

PENENTUAN KADAR ETANOL HASIL FERMENTASI SECARA ENZIMATIS

DETERMINATION OF ETHANOL CONTENT FROM ENZYMATIC FERMENTATION

Hermansyah* dan Novia

Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sriwijaya
Jalan Raya Palembang Prabumulih KM 32 Indralaya Ogan Ilir Sumatera Selatan

*e-mail. : hermansyah@unsri.ac.id

ABSTRAK

Pengembangan sumber energi terbarukan bioetanol membutuhkan metode analisis produk bioetanol secara cepat dan akurat. Pada penelitian ini akan dilakukan pengukuran etanol produksi fermentasi hidrolisat dari tandan kosong kelapa sawit (TKKS), ampas tebu, dan jerami padi. Reaksi didasarkan pada reaksi enzimatik. Etanol dioksidasi oleh nikotinamida-adenin dinukleotida (NAD^+) menjadi asetaldehid dalam keberadaan enzim alkohol dehidrogenase (ADH), dan asetaldehid secara kuantitatif dioksidasi menjadi asam asetat dengan keberadaan aldehid dehidrogenase (AL-DH). NADH yang terbentuk ditentukan absorbansinya dengan spektrofotometer 334 nm, 340 nm, atau 365 nm. Hasil penelitian menunjukkan bahwa fermentasi yang dilakukan selama dua hari sudah menghasilkan etanol dengan kadar masing-masing 0,1368% (v/v); 0,1317% (v/v); dan 0,1149% (v/v) dari hidrolisat TKKS, jerami padi, dan ampas tebu.

Kata kunci: etanol, metode enzimatik, nikotinamida-adenin dinukleotida

ABSTRACT

Development of bioethanol as a renewable energy requires analysis method of bioethanol product fastly and precisely. In this research, ethanol concentration as a fermented product of empty fruit bunches from oil palm, sugarcane bagasse, and rice straw hydrolysates were measured. This reaction was based on enzymatic reaction bioanalysis. Ethanol was oxidized to acetaldehyde by nicotinamide-adenine dinucleotide (NAD^+) in the presence of the enzyme alcohol dehydrogenase (ADH), and acetaldehyde was quantitatively oxidized to acetic acid in the presence of aldehyde dehydrogenase (AL-DH). NADH was determined by its absorbance at 334, 340, or 365 nm. Results showed that fermentation of samples for two days had produced ethanol 0.1368% (v/v), 0.1317% (v/v) and 0.1149% (v/v) from empty fruit bunches from oil palm, rice straw, and sugarcane bagasse hydrolysates, respectively.

Keywords : ethanol, enzymatic method, nicotinamide-adenine dinucleotide

PENDAHULUAN

Etanol atau etil alkohol, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, umumnya disebut dengan alkohol merupakan cairan tidak berwarna, mudah menguap, dan mudah terbakar.

Etanol sering digunakan dalam kehidupan sehari-hari untuk berbagai keperluan, misalnya sebagai pelarut berbagai bahan kimia seperti pelarut parfum, pelarut obat-obatan, maupun pengekstrak berbagai senyawa polar

dalam isolasi dan sintesis senyawa kimia. Kegunaan lain seperti sebagai zat antiseptik, minuman beralkohol, obat psikotik, termoter modern, hingga sebagai energi terbarukan (*renewable energy*) (Pijen *et al.*, 2006)

Pada beberapa buah-buahan seperti durian terdapat kandungan alkohol dalam kadar rendah. Reaksi pembuatan etanol dapat berdasarkan reaksi non enzimatis dan reaksi enzimatis. Sintesis etanol non enzimatis misalnya pada hidrasi etilena menggunakan katalis asam. Etanol dapat diproduksi dari bahan yang mengandung karbohidrat dengan bantuan mikroorganisme yang disebut dengan fermentasi. Mikroorganisme umumnya yang digunakan pada proses fermentasi tersebut adalah khamir *Saccharomyces cerevisiae*. Reaksi pembuatan etanol dengan bantuan *S.cerevisiae* merupakan reaksi enzimatis dengan melibatkan berbagai enzim untuk mengkonversi glukosa menjadi etanol. Pengembangan proses pembuatan etanol secara fermentasi akhir-akhir ini menjadi sangat populer dalam produksi sumber energi terbarukan bioetanol (Gray *et al.*, 2006).

Produksi bioetanol generasi pertama menggunakan bahan baku berpati seperti ubi, gandum, jagung menjadi etanol. Saat ini juga dikembangkan produksi bioetanol generasi kedua menggunakan bahan baku biomasa lignoselulosa. Hidrolisis lignoselulosa dapat dilakukan secara fisik, kimia, biologis ataupun kombinasinya (Sun and Chen, 2002). Hidrolisis lignoselulosa menghasilkan utamanya xilosa dan arabinosa selain glukosa. Khamir *S.cerevisiae wild type* hanya dapat memfermentasi glukosa, dan tidak dapat mengkonversi arabinosa dan xilosa menjadi etanol. Sehingga untuk mendapatkan jumlah etanol yang optimal perlu dilakukan rekayasa genetika terhadap khamir *S.cerevisiae*

atau menskrining mikroorganisme lain yang memiliki enzim-enzim yang terlibat dalam konversi glukosa, xilosa maupun arabinosa menjadi etanol (Karhumaa *et al.*, 2006).

Analisis kuantitatif terhadap sampel yang mengandung etanol sangat diperlukan. Analisis berkaitan berbagai aspek seperti berapa kandungan etanol dalam berbagai produk buah-buahan, analisis forensik terhadap orang mabuk karena minuman beralkohol, dan berapa banyak dihasilkan dari konversi bahan baku lignoselulosa menjadi etanol. Metode yang sering digunakan adalah menggunakan kromatografi gas, atau metode yang lebih sederhana dengan mengukur berat jenis. Akhir-akhir ini, salah satu metode yang sedang berkembang adalah menggunakan reaksi enzimatis dan selanjutnya diukur Spektrofotometer (Benjaphokee *et al.*, 2012).

Krisis energi menstimulasi perkembangan sumber energi terbarukan yang salah satunya adalah bioetanol. Berbagai bahan baku yang berpotensi untuk dapat dikonversi menjadi etanol telah dan sedang dieksplorasi. Mulai dari produksi bioetanol generasi pertama dari bahan baku pati-patian seperti singkong, gandum, jagung, dan sebagainya, hingga produksi bioetanol generasi kedua dari bahan baku biomasa lignoselulosa seperti tandan kosong kelapa sawit (TKKS), ampas tebu, jerami padi, serbuk gergaji, dan lain sebagainya (Cardona *et al.*, 2010; Talebnia *et al.*, 2010). Biomasa lignoselulosa merupakan limbah yang banyak diproduksi, sehingga pemanfaatan bahan baku tersebut akan memiliki dua aspek pemecahan masalah yaitu aspek krisis energi dan aspek lingkungan.

Pada penelitian ini, penentuan kadar etanol dari produk fermentasi TKKS, ampas tebu, dan jerami padi

dilakukan berdasarkan reaksi enzimatik atau disebut *Enzymatic Bioanalysis*. TKKS merupakan reaksi enzimatik berdasarkan oksidasi etanol oleh nikotinamid-adenin dinukleotida ((NAD) dengan bantuan enzim alkohol dehidrogenase (ADH). NADH yang terbentuk diukur dengan spektrofotometer pada daerah panjang gelombang Ultra Violet yaitu 334, 340, atau 365 nm. Dengan menggunakan metode enzimatik bioanalisis ini pengukuran kadar etanol dapat berlangsung secara cepat dan akurat.

METODELOGI PENELITIAN

Bahan yang digunakan

Sampel-sampel biomassa lignoselulosa seperti limbah TKKS, ampas tebu, dan jerami padi. Isolat khamir yang diperoleh dari minuman tuak T4, T5, dan T10. Khamir *Saccharomyces cerevisiae* dengan genotif *MATa met15Δ0 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0* (Benjaphokee *et al.*, 2011). Media cair Yeast extract- Peptone-Dextrose (YPD) yang mengandung 10 g yeast extract, 20 g pepton, 20 g glukosa, air hingga 1 L yang disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121 °C, tekanan 15 psi selama 15 menit. Kadar etanol ditentukan dengan *enzymatic bioanalysis* menggunakan UV method (Boeringer Mannheim, 2011)

Preparasi sampel

Sampel-sampel TKKS, ampas tebu dan jerami padi dibersihkan, dikeringkan, dan dihaluskan hingga ukuran 100 mesh. Untuk menghilangkan kadar lignin atau delignifikasi, sampel di pretreatment menggunakan asam HCl pekat. Sedangkan hidrolisis dilakukan menggunakan HCl dan steam explosion pada 12 °C selama 20 menit. Selanjutnya sampel dicuci dengan air steril hingga pH normal

Fermentasi

Sampel-sampel dilarutkan dalam air hingga berbentuk bubur, ditambahkan *S.cerevisiae* yang telah diinokulasi dan dikultivasi hingga *mid* logaritma $OD_{660} = 0,8-1,0$. Sebanyak 1/100 volume sampel. Inkubasi pada temperatur 30 °C selama 2 hari hingga terbentuk etanol.

Penentuan kadar etanol dengan secara *enzymatic bioanalysis* yang diukur secara UV metode

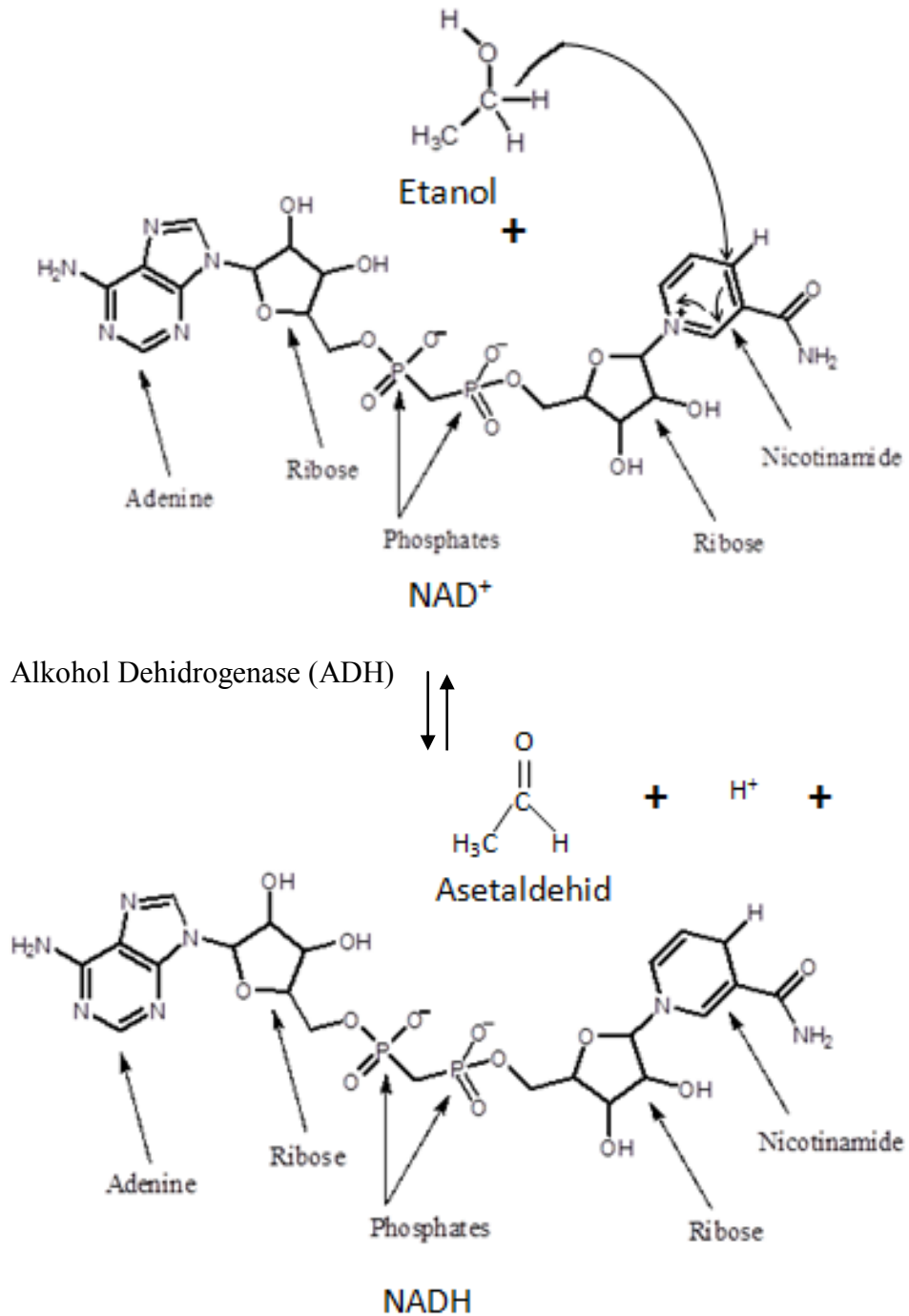
Kit Raegent *enzymatic bioanalysis* (Boeringer Mannheim, 2011) terdiri atas 4 botol. Botol 1 berisi bufer potasium difosfat pH 8,9, botol 2 berisi tablet yang mengandung nikotinamida-adenin dinukleotida 4 mg, aldehyd dehidrogenase 0,8 unit, dan botol 3 berisi alkohol dehidrogenase (ADH) 7000 unit, dan botol 4 berisi larutan etanol kontrol. Larutan botol 1 yang tidak diencerkan disebut juga larutan 1. Larutan 2 dibuat dengan melarutkan tablet dari botol dua ke dalam larutan bufer botol. Larutan 3 merupakan larutan botol 3 yang tidak diencerkan. Tambahkan ke dalam 3 mL larutan 2, kedalam 0,1 mL sampel atau 0,1 mL air redistilasi sebagai blanko. Campurkan dengan baik dan homogen campuran di atas, setelah 3 menit baca dengan segera larutan pada panjang gelombang 334 nm, 340 nm, atau 365 nm dan dicatat sebagai A1. Selanjutnya tambahkan 0,5 mL larutan 3, inkubasi selama 5-10 menit supaya reaksi berlangsung sempurna, dan baca larutan pada panjang gelombang 334 nm, 340 nm, atau 365 nm dan dicatat sebagai A2. Perbedaan pengukuran absorbansi (A2-A1) sampel dihitung dengan $\Delta A = (A2 - A1)$ sampel - (A2 - A1) blanko.

HASIL DAN PEMBAHASAN

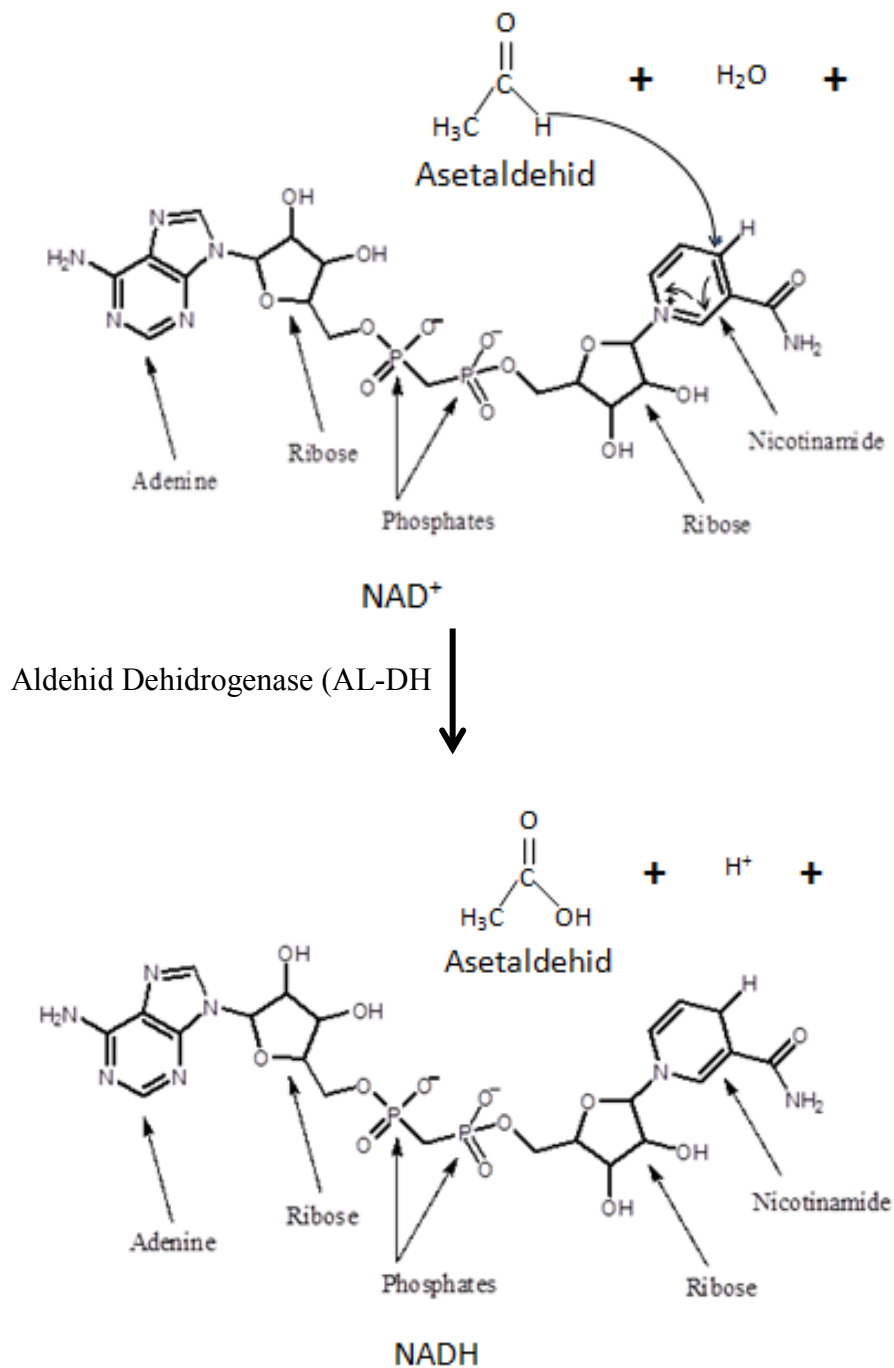
Pengukuran etanol secara enzimatik atau disebut dengan *enzymatic bioanalysis* ini didasarkan pada reaksi berikut. Etanol

dioksidasi oleh nikotinamida-adenin dinukleotida (NAD^+) menjadi asetaldehid dalam keberadaan enzim

alkohol dehidrogenase (ADH), seperti reaksi berikut (**Gambar 1**).



Gambar 1: Reaksi oksidasi etanol (Boeringer Mannheim, 2011)



Gambar 2. Reaksi oksidasi asetaldehid (Boeringer Mannheim, 2011)

Kesetimbangan reaksi oksidasi etanol (**Gambar 1**) terletak pada sisi etanol dan NAD^+ . Kesetimbangan reaksi dapat berpihak ke arah sebelah kanan, yaitu asetaldehid, NADH , dan H^+

jika kondisi reaksi adalah basa dan menjebak asetaldehid. Asetaldehid secara kuantitatif dioksidasi menjadi asam asetat dengan keberadaan aldehyd dehidrogenase (AL-DH) (**Gambar 2**).

NADH yang terbentuk ditentukan absorbansinya dengan spektrofotometer 334 nm, 340 nm, atau 365 nm. NAD adalah koenzim yang mengandung nikotinamida yang berfungsi sebagai pembawa atom hidrogen dan elektron pada beberapa reaksi oksidasi (Berg *et al*, 2001).

Perhitungan kadar etanol sesuai dengan jumlah NADH yang terbentuk adalah stoikiometri dengan setengah jumlah substrat menghasilkan sebagai berikut ($0,7256/ \epsilon$) yang dikalikan dengan ΔA , sedangkan nilai ϵ pada panjang gelombang 340 nm adalah $6,3 \text{ l.mmol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. Hasil pengukuran terhadap sampel-sampel TKKS, jerami padi, dan ampas tebu (**Tabel 1**) bahwa etanol sudah mulai terbentuk pada inkubasi fermentasi selama dua hari, sehingga hasil pengukuran etanol ini bukan merupakan hasil optimal etanol yang dihasilkan dari produk fermentasi tersebut.

Tabel 1. Konsentrasi etanol dari sampel hidrolisat TKKS jerami padi, dan ampas tebu yang difermentasi selama 2 hari dengan metode enzimatis.

No	Sampel	Konsentrasi Etanol (%(v/v))
1	TKKS	0,1368
2	Jerami Padi	0,1317
3	Ampas Tebu	0,1149

Perbedaan konsentrasi etanol yang dihasilkan oleh fermentasi TKKS, jerami padi, dan ampas tebu dikarenakan hasil hidrolisisnya menghasilkan jumlah glukosa yang berbeda.

KESIMPULAN

1. Pengembangan pengukuran konsentrasi etanol dapat dilakukan berdasarkan reaksi reaksi enzimatis oleh enzim alkohol dehidrogenase

(ADH) dan aldehid dehidrogenase (AL-DH) dengan bantuan koenzim nikotinamida adenin dinukleotida (NAD).

2. Pengukuran etanol hasil fermentasi hidrolisat TKKS, jerami padi, dan ampas tebu menghasilkan etanol berturut-turut 0,1368%(v/v); 0,1317%(v/v); dan 0,1149%(v/v).

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh hibah penelitian Kolaborasi Internasional 2014. Terima kasih kami ucapkan kepada Prof. Satoshi Harashima atas penggunaan *Saccharomyces cerevisiae wild type*.

DAFTAR PUSTAKA

- Benjaphokee, S., Hasegawa, D., Yokota, D., Asvarak, T., Auesukaree, C., Sugiyama, M., Kaneko, Y., Boonchird, C., Harashima, S., 2012, Highly efficient bioethanol production a *Saccharomyces cerevisiae* strain with multiple stress tolerance to high temperature, acid, and ethanol, *N. Biotechnol.* 15;29(3):379-86
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., 2001, *Biochemistry*, Fifth Edition, W.H., Freeman and company, Newyork.
- Boeringer Mannheim, 2011. Ethanol UV-Method, Cat.No. 10 176 290 035.
- Cardona, C.A., Quintero, J.A., Paz, I.C., 2010, Production of Bioethanol from Sugarcane Bagasse: Status and Perspectives, *Bioresour. Technol.* 101(13), 4754-66
- Gray, K.A., Zhao, L., Emptage, M., 2006, Bioethanol, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 10, 141-6.
- Karhumaa, K., Wiedermann, B., Hahn-Hagerdal, B., Boles, E., Gorwa-

- Grauslund, M.F., 2006, Co-utilization of L-arabinose and D-xylose by laboratory and industrial *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbiol Cell Factories* 5, 18.
- Pejin, D.J., Vucuroviic, V.M., Popov, S.D., Dodic, J.M., and, Dodic S.N., 2006, Production of ethanol from Kantata Wheat Variety, *APTEFF*, 37, 1-192.
- Sun, Y., and Chen, J., 2002, Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production : a review, *Bioresource Technol.*, 83, 1-11
- Talebna, F., Karakashev D, Angelidaki, I., 2010, Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation, *Bioresour Technol.* 101(13), 4744-53