasi dan konsentrasi bioetanol yang terbentuk akan lebih mudah dipahami dengan melihat Gambar 4. Secara singkat bahwa pada jam 0-24 konsentrasi glukosa meningkat karena pada waktu ini merupakan fase hidrolisis di mana enzim selulase dengan aktif memecah selulosa menjadi glukosa dan juga adanya struktur selulosa amorf (struktur selulosa yang tidak teratur sehingga lebih mudah terhidrolisis) pada serbuk tongkol jagung yang digunakan sebagai substrat merupakan bagian dari selulosa yang lebih mudah untuk dihidrolisis oleh enzim selulase. Aktivitas enzim dalam memecah struktur amorf tersebut dinyatakan dalam CMCase (carboxymethyl cellulose assay). Pada penelitian ini aktivitas enzim dinyatakan dalam CMCase dan FPase, masing-masing sebesar 0,0219 IU/mL dan 0,0423 IU/mL. Bioetanol yang dihasilkan juga meningkat seiring meningkatnya konsentrasi glukosa karena adanya kesesuaian suhu fermentasi dan ketersediaan glukosa yang merupakan sumber bagi *Saccharomyces cerevisiae* untuk dikonversi menjadi bioetanol. Kemudian untuk jam ke-24 sampai jam ke-72 konsentrasi glukosa yang dihasilkan cenderung konstan begitu pula dengan konsentrasi bioetanol yang dihasilkan, hal ini menunjukkan bahwa pada fase ini laju pembentukan glukosa dan pemakaian glukosa untuk diubah menjadi bioetanol adalah setara, sehingga terlihat pada Gambar 4 baik konsentrasi bioetanol yang dihasilkan maupun konsentrasi glukosa sisa fermentasi cenderung konstan pada waktu tersebut. Sedangkan pada jam ke-72 hingga jam ke-120 pembentukan bioetanol naik secara signifikan disertai dengan penurunan jumlah glukosa sisa fermentasi, hal ini disebabkan oleh lebih banyak glukosa yang dipakai oleh *Saccharomyces cerevisiae* untuk menghasilkan jumlah etanol yang lebih banyak tersebut.

Pada penelitian ini didapatkan konsentrasi bioetanol tertinggi sebesar 11,3 mg/mL = 11,3 g/L (dengan perolehan/yield sebesar 0,214 g etanol/g tongkol jagung), perolehan ini didapati lebih tinggi dibandingkan dengan penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Ado dkk. (2010) menggunakan metode SSF dan bahan baku berupa tongkol jagung juga. Penelitian tersebut menghasilkan bioetanol dengan perolehan tertinggi sebesar 6,17% (w/v),

sehingga dapat dilihat bahwa penelitian ini memiliki perolehan konsentrasi bioetanol yang lebih tinggi, yaitu sebesar 11,3% (w/v).

KESIMPULAN

Suhu fermentasi tongkol jagung dengan metode *Simultaneous Saccharification and Fermentation* (SSF) sangat menentukan tingginya konsentrasi bioetanol yang dihasilkan. Waktu fermentasi juga mempengaruhi konsentrasi bioetanol, semakin lama waktu fermentasi maka akan semakin tinggi pula bioetanol yang dihasilkan selama glukosa yang terdapat di dalamnya mencukupi kebutuhan *Saccharomyces cerevisiae* untuk menghasilkan bioetanol. Berdasarkan hasil suhu 35 °C dan waktu fermentasi 120 jam menghasilkan bioetanol dengan konsentrasi paling tinggi yaitu 0,214 g etanol/g tongkol jagung.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi (DIKTI) yang telah mendanai penelitian ini melalui Program Kreativitas Mahasiswa-Penelitian (PKM-P) 2013.

DAFTAR PUSTAKA

- Ado, S.A.; Kachalla, G.U.; Tijjani, M.B.; Aliyu, M.S., Ethanol production from corn cobs by co-cultures of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus niger*, *Journal of Pure and Applied Microbiology*, **2010**, 4(1), 91-94.
- Anwar, Z.; Gulfray, M.; Asad, M. J.; Imran, M.; Akram, Z.; Mehmood, S.; Rehman, R.; Anwar, P.; Sadiq, A., Bioethanol productions from rice polish by optimization of dilute acid pretreatment and enzymatic hydrolysis, *African Journal of Biotechnology*, **2012**, 11(4), 992-998.
- Chandel, A.K.; Chandrasekhar, G.; Radhika, K.; Ravinder, R.; Ravindra P., Bioconversion of pentose sugars into ethanol: a review and future directions, *Biotechnology and Molecular Biology Review*, **2011**, 6(1), 008-020.
- Fatma, H., A.; Fadel, M., Production of bioethanol via enzymatic saccharification of rice straw by cellulase produced by *Trichoderma reesei* under solid state fermentation, *New York Science Journal*, **2010**, 3(4), 72-78.

- Fengel, D.; Wegener, G., *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*, Walter de Gruyter & Co.: Berlin, 1984.
- Goldbeck, R.; Andrade, C.C.P.; Pereira, G.A.G.; Maugeri Filho, F., Screening and identification of cellulase producing yeast-like microorganisms from Brazilian biomes, *African Journal of Biotechnology*, **2012**, 11(53), 11595-11603.
- Hamelinck, C.N.; Hooijdonk G. V.; Faaij, A. P., Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term, *Biomass and Bioenergy*, **2005**, 28(4), 384-410.
- Miloski, K.; Wallace, K.; Fenger, A.; Schneider, E.; Bendinskas, K., Comparison of biochemical and chemical digestion and detection methods for carbohydrates, *American Journal of Undergraduate Research*, **2008**, 7(2), 7-18.
- Minarni, N.; Ismuyanto, B.; Sutrisno, Pembuatan Bioetanol dengan Bantuan *Saccharomyces cerevisiae* dari Glukosa Hasil Hidrolisis Biji Durian, *Kimia Student Journal*, **2013**, 1(1), 36-42.
- Mudawamah, U. R.; Umi R., *Pengaruh Variasi Konsentrasi Ragi Tape dan Waktu Fermentasi Terhadap Kadar Bioetanol dari Kulit Kentang*, Tugas Akhir Sarjana, Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, Malang, 2012.
- Öhgren, K.; Galbe, M.; Zacchi, G., *Simultaneous Saccharification and Fermentation of Steam-Pretreated Corn Stover at High Dry-Matter Concentration for Fuel Ethanol Production*, 2006, Chemical Engineering Department, Lund University, Sweden, www1.eere.energy.gov/biomass/biotech_symposium/docs/3b-08.doc (akses: Maret 2013).
- Shofiyanto, M.E., *Hidrolisis tongkol jagung oleh bakteri selulolitik untuk produksi bioetanol dalam kultur campuran*, Tugas Akhir Sarjana, Jurusan Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Bogor, 2008.
- Sovorawet, B.; Kongkiattakajorn, J., *Bioproduction of ethanol in SHF and SSF from cassava stalks*, School of Bioresources and Technology, King Mongkut University, 2012 http://www.resjournal.kku.ac.th/abstract/17_4_565.pdf (akses: April 2013).
- Sun, Y.; Cheng, J., Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, **2002**, 83(1), 1-11.
- Taherzadeh, M. J.; Karimi, K., Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol, *Bioresources*, **2007**, 2(4), 707-738.
- Wahyuningtyas, P.; Dwiargo, B.; Nugroho, W.A., Studi pembuatan enzim selulase dari mikrofungi *Trichoderma reesei* dengan substrat jerami padi sebagai katalis hidrolisis enzimatik pada produksi bioetanol, *Jurnal Bioproses Komoditas Tropis*, **2013**, 1(1), 21-25.