

# EFEK CALCIUM PADA AKTIFITAS ENSIM PADA HIDROLISA ENSIMATIS KULIT SINGKONG UNTUK BAHAN BAKU BIOETHANOL

Lieke Riadi, Indra Lesmana, Surya Budi Widagdo dan Akbarningrum Fatmawati  
Jurusan Teknik Kimia, Universitas Surabaya, Surabaya, Indonesia  
Email: lieke@ubaya.ac.id

## Intisari

*Cassava waste consists of two parts : the cassava skin which is known as brown skin, and the white part which is attached to the brown skin. We are trying to utilize the cassava waste for making glucose as a material for bioethanol. The aim of this experiment is to learn the effect of slurry concentration and calcium ions concentration to cassava waste hydrolysis. There are two steps in this hydrolysis : liquefaction process using  $\alpha$ -amylase and saccharification process using glucoamylase. The liquefaction process was conducted at 95°C and the saccharification process was conducted at 60°C using Erlenmeyer flask as container for the media and cassava waste. The glucose concentration has been analyzed using DNS method. There was also qualitative analysis of calcium ions to determine how much calcium ions are utilized by enzyme. The experiment result shows that the higher concentration of slurry and calcium ions introduced to the media, the higher glucose concentration will be obtained. The optimum condition for this hydrolysis process cannot be determined yet, since the profile of glucose concentration,  $\text{CaCl}_2$  concentration and slurry concentration is continuously increased at the range data taken in the experiment which is shown by surface response method. Hence, broader range of the data will be needed for the next experiment to find the optimum condition. It is shown that the higher concentration of calcium will result in the higher enzyme activity. Highest concentration of glucose is obtained from 32% w/v slurry concentration and 50 ppm  $\text{CaCl}_2$  concentration which is 238,701 gram/L. All Calcium ion was used by enzyme to maintain its activity.*

*Keywords : hydrolysis, cassava, glucose,  $\alpha$ -amylase, glucoamylase*

## Pendahuluan

Dengan semakin berkurangnya suplai untuk memenuhi kebutuhan energi dunia, ketertarikan dunia dalam mencari sumber energi alternatif meningkat, produksi dan konsumsi ethanol meingkat cukup drastis selama beberapa tahun terakhir di beberapa bagian di dunia ( Srinorakutara *et.al*, 2004). Selama ini pemanfaatan biomassa sebagai energi alternatif yang telah dikembangkan ialah dari hasil pertanian seperti jagung, singkong, molase, ubi jalar, yang sebagian besar dapat digunakan sebagai bahan pangan baik untuk manusia maupun untuk ternak sehingga terjadi persaingan antar kepentingan. Beberapa residu pertanian seperti batang jagung, limbah gula, jerami, hasil buangan hutan mulai diteliti untuk digunakan pada produksi bioethanol (Lin and Tanaka, 2006). Oleh karena itu, dalam dua dekade ini penggunaan teknologi untuk memproduksi ethanol dari sumber-sumber yang bukan bahan makanan telah berkembang, salah satunya adalah limbah kulit singkong. Hasil limbah agroindustri ini masih banyak mengandung pati yang dapat dimanfaatkan untuk membuat bioethanol. Ada tiga tipe bahan baku yang digunakan pada fermentasi untuk pembuatan ethanol yaitu : gula, pati dan bahan serat/selulosa. Gula dapat dikonversi secara langsung menjadi ethanol, pati harus dihidrolisa menjadi gula dengan bantuan enzim yang kemudian dapat difermentasi menjadi ethanol. Sellulosa harus difermentasi terlebih dahulu dengan bantuan asam mineral, dan kemudian difermentasi menjadi ethanol. Hidrolisa pati merupakan tahapan yang penting dalam pengolahan pati menjadi ethanol yang dalam penelitian ini, akan dilakukan hidrolisa ensimatis. Hidrolisa ensimatis memiliki berbagai macam keuntungan, yaitu, dapat menghasilkan yield yang lebih besar, tingkat kemurnian yang lebih tinggi dan memfasilitasi kristalisasi. Banyak faktor-faktor dari kondisi operasi yang mempengaruhi hasil hidrolisa ensimatis pati. Faktor-faktor tersebut antara lain konsentrasi *slurry*, suhu, pH, cara pengaturan suhu, penambahan ion  $\text{Ca}^{2+}$ . Dengan meneliti kondisi optimum dari beberapa faktor kondisi operasi dalam penelitian ini yaitu konsentrasi *slurry* dan konsentrasi  $\text{CaCl}_2$ , dapat diperoleh suatu kerangka hidrolisa ensimatis pati yang optimum dalam batasan masalah penelitian ini. Dengan

demikian penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat selain untuk kepentingan membuat bioethanol dan juga dapat digunakan untuk kepentingan-kepentingan lainnya, seperti untuk kepentingan industri pangan misalnya.

### Metodologi

Bahan yang digunakan : bubuk kulit singkong,  $\alpha$ -amylase, glucoamylase ( yang terdiri dari perbandingan glucoamilase dan pululanase) 40 : 60.

Persiapan singkong :

- 1.Kulit bagian luar yang berwarna coklat dipisahkan dari kulit bagian dalam yang berwarna putih
- 2.Kulit bagian dalam dikeringkan kemudian dipotong.
- 3.Potongan kulit dihancurkan dan diayak untuk memperoleh padatan yang melewati ayakan 1-2 mm.
- 4.Padatan dikeringkan dalam oven pada suhu 55°C selama 24 jam dan kemudian disimpan pada suhu kamar.

Prosedur hidrolisa enzimatis :

- 1.Kulit singkong yang telah dihancurkan disuspensikan dalam 400 ml H<sub>2</sub>O.
- 2.Enzim  $\alpha$ -amylase dimasukkan dengan konsentrasi 0,15% v/w terhadap massa padatan. Hidrolisa dilakukan pada suhu 95°C selama 4 jam. Mendekati 4 jam, sampel diambil dan dianalisa dengan iodium.
- 3.Enzim glucoamylase dimasukkan dengan konsentrasi 0,25% v/w terhadap massa padatan. Hidrolisa dilakukan pada suhu 60°C selama 4 jam.
- 4.Sampel diambil secara berkala dan diletakkan dalam penangas air pada suhu 100°C selama 10 menit sebelum dianalisa kandungan gula pereduksinya.

Prosedur analisa : analisa kandungan gula dilakukan dengan metode DNS, dan uji kualitatif ion Ca dengan penambahan EBT.

Rancangan variabel desain eksperimen

Nilai variabel konsentrasi slurry dan konsentrasi CaCl<sub>2</sub> disesuaikan dengan cara pemilihan nilai variabel untuk metode *response surface* seperti tertulis pada Tabel I.

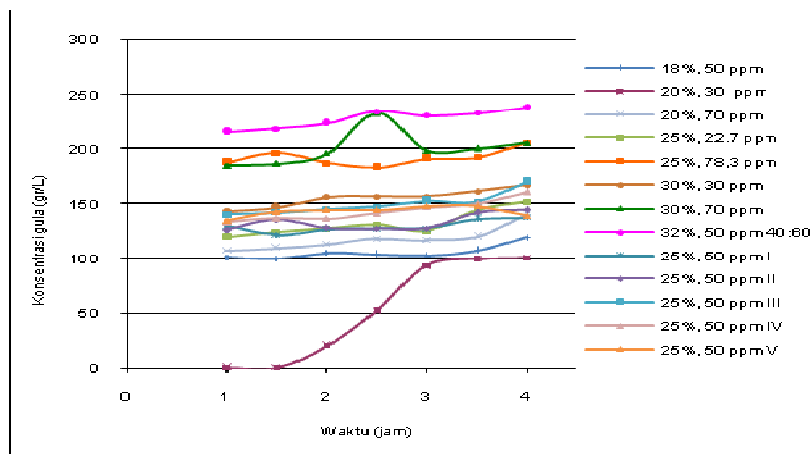
Tabel I. Kombinasi konsentrasi slurry dengan konsentrasi CaCl<sub>2</sub>

Konsentrasi slurry (%w/v)	Konsentrasi CaCl <sub>2</sub> (ppm)	Konsentrasi slurry (%w/v)	Konsentrasi CaCl <sub>2</sub> (ppm)
20	30	25	78,3
20	70	25	50
30	30	25	50
30	70	25	50
18	50	25	50
32	50	25	50
25	22,7		

### Hasil dan Pembahasan

Dari data analisa hasil hidrolisa enzimatis pati kulit singkong ( Gambar 1) dapat dilihat bahwa dengan bertambahnya waktu percobaan, konsentrasi glukosa yang dihasilkan meningkat. Selain itu teramati bahwa konsentrasi bubuk kulit singkong memiliki pengaruh yang signifikan terhadap konsentrasi glukosa yang dihasilkan, semakin tinggi konsentrasi bubuk kulit singkong semakin tinggi pula konsentrasi glukosa yang dihasilkan.





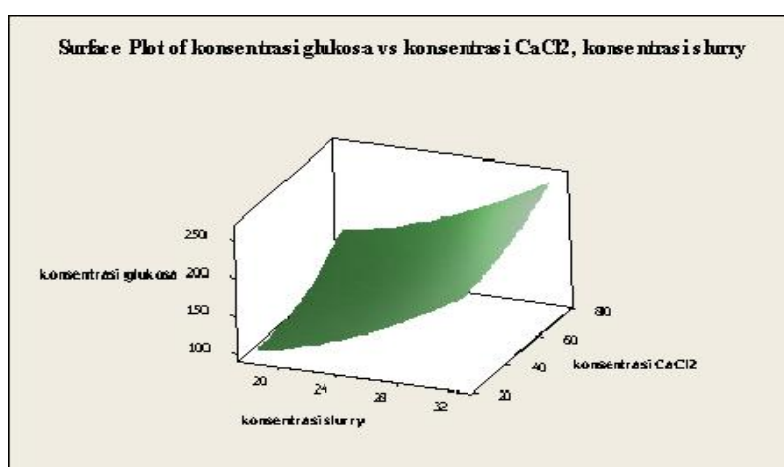
Gambar 1. Konsentrasi gula vs waktu untuk berbagai variasi konsentrasi slurry dan  $\text{CaCl}_2$

Pada penelitian ini hasil konsentrasi glukosa yang tertinggi diperoleh pada konsentrasi *slurry* 32% w/v dan konsentrasi  $\text{CaCl}_2$  50 ppm. Hal ini berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Aggarwal dkk, 2001 yang menyebutkan bahwa kondisi tertinggi tercapai pada konsentrasi bubuk kulit singkong 25% w/v, hal ini diduga sebagai akibat dari perbedaan bahan yang digunakan, pola pengadukan yang terjadi, belum terjadinya inhibisi oleh produk dan pengaruh impurities pada range variabel yang digunakan.

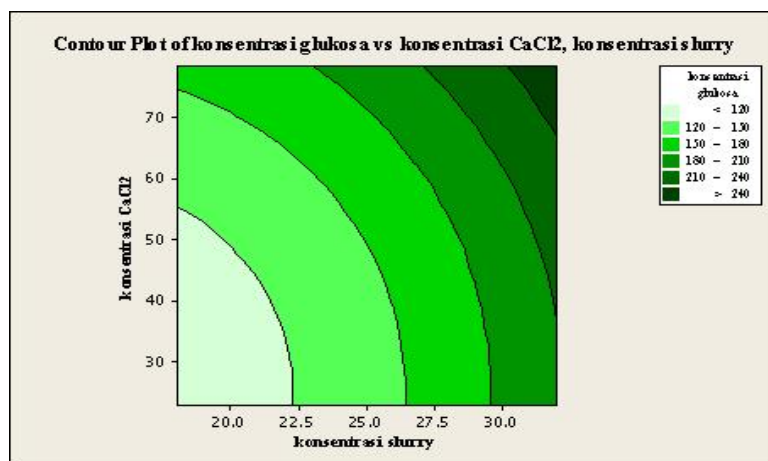
#### Analisa dengan metode *response surface*

Konsentrasi *slurry* = A, konsentrasi  $\text{CaCl}_2$  = B, konsentrasi glukosa = Y

$Y = 152,671 - 8,075A - 0,756B + 0,318A^2 + 0,018B^2 - 0,0064AB$ ,  $R^2$  sebesar 86,67%. Dari pengolahan data dengan menggunakan persamaan response surface diatas,  $R^2$  sebesar 86,67% yang mengikuti orde dua, dapat disimpulkan bahwa konsentrasi glukosa hasil hidrolisa (Y) dipengaruhi oleh konsentrasi *slurry* (A) dan konsentrasi  $\text{CaCl}_2$  (B). Konsentrasi *slurry* dan konsentrasi  $\text{CaCl}_2$  saling terkait. Dengan  $R^2$  sebesar 86,67% maka diperkirakan bahwa persamaan ini belum tentu mewakili keseluruhan data dalam range yang digunakan secara eksak, maupun bila dilakukan penggunaan variabel di luar kisaran variabel penelitian ini. Nilai variabel yang baru dapat ditambahkan di dalam maupun di luar kisaran variabel penelitian ini untuk memperoleh tingkat keyakinan yang lebih untuk persamaan ini. Sehingga dapat diperoleh nilai optimum yang lebih meyakinkan.



Gambar 2. *Surface plot* dari konsentrasi glukosa vs konsentrasi  $\text{CaCl}_2$ , konsentrasi *slurry*



Gambar 3. Contour plot dari konsentrasi glukosa vs konsentrasi CaCl<sub>2</sub>, konsentrasi slurry

Hasil *surface* dan *contour plot* di atas ( Gambar 2 dan Gambar 3) juga menunjukkan hasil yang serupa dengan Gambar 1 yaitu kenaikan konsentrasi slurry dan CaCl<sub>2</sub> menaikkan konsentrasi glukosa secara signifikan.

Tabel II. Konsentrasi gula yang dihasilkan (g/l) dengan konsentrasi slurry 25% (w/v) pada berbagai konsentrasi CaCl<sub>2</sub>

t( jam)	C (22,7 ppm)	C (50 ppm)	C ( 78.3 ppm)
1	120,6714	140,8711	187,468
1,5	124,5698	142,5902	196,269
2	128,0035	145,5305	187,295
2,5	131,3443	147,6523	182,808
3	125,9216	152,6192	190,923
3,5	144,7938	151,9887	192,222
4	151,9953	170,0511	205,745

Dari tabel II diatas dapat dilihat bahwa penambahan CaCl<sub>2</sub> memiliki pengaruh yang signifikan terhadap konsentrasi glukosa yang dihasilkan. Semakin besar konsentrasi CaCl<sub>2</sub> yang ditambahkan semakin besar pula konsentrasi glukosa yang dihasilkan. Hal ini disebabkan karena ion Ca<sup>2+</sup> mampu meningkatkan aktivitas enzim  $\alpha$ -amylase dan glucoamylase. Analisa Ca<sup>2+</sup> digunakan untuk mengetahui ada tidaknya ion Ca<sup>2+</sup> yang masih belum terikat dengan enzim untuk menunjang aktivitas enzim. Analisa ini dilakukan dengan cara menambahkan indikator EBT pada beberapa sampel uji kualitatif. Dari uji kulatif yang dilakukan, tidak ada sisa Ca<sup>2+</sup> dalam larutan produk atau tidak ada Ca<sup>2+</sup> yang tidak terikat oleh enzim.

#### Aktivitas enzim glucoamylase

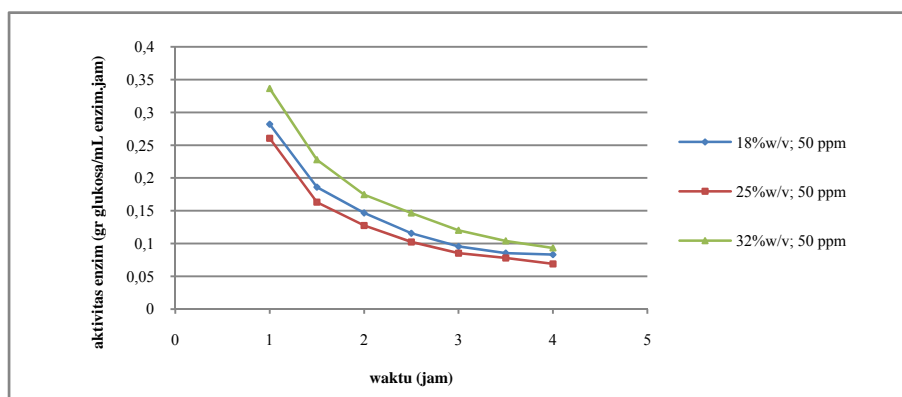
Dari data aktivitas enzim pada berbagai konsentrasi slurry seperti tertulis pada Tabel III dan Tabel IV, dapat disimpulkan bahwa semakin tinggi konsentrasi CaCl<sub>2</sub> maka aktivitas enzim terhadap glucoamylase akan bertahan lebih lama. Hal ini menunjukkan penambahan CaCl<sub>2</sub> akan meningkatkan waktu paruh enzim.

Tabel III . Aktivitas enzim ( g glukosa/ □l enzim jam)  
pada konsentrasi *slurry* 25% w/v pada berbagai konsentrasi CaCl<sub>2</sub>

t (jam)	konsentrasi CaCl <sub>2</sub> (ppm)		
	22,7	50	78,3
1	0.241	0.260	0.375
1.5	0.166	0.163	0.262
2	0.128	0.128	0.187
2.5	0.105	0.102	0.146
3	0.084	0.085	0.127
3.5	0.083	0.078	0.110
4	0.076	0.069	0.103

Tabel IV . Aktivitas enzim ( g glukosa/ □l enzim jam)  
pada konsentrasi CaCl<sub>2</sub> 50 ppm pada berbagai konsentrasi *slurry*

t (jam)	konsentrasi <i>slurry</i> (%w/v)		
	18	25	32
1	0.203	0.260	0.430
1.5	0.134	0.163	0.291
2	0.106	0.128	0.223
2.5	0.083	0.102	0.188
3	0.069	0.085	0.154
3.5	0.061	0.078	0.133
4	0.060	0.069	0.119

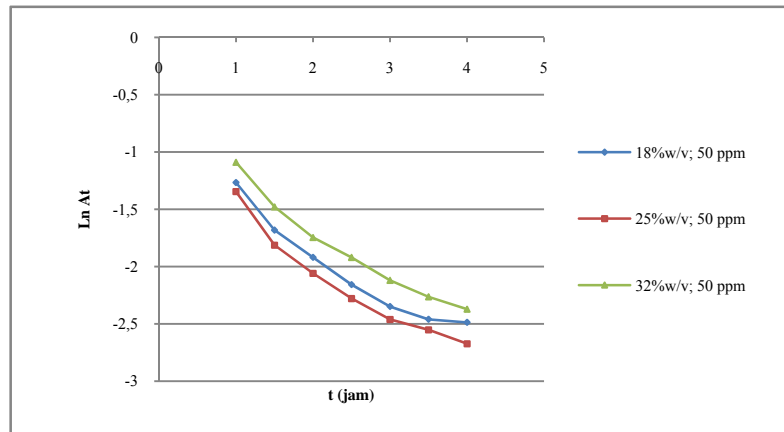


Gambar 4 . Kurva aktivitas enzim per satuan waktu  
pada konsentrasi CaCl<sub>2</sub> 50 ppm pada berbagai konsentrasi *slurry*

Dari Gambar 4 diketahui bahwa konsentrasi *slurry* tidak memiliki pengaruh yang signifikan terhadap aktivitas enzim. Hal ini sesuai dengan teori karena aktivitas enzim hanya dipengaruhi oleh pH, suhu, dan *shear stress*. (Shuler, 1992). Dari Gambar 5 dapat terlihat bahwa seiring berjalannya waktu aktivitas enzim menurun. Penurunan aktivitas enzim pada konsentrasi CaCl<sub>2</sub> yang sama (50 ppm) mengikuti persamaan :

$$\text{Ln}(A_t) = \text{Ln}(A_o) - \frac{\text{Ln}2}{t_{1/2}} \times t \quad (1)$$

$A_t$  = aktivitas enzim pada  $t$  (jam),  $A_o$  = aktivitas enzim pada  $t_o$ ,  $t_{1/2}$  = waktu paruh enzim. Dari hasil regresi linier  $\ln A_t$  vs  $t$  didapatkan nilai aktivitas awal enzim glucoamylase yang digunakan berkisar antara 0.30 - 0.49 gr glukosa/□l enzim.jam.



Gambar 5. Kurva  $\ln A_t$  vs  $t$  pada konsentrasi  $\text{CaCl}_2$  50 ppm pada berbagai konsentrasi *slurry*

## Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa semakin tinggi konsentrasi bubuk kulit singkong akan semakin tinggi pula konsentrasi glukosa yang dihasilkan. Penambahan  $\text{CaCl}_2$  akan meningkatkan konsentrasi glukosa yang dihasilkan. Kondisi optimum dari percobaan tidak tercapai karena hasil metode surface response menunjukkan bahwa profil konsentrasi glukosa, konsentrasi  $\text{CaCl}_2$  dan konsentrasi *slurry* tetap naik pada kisaran data percobaan yang ditentukan. Konsentrasi glukosa tertinggi diperoleh pada variasi konsentrasi bubuk kulit singkong 32% w/v dan konsentrasi  $\text{CaCl}_2$  50 ppm. Dari uji kualitatif ion  $\text{Ca}^{2+}$  didapat bahwa seluruh ion  $\text{Ca}^{2+}$  digunakan oleh enzim untuk mempertahankan aktivitasnya. Aktivitas enzim dipengaruhi oleh konsentrasi  $\text{CaCl}_2$  dan tidak dipengaruhi oleh konsentrasi *slurry*. Dibutuhkan penelitian lebih lanjut dengan konsentrasi bubuk kulit singkong yang lebih besar dan konsentrasi  $\text{CaCl}_2$  yang lebih besar sehingga diharapkan dapat teramati nilai optimum yang belum teramati pada penelitian ini dengan metode surface response.

## Daftar Pustaka

1. Aggarwal N.K., Nigam P., Singh D., Yadav B.S., 2001, "Process Optimization for the Production of Sugar for the Bioethanol Industry from Sorghum, a Non-conventional Source of Starch", World Journal of Microbiology & Biotechnology, 17, 411-415.
2. Shuler M.L., Kargi F., 1992, "Bioprocess Engineering : Basic Concepts", Prentice-Hall.
3. Srinorakutara, T., Suesar, C., Pitiyont, B., Kitpreechavanit, W., and Cattithammanit, S., 2004, Utilization of Waste from Cassava Starch Plant for Ethanol Production, The Joint International Conference on "Sustainable Energy and Environment (SEE)", 344-348.
4. Yan Lin and Shuzo Tanaka, 2006, Ethanol Fermentation from biomass resources : current state and prospects. Appl Microbiol Biotechnol, 69 : 627-642.

