

Pengaruh Konsentrasi Inokulum dan Lama Hidrolisis Bagasse oleh *Aspergillus niger* pada Proses Produksi Bioetanol

Nasrul Rofiah Hidayati*, Pujiati, Devi Triana Rahayu

IKIP PGRI MADIUN

*Corresponding author: nasrul.rofiah@gmail.com

Abstract: Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi inokulum *Aspergillus niger* dan lama hidrolisis terhadap kadar bioetanol bagasse. Proses produksi bioetanol salah satunya adalah hidrolisis menggunakan kapang *Aspergillus niger*. Metode penelitian yang digunakan yaitu eksperimen dengan menggunakan hidrolisis oleh kapang *Aspergillus niger*. Penelitian ini terdiri dari 2 variabel bebas, yaitu konsentrasi inokulum *Aspergillus niger* yang terdiri dari 4 level meliputi P₁ (0 ml/g), P₂ (0,2 ml/g), P₃ (0,4 ml/g), P₄ (0,6 ml/g), dan lama hidrolisis yang terdiri dari 5 level meliputi K₁ (24 jam), K₂ (48 jam), K₃ (72 jam), K₄ (96 jam), dan K₅ (120 jam). Variabel terikat yang dihitung pada penelitian ini adalah kadar bioetanol bagasse. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan anava dua jalur dan uji lanjut LSD. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi inokulum *Aspergillus niger* dan lama hidrolisis berpengaruh terhadap kadar bioetanol bagasse, pada perlakuan konsentrasi inokulum 0,6 ml/g dan lama hidrolisis 72 jam menghasilkan bioetanol dengan kadar tertinggi yaitu 68%, sedangkan pada perlakuan konsentrasi inokulum 0 ml/g dan lama hidrolisis 24 jam menghasilkan bioetanol dengan kadar terendah yaitu 39%.

Keywords: Bioetanol, Bagasse, Hidrolisis, *Aspergillus niger*.

1. PENDAHULUAN

Peningkatan jumlah penduduk secara berkelanjutan akan berdampak pada meningkatnya kebutuhan energi, dimana kebutuhan energi yang paling dominan adalah pada sektor sarana transportasi dan aktivitas industri yang mana kegiatan tersebut banyak membutuhkan konsumsi Bahan Bakar Minyak (BBM) yang berasal dari minyak bumi. Keberadaan minyak bumi berbasis bahan bakar fosil yang sifatnya tidak dapat diperbaharui (*unrenewable*) hingga saat ini menempati urutan yang pertama. Jika penggunaan yang terus meningkat seiring perkembangan zaman maka dapat diperkirakan minyak bumi yang ada tidak dapat mencukupi kebutuhan energi. Penggunaan bahan bakar fosil juga menyebabkan konsentrasi CO₂ dan gas rumah kaca yang lain di udara meningkat (Kurniasari, L., Hartati, I., Yulianto, M, E., 2008). Salah satu usaha untuk memperkecil permasalahan tersebut adalah dengan penggunaan bioetanol sebagai alternatif pengganti bahan bakar berbasis fosil.

Indonesia merupakan negara yang sangat potensial sebagai penghasil bahan baku untuk bahan bakar alternatif selain minyak bumi. Keterbatasan persediaan cadangan minyak bumi dan isu lingkungan menyebabkan negara-negara di dunia mulai beralih pada produksi atau pemanfaatan bahan bakar nabati (Usmana, S, A., Rianda, S., Novia, 2012). Bioetanol yang diproduksi saat ini pada umumnya dibuat dari bahan-bahan yang mengandung karbohidrat tinggi misalnya: tebu, singkong, ubi, jagung, dll yang

merupakan bahan pangan yang mempunyai nilai jual, selain bahan yang mengandung karbohidrat, bioetanol dapat diproduksi dari biomassa lignoselulosa. Salah satu biomassa lignoselulosa di Indonesia yang melimpah dan tidak dimanfaatkan secara maksimal adalah bagasse (ampas tebu).

Indonesia merupakan negara penghasil gula. Hal ini dibuktikan dengan banyaknya pabrik-pabrik gula berdiri di Indonesia, banyaknya gula yang dihasilkan memerlukan bahan baku tebu yang banyak pula. Limbah hasil penggilingan tebu yang biasa disebut bagasse (ampas tebu) akan melimpah seiring banyaknya tebu yang diolah menjadi gula. Bagasse (ampas tebu) merupakan hasil samping dari proses ekstraksi tebu. Bagasse biasanya sebagian kecil hanya digunakan sebagai bahan bakar dan sisanya ditimbun sebagai buangan yang memiliki nilai ekonomis rendah. Penimbunan bagasse akan menimbulkan permasalahan bagi pabrik maupun masyarakat di lingkungan sekitar pabrik gula diantaranya mengotori lingkungan pabrik, dan menyita lahan yang luas untuk penyimpanannya.

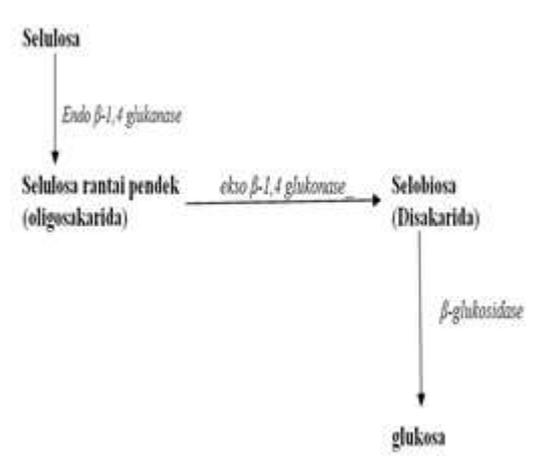
Bagasse (ampas tebu) memiliki kandungan selulosa yang tinggi tinggi mencapai 40,59% , 15,91% hemiselulosa, dan kandungan lignin 17,50% (Gunam, I., Wartini, N., Anggraeni, A., Suparyana, P., 2011). Kandungan selulosa dalam bagasse yang tinggi inilah yang berpotensi menjadikannya menjadi bioetanol, dimana selulosa akan dihidrolisis menjadi glukosa dengan enzim selulosa yang dihasilkan oleh kapang *Aspergillus niger* kemudian difermentasi menjadi

etanol. *Aspergillus niger* menghasilkan beberapa enzim antara lain: amilase, pektinase, amiloglukosidase, dan selulase, serta enzim fitase ekstraseluler Conneely (dalam Marlina, E., Balia, R dan Harlia, E, 2011), dimana enzim tersebut yang akan mendegradasi selulosa menjadi glukosa. Setelah menjadi glukosa, selulosa ini difermentasi menjadi etanol (Gunam, I., Aryanta, W, R., Darma, B, N, S., 2011: 30).

Bioetanol berasal dari dua kata yaitu "bio" dan "etanol" yang berarti sejenis alkohol yang terbuat dari bahan baku tanaman. Bioetanol bersumber dari gula sederhana, pati dan selulosa. Rumus kimia etanol adalah $C_nH_{2n}+OH$. Proses pembuatan bioetanol berbahan dasar biomassa lignoselulosa melibatkan langkah dasar yaitu:

- Pretreatment* (perlakuan pendahuluan) untuk delignifikasi yaitu membebaskan selulosa dan hemiselulosa sebelum hidrolisis.
- Hidrolisis selulosa dan hemiselulosa menghasilkan gula termasuk glukosa, xilosa, arabinosa, galaktosa, mannose, adapun proses hidrolisis oleh enzim selulosa dapat dilihat pada gambar dibawah ini:

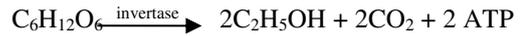
Gambar 1. Metabolisme selulosa



Sumber : Purwoko, T., 2009

Degradasi selulosa menjadi glukosa memerlukan 3 enzim, yaitu endo β -1,4-glukanase yang memecah selulosa menjadi lebih pendek (oligosakarida), ekso β -1,4-glukanase memotong oligosakarida menjadi selobiosa (disakarida) dari ujung nonreduksi, dan β -glukosidase memecah selobiosa menjadi glukosa selanjutnya glukosa diglikolisis.

- Fermentasi gula reduksi menjadi etanol. Selama proses fermentasi selain menghasilkan alkohol dan karbondioksida, juga terdapat produk lain yang disebut asam asetat. Sebanyak 95,5% gula bila difermentasi akan menghasilkan 57,7% etanol, 33,3% karbondioksida, dan 2,5% asam asetat. Perubahan gula pereduksi menjadi etanol dilakukan oleh enzim intervase, yaitu enzim kompleks yang terkandung dalam ragi. Reaksinya adalah sebagai berikut:



- Destilasi bioetanol, larutan fermentasi kemungkinan mengandung air, etanol, dan biomassa yang tersisa. Prinsip kerja destilasi adalah dengan mempertimbangkan titik didih masing-masing larutan. Titik didih etanol murni adalah 78°C sedangkan air adalah 100°C (kondisi standar). Pemanasan larutan pada suhu 78-80°C akan mengakibatkan sebagian besar etanol menguap, dan melalui unit kondensasi akan bisa menghasilkan etanol dengan konsentrasi lebih tinggi. Selanjutnya untuk mengetahui kadar etanol yang dihasilkan dari proses destilasi, maka perlu dianalisa atau diukur kadarnya dengan metode menentukan berat jenis etanol yang dihasilkan. Berat jenis dihitung dengan rumus berikut:

$$\rho = \frac{m}{v}$$

Keterangan:

ρ : Berat Jenis Larutan Standar Etanol (g/ml)

m: Massa (g)

v : Volume Piknometer (ml)

2. METODOLOGI

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Biologi IKIP PGRI Madiun. Metode yang digunakan adalah eksperimen menggunakan rancangan acak lengkap. Parameter yang diteliti adalah kadar bioetanol *bagasse*. Variabel yang pertama adalah konsentrasi inokulum *Aspergillus niger* yaitu: P₁ (0 ml/g), P₂ (0,2 ml/g), P₃ (0,4 ml/g), dan P₄ (0,6 ml/g). Variabel yang kedua adalah lama hidrolisis yaitu: K₁ (24 jam), K₂ (48 jam), K₃ (72 jam), K₄ (96 jam), dan K₅ (120 jam). Data yang diperoleh dari masing-masing perlakuan dianalisis dengan anava dua jalur, apabila perlakuan berpengaruh nyata (signifikan) terhadap parameter yang diteliti maka dilanjutkan dengan uji LSD.

Proses pembuatan bioetanol melalui tahap-tahap berikut:

- Pretreatment secara fisika yaitu pengeringan, pencacahan, kemudian pemanasan dengan suhu tinggi.
- Hidrolisis secara enzimatik menggunakan kapang *Aspergillus niger*.
- Fermentasi menggunakan yeast *Saccaromyces cerevisiae*.
- Destilasi
- Penetapan kadar bioetanol menggunakan picnometer.

Alat dan bahan yang digunakan antara lain:

Alat penelitian:

Botol infus berukuran 500 ml, autoclave Merk All American model 25 X-2, cawan petri, mikropipet, erlenmeyer, beaker glass, pemanas spiritus, botol spray, neraca analitik, spatula, Rotari Orbital merk Wina type 109 A, destilator, labu alas bulat, gelas



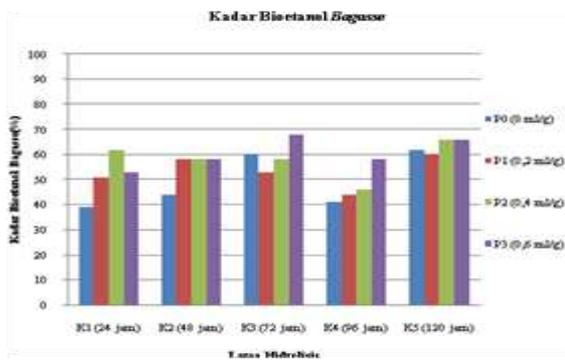
ukur, erlenmeyer, pemanas, neraca analitik merk Meitler AE 200, piknometer.

Bahan penelitian:

Bagasse (ampas tebu) dalam keadaan kering, aquadest, kapang *Aspergillus niger* murni, glukosa, KH_2PO_4 , MgSO_4 , kapas, aluminium foil, yeast *Saccharomyces cerevisiae* merk fermipan, PDA (*Potato Dextrose Agar*), gula.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil analisis dengan anava dua jalur diperoleh hasil bahwa konsentrasi inokulum *Aspergillus niger* dan lama hidrolisis memiliki nilai signifikansi $\leq 0,05$ yang berarti ada pengaruh konsentrasi inokulum dan lama hidrolisis terhadap kadar bioetanol *bagasse*.

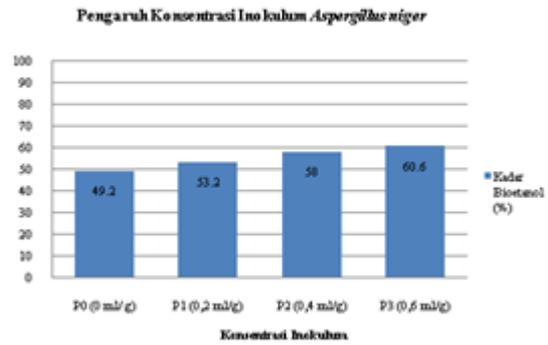


Gambar 2. Histogram pengaruh konsentrasi inokulum *Aspergillus niger* dan lama hidrolisis terhadap kadar bioetanol *bagasse*

Hasil rata-rata perhitungan kadar bioetanol menunjukkan kadar tertinggi yaitu 68% pada perlakuan P₃K₃ yaitu konsentrasi inokulum 0,6 ml/g dan lama hidrolisis 72 jam. Dan kadar terendah yaitu 39% terdapat pada perlakuan P₀K₁ yaitu konsentrasi 0 ml/g dan lama hidrolisis 24 jam. Adapun histogram pengaruh konsentrasi inokulum dan lama hidrolisis *Aspergillus niger* terhadap kadar bioetanol *bagasse* dapat dilihat pada Gambar 2 dibawah ini:

Pengaruh Konsentrasi Inokulum *Aspergillus niger* Terhadap Kadar Bioetanol *Bagasse*

Berdasarkan hasil uji hipotesis menggunakan anava dua jalur menunjukkan konsentrasi inokulum *Aspergillus niger* berpengaruh terhadap kadar bioetanol *bagasse* dan rerata kadar bioetanol dapat dilihat pada histogram pada gambar 3 dibawah ini:



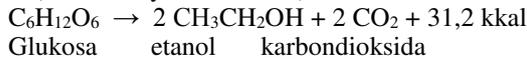
Gambar 3. Histogram pengaruh konsentrasi inokulum *Aspergillus niger* terhadap kadar bioetanol *bagasse*

Gambar 3. menunjukkan pada perlakuan P₀ (konsentrasi inokulum 0 ml/g) memiliki rata-rata kadar bioetanol 49,2%, kemudian perlakuan P₁ (konsentrasi inokulum 0,2 ml/g) rata-rata kadar bioetanol meningkat yaitu 53,2%, hal ini menunjukkan bahwa dalam pertumbuhannya kapang *Aspergillus niger* mampu menghasilkan enzim selulase dan digunakan untuk mendegradasi selulosa menjadi glukosa yang akan difermentasi dengan bantuan yeast *Saccharomyces cerevisiae* menjadi etanol dan karbondioksida, selanjutnya pada perlakuan P₂ (konsentrasi inokulum 0,4 ml/g) dan P₃ (konsentrasi inokulum 0,6 ml/g) menghasilkan bioetanol dengan kadar yang cenderung meningkat secara berturut-turut yaitu 58% dan 60,6%, sehingga pada perlakuan P₃ (konsentrasi inokulum 0,6 ml/g) menghasilkan rata-rata kadar bioetanol tertinggi dibandingkan dengan perlakuan konsentrasi inokulum 0 ml/g, 0,2 ml/g, dan 0,4 ml/g

Rata-rata kadar bioetanol tertinggi yaitu pada perlakuan P₃ yang dihidrolisis oleh *Aspergillus niger* dengan konsentrasi inokulum yang tinggi (0,6 ml/g) menunjukkan bahwa enzim selulase yang dihasilkan oleh *Aspergillus niger* untuk memecah selulosa menjadi gula yang lebih sederhana (glukosa) lebih tinggi dibandingkan dengan pemberian inokulum dengan konsentrasi yang rendah dan kadar glukosa meningkat, sehingga dalam proses fermentasi glukosa menjadi etanol oleh yeast *Saccharomyces cerevisiae* mencapai kadar yang lebih tinggi. Penelitian Usmana, S.A, Rianda, S dan Novia (2012) menuturkan bahwa semakin banyak jumlah enzim selulase yang dihasilkan kapang *Aspergillus niger* dalam pembuatan etanol berbahan baku tandan kosong kelapa sawit maka kadar etanol yang dihasilkan juga semakin meningkat.

Aspergillus niger dalam metabolismenya menghasilkan beberapa enzim selulase dan amilo glukosidase (Hermiati, Mangunwidjaja, Sunarti, Suparno, Prasetyo, 2010). Enzim-enzim yang dihasilkan oleh *Aspergillus niger* akan digunakan untuk mendegradasi selulosa yang terkandung dalam *bagasse* menjadi gula sederhana (glukosa). Enzim tersebut antara lain endo β -1,4-glukanase yang memecah selulosa menjadi lebih pendek (oligosakarida), ekso β -1,4-glukanase memotong oligosakarida menjadi selobiosa (disakarida) dari

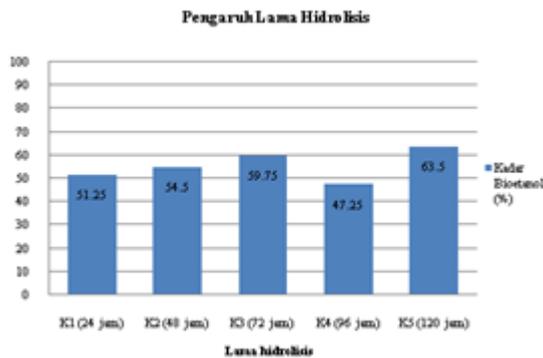
ujung nonreduksi, dan β -glukosidase memecah selobiosa menjadi glukosa (Purwoko, 2009: 121). Selanjutnya glukosa difermentasi dengan bantuan *Saccharomyces cerevisiae* akan menghasilkan etanol dan karbondioksida dengan persamaan reaksi sebagai berikut (Lud Waluyo, 2011: 150) :



Saccharomyces cerevisiae biasa digunakan dalam produksi etanol karena mampu menghasilkan enzim zymase yang dapat mengkonversi gula menjadi alkohol (Azizah, N, Mulyani, 2012).

Pengaruh Lama Hidrolisis Terhadap Kadar Bioetanol Bagasse

Berdasarkan hasil uji hipotesis menggunakan anava dua jalur menunjukkan lama hidrolisis berpengaruh terhadap kadar bioetanol bagasse dan rerata kadar bioetanol dapat dilihat pada histogram pada gambar 5 dibawah ini:



Gambar 5. Histogram pengaruh lama hidrolisis terhadap kadar bioetanol bagasse

Gambar 5. menunjukkan pada perlakuan K₁ (lama hidrolisis 24 jam) memiliki rata-rata kadar bioetanol 51,25 %, hal ini menunjukkan pada saat 24 jam kapang *Aspergillus niger* berada pada fase lag dimana pada fase ini kapang masih menyesuaikan diri dengan substrat dan kondisi lingkungan, sehingga belum terjadi pembelahan sel karena beberapa enzim mungkin belum disintesis (Lud Waluyo, 2007: 103), kemudian pada waktu hidrolisis 48 jam (K₂), dan 72 jam (K₃) rata-rata kadar bioetanol meningkat secara berturut-turut yaitu 54,5% dan 59,75%. Pada waktu hidrolisis 96 jam (K₄) menunjukkan kadar bioetanol menurun yaitu 47,25%, namun pada waktu hidrolisis 120 jam (K₅) rata-rata bioetanol meningkat mencapai kadar tertinggi yaitu 63,5%.

Meningkatnya kadar bioetanol hingga waktu hidrolisis 72 jam menunjukkan bahwa kapang berada pada fase pertumbuhan, dimana pada fase ini metabolisme kapang menghasilkan enzim selulase yang optimal. Hal ini sesuai dengan penelitian Rofik, S dan Riwayati, I (2013) yang menyatakan bahwa waktu optimum yang dibutuhkan untuk reaksi hidrolisa enzimatik adalah 72 jam dengan kadar glukosa yaitu 22,04%. Pada waktu hidrolisis 96 jam

rata-rata kadar bioetanol mengalami penurunan dan menghasilkan kadar bioetanol terendah dibandingkan dengan perlakuan lainnya yaitu 47,25%, hal ini dapat disebabkan nutrisi yang berkurang dan sudah tidak menunjang kapang *Aspergillus niger* untuk berkembang, sehingga kapang banyak yang mati, selain itu menurut Kusumaningtyas *et, al*, 2005 dalam (Pujiati, 2014) kadar air yang tinggi akan mempercepat pertumbuhan kapang sehingga nutrisi dalam ampas tebu (*bagasse*) akan cepat habis dan menyebabkan kapang lebih cepat mati, tetapi kondisi tersebut juga dapat menyebabkan spora pada *Aspergillus niger* menjadi dorman. Jadi kadar air juga menjadi salah satu faktor yang mempengaruhi pertumbuhan *Aspergillus niger*.

Pada waktu hidrolisis 120 jam kadar bioetanol mengalami kenaikan dan menghasilkan bioetanol dengan kadar tertinggi, hal ini dapat dikarenakan spora pada *Aspergillus niger* setelah mengalami masa dorman yang disebabkan oleh kadar air yang tinggi, kemudian spora tumbuh kembali hingga waktu optimum pertumbuhannya menghasilkan enzim selulase, dimana menurut penelitian Devi, M. C and Kumar, M.S (2012) menyatakan semakin lama waktu inkubasi kapang maka enzim selulase yang dihasilkan semakin tinggi hingga mencapai waktu optimum 7 hari dan setelah itu produksi enzim selulase akan mengalami penurunan. Enzim selulase yang dihasilkan oleh metabolisme kapang akan digunakan untuk mendegradasi selulosa yang terdapat dalam substrat *bagasse* menjadi glukosa yang kemudian difermentasi oleh yeast *Saccharomyces cerevisiae* menjadi etanol dan karbondioksida.

Pertumbuhan mikroba untuk menghasilkan enzim selulase yang akan menghidrolisa selulosa menjadi gula sederhana (glukosa) selain dipengaruhi oleh konsentrasi inokulum mikroba dan lama hidrolisis juga dipengaruhi oleh beberapa faktor lain diantaranya: kondisi media, pH, serta suhu pada saat inkubasi (Rofik, S, dkk, 2013), sehingga jika pH dalam larutan, kondisi media maupun suhu pada saat inkubasi mikroba tidak sesuai, maka pertumbuhan mikroba untuk menghasilkan enzim selulase kurang maksimal dan kadar glukosa yang dihasilkan cenderung rendah, disamping itu proses pretreatment yang tidak sempurna dapat menyebabkan lignin belum hilang sepenuhnya.

4. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa Perbedaan konsentrasi inokulum dan lama hidrolisis *bagasse* oleh *Aspergillus niger* pada proses produksi bioetanol berpengaruh terhadap kadar bioetanol *bagasse*. Kadar bioetanol *bagasse* tertinggi terdapat pada perlakuan konsentrasi inokulum 0,6 ml/g dan lama hidrolisis 72 jam (P₃K₃) yaitu 68%, sedangkan kadar bioetanol terendah terdapat pada perlakuan konsentrasi inokulum 0 ml/g dan lama hidrolisis 24 jam (P₀K₁) yaitu 39%.



5. SARAN

Peneliti selanjutnya dapat meneliti kadar bioetanol dengan menggunakan metode hidrolisis kapang yang berbeda, sehingga dapat mengetahui karakteristik dan potensi mikroba pada proses hidrolisis secara enzimatik dalam memproduksi bioetanol.

6. DAFTAR PUSTAKA

- Azizah, N., Mulyani, S. (2012). Pengaruh Lama Fermentasi Terhadap Kadar Alkohol, pH, Dan Produksi Gas Pada Proses Fermentasi Bioetanol Dari Whey Dengan Substitusi Kulit Nanas. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*, 1 (2): 72-77.
- Devi, M, C and Kumar, M, S. (2012). Production Optimization and Partial Purification of Cellulase by *Aspergillus niger* Fermented With Paper and Timber Sawmill Industrial Wates. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*. 2 (1): 120-128.
- Gunam, I., Aryanta, W, R., Darma, B, N, S. (2011). Produksi Selulase Kasar Dari Kapang *Trichoderma viride* Dengan Perlakuan Konsentrasi Substrat Ampas Tebu Dan Lama Fermentasi. *Jurnal Biologi*, 15 (2): 29-33.
- Gunam, I., Wartini, N., Anggraeni, A., Suparyana, P. (2011). Delignifikasi Ampas Tebu Dengan Larutan Natrium Hidroksida Sebelum Proses Sakarifikasi Secara Enzimatik Menggunakan Enzim Selulase Kasar Dari *Aspergillus niger* FNU 6018. *Jurnal Teknologi Indonesia*. 34 (3): 24-32.
- Hermiati, E., Mangunwidjaja, D., Sunarti, T., Suparno, O., Prasetyo, B. (2010). Pemanfaatan Biomassa Lignoselulosa Ampas Tebu Untuk Produksi Bioetanol. *Jurnal Litbang Pertanian*. 29 (4): 121-130.
- Kurniasari, L., Hartati, I., Yulianto, M, E. (2008). Kajian Hidrolisa Enzimatik Jerami Padi Untuk Produksi Bioetanol. *Momentum*, 4 (1): 56-64.
- Lud, Waluyo. 2011. *Mikrobiologi Umum*. Malang: UMM Press.
- Marlina, E., T., Balia, R., L., dan Harlia, E. 2011. *Pengaruh Imbangan Lumpur Susu dan Tepung Onggok Terhadap Pertumbuhan Aspergillus niger dan Ph Produk Fermentasi*. Fakultas Peternakan Universitas Padjadjaran Bandung.
- Pujiati. 2014. Biodegradasi Bagasse Oleh Kapang *Aspergillus niger*. *Prosiding Seminar Nasional Pendidikan Sains UNESA*. Jurusan Pendidikan Biologi IKIP PGRI Madiun.
- Purwoko, T. 2009. *Fisiologi Mikroba*. Jakarta: Bumi Aksara.
- Rofik, S dan Riwayati, I. (2013). Pengaruh Waktu Terhadap Kandungan Glukosa Pada Reaksi Hidrolisa Enzimatik Daun Api-api (*Avecennia alba*) dengan Menggunakan Selulase. *Prosiding SNST ke-4 Fakultas Teknik Universitas Wahid Hasyim Semarang*. (A.1): 1-5
- Usmana, S, A., Rianda, S., Novia. (2012). Pengaruh Volume Enzim Dan Waktu Fermentasi Terhadap Kadar Etanol (Bahan Baku Tandan Kosong Kelapa Sawit Dengan Pretreatment Alkali). *Jurnal Teknik Kimia*. 18 (2): 17-25.