

## PRODUKSI BIOETANOL DARI LIMBAH BATANG KELAPA SAWIT (*Elaeis guineensis*) MENGGUNAKAN *Zymomonas mobilis* DENGAN PERLAKUAN *CRUDE ENZIM Trichoderma reesei* DAN *Aspergillus niger*

Sindhea Nurmala Santi, Trianik Widyaningrum\*  
Universitas Ahmad Dahlan  
[\\*trianik.widyaningrum@pbio.uad.ac.id](mailto:trianik.widyaningrum@pbio.uad.ac.id)

### ABSTRAK

Bioetanol menjadi salah satu energi alternatif yang mulai dibutuhkan, seiring menipisnya cadangan minyak bumi. Bioetanol dapat diperoleh dari berbagai limbah antara lain limbah batang kelapa sawit yang mengandung selulosa sebesar 86,03%. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui produksi bioetanol dari limbah batang kelapa sawit dengan perlakuan crude enzim *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger*. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen menggunakan Rancangan Acak Lengkap, yaitu rasio crude enzim dari *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger* (0:0), (1:0), (0:1), (1:1), (2:1), (1:2), (3:1), (1:3) terhadap kadar gula dan bioetanol hasil fermentasi limbah batang kelapa sawit menggunakan *Zymomonas mobilis*. Kadar gula diukur menggunakan metode DNS, kadar bioetanol menggunakan alkoholmeter. Data dianalisis menggunakan one way ANOVA. Hasil penelitian menunjukkan bahwa crude enzim *T. reesei* dan *A. niger* dapat meningkatkan kadar gula, yaitu pada rasio crude enzim *T. reesei* dan *A. niger* 3:1 (11,89 g/mL). Kadar bioetanol tertinggi pada rasio crude enzim *T. reesei* dan *A. niger* (2:1), sebesar 2,34%.

**Kata Kunci:** *Aspergillus niger*, Bioetanol, Batang Kelapa Sawit, *Trichoderma reesei*, *Zymomonas mobilis*

### ABSTRACT

Bioethanol is an alternative energy that is starting to be needed, along with the depletion of petroleum reserves. Bioethanol can be obtained from various wastes, including palm oil trunk waste which contains 86.03% cellulose. The purpose of this study was to determine the production of bioethanol from oil palm trunk waste by treatment with crude enzymes *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger*. This research is an experimental study using a completely randomized design, namely the ratio of crude enzymes from *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* (0:0), (1:0), (0:1), (1:1), (2:1), (1:2), (3:1), (1:3) on sugar and bioethanol content of fermented oil palm stem waste using *Zymomonas mobilis*. Sugar content was measured using the DNS method, bioethanol content was measured using an alcoholmeter. Data were analyzed using one way ANOVA. The results showed that the crude enzymes *T. reesei* and *A. niger* could increase the sugar content, namely the ratio of crude enzymes *T. reesei* and *A. niger* 3:1 (11.89 g/mL). The highest bioethanol content was in the ratio of crude enzymes *T. reesei* and *A. niger* (2:1), which was 2.34%.

**Keywords:** *Aspergillus niger*, Bioethanol, Oil Palm Stem, *Trichoderma reesei*, *Zymomonas mobilis*

### PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara berkembang yang memiliki perkebunan kelapa sawit terbesar di dunia. Sebagian besar terdapat di Pulau Sumatera, Kalimantan, dan Sulawesi.

Perkebunan kelapa sawit akan mengalami masa peremajaan (*replanting*), saat umur tanaman sudah mencapai 25 tahun. Peremajaan adalah penggantian tanaman kelapa sawit yang sudah tidak memproduksi buah lagi dengan tanaman yang baru (Apriyanto *et al.*, 2020). Batang kelapa

sawit memiliki kandungan lignoselulosa yang tinggi (Suyanto *et al.*, 2015), terutama kandungan selulosa sebesar 86,03%. Kandungan ini lebih tinggi dibandingkan pada tandan kosong 78,85%, daun 69,89%, dan akar 67,89% (Winarni *et al.*, 2015). Selulosa merupakan polimer linier D-glukosa yang terikat pada ikatan 1,4 glikosidik dan berasosiasi kuat dengan hemiselulosa dan lignin. Senyawa ini apabila dihidrolisis akan mampu menghasilkan glukosa (Lestari *et al.*, 2018).

Hidrolisis bahan lignoselulosa dapat dengan bantuan jamur *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger*. *Aspergillus niger* menghasilkan  $\beta$ -glukosidase yang tinggi, namun sebaliknya untuk *Trichoderma reesei* menghasilkan dalam jumlah sedikit. Jamur selulolitik tersebut mampu menguraikan selulosa menjadi glukosa (Kodri *et al.*, 2013). Glukosa merupakan salah satu bahan utama dalam pembuatan energi alternatif, yaitu bioetanol. Bioetanol merupakan suatu cairan kimia, diperoleh dari hasil proses fermentasi yang dibantu dengan mikroorganisme. Fermentasi untuk menghasilkan cairan bioetanol menggunakan bahan-bahan yang mengandung gula, seperti glukosa, pati, dan serat (Widyaningrum & Parahadi, 2020).

Fermentasi untuk menghasilkan bioetanol memerlukan bantuan bakteri seperti *Z. mobilis*. Bakteri tersebut mampu bekerja lebih spesifik dari pada khamir (Albert *et al.*, 2015). Selain itu, keunggulan dari bakteri *Z. mobilis* yaitu memiliki toleran terhadap kadar etanol yang tinggi, dan mampu mengkonversi glukosa dari bahan lignoselulosa dengan baik (Lestari *et al.*, 2018). Bakteri *Z. mobilis* menggunakan jalur Entner-Doudoroff dalam fermentasi. Energi yang dihasilkan dari proses tersebut akan menyebabkan *Z. mobilis* memiliki cukup energi untuk menguraikan glukosa (Kusumaningati *et al.*, 2013).

## **METODE**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen. Bahan yang digunakan adalah

batang kelapa sawit yang diperoleh dari perkebunan kelapa sawit di Provinsi Jambi. Mikroorganisme yang digunakan yaitu jamur *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger*, serta bakteri *Zymomonas mobilis*. NaOH untuk proses *pretreatment*, dan bahan untuk proses hidrolisis yaitu larutan nutrisi (untuk 1000 mL diperlukan 3 gr urea, 3 gr (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 3 gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,5 gr MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 1,5 gr CaCl). Bahan untuk penumbuhan jamur *T. reesei* dan *A. niger* yaitu PDA (*Potatoes Dextrose Agar*), untuk bakteri *Zymomonas mobilis* yaitu media padat NA (*Natrium Agar*) dan media cair NB (*Natrium Broth*). Pengukuran kadar gula menggunakan bahan DNS (Dinitrosalisilat), Asam dinitro, Sodium sulfat, NaOH, aquades, dan Garam Rochelle 40%.

### **Penumbuhan Jamur *T. reesei* dan *A. niger***

Pembuatan media miring dilakukan dengan mendidihkan PDA 10 gr yang ditambahkan aquades 150 mL, dan dimasukkan dalam tabung reaksi. Sterilisasi dengan *autoclave* selama 15 menit dengan suhu 121°C. Selanjutnya dilakukan kultur jamur menggunakan ose bulat, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 6 hari untuk *T. reesei* dan 8 hari untuk *A. niger* (Widyaningrum *et al.*, 2017).

### **Proses Pre-treatment**

Batang kelapa sawit dikeringkan dan dihaluskan menjadi serbuk. Serbuk yang diperoleh selanjutnya dipanaskan dengan larutan NaOH hingga 40 menit dan diaduk (Kodri dkk., 2013). Serbuk selanjutnya disaring, dicuci dengan aquades, dan ditambahkan HCl hingga pH netral, lalu dikeringkan kembali dengan oven suhu 50°C.

### **Pembuatan Crude Enzim**

Biakan jamur *T. reesei* dan *A. niger* masing-masing dimasukkan dalam erlenmeyer yang berisi 50 mL larutan nutrisi dan 10 gr serbuk batang kelapa sawit. Erlenmeyer diinkubasi selama 8 hari, lalu ditambahkan 200 mL larutan Tween 80. Larutan dihomogenkan dengan *magnetic stirrer* selama 2 jam. Pemanenan

*crude* enzim menggunakan sentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Supernatan yang didapatkan dari *T. reesei* dan *A. niger* berupa *crude* enzim akan digunakan pada proses hidrolisis (Widyaningrum & Parahadi, 2020).

### Proses Hidrolisis

Bubuk batang kelapa sawit hasil *pretreatment* dipanaskan dengan aquades 1:10 dimasukkan dalam 24 botol UC masing-masing 100 mL. masing-masing botol UC ditambahkan *crude* enzim 10% dengan perbandingan rasio 0:0 ; 1:0 ; 0:1 ; 1:1 ; 2:1 ; 1:2 ; 3:1 ; 1:3 untuk 3 kali pengulangan. Botol UC ditutup rapat dan diinkubasi dengan suhu 37 °C selama 24 jam (Widyaningrum dan Parahadi, 2020). Hasil hidrolisis selanjutnya dilakukan pengukuran kadar gula menggunakan metode DNS, dan diukur dengan alat spektrofotometer.

### Penumbuhan Bakteri *Z. mobilis*

Bakteri *Z. mobilis* disubkulturkan pada media NA (*Nutrient Agar*) miring, dan diinkubasi selama 24 jam. Biakan bakteri *Z. mobilis* pada media miring dibiakkan kembali pada media cair NB (*Nutrient Broth*) 100 ml dan disimpan dalam inkubator (Kartikasari *et al.*, 2013).

### Proses Fermentasi

Substrat pada 24 botol UC hasil dari hidrolisis disterilkan dengan *autoclave* selama 15 menit, lalu masing-masing ditambahkan dengan 10 mL *Z. mobilis*. Fermentasi selama 5 hari, dan pengukuran kadar etanol menggunakan alkoholmeter (Kodri *et al.*, 2013).

### Pengukuran Kadar Gula

Pengukuran kadar gula menggunakan metode DNS. Hasil hidrolisis masing-masing diambil 0,5 mL, ditambahkan aquades 0,5 mL, dan larutan DNS 0,5 mL. Panaskan dengan *waterbath* selama 5 menit, lalu ditambahkan 0,5 mL Garam Rochelle dan divortex. Larutan sudah bisa diukur menggunakan spektrofotometer

dengan panjang gelombang 540 (Kodri *et al.*, 2013).

### Pengukuran Kadar Bioetanol

Bioetanol didapatkan dari proses destilasi pada 24 botol UC, dan diukur kadar etanol menggunakan Alkoholmeter. Rumus yang digunakan untuk kadar etanol sebagai berikut:

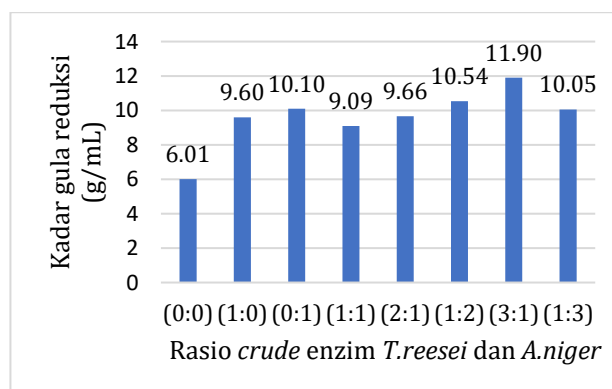
$$\text{Kadar etanol} = \frac{\text{Volume destilat}}{\text{Volume awal sampel}} \times \text{hasil pengukuran alkohol meter}$$

(Kodri *et al.*, 2013).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Kadar Gula Reduksi Batang Kelapa Sawit setelah Perlakuan *Crude* Enzim *T. reesei* dan *A. niger*

Hasil pengukuran kadar gula tertinggi pada batang kelapa sawit setelah perlakuan *crude* enzim *T. reesei* dan *A. niger* yaitu (3:1), yaitu 11,89 g/mL, berbeda jauh dengan kadar gula sebelum mendapat perlakuan, yaitu hanya sebesar 6,01 g/mL. Pengukuran kadar gula setelah perlakuan dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Rerata kadar gula reduksi batang kelapa sawit setelah perlakuan rasio *crude* enzim *T.reesei* dan *A.niger*.

Berdasarkan hasil pengukuran pada Gambar 1, dilakukan uji *one way* Anova dan mendapatkan Sig 0,001 < 0,05, yang menandakan bahwa terdapat perbedaan nyata pada tiap perlakuan terhadap kadar gula setelah perlakuan *crude* enzim *T. reesei* dan *A. niger*. Oleh karena itu, dilanjutkan dengan uji lanjut BNT 5%

## Sindhea Nurmalia Santi dan Trianik Widyaningrum,

Produksi Bioetanol dari Limbah Batang Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis*) Menggunakan *Zymomonas mobilis* dengan Perlakuan Crude Enzim *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger*  
Jurnal Biolokus: Jurnal Penelitian Pendidikan Biologi dan Biologi Vol.5 (1)

untuk melihat perbedaan pada tiap perlakuan, dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil uji lanjut kadar gula batang kelapa sawit setelah perlakuan rasio *crude* enzim *T.reesei* dan *A.niger*.

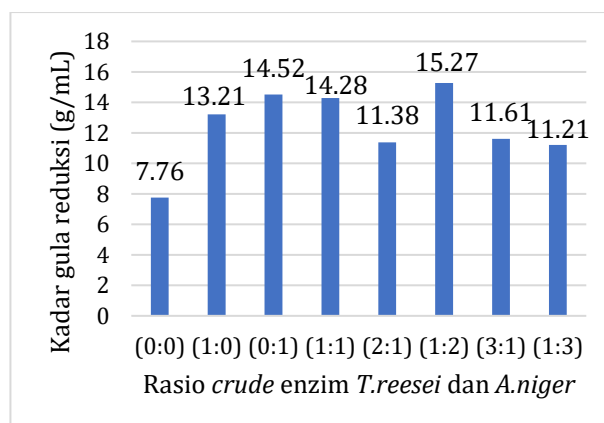
Perlakuan setelah diberi <i>crude</i> enzim	N	Uji Duncan (0.05)		
		Subset		
		1	2	3
(0:0)	3	6.01		
(1:1)	3		9.08	
(1:0)	3		9.60	
(2:1)	3		9.66	
(1:3)	3		10.05	10.05
(0:1)	3		10.10	10.10
(1:2)	3		10.53	10.53
(3:1)	3			11.89

Hasil dari uji lanjut didapatkan bahwa tiap letak kolom subset menunjukkan beda nyata dari tiap perlakuan rasio *crude* enzim *T.reesei* dan *A.niger*. Perbedaan kadar gula yang cukup tinggi antara sebelum perlakuan dan sesudah perlakuan *crude* enzim menandakan bahwa kombinasi dari kedua *crude* enzim dari *T. reesei* dan *A. niger* mampu menghasilkan enzim selulase yang berpotensi tinggi untuk menguraikan struktur selulosa menjadi glukosa (Oktavia *et al*, 2014).

Gula reduksi yang meningkat setelah perlakuan dengan *crude* enzim disebabkan oleh *T. reesei* dan *A. niger* mampu menghasilkan enzim selulase yang dapat menghasilkan glukosa dengan menghidrolisis selulosa dan hemiselulosa (Widyaningrum & Parahadi, 2020). *T. reesei* mampu menghasilkan enzim endo- $\beta$ -1,4-glukanase dan ekso- $\beta$ -1,4-glukanase sebanyak 80% (Kodri *et al.*, 2013). Sedangkan *A. niger* mampu menghasilkan  $\beta$ -Glukanase yang tinggi. Sehingga kombinasi dari kedua *crude* enzim *T. reesei* dan *A. niger* akan berpotensi tinggi untuk menghasilkan kadar gula dari bahan yang mengandung selulosa (Kavanagh, 2011).

## Kadar Gula Reduksi Batang Kelapa Sawit setelah Fermentasi menggunakan *Z. mobilis*

Hasil pengukuran kadar gula batang kelapa sawit setelah fermentasi menggunakan *Z. mobilis* dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Kadar gula reduksi batang kelapa sawit setelah fermentasi menggunakan *Z. mobilis*

Berdasarkan hasil pengukuran gula setelah fermentasi menggunakan *Z. mobilis*, dilakukan uji *one way* Anova dan didapatkan Sig > 0,05, sehingga tidak terdapat perbedaan nyata pada tiap perlakuan. Kadar gula terlihat naik pada beberapa rasio. Hal tersebut tidak sesuai dengan pendapat Bagaskara *et al.* (2020) yang menyebutkan bahwa proses fermentasi dalam memproduksi bioetanol akan menyebabkan penurunan kadar gula.

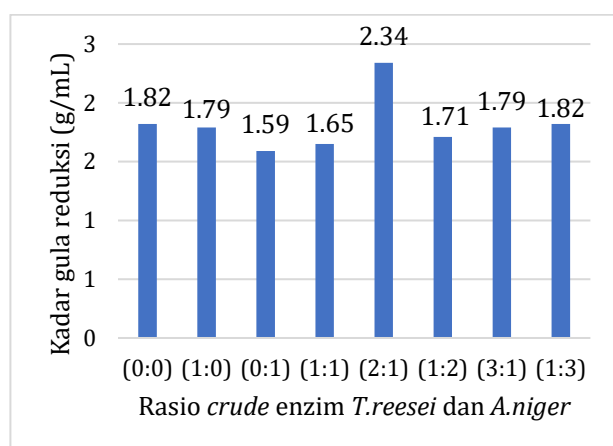
## Kadar Etanol Batang Kelapa Sawit setelah Fermentasi menggunakan *Z. mobilis*

Berdasarkan hasil penelitian didapatkan kadar etanol tertinggi pada rasio *crude* enzim *T. reesei* dan *A. niger* (2:1) sebesar 2,34%, dapat dilihat pada Gambar 3. *Z. mobilis* menggunakan jalur glikolisis Entner-Doudoroff dalam fermentasi, dan akan mengkonversi glukosa menjadi 2 molekul bioetanol dan satu molekul energi berupa ATP (Febriani *et al.*, 2020). Energi yang dihasilkan tersebut akan menyebabkan

## Sindhea Nurmalia Santi dan Trianik Widyaningrum,

Produksi Bioetanol dari Limbah Batang Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis*) Menggunakan *Zymomonas mobilis* dengan Perlakuan Crude Enzim *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger*  
Jurnal Biolokus: Jurnal Penelitian Pendidikan Biologi dan Biologi Vol.5 (1)

*Z. mobilis* memiliki kecepatan tinggi untuk menguraikan glukosa (Kusumaningati *et al.*, 2013). Namun, tidak selalu kandungan glukosa yang tinggi akan menghasilkan kadar etanol yang tinggi pula (Kartikasari *et al.*, 2013).



Gambar 3. Rerata kadar etanol batang kelapa sawit setelah fermentasi menggunakan *Z. mobilis*

## PENUTUP

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pemberian rasio *crude* enzim *T. reesei* dan *A. niger* yang berbeda mempengaruhi kadar gula yang dihasilkan batang kelapa sawit. Kadar gula tertinggi didapatkan pada *T. reesei* dan *A. niger* (3:1) sebesar 11,89 g/mL. Kadar etanol tertinggi didapatkan pada *T. reesei* dan *A. niger* (2:1) sebesar 2,34%. Saran untuk penelitian ini yaitu, perlunya dilakukan penelitian lanjut terhadap batang kelapa sawit menggunakan mikrobia lainnya untuk memproduksi bioetanol lebih tinggi.

## REFERENSI

Albert, Idiawati, N., & Rudiansyah. (2015). Pembuatan Bioetanol Menggunakan *Zymomonas mobilis* dari Limbah Tongkol Jagung. *JKK: Jurnal Kimia Khatulistiwa*, 4(2), 72–75.

Apriyanto, M., Fikri, K. N. S., Siregar, V. A., Jamri, & Azhar, A. (2020). Penyuluhan Tentang Peremajaan Kelapa Sawit dan Legalitas Lahan. *JPM: Jurnal Pengabdian Masyarakat*, 1(1), 1–6.

Bagaskara, A., Wijaya, I. M. M., & Antara, N. S. (2020). Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Penghasil Bioetanol dari Lingkungan Industri Arak di Desa Tri Eka Buana, Kecamatan Sidemen, Karangasem Bali. *Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri*, 8(2), 290–300.

Febriani, Y., Sidharta, B. R., & Pranata, F. S. (2020). Produksi Bioetanol Pati Umbi Talas (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) dengan Variasi Konsentrasi Inokulum dan Waktu Fermentasi *Zymomonas mobilis*, 5(2), 92–98.

Kartikasari, S. D., Nurhatika, S., & Muhibuddin, A. (2013). Potensi Alang-alang (*Imperata cylindrica* (L.) Beauv) dalam Produksi Etanol Menggunakan Bakteri *Zymomonas mobilis*. *Jurnal Sains Dan Seni Pomits*, 2(2), 2337–3520.

Kavanagh, K. (2011). *Fungi Biology and Application* (2nd ed.). Wiley-Blackwell.

Kodri, Argo, B. D., & Yulianingsih, R. (2013). Pemanfaatan Enzim Selulase dari *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger* sebagai Katalisator Hidrolisis Enzimatik Jerami Padi dengan Pretreatment Microwave. *Jurnal Bioproses Komoditas Tropis*, 1(1), 36–43.

Kusumaningati, M. A., Nurhatika, S., & Muhibuddin, A. (2013). Pengaruh Konsentrasi Inokulum Bakteri *Zymomonas mobilis* dan Lama Fermentasi Pada Produksi Etanol dari Sampah Sayur dan Buah Pasar. *Jurnal Sains dan Seni Pomits*, 2(2), 5–7.

Lestari, I., Sendri, D., & Laili, H. N. (2018). Pemanfaatan Limbah *Fiber Ex-Fibercyclone* dan Tandan Kosong Kelapa Sawit sebagai Bioetanol dengan Menggunakan Bakteri *Zymomonas mobilis*. *Jurnal Citra Widya Edukasi*, 10(3), 225–232.

**Sindhea Nurmalia Santi dan Trianik Widyaningrum,**

Produksi Bioetanol dari Limbah Batang Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis*) Menggunakan *Zymomonas mobilis* dengan Perlakuan Crude Enzim *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger*  
**Jurnal Biolokus: Jurnal Penelitian Pendidikan Biologi dan Biologi Vol.5 (1)**

- Lestari, M. D., Sudarmin, & Harjono. (2018). Ekstraksi Selulosa dari Limbah Pengolahan Agar Menggunakan Larutan NaOH sebagai Prekursor Bioetanol. *Indonesian Journal of Chemical Science*, 7(3), 236-241.
- Oktavia, F. I., Argo, B. D., & Lutfi, M. (2014). Hidrolisis Enzimatis Ampas Tebu (*Bagasse*) Memanfaatkan Enzim Selulase dari Mikrofungi *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger* Sebagai Katalisator dengan *Pretreatment Microwave*. *Jurnal Keteknik Pertanian Tropis dan Biosistem*, 2(3), 256-262.
- Suyanto, Matsunaga, K., Inoue, H., & Sakanishi, K. (2015). Produksi Bioetanol dari Batang Tua Kelapa Sawit dengan Air Panas Bertekanan dan (Ball Mill). *Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia (JBBI)*, 2(2), 49-54.  
<https://doi.org/10.29122/jbbi.v2i2.508>
- Widyaningrum, T., & Parahadi, M. (2020). "Bioethanol Levels of Dragon Fruit (*Hylocereus polyrhizus*) Peel with the Addition of Blend Crude Cellulase Enzyme from *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger*." *Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology*, 05(01), 1-5.  
<https://doi.org/10.22146/jtbb.52189>
- Widyaningrum, T., Prastowo, I., Parahadi, M., & Indriyanti, E. (2017). Production of Bioethanol from *Sargassum crassifolium* Using Cellulase Enzymes from *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger*. *International Conference on Natural and Social Sciences*. Palopo Cokroaminoto University.
- Winarni, I., Komarayati, S., & Bardant, T. B. (2015). Pembuatan Bioetanol Secara Enzimatis dari Limbah Batang Sawit (*Elaeis guineensis*) dengan Penambahan Surfaktan. *Jurnal Penelitian Hasil Hutan*, 34(2), 127-135.