

**PENGARUH PERLAKUAN DELIGNIFIKASI TERHADAP HIDROLISIS
SELULOSA DAN PRODUKSI ETANOL DARI LIMBAH
BERLIGNOSELULOSA**
*(The Effects of Delignification Treatments on Cellulose Hydrolysis and Ethanol
Production from Lignocellulosic Wastes)*

Luciasih Agustini¹ & Lisna Efiyanti¹

¹Pusat Penelitian dan Pengembangan Konservasi dan Rehabilitasi
Jl. Gunung Batu 5 Po Box 165; Telp. 0251-8633234, 7520067; Fax. 0251-8638111
e-mail: luci_agustini@forda-mof.org, luciagustini@yahoo.com, lisnaefiyanti@yahoo.com

Diterima 2 Desember 2013, Disetujui 16 Februari 2015

ABSTRACT

Delignification signifies as the crucial stages in converting lignocelluloses into ethanol. It affects further hydrolysis and fermentation processes. This paper looks into the effects of three different delignification processes (physical-, chemical-, and biological- treatments) of lignocellulosic biomass (i.e sawdusts of sengon and oil-palm petioles) on cellulose hydrolysis and fermentation. Physically, biomass was pressurized in autoclave which has been set for 121°C, 1 atm for 30 minutes. Chemically, 1% H₂SO₄ was added during pressurized process. Biologically, pressurized biomass was inoculated using microorganism MD-14 FB.1 obtained from INTROF-CC collection For the control, biomass stuffs without chemical, physical, and biological treatments, sustained the hydrolysis/fermentation process as well. Delignification properties with regard to α -cellulose, lignin, hemicellulose contents in the treated as well as control biomass were examined according to the ASTM procedures. The amount of glucose exhibited from cellulose hydrolysis was determined by 3,5-dinitrosalicylic acid method, while the ethanol content was determined by potassium dichromate method. Results show that in general, chemical delignification is more effective than physical and biological treatments. It shows greater yield of lignin decomposition and sugar liberation in hydrolysis. Chemical delignification treatment produced about 0.0022 - 0.4046% ethanol from the substrate fermentation. The enzyme produced from the isolation has not significantly optimized the ethanol fermentation. Further research is needed in finding the compatibility between lignocellulose biomass and enzymes which were developed from microbe isolates.

Keywords: Bioconversion, bioethanol, delignification, enzymes, fermentation

ABSTRAK

Delignifikasi merupakan salah satu perlakuan yang berpengaruh terhadap biokonversi biomasa berlignoselulosa menjadi etanol, karena delignifikasi berpengaruh terhadap proses hidrolisis dan fermentasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh perlakuan delignifikasi secara fisika, kimia dan biologi dari limbah kayu sengon dan pelepah daun kelapa sawit terhadap proses hidrolisis dan fermentasi. Secara fisis, proses delignifikasi dilakukan dengan memasukkan biomasa ke dalam autoklaf dengan suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 30 minutes. Secara kimia, larutan H₂SO₄ 1% ditambahkan selama proses di dalam autoklaf. Secara biologi, biomasa yang telah diperlakukan dalam autoklaf diinokulasi dengan mikroorganisma MD-14 FB.1 yang diperoleh dari koleksi INTROF-CC. Pengujian komposisi lignin, α -selulosa, dan hemiselulosa dilakukan berdasarkan standar pengujian yang telah ditetapkan oleh ASTM. Kadar glukosa yang terbentuk dari hidrolisis selulosa dengan ditentukan dengan metode asam 3,5-dinitrosalisilat. Kadar etanol pada akhir proses fermentasi ditentukan dengan metode potassium dikromat. Hasil penelitian menunjukkan bahwa efektivitas delignifikasi dan hidrolisis sampel dengan perlakuan kimiawi lebih optimal dibandingkan perlakuan

lainnya, dan menghasilkan kadar etanol antara 0,0022 - 0,4046 % (v/v), dengan kadar tertinggi dihasilkan dari sampel yang menggunakan enzim hidrolisis komersial. Enzim yang dihasilkan oleh isolat-isolat yang digunakan pada percobaan ini belum dapat mengoptimalkan proses fermentasi etanol dari lignoselulosa sengon dan pelepah daun kelapa sawit. Penelitian untuk mencari isolat yang lebih potensial dan optimasi proses produksi bioethanol masih perlu dilanjutkan.

Kata kunci: Biokonversi, bioetanol, delignifikasi, enzim, fermentasi

I. PENDAHULUAN

Di tengah isu dampak perubahan iklim karena meningkatnya efek gas rumah kaca, serta semakin terbatasnya pasokan bahan bakar fosil, upaya untuk mencari sumber energi alternatif dan terbarukan menjadi program yang gencar dilaksanakan oleh beberapa negara sejak beberapa dekade terakhir. Salah satu sumber tersebut adalah bahan berkarbon untuk produksi bioetanol. Penggunaan etanol sebagai campuran bahan bakar kendaraan bermotor dapat mengurangi konsumsi bahan bakar fosil dan menurunkan emisi gas rumah kaca (Sun dan Cheng, 2002).

Penggunaan bioetanol sebagai sumber energi alternatif telah mulai diterapkan di beberapa negara, seperti: Amerika Serikat, Canada, Brasil, Kolombia, Jerman, Prancis, Italia, Spanyol, Belanda, Belgia, Tiongkok, India, Thailand, Malaysia, dan Philipina (Walter *et al.*, 2008). Amerika Serikat, yang terutama menggunakan bahan biomassa berupa jagung, dan Brasil, yang menggunakan tebu, sebagai bahan baku untuk produksi etanol, pada tahun 2007 dapat memproduksi 49,6% dan 38,3% dari total produksi bio-etanol dunia (Li *et al.*, 2009). Penggunaan biomassa jagung, tebu, ataupun komoditi lain yang mengandung gula atau pati sebagai bahan baku etanol (bioetanol generasi I) menjadi dilema, mengingat jenis-jenis tersebut merupakan komoditi pangan. Kompetisi penggunaan bahan baku untuk keperluan pangan dan produksi etanol ini dapat menyebabkan tingginya biaya produksi bioetanol dan kelangkaan sumber pangan. Oleh karena itu, penggunaan bahan biomassa lain berupa limbah biomassa berlignoselulosa dari kegiatan produksi atau industri kehutanan, pertanian dan perkebunan sebagai bahan baku produksi bioetanol menjadi fokus pengembangan teknologi produksi bioetanol generasi II, karena pada biomassa berlignoselulosa ini terdapat

senyawa polisakarida (selulosa dan hemiselulosa) yang dapat diuraikan menjadi senyawa gula dan dapat difermentasi menjadi etanol. Namun, mengingat senyawa polisakarida pada biomassa ini tercampur dengan senyawa lignin, maka delignifikasi (proses penguraian lignin) merupakan proses yang penting dalam proses pengubahan biomassa berlignoselulosa menjadi etanol. Proses ini berperan dalam meningkatkan aksesibilitas enzim selulase dan hemiselulase dalam menghidrolisis komponen selulosa dan hemiselulosa (Rosgaard *et al.*, 2007; Wan dan Li, 2012).

Penelitian yang menjajaki biomassa berlignoselulosa sebagai bahan baku bioetanol telah banyak dilakukan (Kim dan Dale, 2004; Wati *et al.*, 2007; Buaban *et al.*, 2010; Erdei *et al.*, 2010), namun studi yang menelaah peran delignifikasi dalam biokonversi limbah berlignoselulosa menjadi etanol masih terbatas. Oleh karena itu, sebagai kontribusi terhadap kemungkinan dan peluang pemanfaatan limbah lignoselulosa sebagai sumber energi alternatif, penelitian ini berupaya untuk mengetahui peran delignifikasi terhadap proses hidrolisis dan fermentasi sebagai suatu rangkaian proses dalam menghasilkan bioetanol dari limbah biomassa berlignoselulosa.

Jenis limbah lignoselulosa yang digunakan pada penelitian ini adalah serbuk gergaji kayu sengon (*Paraserianthes falcataria* L. Nielsen) dan pelepah daun kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.). Kedua jenis biomassa ini dipilih terkait dengan kelimpahan dan kemudahan untuk memperolehnya. Sengon merupakan jenis tanaman primadona yang ditanam di areal hutan rakyat karena termasuk pohon yang cepat tumbuh dan banyak digunakan oleh industri pengolahan kayu terutama di pulau Jawa (Munawar, 2010). Pemanfaatannya pun beragam, seperti untuk bahan konstruksi ringan, kemasan, bahan baku triplex, kayu lapis, papan partikel, papan blok, alat musik, korek api, dll. (Krisnawati *et al.*, 2011).

Usaha pemanfaatan kayu HTI sengon melibatkan penebangan, penggergajian dan pemotongan sehingga dihasilkan limbah dalam jumlah besar, diantaranya adalah serbuk gergaji. Selanjutnya, pelepah daun sawit yang juga sebagai sumber lignoselulosa, merupakan hasil samping, bahkan seringkali dianggap sebagai sampah/limbah dari proses pemeliharaan dan pemanenan pohon kelapa sawit (Intara dan Dyah, 2012). Dikaitkan dengan luasan perkebunan kelapa sawit Indonesia yang begitu luas, maka pelepah sawit sangat potensial digunakan sebagai bahan baku pembuatan bioetanol generasi II.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh perlakuan delignifikasi secara fisika, kimia dan biologi dari limbah kayu sengon dan pelepah daun kelapa sawit terhadap proses hidrolisis dan fermentasi dengan memanfaatkan beberapa isolat mikroorganisme lignoselulolitik koleksi INTROFCC (*Indonesian Tropical Forest Culture Collection*) Puslitbang Konservasi & Rehabilitasi di Bogor. Kadar glukosa yang dihasilkan pada tahap hidrolisis dan kadar etanol yang dihasilkan pada akhir tahap fermentasi menjadi faktor penentu dalam membandingkan pengaruh ketiga macam perlakuan delignifikasi tersebut.

II. BAHAN DAN METODE

A. Bahan dan Alat Penelitian

Sampel biomasa berlignoselulosa yang digunakan pada penelitian ini adalah limbah serbuk gergaji kayu sengon (*Paraserianthes falcataria* L. Nielsen) dan pelepah daun kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) yang diperoleh dari penggergajian kayu dan perkebunan kelapa sawit milik masyarakat di sekitar Kecamatan Jasinga, Kabupaten Bogor. Isolat mikroorganisme yang digunakan dalam penelitian ini adalah mikroorganisme koleksi INTROF-CC diantaranya isolat fungi MD14 FB.1 yang digunakan pada tahap delignifikasi secara biologis, bakteri LR-18 T.8 dan TG-02 S.9 yang menjadi sumber enzim hidrolisis dan isolate *yeast* CT26A.1 yang berfungsi sebagai agen fermentasi. Adapun bahan-bahan kimia yang diperlukan, yaitu: media NB (*Nutrient Broth*), *yeast* ekstrak, enzim selulase C2605 dan hemiselulase H2125 (Sigma-Aldrich),

CMC (*carboxymethylcellulose sodium salt*), xylan, $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Na-K tartarate), fenol, asam sitrat monohidrat, buffer asetat, buffer fosfat, 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS), glukosa, xylosa, *ethanol absolute*, aquades, dan *potassium dichromate*. Peralatan yang digunakan adalah: tabung reaksi, tabung Falcon, cawan petri, *centrifuge*, *cuwet*, labu Erlenmeyer, gelas ukur, gelas beaker, timbangan analitik, *autoclave*, *laminar air flow cabinet*, *syringe filter* dengan ukuran pori-pori 0,20 μm , pipet & tips nya, *shaker rotator* serta UV-Vis spektrofotometer SHIMADZU.

B. Metode Penelitian

Dua macam substrat lignoselulosa itu, adalah: (1) serbuk gergaji kayu sengon, dan (2) pelepah daun kelapa sawit. Empat macam perlakuan delignifikasi, yaitu: (K_0) Kontrol; (P_1) delignifikasi secara fisis; (P_2) delignifikasi secara kimia; dan (P_3) delignifikasi secara biologis menggunakan isolat fungi MD-14 FB.1. Setelah delignifikasi dilakukan proses hidrolisis selulosa dan hemiselulosa menjadi gula sederhana. Sebagai sumber enzim untuk hidrolisis tersebut adalah supernatan dari kultur cair isolat bakteri (E_1) LR-15 T.8 dan (E_2) TG-02 S.9, yang akan dibandingkan dengan (E_3) enzim selulase dan hemiselulase kompleks C2605 dan H2125 (Sigma-Aldrich) yang berasal dari *Aspergillus* sp. Kultur *yeast* CT26A.1 koleksi INTROF-CC, yang menunjukkan kemampuan dapat mengubah glukosa menjadi etanol sebagai agen fermentasi, ditambahkan pada setiap perlakuan (setelah tahapan delignifikasi dan hidrolisis). Isolat-isolat mikroorganisme tersebut yang digunakan pada penelitian ini telah terkarakterisasi potensinya untuk digunakan pada tahap delignifikasi (MD-14 FB.1), hidrolisis (LR-15 T.8 dan TG-02 S.9) dan fermentasi (CT26A.1) berdasarkan uji pendahuluan (data tidak dipublikasikan).

1. Uji delignifikasi

Delignifikasi adalah suatu proses mengubah struktur kimia biomasa berlignoselulosa dengan tujuan mendegradasi lignin secara selektif sehingga menguraikan ikatan kimianya baik secara ikatan kovalen, ikatan hidrogen maupun ikatan van der Waals, dengan komponen kimia lain pada bahan berlignoselulosa (selulosa dan hemiselulosa), dan diusahakan komponen lain

tersebut tetap utuh. Proses delignifikasi bisa dilakukan secara panas (*thermal*), kimia dan biologis. Dengan demikian, substrat selulosa dan hemiselulosa yang tersisa akan lebih mudah diakses oleh enzim pengurai termasuk enzim hidrolisis (Sun dan Cheng, 2012; Rosgaard *et al.*, 2009).

Serbuk gergaji kayu sengon dan pelepah daun kelapa sawit masing-masing dicuci dan dikeringkan, jika hasilnya masih berukuran besar, dicacah dan digiling terlebih dahulu, kemudian diayak dengan ukuran *mesh* 40/60 (lolos 40 mesh, tertahan di 60 mesh). Biomassa tersebut disiapkan untuk tiga macam perlakuan delignifikasi (P_1 , P_2 dan P_3) dan satu control (K_0). Untuk kontrol (K_0): spesimen biomassa tanpa perlakuan apapun; sedangkan perlakuan pertama (P_1): spesimen didelignifikasi secara *Fisis*, yaitu biomassa disterilkan 121°C, 1 Atm, 30 menit dalam *autoclave*; pada perlakuan ke-2 (P_2) biomassa didelignifikasi secara Kimia, yaitu biomassa disterilkan dalam *autoclave* dengan penambahan 1% H_2SO_4 (Mutreja *et al.* 2011); dan perlakuan ke-3 (P_3) delignifikasi *Biologis*, biomassa setelah disterilkan dan didinginkan, lalu diinokulasi dengan isolat MD-14 FB.1 dan diinkubasi selama 2 minggu. Seluruh hasil perlakuan delignifikasi dan kontrol kemudian dipisahkan untuk analisa komposisinya yaitu kadar lignin, selulosa dan hemiselulosa; dan dilakukan uji coba produksi etanol. Sebelum dianalisa, spesimen hasil perlakuan P_1 , P_2 dan P_3 perlu dikeringkan dalam oven 50°C selama 2-3 hari karena menjadi sedikit basah setelah perlakuan. Kadar lignin ditentukan dengan metode TAPPI T13m-45 ASTM; selulosa ditentukan dengan metode ASTM 1103-60 tahun 1977. Hemiselulosa ditentukan dengan menganalisa kadar holoselulosa terlebih dahulu. Holoselulosa dianalisa dengan metode ASTM 1104-56 tahun 1978. Kadar hemiselulosa diperoleh dari pengurangan kadar holoselulosa oleh kadar selulosa.

2. Produksi etanol dengan metode *simultaneous saccharification and fermentation (SSF)* termodifikasi

a. Proses hidrolisis

Proses hidrolisis untuk kasus ini adalah mendepolimerisasi selulosa, pati dan hemiselulosa melalui reaksi dengan air (H_2O) menjadi senyawa sederhana (glukosa dan monomer lain). Proses

hidrolisis tersebut berlangsung dengan bantuan katalis kimia (asam mineral) atau biokatalis (enzim selulosa).

Lima gram biomassa sengon dan pelepah daun kelapa sawit (yang masing-masing sudah diketahui berat kering ovennya), baik yang telah diberi perlakuan delignifikasi (P_1 , P_2 , P_3) maupun control (K_0), masing-masing disuspensikan ke dalam 100 ml larutan penyangga (buffer) asetat pH 4 dalam labu Erlenmeyer 500ml. Lalu ditambahkan 50 ml supernatan kultur bakteri LR-15 T.8 (E_1) atau TG-02 S.9 (E_2) atau 10% larutan enzim selulase kompleks Sigma-aldrich C2605 (E_3), kemudian diinkubasi 1 minggu pada suhu ruang di atas *shaker rotator* dengan kecepatan 125 rpm, agar proses hidrolisis berlangsung terlebih dahulu. Untuk menentukan adanya aktivitas hidrolisis selulosa menjadi glukosa, 5 ml supernatan dari kultur set percobaan diambil, lalu direaksikan dengan 5 ml larutan DNS kemudian dipanaskan dalam air mendidih selama lima menit. Setelah didinginkan dan mencapai suhu ruangan, 1 ml larutan $KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$ (*potassium sodium tartate*) 40% ditambahkan untuk menstabilkan warna. Selanjutnya, larutan supernatant tersebut diukur absorbansinya pada 540 nm (Sangkharak *et al.*, 2011). Kurva standar glukosa dibuat dengan mengukur absorpsi larutan glukosa (konsentrasi berkisar 0-1,5 mg/ml; dengan interval konsentrasi 0,125 mg/ml) yang diperlakukan sama sesuai dengan metode di atas. Jumlah gula tereduksi dihitung dengan mengacu pada kurva standar yang diperoleh.

b. Proses fermentasi

Fermentasi untuk kaitan ini adalah suatu proses mendegradasi senyawa glukosa atau heksosa lain ($C_6H_{12}O_6$) dalam keadaan tanpa oksigen (O_2) atau oksigen terbatas menjadi senyawa lebih sederhana yaitu alkohol (C_2H_5OH) dan CO_2 . Proses tersebut berlangsung dengan bantuan organisme seperti ragi atau agen fermentasi lain yaitu pada percobaan ini adalah isolat CT26A.1.

Sebelum digunakan sebagai agen fermentasi pada perangkat percobaan (P_1 , P_2 , P_3 , K_0), isolat *Candida fermentati* CT26A.1 ditumbuhkan pada medium pengayaan, yaitu: medium GYE (glukosa + *yeast* ekstrak) selama 48 jam pada suhu ruang di atas *shaker rotator* dengan kecepatan 125 rpm. Proses fermentasi diinisiasi dengan memasukkan 50 ml suspensi *yeast* ini dimasukkan ke dalam labu

Erlenmeyer yang masing-masing telah berisi suspensi campuran biomassa (hasil delignifikasi) + E₁, campuran biomassa + E₂ dan campuran biomassa + E₃ secara terpisah. Perangkat percobaan ini masing-masing diinkubasi pada suhu ruang dan dikocok di atas *shaker rotator* dengan kecepatan 125 rpm, selama 10 hari (sesuai dengan data seleksi dan optimasi tahap fermentasi pada uji pendahuluan data tidak dipublikasikan). Lalu kultur disentrifugasi dengan kecepatan 3600g, 30 menit, kemudian supernatan disaring dengan menggunakan *syringe filter* dengan ukuran pori-pori 0,2 µm.

Kadar etanol diestimasi dengan mengambil 8 ml supernatan kultur hasil fermentasi ke dalam tabung Falcon 15 ml, lalu ditambah dengan 4 ml larutan *potassium dichromate*, dan dipanaskan selama 10 menit dalam *waterbath* berisi air mendidih. Selama proses pemanasan, etanol bereaksi dengan *potassium dichromate* menjadi senyawa asam, yang menyebabkan perubahan warna dari oranye menjadi hijau kebiru-biruan. Perubahan warna ini diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang (λ) 600 nM. Nilai absorbansi dikonversi menjadi konsentrasi etanol dengan mengacu pada kurva standar. Kurva standar yang merupakan hubungan antara konsentrasi etanol dengan nilai absorbansi dibuat pada kisaran konsentrasi 0 - 25 % dengan interval 2,5% (Soe *et al.*, 2009).

C. Rancangan Percobaan dan Analisa Data

Untuk uji aktivitas enzim hidrolisis dan seleksi *yeast*, konversi nilai absorbansi menjadi konsentrasi glukosa tereduksi dan kadar etanol ditentukan dengan mengacu pada kurva standar terkait. Persamaan kurva standar untuk mengkonversi data absorbansi hasil percobaan menjadi konsentrasi glukosa atau etanol dengan memplot pada persamaan-persamaan regresi linier tersebut dihitung dengan bantuan paket program Microsoft Excel® 2007.

Penelaahan data produksi gula perduksi dan etanol menggunakan rancang acak lengkap (RAL) faktorial. Sebagai faktor-faktor masing-masing adalah 2 macam biomassa lignoselulosa (yaitu serbuk gergaji dan pelepah daun kelapa sawit), 4 macam perlakuan delignifikasi awal (P₁, P₂, P₃, K₀) dan 3 macam sumber hidrolisis fermentasi (E₁, E₂, E₃). Tiap taraf kombinasi ketiga faktor tersebut

(2x4x3) dilakukan ulangan sebanyak 3 kali. Jika pengaruh faktor tersebut nyata baik secara tunggal atau secara interaksi, telaahan lebih lanjut dilakukan dengan uji Tukey. Penerapan RAL dan uji Tukey dibantu dengan software ASSISTAT 7.6 Beta® 2011.

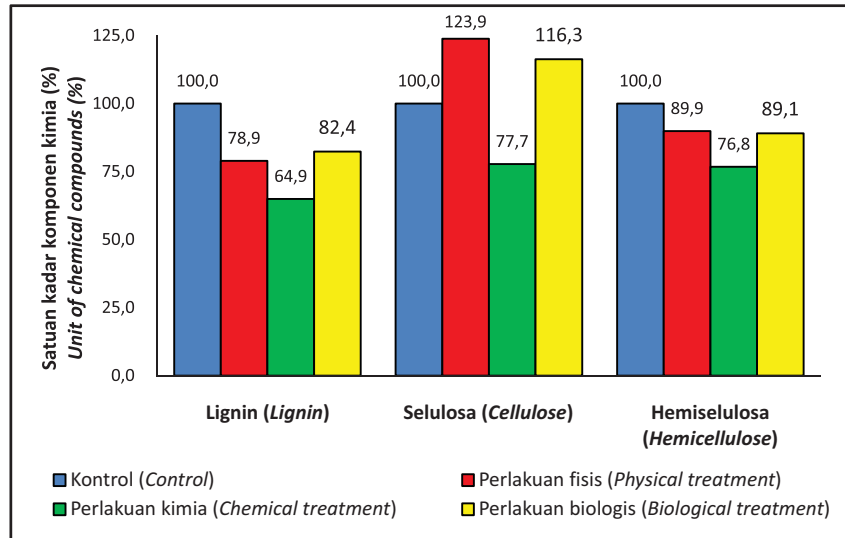
III. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Delignifikasi dan Pengaruhnya terhadap Proses Hidrolisis Selulosa

Dalam penelitian ini, perlakuan delignifikasi, baik pada limbah serbuk kayu sengon maupun pelepah daun kelapa sawit, telah menurunkan kadar lignin sekitar 5 - 35% dibandingkan dengan kontrol (Gambar 1 dan 2). Perlakuan secara kimia (menggunakan H₂SO₄ 1%, Mutreja *et al.*, 2011) menunjukkan penurunan kadar lignin yang paling banyak, yaitu 35,1% pada biomassa serbuk kayu sengon dan 29,3% pada biomassa serbuk pelepah sawit.

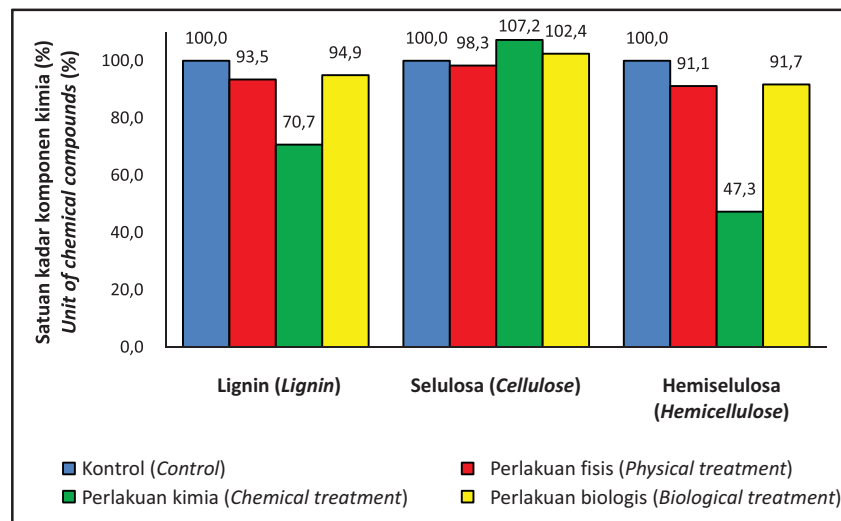
Delignifikasi secara fisis dan biologis menurunkan kadar lignin pada serbuk kayu sengon sekitar 17 - 21% dan pada pelepah daun kelapa sawit sekitar 5 - 6,5%. Adapun kadar selulosa pada serbuk kayu sengon cenderung naik (2,4 - 23,9%) sedangkan pada pelepah daun kelapa sawit delignifikasi fisis menyebabkan kadar selulosa turun 1,7% dibandingkan kontrol. Kadar hemiselulosa turun pada semua perlakuan *pretreatment* sekitar 8,3 - 52,7% dibandingkan dengan kontrol (Gambar 1 dan 2).

Meskipun sama-sama dapat menurunkan kadar lignin, perlakuan delignifikasi fisis dan biologis belum seefektif perlakuan kimia. Belum optimalnya perlakuan delignifikasi fisis menunjukkan bahwa pengkondisian sifat-sifat fisika, yaitu: pemanasan sampai 121°C pada tekanan 1 atmosfer selama 30 menit, bukan kondisi yang optimal untuk proses delignifikasi. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa kondisi optimal untuk delignifikasi dengan memanipulasi faktor fisika adalah pada temperatur 160 - 260°C pada tekanan 0,69 - 4,83 MPa, yang setara dengan 6,8 - 47,7 atm (Grous *et al.*, 1986); 270°C selama 1 menit atau 190°C selama 10 menit (Duff dan Murray, 1996). Dengan demikian, dapat difahami bahwa pengkondisian yang diterapkan dalam penelitian ini masih di bawah kondisi optimum.



Gambar 1. Komponen kimia serbuk kayu sengon hasil perlakuan delignifikasi secara fisis, kimia dan biologis, dibandingkan dengan kontrol.¹⁾

Figure 1. Chemical contents in *Paraserianthes falcataria* sawdust after physical-, chemical- and biological-delignification, compared to those of the control.¹⁾



Gambar 2. Komponen kimia serbuk pelepah sawit hasil perlakuan delignifikasi secara fisika, kimia dan biologi, dibandingkan dengan kontrol.²⁾

Figure 2. Chemical contents in oil palm petiole sawdust after physical-, chemical- and biological-delignification, compared to those of the control.²⁾

- 1) Dalam 15 g berat kering kontrol serbuk kayu sengon mengandung 4,94 g lignin; 5,51 g selulosa; dan 3,85 g hemiselulosa (inside 15 g of oven-dry sengon-wood sawdust were contained lignin, cellulose, and hemicellulose as much as 4.94, 5.51, and 3.85 g respectively).
- 2) Dalam 15 g berat kering kontrol serbuk pelepah sawit mengandung 3,11g lignin; 6,10g selulosa; dan 4,57 g hemiselulosa (inside 15 g of oven-dry oil palm petiole sawdust were contained lignin, cellulose, and hemicellulose as much as 3.11, 6.10 and 4.57 g respectively).

Penggunaan mikroorganisme, terutama jamur lapuk putih (*white-rot fungi*) untuk menguraikan lignin pada limbah berlignoselulosa telah banyak dilaporkan (Schurz, 1978; Zimmermann, 1990). Fungi *Pleurotus ostreatus* digunakan untuk menguraikan lignin pada jerami gandum dengan waktu inkubasi 5 minggu (Hatakka, 1983) sedangkan Akin *et al.* (1995) menggunakan fungi *Ceriporiopsis subvermispora* dan *Cyathus stercoreus* dengan waktu inkubasi 6 minggu. Proses biodegradasi lignoselulosa dengan fungi-fungi ini telah meningkatkan proses biodegradasi sekitar 29 - 77 % (Akin *et al.*, 1995). Dengan demikian, kurang optimalnya proses biodegradasi lignin dengan menggunakan isolat fungi MD-14 FB.1 - yang hanya meningkatkan biodegradasi lignin 17,7 % pada serbuk kayu sengon dan 5,1% pada serbuk pelapah sawit - dapat disebabkan oleh singkatnya waktu inkubasi (2 minggu), sehingga jumlah lignin yang terurai belum optimal.

Adapun perlakuan delignifikasi kimia, meskipun menunjukkan penurunan kadar lignin paling banyak, namun perlakuan ini tidak disarankan untuk diaplikasikan pada skala yang lebih besar. Selain karena bersifat toksik dan korosif sehingga memerlukan desain reaktor dari material yang khusus, penggunaan larutan asam yang disertai pemanasan dapat menginduksi terbentuknya senyawa inhibitor, seperti: furfural (*derivate* dari xylosa), 5-hydroxymethyl furfural (*derivate* senyawa C6) dan senyawa fenolik (*derivate* dari lignin) yang dapat menghambat kerja enzim selulase dan efektivitas fermentasi (Rosgaard *et al.*, 2007; Chaturvedi dan Verma, 2013).

Pada penelitian ini, perlakuan delignifikasi cenderung berpengaruh terhadap peningkatan kadar selulosa, kecuali untuk delignifikasi kimia kayu sengon dan delignifikasi fisis pelepah sawit. Kadar hemiselulosa cenderung menurun pada semua perlakuan (Gambar 1 dan Gambar 2). Hal ini menjadi indikasi bahwa perlakuan delignifikasi pada dasarnya menyebabkan selulosa, yang merupakan target utama proses hidrolisis menjadi lebih mudah diakses (Harmsen *et al.* 2010). Adapun penurunan kadar hemiselulosa setelah perlakuan delignifikasi mengindikasikan bahwa perlakuan delignifikasi yang diterapkan pada biomasa sengon dan pelepah sawit ini, tidak hanya menyebabkan degradasi lignin, tetapi depolimerisasi hemiselulosa juga (Saha *et al.*, 2005; Taherzadeh dan Karimi, 2008; Brodeur *et al.*

2011). Ini disebabkan hemiselulosa merupakan senyawa karbohidrat penyusun sel bahan berlignoselulosa tetapi dengan derajat polimerisasi yang lebih rendah daripada selulosa. Akibatnya hemiselulosa sangat rentan terhadap suhu tinggi, asam dan basa dibandingkan selulosa. Lebih lanjut hemiselulosa merupakan polimer karbohidrat yang tersusun dari monomer heksosa ($C_6H_{12}O$) dan monomer pentosa ($C_5H_{12}O_5$). Degradasi heksosa (termasuk glukosa) tanpa oksigen menghasilkan etanol (produk utama) sedangkan hal serupa untuk pentosa menghasilkan furfural (Prentti, 2006).

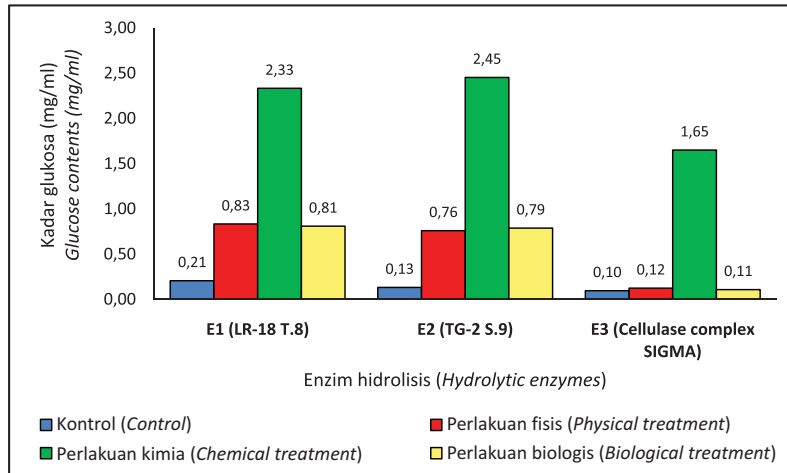
Perlakuan delignifikasi biomasa sengon, jika dihubungkan dengan proses hidrolisis, secara umum menyebabkan peningkatan kadar gula tereduksi dibandingkan dengan kontrol (Gambar 3). Biomasa sengon hasil perlakuan kimiawi, meskipun mengalami penurunan kadar selulosa sejumlah 22,3% namun justru menghasilkan kadar gula tereduksi paling tinggi untuk ketiga macam enzim hidrolisis (E_1 , E_2 dan E_3), yaitu berkisar 1,65 - 2,45 mg/ml. kadar gula tereduksi pada biomasa sengon hasil perlakuan delignifikasi fisis dan biologis, relatif lebih rendah dibandingkan perlakuan delignifikasi kimiawi, meskipun relatif lebih tinggi daripada kontrol (Gambar 3).

Pengaruh perlakuan delignifikasi biomasa pelepah sawit terhadap proses hidrolisis lebih bervariasi. Delignifikasi secara kimia menghasilkan kadar gula tereduksi yang lebih rendah daripada kontrol, baik pada proses hidrolisis yang dikatalis oleh enzim E_1 , E_2 , maupun E_3 . Delignifikasi fisis menghasilkan kadar gula tereduksi yang lebih tinggi daripada kontrol hanya diperoleh dari proses hidrolisis yang dikatalis oleh enzim E_2 dan E_3 . Delignifikasi biologis, hanya menunjukkan aktivitas hidrolisis yang paling optimal pada proses yang dikatalis oleh E_3 (Gambar 4).

Fenomena yang menarik untuk dicermati lebih lanjut tampak pada sampel biomasa pelepah daun kelapa sawit. Meskipun perlakuan delignifikasi secara kimiawi dapat menguraikan lignin relatif lebih optimal dan menghasilkan selulosa lebih banyak (Gambar 2), tetapi kadar glukosa yang dihasilkan dari proses hidrolisis selulosa tersebut justru paling sedikit dibandingkan perlakuan lainnya (Gambar 4). Hal ini menjadi indikasi bahwa delignifikasi serbuk pelepah sawit secara

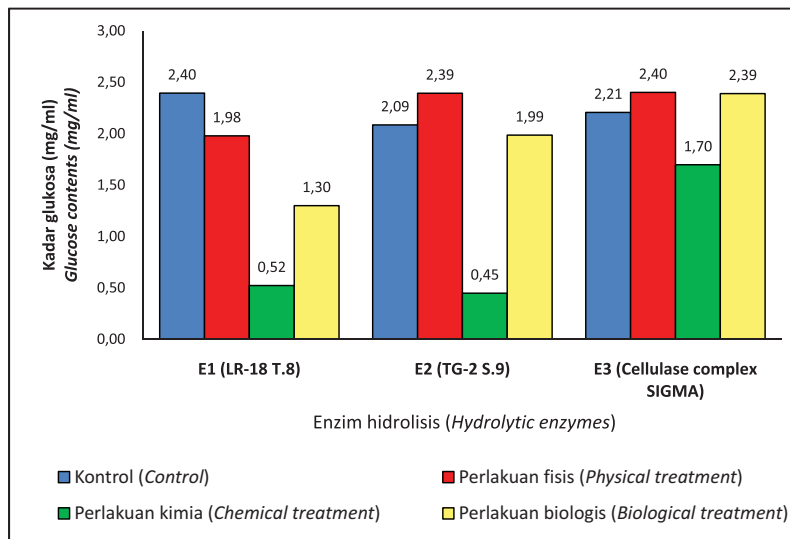
kimia diduga dapat menghasilkan senyawa inhibitor yang dapat menghambat kerja enzim hidrolisis (Rosgaard *et al.*, 2007), sehingga tidak

seluruh potensi selulosa dapat diuraikan menjadi glukosa. Namun peran senyawa inhibitor ini tidak dikaji dalam penelitian ini.



Gambar 3. Kadar glukosa³⁾ hasil hidrolisis serbuk kayu sengon menggunakan filtrat kasar enzim LR-18 T.8 (E1), TG-2 S.9 (E2) dan enzim selulase dan hemiselulase komersial C2605 dan H2125, inkubasi 7 hari.

Figure 3. Glucose contents³⁾ in *Paraserianthes sawdust* after 7-day hydrolysis using crude filtrated enzymes of LR-18 T.8 (E1), TG-2 S.9 (E2) and commercial enzymes complex of C2605 and H2125.



Gambar 4. Kadar glukosa³⁾ hasil hidrolisis serbuk pelepah sawit menggunakan filtrat kasar enzim LR-18 T.8 (E1), TG-2 S.9 (E2) dan enzim selulase dan hemiselulase komersial C2605 dan H2125, inkubasi 7 hari.

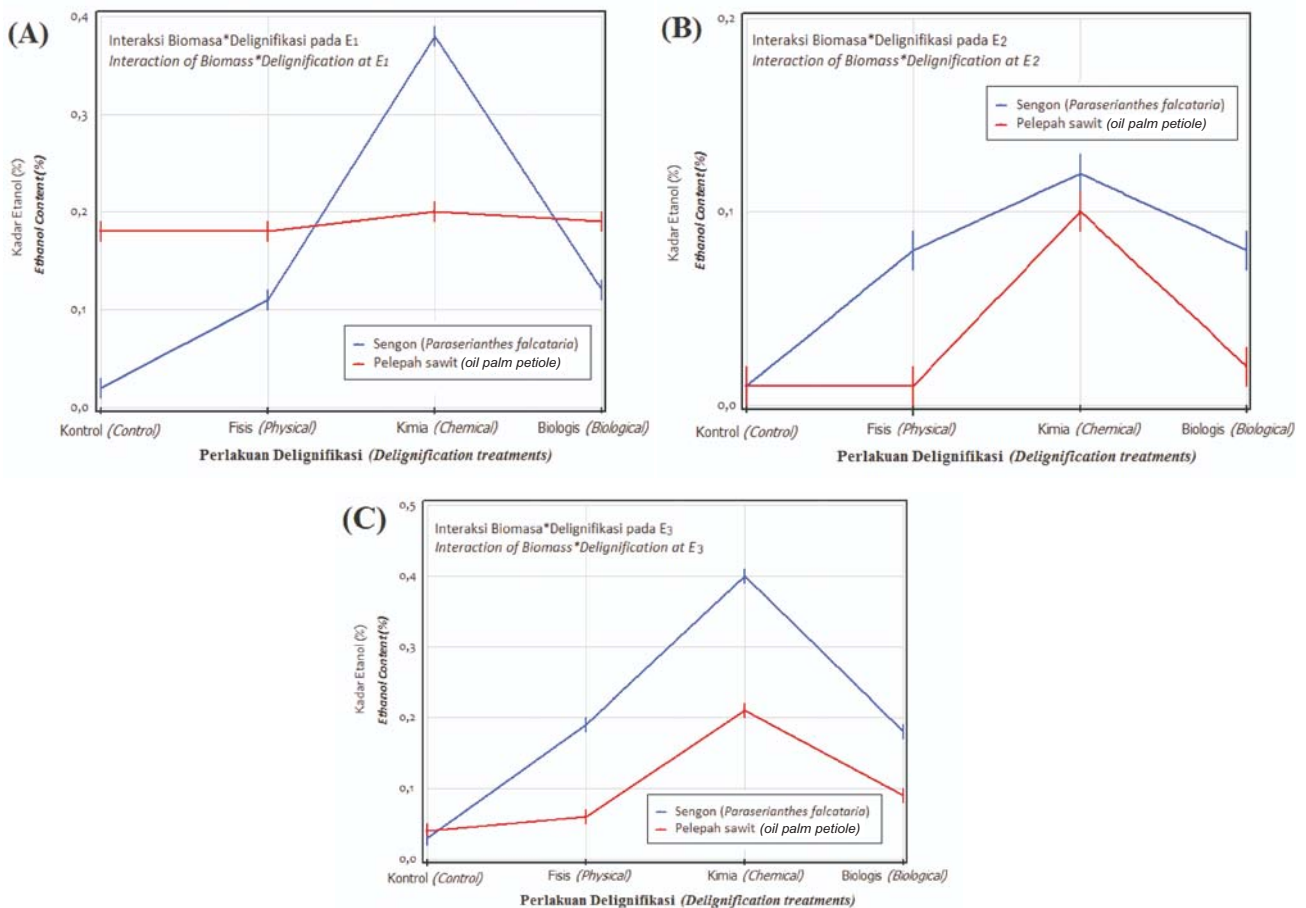
Figure 4. Glucose contents³⁾ of oil palm petiole after 7-day hydrolysis using crude filtrated enzymes of LR-18 T.8 (E1), TG-2 S.9 (E2) and commercial enzymes complex of C2605 and H2125.

1) Kadar glukosa diukur dari 100ml aliquot hasil hidrolisis 5g sampel biomasa. Glucose content was measured from 100ml aliquot of 5gr hydrolysed biomass.

Dengan membandingkan efektivitas kerja ketiga enzim hidrolisis pada dua sampel biomasa yang berbeda (Gambar 3 dan Gambar 4) terlihat bahwa aktivitas penguraian selulosa menjadi glukosa ditentukan oleh kecocokan antara jenis biomasa dan enzim hidrolisisnya. Pada serbuk kayu sengon, E₁ dan E₂ yang dihasilkan dari isolat LR-15 T.8 dan TG-2 S.9 tampak lebih efektif dalam menguraikan selulosa menjadi glukosa jika dibandingkan dengan enzim selulase komersial, untuk semua perlakuan delignifikasi. Hal yang sebaliknya terjadi pada proses hidrolisis biomasa serbuk pelepah daun sawit. Enzim filtrat kasar E₁ yang dihasilkan oleh isolat bakteri LR-15 T.8 cenderung kurang optimal dibandingkan dengan E₂ dan enzim selulase komersial (Gambar 4).

B. Pengaruh Delignifikasi dan Hidrolisis terhadap Produksi Etanol

Ujicoba produksi etanol dari serbuk kayu sengon dan pelepah sawit dengan menggunakan beberapa isolat koleksi FORDA-CC (bakteri LR-15 T.8 atau TG-2 S.9; dan yeast CT 26A.1) dilakukan dalam kondisi optimum pH 4 dan waktu inkubasi 10 hari, berdasarkan hasil uji pendahuluan, yang menunjukkan bahwa pH 4 optimum bagi aktivitas filtrat kasar enzim E₁ dan E₂ dibandingkan dengan aktivitas pada level pH 5 sampai dengan 10 (data tidak ditampilkan di sini). Namun, kadar etanol yang dihasilkan masih sangat rendah, yaitu berkisar antara 0,0022 - 0,4046% v/v (Tabel 1), yang setara dengan 0,079 - 3,23 g/L etanol.



Gambar 5. Kadar etanol⁴⁾ hasil fermentasi serbuk kayu sengon dan pelepah sawit dengan variasi perlakuan delignifikasi dan enzim hidrolisis E₁ (A); E₂ (B) dan E₃ (C).

Figure 5. Ethanol contents⁴⁾ that resulted in the fermented sawdust from sengon wood and oil-palm petiole using four varying delignification treatments, each with three different hydrolytic enzymes designated as E₁ (A); E₂ (B) and E₃ (C) respectively.

Proses konversi biomasa berlignoselulosa menjadi etanol memang masih belum menunjukkan hasil yang optimal. Srivinas *et al.* (1995) yang mencoba mengkonversi material berselulosa dengan menggunakan mikro-organisme hasil fusi (penggabungan) protoplast *Trichoderma reesei* dan *Saccharomyces cerevisiae*, melalui teknik *single stage direct bioconversion* hanya memperoleh kadar etanol 0,17 g/L. Irawati *et al.*, (2009) yang menggunakan limbah serbuk gergaji kayu jati, meranti dan sengon sebagai bahan baku, dan fungi *Phanerochaete chrysosporium* sebagai agen biodelignifikasi, serta teknik hidrolisis dan fermentasi yang simultan, menghasilkan kadar etanol 0,311 g/L dari serbuk gergaji kayu jati; 0,364 g/L dari serbuk kayu meranti; dan 0,448 g/L dari serbuk kayu sengon. Hasil yang lebih baik ditunjukkan oleh Samsuri *et al.*, (2009), yang memperoleh etanol dengan konsentrasi 6,94 g/L dari limbah tebu (*bagasse*) yang dihidrolisis dengan campuran enzim selulase dan selubiose serta agen fermentasi *Saccharomyces cerevisiae*. Mengacu pada hasil-hasil penelitian ini, tergambar bahwa untuk dapat diproduksi secara masal dan memenuhi nilai-nilai komersil, maka serangkaian penelitian yang lebih intensif masih perlu dilakukan, agar proses biokonversi limbah berlignoselulosa menjadi etanol lebih efektif.

Uji statistik menunjukkan bahwa variansi kadar etanol ini ditentukan oleh interaksi antara jenis biomassa, perlakuan delignifikasi dan enzim hidrolisis yang berbeda-beda ($F_{hitung} > F_{tabel} = 406,2966 > 3,2049$; $p < 0,001$). Secara umum, bahan baku berupa serbuk gergaji kayu sengon menghasilkan kadar etanol yang lebih tinggi daripada serbuk pelepah daun kelapa sawit (Gambar 5), kecuali untuk sampel biomassa yang tidak diberi perlakuan delignifikasi (kontrol) dan perlakuan fisika yang dihidrolisis dengan enzim filtrat kasar E_1 (Gambar. 5A). Pelepah daun kelapa sawit meskipun memiliki kandungan lignin yang lebih rendah dengan kadar selulosa dan hemiselulosa yang relatif lebih banyak, tetapi kadar etanol yang dihasilkan pada akhir proses biokonversi ini justru lebih rendah dari serbuk sengon (Gambar 5A,B,C). Hal ini sejalan dengan rendahnya kadar glukosa yang diperoleh pada proses hidrolisis selulosa, sebagai tahapan proses yang menghasilkan substrat gula yang akan

difermentasi menjadi etanol.

Rendahnyanya kadar etanol ini pun dipengaruhi oleh efektivitas isolat yeast *Candida fermentati* ICT 26A.1 yang berdasarkan uji pendahuluan dalam kegiatan ini menunjukkan bahwa isolat ini berpotensi sebagai agen fermentasi namun ternyata kadar etanol yang dihasilkan masih sangat rendah ($< 0,5\%$). Oleh karena itu, eksplorasi dan skrining yeast untuk keperluan fermentasi etanol ini perlu terus dilakukan. Metode skrining pun perlu terus dioptimalkan agar isolat yang terseleksi memiliki potensi yang optimum dalam mengubah glukosa kayu menjadi etanol.

IV. KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Sebagai awal dari suatu rangkaian proses biokonversi limbah biomasa berlignoselulosa menjadi etanol, delignifikasi berpengaruh terhadap efektivitas reaksi-reaksi selanjutnya, yaitu reaksi hidrolisis dan fermentasi. Pada penelitian ini, delignifikasi secara kimiawi, yaitu dengan H_2SO_4 1% menunjukkan efektivitas degradasi lignin yang paling tinggi dibandingkan dengan perlakuan delignifikasi lainnya, sehingga kadar etanol yang dihasilkan pada akhir fermentasi berbeda nyata, baik pada sampel yang dihidrolisis dengan enzim filtrat kasar (E_1 atau E_2), maupun enzim komersial (E_3).

Selain kelimpahan substrat selulosa, kompatibilitas antara enzim hidrolisis dan jenis sampel lignoselulosa merupakan faktor yang mempengaruhi efektivitas reaksi hidrolisis. Pada percobaan ini, sampel serbuk pelepah daun kelapa sawit menghasilkan kadar etanol yang lebih rendah tetapi tidak berbeda nyata dari serbuk kayu sengon, meskipun kadar holoselulosa pelepah sawit lebih banyak dari kayu sengon. Hal ini menunjukkan bahwa baik E_1 , E_2 maupun E_3 bukanlah enzim hidrolisis yang paling optimal untuk mengurai komponen selulosa pelepah daun sawit menjadi glukosa.

Isolat *Candida fermentati* CT 26A.1 yang digunakan dalam ujicoba ini berpotensi sebagai agen fermentasi namun ternyata kadar etanol yang dihasilkan masih sangat rendah ($< 0,5\%$ v/v).

B. Saran

Untuk meningkatkan kadar etanol dari proses biosintesis yang melibatkan mikroorganisme, pemilihan mikroorganisme yang potensial merupakan hal penting. Oleh karena itu, optimasi metode seleksi isolat-isolat potensial dan optimasi reaksinya, baik untuk tahap delignifikasi, hidrolisis, maupun fermentasi mutlak diperlukan agar teknologi produksi bioetanol generasi II yang lebih optimal dan ramah lingkungan dapat dikembangkan di Indonesia, dalam skala yang lebih besar di masa yang akan datang.

DAFTAR PUSTAKA

- Akin, D.E., L.L. Rigsby, Sethuraman, A. W.H.-III Morrison, Gamble, G.R. & Eriksson, K.E.L. (1995). Alterations in structure, chemistry, and biodegradability of grass lignocelluloses treated with white rot fungi *Ceriporiopsis subvermispora* and *Cyathus stercoreus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 1591 - 1598.
- American Standard Testing Material (ASTM) (1995). Annual book of ASTM Standards. Volume 04.10 Wood. Section 4. Philadelphia: ASTM
- Brodeur, G., Yau, E. Badal, K. Collier, J. Ramachandran, K.B. Ramakrishnan, S. (2011). Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: a review. *Enzyme Research*, 2011: 1-17. [doi:10.4061/2011/787532].
- Buaban, B., H. Inoue, S. Yano, S. Tanapongpipat, V. Ruanglek, & V. Champreda.(2010). Bioethanol Production from Ball Milled Bagasse Using On-Site Produced Fungal Enzyme Cocktail and Xylose-Fermenting *Pichia stipitis*. *Journal of Bioscience & Bioengineering*, 110(1):18-25.
- Chaturvedi, V. & Verma, P. (2013). An overview of key pretreatment processes employed for bioconversion of lignocellulosic biomass into biofuels and value added products. 3. *Biotech*, 3, 415 - 431.
- Duff, S.J.B & W.D. Murray.(1996). Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. *Bioresource Technology*, 55, 1 - 33.
- Erdei, B., Z. Barta, B. Sipos, K. Reczey, M. Galbe, & G. Zacchi. (2010). Ethanol Production from Mixtures of Wheat Straw and Wheat Meal. *Biotechnology for Biofuel*, 3, 16.
- Grous, W.R., Converse, A.O. & H.F. Grethlein. (1986). Effect of steam explosion pretreatment on pore size and enzymatic hydrolysis of poplar. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 8, 274 - 280.
- Harmsen, P.F.H., Huijgen, W.J.J. Lopez, L.M.B. & Bakker, R.R.C. (2010). Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass. Energy Research Centre of the Netherlands.pp.1-49.
- Hatakka, A.I. (1983). Pretreatment of wheat straw by white-rot fungi for enzymatic saccharification of cellulose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 19, 361 - 363.
- Irawati, D., Azwar, N.R. Syafii, W. & Artika, I.M. (2009). Pemanfaatan Serbuk Kayu untuk Produksi Etanol dengan Perlakuan Pendahuluan Delignifikasi Menggunakan Jamur *Phanerochaete chrysosporium*. *Jurnal Ilmu Kebutanan*, III (1), 13 - 22.
- Intara, Y.I., dan Dyah, B.P. (2012). Studi sifat fisik dan mekanik parenkim pelepah daun kelapa sawit untuk pemanfaatan sebagai bahan anyaman. *AGROINTEK*, 6(1), 36 -44.
- Kim, S., & B.E. Dale. (2004). Global potential bioethanol production from waste crops and crop residues. *Biomass & Bioenergy*, 26, 361 - 375.
- Krisnawati, H., E. Varis, M. Kallio, M., & Kanninen, M. (2011). *Paraserianthes falcataria* (L) Nielsen - Ekologi, Silviculture dan Produktivitas. Bogor - Indonesia: CIFOR.
- Li, X.H., H.J. Yang, B. Roy, D. Wang, W.F. Yue, L.J. Jiang, E.Y. Park, & Y.G. Miao. (2009). The most stirring technology in the future: cellulase enzyme and biomass utilization. *African Journal of Biotechnology*, 8, 2418-2422.
- Munawar, A. (2010). *Analisa Nilai Tambah dan Pemasaran Kayu Sengon Gergajian Studi Kasus*

- di Kecamatan Cigudeg Kabupaten Bogor. Dept. Agribisnis, Fakultas Ekonomi dan Manajemen, Institut Pertanian Bogor. [skripsi].
- Mutreja, R., Das, D. Goyal, D. & Goyal, A. (2011). Bioconversion of agricultural waste to ethanol by SSF using recombinant cellulase from *Clostridium thermocellum*. *Enzyme Research*. [DOI:10.4061/2011/340279].
- Prentti, O. (2006). Wood structure and properties. New York-London-Toronto: Trans Technical Publication.
- Rosgaard, L., S. Pedesen, & A.S. Meyer. (2007). Comparison of Different Pretreatment Strategies for Enzymatic Hydrolysis of Wheat and Barley Straw. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 143,284 - 296.
- Saha, B.C., L.B. Hen, M.A. Cotta & Y.V. Wu. (2005). Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of rice hulls to ethanol. *Biotechnology Progress*, 21(3), 816 - 822.
- Sangkharak, K., P. Vangsirikul, & S. Jantachat. (2011). Isolation of novel cellulase from agricultural soil and application for ethanol production. *International Journal of Advance Biotechnology and Research*, 2(2), 230-239.
- Samsuri, M., M. Gozan, B. Prasetya, & M. Nasikin. (2009). Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic bagasse for bioethanol production. *Journal of Biotechnology Research in Tropical Region*, 2(2), 1-5.
- Schurz, J. (1978). Bioconversion of cellulosic substances into energy. In Ghose, T.K.: *Chemicals and Microbial Protein Symposium Proceedings*, Eds. New Delhi: IIT
- Soe H.B., Kim, H.J. & Jung, H.K. (2009). Measurement of ethanol concentration using solvent extraction and dichromate oxidation and its application to bioethanol production process. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36, 285 - 292.
- Srivinas, D., Rao, K.J. Theodore, K. & Panda, T. (1995). Direct conversion of cellulosic material to ethanol by the intergeneric fusant *Trichoderma reesei* Qm9414/*Saccharomyces cereviceae* NCIM 38288. *Enzyme & Microbial Technology*, 17, 418 - 423.
- Sun Y., and J. Cheng. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresources Technology*, 83, 1-11.
- Taherzadeh, M.J. and K. Karimi. (2008). Pretreatment of lignocellulosic waste to improve ethanol and biogas production: a review. *Int. J. Mol. Sci.*, 9, 1621 - 1651.
- Technical Association of the Pulp and Paper Industry (TAPPI) (1993). The Technological Association of the Pulp and Paper Industry Methods. Atlanta Georgia: TAPPI.
- Walter, A., F. Rosillo-Calle, P. Dolzan, E. Pracente, and K.B. da Cunha. (2008). Perspective on Fuel Ethanol Consumption and Trade. *Biomass and Bioenergy*, 32, 730-748.
- Wan, C. and Y. Li. (2012). Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. *Biotechnol. Adv.*, 30(6), 1447-1457.
- Wati, L., Kumari, S. and Kundu, B.S. (2007). Paddy Straw as Substrate for Ethanol Production. *Indian Journal of Microbiology*, 47, 26 - 29.
- Zimmermann, W. (1990). Degradation of lignin by bacteria. *J. Biotechnol.*, 13; 119-130.