

STUDI BAHAN BAKU BERLIGNOSELULOSA DARI LIMBAH PERTANIAN UNTUK PRODUKSI GULA XILOSA MURAH DIKUTI PROSES FERMENTASI MENGHASILKAN ETANOL

Rurry Patradhiani, Indira Setia Utami, Arief Widjaja*

Lab. Teknologi Biokimia, Jurusan Teknik Kimia, Fakultas Teknologi Industri
Institut Teknologi Sepuluh Nopember
Kampus ITS-Keputih Sukolilo, Surabaya-60111
Telp 031-5946240 email : arief_w@chem-eng.its.ac.id

Abstrak

*Produksi etanol dari limbah pertanian berlignoselulosa (xilan) dilakukan untuk mengatasi permasalahan peningkatan penggunaan energi. Salah satu upayanya adalah melalui proses degradasi enzimatis menghasilkan gula xilosa dilanjutkan proses fermentasi menghasilkan etanol dengan bantuan yeast *Pichia stipitis*. Proses degradasi menggunakan 5 gram substrat bahan baku treatment untuk 2.66 mL larutan enzim xilanase suhu 50 °C dan pH 5.5 kemudian mengukur gula reduksi yang dihasilkan. Proses fermentasi mikroaerobik dalam erlenmeyer pH 6.5 dan 35 °C dengan inkubator shaker kecepatan 100 rpm untuk aerasi selama 6 dan 8 hari. Uji kadar gula reduksi menjadi etanol menggunakan metode DNS dan High Performance Liquid Chromatography (HPLC), kadar etanol dianalisa dengan Gas Chromatography. Aktivitas enzim xilanase diperoleh sebesar 4.17 IU/ml. Dengan metode DNS, didapatkan konsentrasi gula reduksi maksimum dari dedak gandum sebesar 2.67 gr/L. Untuk metode HPLC konsentrasi gula xilosa dedak gandum sebesar 1,21 g/L. Fermentasi 5% xilosa murni pada 6 dan 8 hari kadar etanol sebesar 1,9%(v/v) dan 2,2% (v/v), sedangkan kadar etanol tertinggi dedak gandum 0,7% (v/v) dan 1,19% (v/v) untuk 6 dan 8 hari dengan initial cell 6.5 g/L. Berdasarkan hasil penelitian disimpulkan kandungan xilan dalam bahan baku mempengaruhi kadar gula yang dihasilkan dan yeast *P.stipitis* mampu memfermentasi xilosa murni menjadi etanol.*

Kata kunci : *Etanol; xilan; enzim xilanase; Pichia stipitis*

1. Pendahuluan

Dunia sedang menghadapi problem penggunaan energi berbasis fosil seperti minyak bumi dan gas alam, dimana penggunaan energi ini akan semakin meningkatkan kadar CO₂ di alam yang dapat memberikan efek rumah kaca yang disinyalir sebagai sumber pemanasan global (Committee on Science, Engineering and Public Policy, 1991). Disamping itu, bahan bakar berbasis fosil tidak dapat diperbarui, karena itu penemuan sumber energi baru yang dapat diperbarui sangat dibutuhkan untuk memenuhi kebutuhan energi dunia yang semakin meningkat.

Sejauh ini telah dikenal enzim-enzim hemiselulase yang dapat mendegradasi hemiselulosa, diantaranya yang paling utama yaitu enzim xilanase (Fengel dan Wegner, 1984). Enzim xilanase selama ini umumnya diaplikasikan pada proses pemutihan atau pengelantangan pulp (pulp bleaching) dimana enzim ini mendegradasi komponen xilan dalam hemiselulosa. Penggunaan enzim xilanase yang lain sampai sejauh ini adalah pada pembuatan roti, pembuatan minuman beralkohol, dan pembuatan makanan ternak (Collins dkk., 2005). Akan tetapi penggunaan enzim xilanase dalam kaitannya dengan pengadaan energy belum pernah dilakukan sebelumnya.

Xilan merupakan komponen utama dari hemiselulosa pada dinding sel tumbuhan yang terikat pada selulosa, pektin, lignin dan polisakarida lainnya untuk membentuk dinding sel. Jumlah xilan diberbagai macam kayu bervariasi tergantung dari jenis kayunya dan bisa mencapai lebih dari 20% (Fengel dan Wenger, 1999). Komponen xilan juga melimpah pada limbah-limbah pertanian seperti dedak gandum 12,3% ; bagas tebu 9,6% dan sekam padi 12,1% (Richana dkk.,2004). Karena jumlah xilan dialam sangat besar dimana merupakan jumlah terbesar kedua setelah selulosa (Subramanian dan Prema, 2002), maka xilan merupakan kandidat yang sangat menjanjikan untuk dikonversi menjadi etanol yang merupakan bahan baku energy yang dapat diperbarui.

Dari penelitian ini diharapkan dapat diperoleh suatu metode baru dalam pengadaan sumber energi terbarukan yaitu dengan memanfaatkan xilan yang jumlahnya melimpah di alam melalui konversi enzimatis menjadi monomer xilosa oleh enzim xilanase diikuti fermentasi xilosa menjadi etanol dengan bantuan yeast *Pichia stipitis*.

2. Metodologi Penelitian

2.1 Bahan

Dedak gandum didapatkan dari toko pakan ternak didaerah Bratang, Surabaya. Sekam padi diperoleh dari tempat penggilingan padi didaerah Jagir, Surabaya. Bagas tebu diambil dari penjual sari tebu di Jalan Jemursari, Surabaya. *P. stipitis* dari Lab. Mikrobiologi dan Teknologi Bio-Proses, Teknik Kimia, ITB. *T. reesei* dari Departemen Biologi, FMIPA, UNAIR. *Xilan Oat Spelt* (Sigma, Germany), *D-xilose* (Sigma, Germany), PDA (Merck, Germany), Bacto agar (Fluka, Germany), Yeast ekstrak (Merck, Germany), Pepton, Urea, Dinitrosalicylic acid (DNS), aquadest serta bahan-bahan kimia pelarut lainnya.

2.2 Kondisi Operasi dan Variabel Penelitian

Kondisi operasi pada tahap pembuatan enzim yang dilakukan antara lain:

- Jenis strain = *T. reesei*
- Temperatur operasi = 32 °C (suhu ruang)
- pH = 5.5

Kondisi operasi pada tahap degradasi enzimatik yang dilakukan antara lain:

- Temperatur operasi = 50 °C
- pH = 5.5

Kondisi operasi pada tahap fermentasi yang dilakukan antara lain:

- Jenis strain = *Pichia stipitis*
- Temperatur operasi = 35 °C (suhu ruang)
- pH = 5.5

Variabel yang digunakan pada tahap konversi xilan menjadi xilosa antara lain:

- Bahan Baku = Dedak gandum, Bagas Tebu, Sekam Padi

Variabel yang digunakan pada tahap fermentasi antara lain

- Waktu fermentasi = 6 hari dan 8 hari.

2.3 Metode Penelitian

Produksi Enzim Xilanase dari strain *T. reesei*

Produksi enzim xilanase dilakukan dengan menginokulasikan suspensi jamur *Trichoderma reesei* yang telah dikembangkan pada media agar miring *Potato Dextrose Agar* (PDA), kedalam medium fermentasi steril, dan menginkubasikan suspensi pada temperature, pH dan waktu yang telah ditentukan. Kemudian, enzim yang dihasilkan diekstrak dengan menambahkan buffer sitrat 0,1 M pH 5,5 sebanyak 100 ml yang mengandung 0,1% *Tween* 80, lalu dishaker selama 135 menit. Setelah itu cairan enzim disentrifugasi dengan *refrigerated centrifuge* pada kecepatan 5000 rpm selama 1 jam. Kemudian melakukan filtrasi dengan menggunakan kertas saring halus untuk memisahkan filtrat dengan mycelia beserta endapan media didalamnya dimana supernatan mengandung enzim yang diproduksi dalam penelitian ini. Enzim xilanase yang didapatkan kemudian diuji aktifitasnya menggunakan metode *Dinitrosalicylic Acid* (DNS) dengan larutan standar xilosa. Besarnya panjang gelombang selama analisa diset pada 540 nm, untuk mengukur gula reduksi (Miller, G.L, 1959).

Pre-Treatment Bahan Baku

Sebanyak 5 gr bahan baku berukuran 100 mesh ditambahkan 100 ml larutan NaOH 1%, kemudian memanaskan larutan pada suhu 70-80 °C selama 6 jam. Larutan dipisahkan dengan penyaringan menggunakan kertas saring pada water jet pump. Padatan bahan baku dibilas menggunakan air aquadest suhu 70-80 °C hingga bahan baku mencapai pH 7. Mengambil substrat bahan baku dan memisahkan filtratnya. Padatan bahan baku dioven pada suhu 100 °C selama 3 jam, lalu didinginkan pada suhu kamar.

Produksi Xilosa oleh Enzim Xilanase

Menyiapkan bahan yang mengandung xilan yakni bahan baku dengan ukuran 100 mesh yang telah ditreatment sebelumnya. Kemudian menambahkan enzim xilanase dengan dosis tertentu untuk setiap 5 gr bahan baku. Menambahkan larutan buffer sitrat 0,1 M pH 5,5 sebanyak 100 ml hingga substrat bahan baku terendam kemudian memanaskan pada suhu 50 °C dan pH 5,5 selama 2 jam. Menyaring larutan menggunakan kertas saring sehingga didapatkan larutan xilosa.

Fermentasi Xilosa menjadi Etanol oleh *P. stipitis*

Tahap persiapan mikroorganisme, Strain yeast *Pichia stipitis* ditumbuhkan pada agar plate yang mengandung 10 g/L yeast ekstrak, 20 g/L pepton, 20 g/L xilosa dan 20 g/L agar dan telah disterilisasi. Mikroorganisme ditumbuhkan pada suhu 32 °C selama 3 hari. Koloni pada agar plate dipindahkan ke dalam media filter-sterilized yang mengandung 1.7 g/L yeast nitrogen base (tidak mengandung asam amino dan ammonium sulfat), 2.27 g/L urea, 6.56 g/L peptone dan 20 g/L xilosa. Koloni ditumbuhkan selama 1 hari. Sel disentrifugasi pada 5000 rpm selama 15 menit dan supernatan dipisahkan dari sel. Sel disuspensi dengan 50 ml aquadest steril. Menghitung berat sel berdasarkan harga absorbansi pada kurva standart initial cell.

Tahap persiapan media substrat, Menyiapkan 100 ml larutan xilosa yang didapat dari prosedur sebelumnya. Melakukan boiling dan overliming pretreatment dengan menambahkan larutan $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 2% hingga larutan mencapai pH 10 kemudian memanaskan hingga mendidih selama 15 menit (Nigam, 2001). Menyaring endapan yang terbentuk menggunakan kertas saring dan mengambil filtratnya. Menambahkan larutan asam sulfat 2 N hingga pH 5.5 Mengatur pH larutan menjadi 5.5 dengan cara menambahkan buffer asetat 0.1 M pH 5.5.

Tahap fermentasi xilosa, Memasukkan 100 mL larutan media substrat ke dalam erlenmeyer 250 ml. Menambahkan 2 ml larutan nutrisi yang mengandung 1.7 gr yeast ekstrak, 2.27 gr urea, dan 6.56 gr pepton kemudian menutup menggunakan sumbat kasa. Mensterilisasi larutan media substrat dalam autoclave. Mendinginkan hingga suhu ruangan. Menambahkan 14 ml inoculum dengan konsentrasi sel *P. Stipitis* 6,5 g/L. Melakukan inkubasi selama 6 hari pada incubator air shaker suhu 30 °C dan 100 rpm. Mengulangi prosedur 1 sampai 5, untuk inkubasi selama 8 hari. Menganalisa kadar etanol menggunakan Gas Kromatografi. Menghitung pH dan gula akhir.

3. Pembahasan dan Hasil

3.1 Produksi Enzim Xilanase

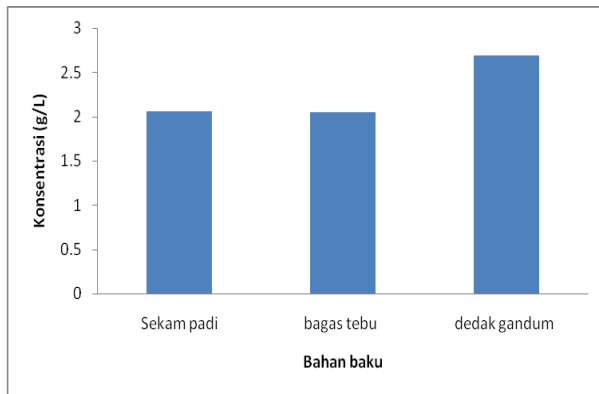
Enzim xilanase yang digunakan dalam degradasi ini mempunyai aktifitas enzim sebesar 4,17 IU/ml. Enzim ini diproduksi dari jamur *T. reesei* dengan kondisi-kondisi optimum agar enzim yang diperoleh mempunyai aktifitas yang optimum saat diekstrak dari jamur tersebut. Kondisi-kondisi ini meliputi pH, suhu, garam-garam mineral dan lain-lain. Bahan baku yang didegradasi adalah bahan baku sebanyak 5 gr. Sehingga untuk mendegradasi 5 gr bahan baku diperlukan enzim sebanyak 13,3 ml. Jika dibandingkan dengan enzim xilanase komersial yang memiliki aktifitas sebesar 15 IU/ml, aktifitas enzim xilanase yang dihasilkan masih kecil namun enzim ini mampu mendegradasi xilan menjadi xilosa.

3.2 Pre-treatment Bahan Baku

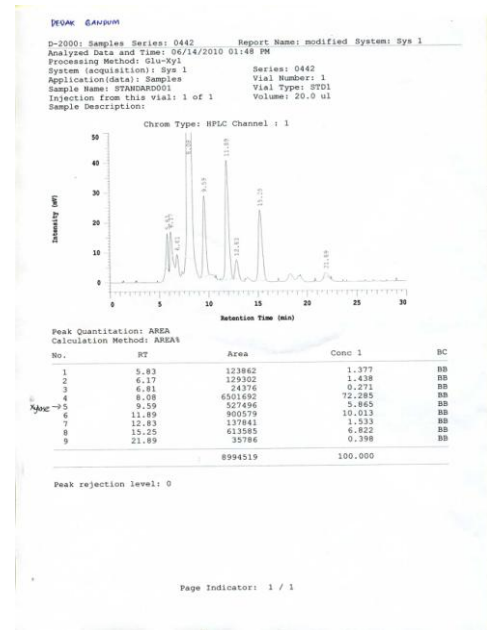
Bahan baku yang digunakan berukuran 100 mesh, hal ini dimaksudkan untuk mempermudah degradasi enzimatik oleh enzim xilanase, ukuran yang kecil akan memperluas permukaan kontak antara enzim dengan bahan baku sehingga mempermudah enzim dalam mendegradasi xilan dalam hemiselulosa bahan baku menjadi gula xilosa. Bahan baku kemudian dianalisa kadar hemiselulosanya terlebih dahulu menggunakan TAPPI METHOD T 203 om 88 didapatkan kadar Hemiselulosa untuk Sekam padi 26,55%, Dedak gandum 33,79%, Bagas Tebu 11,72% (Ramirez,1988). Pretreatment kimiawi dilakukan karena adanya struktur lignin yang bersifat kokoh yang dapat menghalangi kinerja enzim dalam mendegradasi xilan yang terkandung dalam hemiselulosa. Dalam hal ini NaOH 1 % dapat menurunkan derajat polimerisasi, kristalinitas dan memutus ikatan antara lignin dan karbohidrat. (Yee Sun dan Jiayang Cheng, 2002).

3.3 Degradasi Xilan menjadi Xilosa oleh Enzim Xilanase

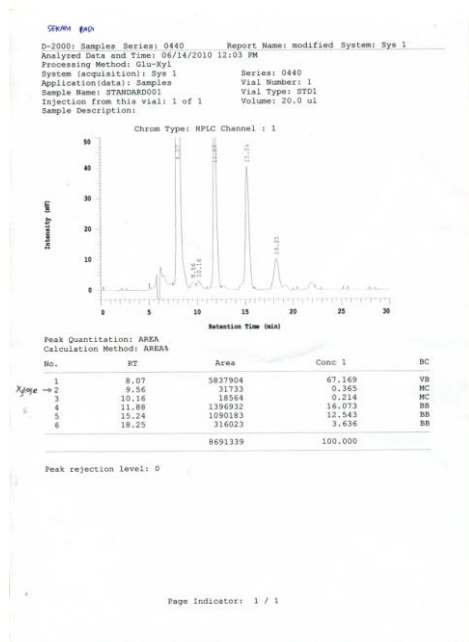
Degradasi ini dilakukan pada 5 gram bahan baku yang telah dilakukan treatment, dicampur dengan 2,66 ml/gr enzim xilanase dan buffer sitrat 0.1 M pH 5.5. Konsentrasi gula dalam larutan yang terbentuk dianalisa dengan menggunakan metode *Dinitrosalicylic Acid* (DNS) dan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Metode DNS hanya mampu menganalisa gula reduksi dalam bahan baku. Sehingga perlu dilakukan analisa dengan HPLC untuk mengetahui kadar xilosa yang terkandung dalam bahan baku.



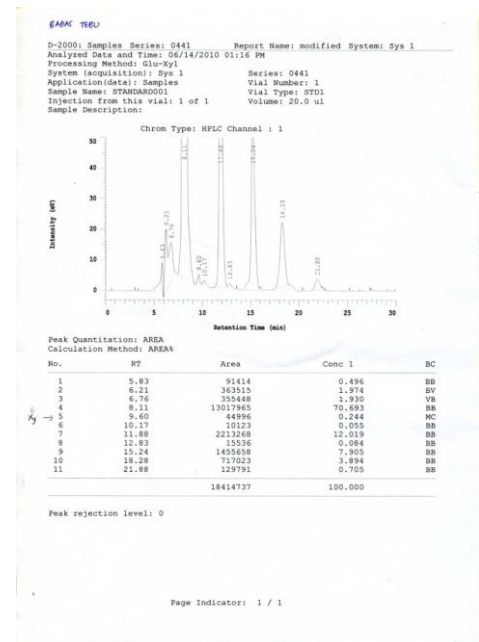
Gambar 3.3.1 Grafik kandungan gula dengan metode DNS



Gambar 3.3.2 Kromatogram HPLC gula dedak gandum



Gambar 3.3.3 Kromatogram HPLC gula sekam padi



Gambar 3.3.4 Kromatogram HPLC gula bagas tebu

Dari hasil analisa HPLC konsentrasi gula tertinggi terdapat pada dedak gandum sebesar 1,21 g/L, sekam padi sebesar 0,062 g/L dan bagas tebu sebesar 0,093 g/L. Jika dibandingkan dengan konsentrasi gula hasil metode DNS yang memiliki konsentrasi yang lebih besar dapat disimpulkan bahwa kemungkinan terbentuk gula reduksi lain selain xilosa sehingga pada analisa DNS, gula reduksi lain itulah yang terdeteksi.

3.4 Fermentasi Xilosa Menghasilkan Etanol

Fermentasi xilosa ini menggunakan xilosa murni sebagai bahan utama yang akan difermentasi. Dalam fermentasi ini, nutrien yang digunakan adalah pepton sebanyak 328 g/L, yeast ekstrak 85 g/L, dan urea 113,5g/L

dalam volume sebanyak 2 ml (Agbobbo dkk. 2007). Fermentasi ini dilakukan dalam pH 5,5 dan suhu 35°C karena *P. stipitis* bekerja optimum pada range pH dan suhu ini. Sedangkan aerasi dilakukan pada pengadukan 100 rpm. pH fermentasi diatur dengan menggunakan buffer asetat 0,1 M pH 5,5 agar pH larutan terjaga konstan dari awal sampai akhir fermentasi sehingga *P. stipitis* tetap bekerja dalam kondisi optimum.

Dari hasil fermentasi menggunakan larutan xilosa 100 ml dengan konsentrasi xilosa 50 g/L dari xilosa murni selama 6 dan 8 hari, pada suhu 303 K, pH 5,5 dan dengan pengadukan 100 rpm, didapatkan konsentrasi etanol sebesar 1,964%(v/v) dan 2,204%(v/v) yang dianalisa dengan menggunakan gas chromatography (GC).

Reaksi fermentasi yang mungkin terjadi, yaitu :

- 3 Xilosa \rightarrow 5 Etanol + 5 Karbon Dioksida
- 3 Xilosa \rightarrow 4 Etanol + 7 Karbon Dioksida
- Xilosa \rightarrow 2 Etanol + Karbon Dioksida + Air

Berdasarkan hasil analisa GC didapatkan kadar etanol untuk dedak gandum 6 dan 8 hari sebesar 0,74% (v/v) dan 1,19 % (v/v), sekam padi 6 hari 0,69 % (v/v), 8 hari 1,17% (v/v) dan bagas tebu 6 hari 0,68% (v/v), 8 hari 1,05% (v/v). Berdasarkan yield teoritis reaksi pembentukan etanol untuk xilosa murni, yaitu sekitar 61%. Etanol teoritis yang terbentuk dari dedak gandum dengan konsentrasi gula xilosa 1,21 g/L adalah 0,0605 % (w/v). Padahal kadar etanol dari analisa GC sebesar 0,74% (v/v) atau 0,577 % (w/v). Hal ini mungkin dikarenakan terdapat gula reduksi lain yang difermentasi menjadi etanol oleh *Pichia stipitis* yang kemungkinannya adalah gula galaktosa dan mannosa.

Daftar Pustaka

- Anja MERYANDINI, Nunuk WIDHYASTUTI, Yulin LESTARI. (2008): “*Pemurnian dan Karakterisasi Xilanase*”, Makara Sains, Vol.12, No.2.
- Frank K. AGBOGBO, Frank D. HAGENSEN, David MILAM, dan Kevin S. WENGER. (2008): “*Fermentation of Acid-pretreated Corn Stover to Ethanol Without Detoxification Using Pichia stipitis*”, Appl Biochem Biotechnol 145:53–58.
- Frank K. AGBOGBO, Guillermo Coward KELLY, Mads Torry SMITH, dan Thomas W. JEFFERIES. (2007): “*The Effect of Initial Cell Concentration on Xylose Fermentation by Pichia stipitis*”, Appl Biochem Biotechnol Vol 136-142.
- G.L. Miller (1959): “*Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar*”, Analytical Chemistry, 31, 426-428.
- Khanok RATANAHANOKCHAI, Khin Lay KYU, Dudsadee UTTAPAP, Morakot TANTICHAROEN. (1994): “*Induction of Xylanase in Bacillus circulans B₆*”, Bioresource Technology 48.
- Lee, Sunggyu, Speight, James G., and Loyalka, Sudarshan K., 2007, *Handbook of Alternative Fuel Technologies*, CRC Press, Boca Raton.
- Nur Richana. (2002): “*Produksi dan Prospek Enzim Xilanase dalam Pengembangan Bioindustri di Indonesia*”, Buletin AgroBio 5 (1):29-36.
- Rao, K., Chelikani, S., Relue, P. dan Varanasi, S. (2008): “*A Novel Technique that Enables Efficient Conduct of Simultaneous Isomerization and Fermentation (SIF) of Xylose*”, Appl Biochem Biotechnol 146:101–117.
- Tae Young LEE, Myoung Dong KIM, Kyu Yong KIM, dkk. (2000): “*A Parametric Study on Ethanol Production from Xylose by Pichia stipitis*”, Biotechnology Bioprocess Engineering,5:27-31.
- Yoshitosi NAKAMURA. dan SAWADA. (1997): “*T. Lignin Peroxidase Production by Phanerochaete chrysosporium Immobilized on Polyurethane Foam*”, Journal Chemical Engineering Japan., 30, 1- 6.