

BIOKONVERSI LIGNOSELULOSA DARI BIOMASSA TANDAN  
KOSONG KELAPA SAWIT (TKKS) MENJADI ETANOL MELALUI  
PROSES SAKARIFIKASI DAN FERMENTASI SERENTAK (SFS)

IMAN FIRMANSYAH

0606040343



UNIVERSITAS INDONESIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
DEPARTEMEN KIMIA  
DEPOK  
2009

**BIOKONVERSI LIGNOSELULOSA DARI BIOMASSA TANDAN  
KOSONG KELAPA SAWIT (TKKS) MENJADI ETANOL MELALUI  
PROSES SAKARIFIKASI DAN FERMENTASI SERENTAK (SFS)**

**Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Sains**

**Oleh :**

**IMAN FIRMANSYAH**

**0606040343**



**UNIVERSITAS INDONESIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
DEPARTEMEN KIMIA  
DEPOK  
2009**

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Kelangkaan bahan bakar minyak yang terjadi belakangan ini telah memberikan dampak yang sangat luas di berbagai sektor kehidupan. Sektor yang paling cepat terkena dampaknya adalah sektor transportasi. Fluktuasi suplai dan harga minyak bumi seharusnya membuat kita sadar bahwa jumlah cadangan minyak yang ada di bumi semakin menipis. Karena minyak bumi adalah bahan bakar yang tidak bisa diperbarui, maka kita harus mulai memikirkan bahan penggantinya.

Sebenarnya di Indonesia terdapat berbagai sumber energi terbarukan yang melimpah, misalnya biomassa dari limbah pertanian dan kehutanan. Produksi kelapa sawit merupakan industri agrikultural utama di Indonesia, dengan menghasilkan total produksi *Crude Palm Oil* (CPO) 15 juta ton/tahun. Terdapat lebih dari 3 juta hektar perkebunan kelapa sawit. Total sekitar 90 juta ton biomassa yang dapat diperbaharui (batang, daun palm, pelepah batang, serat palm sisa boiler, dan tandang kosong) diproduksi setiap tahun. Proses produksi CPO akan menghasilkan limbah padat tandan kosong kelapa sawit (TKKS). Limbah TKKS mewakili sekitar 9% dari total produksi. Akibat terlalu banyak hasil produksi, menyebabkan limbah padat maupun cair yang dihasilkan juga banyak (Yan, dkk. 2007).

Biomassa TKKS ini belum banyak dimanfaatkan, padahal umumnya berupa bahan berlignoselulosa yang dapat dikonversi menjadi etanol. Komponen utama dalam limbah lignoselulosa TKKS terdiri dari selulosa (41,3% – 46,5%), hemiselulosa (25,3% – 33,8%), dan lignin (27,6% – 32,5%) (Costello and Chun, 1988 dalam Sudiyani, 2006). Konversi bahan berlignoselulosa menjadi etanol pada dasarnya terdiri dari perlakuan awal (*pretreatment*) untuk menghilangkan lignin, hidrolisa selulosa menjadi gula dan fermentasi gula menjadi etanol.

Penggunaan etanol sebagai bahan bakar mempunyai beberapa keunggulan dibandingkan dengan BBM (Bahan Bakar Minyak) karena kandungan oksigen yang tinggi (35%) sehingga jika dibakar sangat bersih, nilai oktannya tinggi (118), ramah lingkungan, karena emisi gas karbon mono oksida lebih rendah 19-25% dibanding BBM, sehingga tidak memberikan kontribusi pada akumulasi karbon dioksida di atmosfer, dan bersifat terbarukan, sedangkan BBM akan habis karena bahan bakunya fosil (Costello and Chun, 1988 dalam Sudiyani, 2006).

Proses konversi lignoselulosa menjadi bioetanol terdiri dari dua tahap utama, yaitu hidrolisis/sakarifikasi dan fermentasi. Pada metode terdahulu proses hidrolisis dan fermentasi dilakukan secara terpisah atau *Separated Hydrolysis and Fermentation* (SHF) dan yang terbaru adalah proses *Simultaneous Saccharification and Fermentation* (SSF) atau Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak (SFS). Kelebihan dari proses SHF adalah tiap proses dapat dilakukan dalam kondisi pH dan temperatur yang optimum karena

dilakukan dalam dua tempat yang berbeda. Akan tetapi, pada proses sakarifikasinya dapat terjadi akumulasi dari produk akhir sakarifikasi, yaitu glukosa yang dapat menghambat aktivitas dari enzim *selulase*.

Kelebihan dari proses SFS dibandingkan dengan proses SHF adalah laju hidrolisis semakin cepat karena glukosa yang terbentuk akan segera diubah menjadi etanol oleh mikroba. Kebutuhan enzim dalam proses SFS tidak terlalu banyak, rendemen produk etanol yang lebih tinggi yaitu 0,388 g/L/jam sedangkan untuk SHF hanya 0,109 g/L/jam, mengurangi resiko kontaminasi, waktu proses yang lebih pendek yaitu hanya 48 jam dan untuk SHF 179 jam, dan volume fermentor lebih kecil karena hanya digunakan satu reaktor saja (Marques, *et al.* 2008).

Ada beberapa hal yang harus diperhatikan dalam metode SFS, yaitu suhu hidrolisis dan fermentasi yang tidak sama, toleransi mikroba terhadap etanol, dan penghambatan kerja enzim oleh etanol. Kondisi optimum untuk proses hidrolisis/sakarifikasi dengan enzim *selulase*  $\pm 50^{\circ}\text{C}$  dan proses fermentasi dengan menggunakan mikroorganisme pada  $35^{\circ}\text{C}$ . Akan tetapi hal ini dapat teratasi dengan menggunakan enzim dan mikroba yang toleran terhadap panas dan etanol seperti *selulase* dan *Saccharomyces cerevisiae* sehingga proses SFS akan berjalan dengan baik (Sun and Cheng, 2002 dalam Hermiati dan Sukara, 2005).

## 1.2 Perumusan Masalah

Perumusan masalah dari penelitian ini adalah bagaimana pengolahan awal TKKS (*pretreatment*) dilakukan untuk mengurangi lignin, kristalinitas selulosa, dan untuk memperluas permukaan bahan. Bagaimana mengkonversi TKKS hasil *pretreatment* menjadi etanol melalui proses SFS dengan menggunakan enzim *selulase* dan khamir *Saccharomyces cerevisiae*. Bagaimana pengaruh penambahan konsentrasi enzim dan konsentrasi glukosa dalam proses SFS terhadap produk etanol yang dihasilkan.

## 1.3 Hipotesis

Hipotesis-hipotesis yang dapat dikemukakan ialah sebagai berikut:

- Proses *preeratment* secara fisika dan kimia menggunakan basa NaOH dapat digunakan untuk mengurangi lignin, hemiselulosa, dan mencegah kristalisasi selulosa agar proses sakarifikasi dan fermentasi dapat mencapai hasil optimum.
- Konversi limbah lignoselulosa Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS) menjadi bioetanol dapat melalui proses satu tahap dengan metode Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak (SFS).
- Proses produksi bioetanol secara SFS dapat menggunakan enzim *selulase* yang dimodifikasi dan kapang *Saccharomyces cerevisiae* strain Indonesia.

- Metode SFS dalam prosesnya sangat dipengaruhi oleh temperatur, konsentrasi substrat, pH, dan waktu reaksi.

#### **1.4 Tujuan Penelitian**

- Pemanfaatan limbah lignoselulosa TKKS untuk produksi bioetanol melalui proses *pretreatment* dan SFS.
- Mempelajari pengaruh beberapa parameter terhadap proses produksi bioetanol secara SFS.

#### **1.5 Metode Penelitian**

Dalam penelitian, digunakan limbah lignoselulosa TKKS sebagai bahan awal untuk produksi bioetanol. Prinsip yang digunakan ialah dengan sistem Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak (SFS). Variabel-variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ialah konsentrasi, pH, dan waktu reaksi. Analisis etanol dengan kromatografi gas (GC).

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq)

Kelapa sawit adalah tumbuhan industri penting penghasil minyak masak, minyak industri, maupun bahan bakar (biodiesel). Perkebunannya menghasilkan keuntungan besar sehingga banyak hutan dan perkebunan lama dikonversi menjadi perkebunan kelapa sawit. Pada saat ini, Indonesia adalah penghasil minyak kelapa sawit pertama di dunia. Di Indonesia penyebarannya di daerah Aceh, pantai timur Sumatra, Jawa, dan Sulawesi.



Gambar 2.1 Kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq)

([http://id.wikipedia.org/kelapa\\_sawit/](http://id.wikipedia.org/kelapa_sawit/))

Taksonomi kelapa sawit adalah sebagai berikut:

Divisi : Spermatophyta

Subdivisi : Angiospermae

Kelas : Monocotyledonae

Ordo : Palmaes

Famili : Palmaceae

Genus : *Elaeis*

Spesies : *Elaeis guineensis* Jacq

Morfologi kelapa sawit berbentuk pohon. Tingginya dapat mencapai 24 meter. Akar serabut tanaman kelapa sawit mengarah ke bawah dan samping. Selain itu juga terdapat beberapa akar napas yang tumbuh mengarah ke samping atas untuk mendapatkan tambahan aerasi. Seperti jenis palma lainnya, daunnya tersusun majemuk menyirip. Daun berwarna hijau tua dan pelepah berwarna sedikit lebih muda. Penampilannya agak mirip dengan tanaman salak, hanya saja dengan duri yang tidak terlalu keras dan tajam. Batang tanaman diselimuti bekas pelepah hingga umur 12 tahun.

Setelah umur 12 tahun pelepah yang mengering akan terlepas sehingga penampilan menjadi mirip dengan kelapa. Bunga jantan dan betina terpisah namun berada pada satu pohon (*monoecious diclin*) dan memiliki

waktu pematangan berbeda sehingga sangat jarang terjadi penyerbukan sendiri. Bunga jantan memiliki bentuk lancip dan panjang sementara bunga betina terlihat lebih besar dan mekar. Tanaman sawit dengan tipe cangkang pisifera bersifat *female steril* sehingga sangat jarang menghasilkan tandan buah dan dalam produksi benih unggul digunakan sebagai tetua jantan.

Buah sawit mempunyai warna bervariasi dari hitam, ungu, hingga merah tergantung bibit yang digunakan. Buah bergerombol dalam tandan yang muncul dari tiap pelapah. Minyak dihasilkan oleh buah. Kandungan minyak bertambah sesuai kematangan buah. Setelah melewati fase matang, kandungan asam lemak bebas (FFA, *free fatty acid*) akan meningkat dan buah akan rontok dengan sendirinya. Buah terdiri dari tiga lapisan, yaitu *Eksoskarp* merupakan bagian kulit buah berwarna kemerahan dan licin, *Mesoskarp* merupakan serabut buah, dan *Endoskarp* yang merupakan cangkang pelindung inti. Inti sawit (kernel, yang sebetulnya adalah biji) merupakan endosperma dan embrio dengan kandungan minyak inti berkualitas tinggi. Kelapa sawit berkembang biak dengan cara generatif. Buah sawit matang pada kondisi tertentu, embrionya akan berkecambah menghasilkan tunas (plumula) dan bakal akar (radikula).

Habitat asli kelapa sawit adalah daerah semak belukar. Sawit dapat tumbuh dengan baik di daerah tropis ( $15^{\circ}$  LU -  $15^{\circ}$  LS). Tanaman ini tumbuh sempurna di ketinggian 0-500 m dari permukaan laut dengan kelembaban 80-90%. Sawit membutuhkan iklim dengan curah hujan stabil, 2000-2500 mm

setahun, yaitu daerah yang tidak tergenang air saat hujan dan tidak kekeringan saat kemarau. Pola curah hujan tahunan mempengaruhi perilaku pembungaan dan produksi buah sawit.

Kelapa sawit yang dibudidayakan terdiri dari dua jenis: *Elaeis guineensis* dan *Elaeis oleifera*. Jenis pertama adalah yang pertama kali dan terluas dibudidayakan orang. *Elaeis oleifera* sekarang mulai dibudidayakan pula untuk menambah keanekaragaman sumber daya genetik. Penangkar seringkali melihat tipe kelapa sawit berdasarkan ketebalan cangkang, yang terdiri dari *Dura*, *Pisifera*, dan *Tenera*.

Dura merupakan sawit yang buahnya memiliki cangkang tebal sehingga dianggap memperpendek umur mesin pengolah, namun biasanya tandan buahnya besar-besar dan kandungan minyak per tandannya berkisar 18%. Pisifera buahnya tidak memiliki cangkang, namun bunga betinanya steril sehingga sangat jarang menghasilkan buah. Tenera adalah persilangan antara induk Dura dan jantan Pisifera. Jenis ini dianggap bibit unggul sebab melengkapi kekurangan masing-masing induk dengan sifat cangkang buah tipis, namun bunga betinanya tetap fertil. Beberapa tenera unggul memiliki persentase daging per buahnya mencapai 90% dan kandungan minyak per tandannya dapat mencapai 28%. Untuk pembibitan massal, sekarang digunakan teknik kultur jaringan ([http://id.wikipedia.org/kelapa\\_sawit/](http://id.wikipedia.org/kelapa_sawit/)).

Pohon kelapa sawit sudah mengeluarkan manggar pada umur 3-4 tahun dan pada umur 8-11 tahun telah menghasilkan lebih dari 20 ton tandan buah segar (TBS)/Ha/tahun. Pemanenan dilakukan setelah tandan berumur 5-6 bulan. Dalam proses pemanenan buah kelapa sawit untuk pengolahan minyak, terdapat limbah berupa tandan kosong kelapa sawit (TKKS) yang sampai saat ini belum banyak dimanfaatkan.

Indonesia memiliki potensi besar untuk memanfaatkan produk samping sawit sebagai sumber energi terbarukan. Kelapa sawit Indonesia merupakan salah satu komoditi yang mengalami pertumbuhan yang sangat pesat. Pada tahun 1980-an hingga pertengahan tahun 1990-an luas area kebun meningkat dengan laju 11% per tahun. Sejalan dengan luas area, produksi CPO (*Crude Palm Oil*) juga meningkat dengan laju 9,4% per tahun. Data tahun 2004 menunjukkan bahwa potensi kelapa sawit berdasarkan luas perkebunannya mencapai 5.291.562 ha dengan total produksi minyak mencapai 6.237.425 ton. Sampai dengan tahun 2010 produksi CPO diperkirakan meningkat dengan laju 5-6% per tahun, sedangkan untuk periode 2010-2020 pertumbuhan produksi berkisar antara 2-4%.

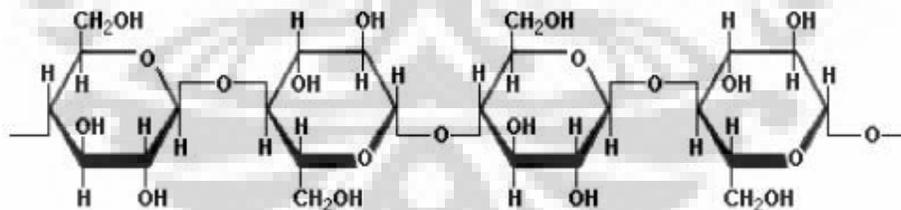
Secara umum, industri kelapa sawit menghasilkan 1,1 ton TKKS untuk setiap ton CPO yang dihasilkan. Sampai saat ini kapasitas penanganan limbah tersebut masih sangat kecil dibandingkan dengan limbah yang terbentuk, padahal kandungan selulosa TKKS cukup tinggi (41-46%) sehingga apabila dikonversi menjadi produk yang bermanfaat seperti untuk

produksi etanol sangat prospektif

(<http://elearning.unej.ac.id/courses/PNU1705/document/bab1kpswt.doc>).

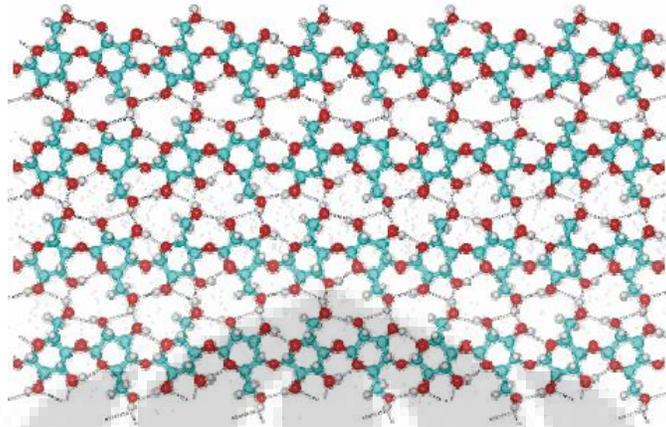
## 2.2 Selulosa

Selulosa adalah komponen utama yang mencapai 62.9% dari bobot kering TKKS (Law *et al.* 2008). Selulosa sangat erat berasosiasi dengan hemiselulosa dan lignin. Isolasi selulosa membutuhkan perlakuan kimia yang intensif (Aziz *et al.* 2002). Selulosa terdiri dari unit monomer D-glukosa yang terikat melalui ikatan  $\beta$ -1-4-glikosidik. Residu glukosa tersusun dengan posisi  $180^\circ$  antara satu dengan yang lain, dan selanjutnya pengulangan unit dari rantai selulosa membentuk unit selobiosa. Derajat polimerasi (DP) selulosa bervariasi antara 7000 – 15000 unit glukosa, tergantung pada bahan asalnya.



Gambar 2.2 Struktur molekul selulosa

(<http://www.scientificpsychic.com/fitness/carbohydrates.html>)



Gambar 2.3 Model molekul selulosa

(<http://www.lsbu.ac.uk/water/hycel.html>)

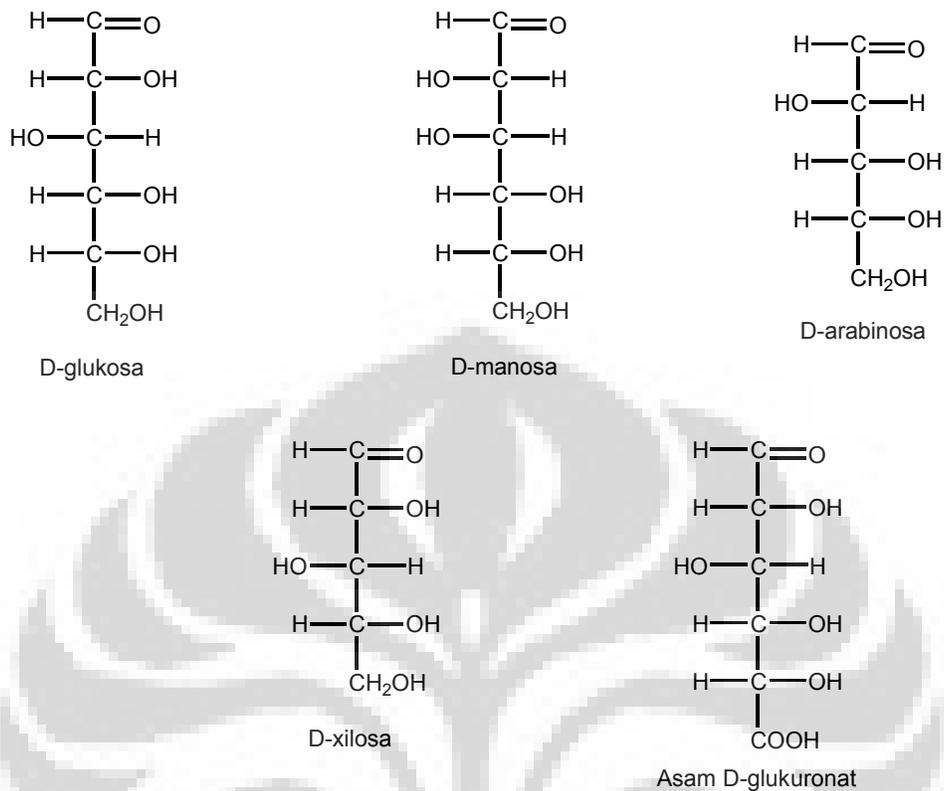
Gugus fungsional dari rantai selulosa adalah gugus hidroksil. Gugus –OH ini dapat berinteraksi satu sama lain dengan gugus –O, –N, dan –S, membentuk ikatan hidrogen. Ikatan –H juga terjadi antara gugus –OH selulosa dengan air. Gugus –OH pada selulosa menyebabkan permukaan selulosa menjadi hidrofilik.

Rantai selulosa memiliki gugus –H di kedua ujungnya. Ujung –C1 memiliki sifat pereduksi. Struktur rantai selulosa distabilkan oleh ikatan hidrogen yang kuat di sepanjang rantai. Di dalam selulosa alami dari tanaman, rantai selulosa diikat bersama-sama membentuk mikrofibril kristalin dimana setiap rantai selulosa diikat bersama-sama dengan ikatan hidrogen.

Sebuah kristal selulosa mengandung sepuluh rantai glukosa dengan orientasi paralel. Tujuh kristal *polymorphs* telah diidentifikasi untuk selulosa, yang dikodekan dengan  $\alpha$ ,  $\beta$ , II, III, IIII, IVI dan IVII (Marchessault, R.H *et al.* 1981). Di alam, kristal selulosa jenis  $\alpha$  dan  $\beta$  ditemukan melimpah (Attala and Vanderhart, 1984). Sebagai tambahan di dalam area kristalin, selulosa alami mengandung area *amorphous* yang lebih sedikit.

### 2.3 Hemiselulosa

Hemiselulosa umumnya dikelompokkan berdasarkan residu gula utama yang menyusun rangkanya, seperti: xilan, mannan, galaktan, dan glukosa, dengan xilan dan mannan yang monomer atau unit monosakaridanya dapat dilihat pada Gambar 2.4. Hemiselulosa umumnya berasosiasi secara kimia atau terikat silang dengan polisakarida, protein, atau lignin. Xilan kemungkinan sebagai wilayah ikatan utama antara lignin dan karbohidrat lain. Hemiselulosa lebih mudah larut daripada selulosa, dan dapat diisolasi dari kayu dengan ekstraksi. Rata-rata derajat polimerisasi (DP) dari hemiselulosa bervariasi antara 70 dan 200, tergantung pada jenis kayu (Palonen, 2004).



Gambar 2.4 Beberapa gula penyusun hemiselulosa (Hu *et al.* 2008)

Hemiselulosa di dalam kayu keras dan tanaman semusim terutama tersusun atas xilan (15-30%), sedangkan hemiselulosa kayu lunak tersusun atas galaktoglukomannan (15 – 20%) dan xilan (7 – 10%). Xilan kayu keras terdiri atas unit  $\beta$ -D-xilopiranosil, yang mengandung asam 4-O-metil- $\alpha$ -D-glukuronat dan gugus samping asetil. Asam 4-O-metil- $\alpha$ -D-glukuronat diikat kerangka xilan melalui ikatan O-(1,2)-glikosidik. Rasio molar antara xilosa : asam glukuronat : residu asetil adalah antara 10:1:7. Xilan kayu lunak adalah arabino-4-O-metilglukuronoxilan, tetapi rangka xilan disubstitusi pada karbon

2 dan 3 secara berurutan dengan asam 4-O-metil- $\alpha$ -D-glukuronat dan residu  $\alpha$ -L-arabinofuranosil (Ramos, 1992).

Galaktoglukomannan kayu lunak memiliki rangka ikatan  $\beta$ -1-4 unit  $\beta$ -D-glukopiranosil dan  $\beta$ -D-mannopiranosil, yang sebagian disubstitusi oleh  $\alpha$ -D-galaktopiranosil dan gugus asetil (Marchessault, R.H *et al.* 1981). Terdapat dua macam galaktoglukomannan yaitu fraksi larut air dan alkali, dengan rasio mannanosa:glukosa:galaktosa:residu asetil 3:1:1:0,24 untuk fraksi larut air, dan 3:1:0,1:0,24 untuk fraksi larut alkali (Palonen, 2004).

## 2.4 Lignin

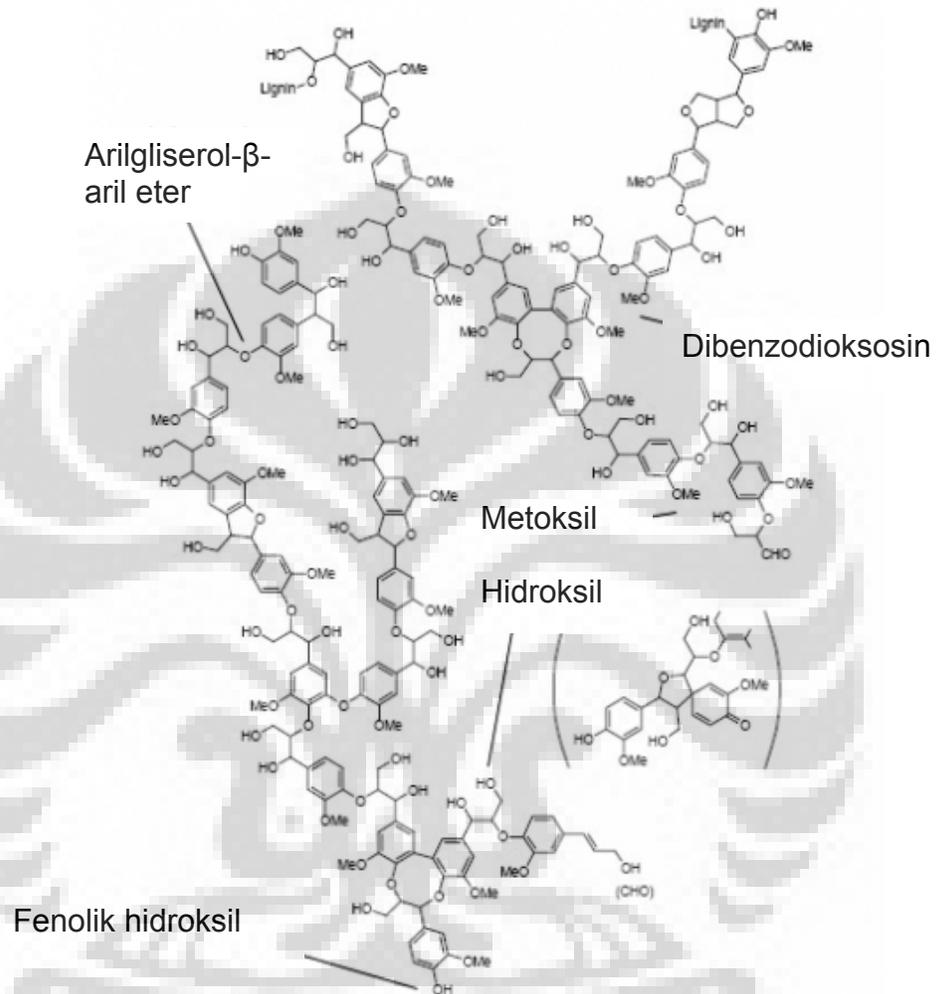
Lignin adalah polimer fenilpropanoid tiga dimensi yang dihubungkan dengan beberapa ikatan berbeda antara karbon ke karbon dan beberapa ikatan lain antara unit fenilpropan yang tidak mudah dihirolisis (Higuchi, 2004). Di alam lignin ditemukan sebagai bagian integral dari dinding sel tanaman, terbenam di dalam polimer matrik dari selulosa dan hemiselulosa. Lignin adalah polimer dari unit fenilpropen: unit guaiasil (G) dari prekursor trans-koniferil-alkohol, siringil (S) unit dari trans-sinapil-alkohol, dan p-hidroksifenil (H) unit dari prekursor trans-p-kumaril alkohol. Komposisi lignin di alam sangat bervariasi tergantung pada spesies tanaman.

Pengelompokan seperti kayu lunak, kayu keras, dan rumput-rumputan, lignin dapat dibagi menjadi dua kelompok utama, yaitu: guaiasil lignin dan guaiasil-siringil lignin (Palonen, 2004). Guaiasil lignin adalah produk polimerisasi yang didominasi oleh koniferil alkohol, sedangkan guaiasil-siringil lignin tersusun atas beberapa bagian dari inti aromatik guaiasil dan siringil, bersama dengan sejumlah kecil unit p-hidroksifenil.

Kayu lunak terutama tersusun atas unit guaiasil, sedangkan kayu keras juga tersusun atas unit siringil. Kayu lunak ditemukan lebih resisten untuk didelignifikasi dengan ekstraksi basa daripada kayu keras. Hal ini menimbulkan dugaan bahwa guaiasil lignin membatasi pemekaran (*swelling*) serat dan dengan demikian menghalangi serangan enzim pada siringil lignin. Struktur yang lebih resisten dari guaiasil lignin juga telah diobservasi di dalam studi degradasi dari lignin sintesis oleh fungi perombak lignin *Phanerochaeta chrysosporium* (Ramos, 1992).

Beberapa studi lignin terbaru menemukan bahwa terdapat struktur lignin yang bermacam-macam (Novikora, 2002). Lignin terdiri dari daerah amorphous dan bentuk-bentuk terstruktur seperti partikel tabung dan globul. Ada indikasi pula bahwa struktur kimia dan tiga dimensi lignin sangat dipengaruhi oleh matrik polisakarida. Simulasi dinamik menunjukkan bahwa gugus hidroksil dan metoksil di dalam prekursor lignin dan oligomer mungkin berinteraksi dengan mikrofibril selulosa sejalan dengan fakta bahwa lignin

memiliki karakteristik hidrofobik. Skema struktur dari lignin kayu lunak, termasuk struktur baru dibenzodiaksosin, diperlihatkan pada Gambar 2.5.



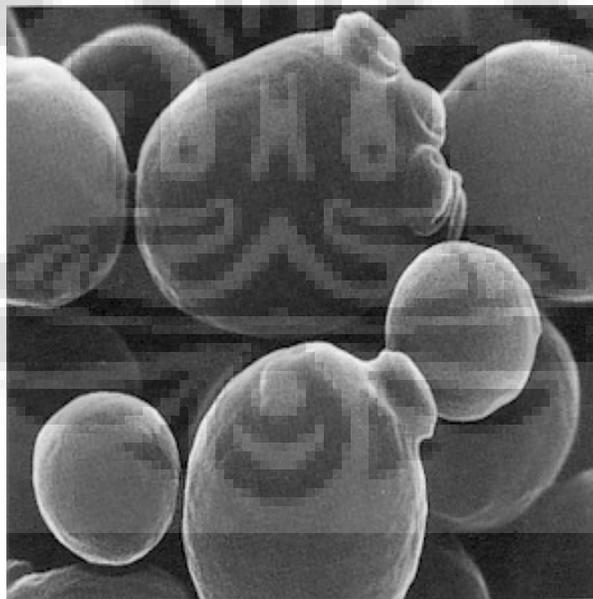
Gambar 2.5 Struktur lignin kayu lunak. Gugus struktur dan fungsional yang umum ditemukan di dalam molekul lignin ( Hammel, 1997).

Struktur kimia asal lignin mengalami perubahan di bawah kondisi suhu yang tinggi dan asam, seperti pada *pretreatment* dengan uap panas. Reaksi pada temperatur tinggi di atas 200°C, lignin terpecah menjadi partikel yang lebih kecil dan terlepas dari selulosa (Tanahashi, M., *et al.* 1983).

Penelitian awal pada lignin kayu keras menunjukkan bahwa ikatan  $\beta$ -O-4 aril eter terpecah pada saat perlakuan *steam-explosion* yang menyebabkan penurunan bobot molekul dan meningkatkan kandungan fenolik (Tanahashi, M., *et al.* 1983).

## 2.5 *Saccharomyces cerevisiae*

*Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) sangat berperan dalam industri fermentasi karena kemampuannya dalam memfermentasi senyawa gula menjadi senyawa alkohol. *S. cerevisiae* merupakan salah satu jenis khamir yang sangat dikenal oleh masyarakat sebagai ragi roti (*baker's yeast*).



Gambar 2.6 *Saccharomyces cerevisiae*

([www.chateauneuf.dk/artikler/vini15.jpg](http://www.chateauneuf.dk/artikler/vini15.jpg))

Taksonomi *S. cerevisiae* (Barnet, 1990):

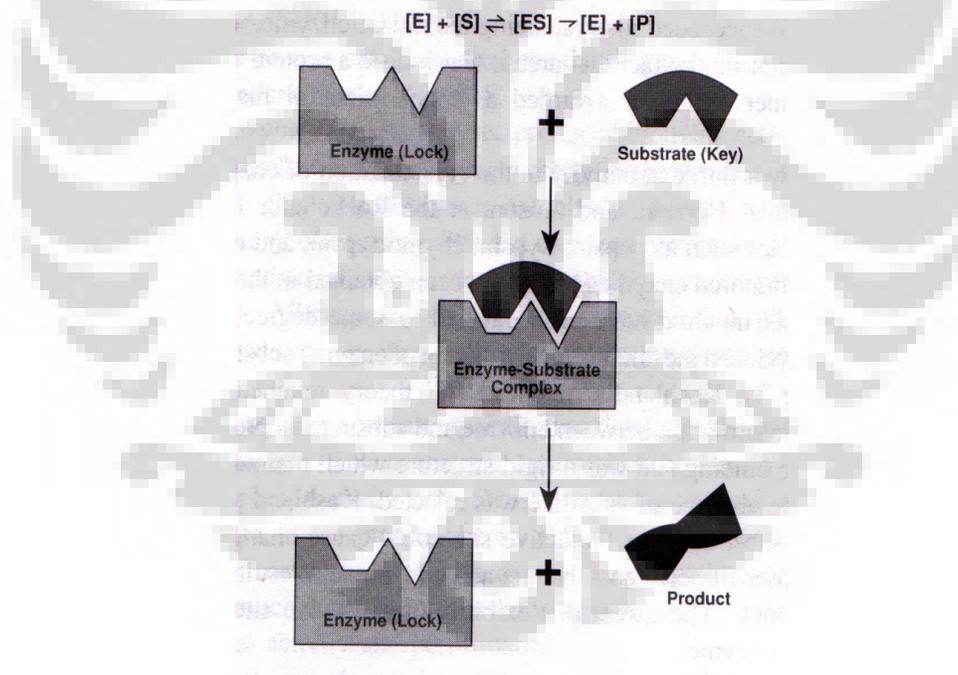
Kingdom : Fungi  
Phylum : Ascomycota  
Kelas : Hemiascomycetes  
Ordo : Saccharomycetales  
Famili : Saccharomycetaceae  
Genus : Saccharomyces  
Spesies : *Saccharomyces cerevisiae*

Khamir merupakan organisme uniseluler dan umumnya membelah diri dengan pertunasan. Sel khamir lebih besar dari pada kebanyakan bakteri, dengan ukuran yang sangat beragam yaitu lebar 1-5  $\mu\text{m}$  dan panjang 5-30  $\mu\text{m}$ . Khamir bersifat anaerobik fakultatif, dimana khamir dapat hidup dalam keadaan aerobik maupun dalam keadaan anaerobik. Suhu optimum pertumbuhan khamir adalah 30°C, dengan suhu maksimum adalah 35-37°C dan suhu minimum adalah 9-11°C (Judoamijojo *et al.* 1992). Pertumbuhan maksimum terjadi hingga hari ke-3 dan mulai mengalami penurunan setelah hari ke-7 (Walker, 1995).

## 2.6 Enzim

Enzim merupakan polipeptida (protein) yang berfungsi sebagai katalis (senyawa yang mempercepat proses reaksi tanpa habis bereaksi) dalam suatu reaksi kimia. Enzim bekerja dengan cara menempel pada permukaan

molekul zat-zat yang bereaksi dan dengan demikian mempercepat proses reaksi. Percepatan terjadi karena enzim menurunkan energi pengaktifan yang dengan sendirinya akan mempermudah terjadinya reaksi. Sebagian besar enzim bekerja secara khas, yang artinya setiap jenis enzim hanya dapat bekerja pada satu macam senyawa atau reaksi kimia. Hal ini disebabkan perbedaan struktur kimia tiap enzim yang bersifat tetap. Sebagai contoh, enzim  $\alpha$ -amilase hanya dapat digunakan pada proses perombakan pati menjadi glukosa.



Gambar 2.7 Reaksi enzim dengan substrat

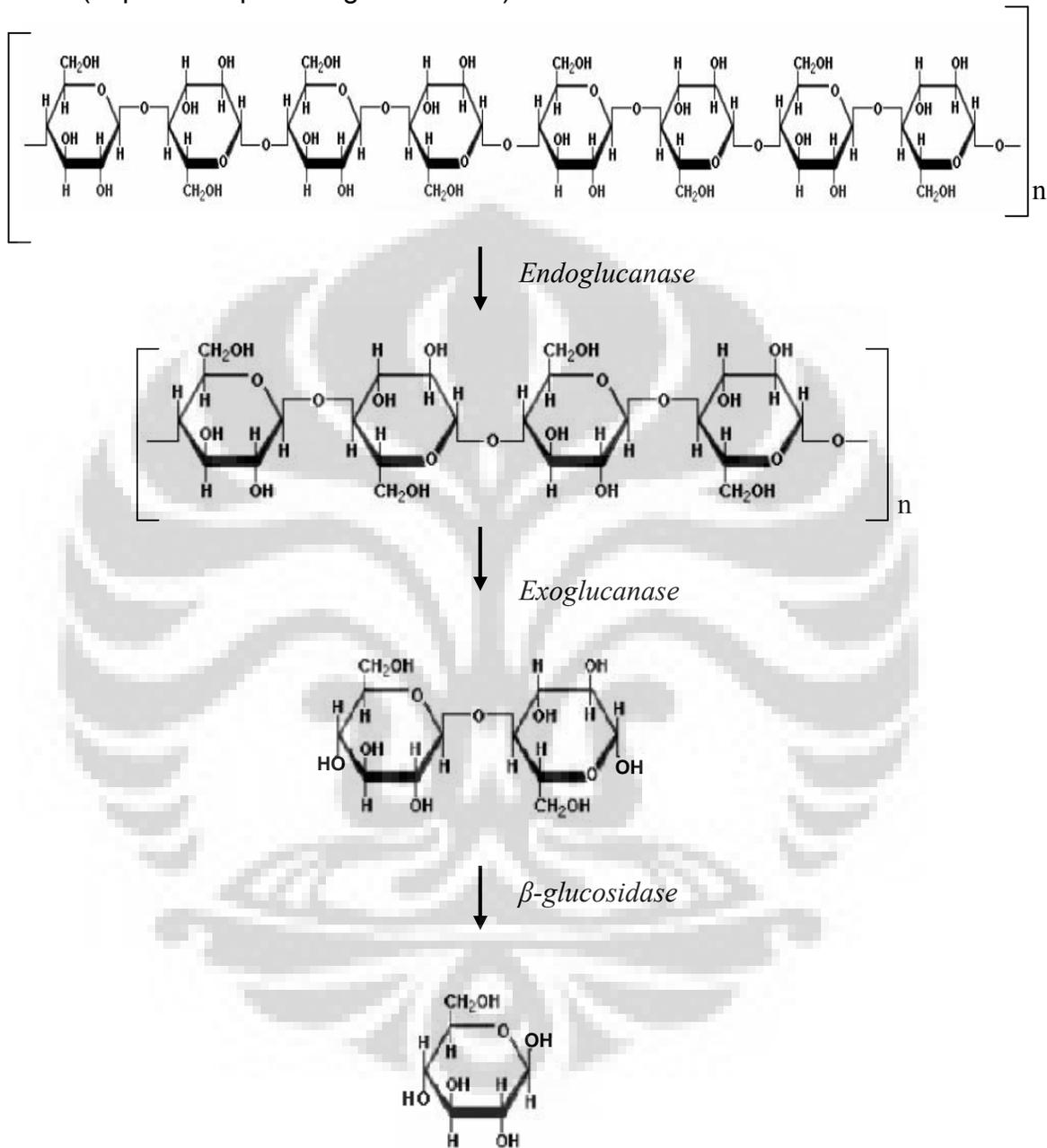
([http://suharjawanasuria.tripod.com/teknologi\\_pakan\\_enzyme.htm](http://suharjawanasuria.tripod.com/teknologi_pakan_enzyme.htm))

Kerja enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor, terutama adalah substrat, suhu, keasaman, kofaktor dan inhibitor. Tiap enzim memerlukan suhu dan pH (tingkat keasaman) optimum yang berbeda-beda, karena enzim adalah protein, yang dapat mengalami perubahan bentuk jika suhu dan keasaman berubah. Di luar suhu atau pH yang sesuai, enzim tidak dapat bekerja secara optimal atau strukturnya akan mengalami kerusakan. Hal ini akan menyebabkan enzim kehilangan fungsinya sama sekali. Kerja enzim juga dipengaruhi oleh kofaktor dan inhibitor.

Dewasa ini, enzim adalah senyawa yang umum digunakan dalam proses produksi. Enzim yang digunakan pada umumnya berasal dari enzim yang diisolasi dari bakteri. Penggunaan enzim dalam proses produksi dapat meningkatkan efisiensi yang kemudian akan meningkatkan jumlah produksi.

*Selulase* adalah enzim yang mampu memutuskan ikatan glikosidik  $\beta$  (1,4) pada selulosa, selodekstrin, selobiosa, dan turunan selulosa lainnya. Enzim selulase terdiri dari *endoglucanase*, *exoglucanase*, dan  *$\beta$ -glukosidase*. *Endoglucanase* berfungsi untuk memecah polisakarida selulosa menjadi rantai yang lebih pendek yaitu oligosakarida. *Endoglucanase* menyerang bagian tengah dari suatu polisakarida sehingga dari satu molekul polisakarida akan dihasilkan 2 molekul oligosakarida. *Exoglucanase (cellobiohidrolase)* berfungsi mengubah satuan oligosakarida menjadi molekul-molekul disakarida. Bagian lain adalah  *$\beta$ -glukosidase* yang berfungsi untuk mengkonversi atau memecah satuan disakarida menjadi dua molekul glukosa

yang merupakan gula sederhana yang dapat diubah menjadi etanol Gambar 2.8 (<http://id.wikipedia.org/wiki/Enzim>).



Gambar 2.8 Skema pemutusan ikatan glikosida pada selulosa oleh enzim *selulase*

([www.answers.com/topic/cellulase](http://www.answers.com/topic/cellulase))

## 2.7 Perlakuan pendahuluan (*Pretreatment*)

*Pretreatment* terhadap bahan berlignoselulosa yang akan digunakan untuk produksi etanol perlu memperhatikan hal-hal antara lain dapat mempermudah pembentukan gula atau kemampuan pembentukan gula secara enzimatik, menghindari terjadinya degradasi atau kehilangan karbohidrat, menghindari terbentuknya produk sampingan yang bersifat sebagai penghambat pada proses hidrolisis dan fermentasi, dan biaya yang efektif.

*Pretreatment* dapat dilakukan secara fisika, fisiko-kimia, kimia, biologis maupun kombinasi dari cara satu dengan yang lainnya. Beberapa contoh cara *Pretreatment* tersebut (Sun and Cheng, 2002).

### 2.7.1 *Pretreatment* secara fisika

Pencacahan secara mekanik, misalnya *chipping*, *grinding* dan *milling* yang bertujuan untuk memperkecil ukuran bahan dan sekaligus mengurangi kristalinitas selulosa

Pirolisis pada suhu rendah

### 2.7.2 *Pretreatment* secara fisiko-kimia

- *Steam explosion*. Metoda ini paling banyak digunakan untuk perlakuan pendahuluan bahan berlignoselulosa. Pada metoda ini partikel biomassa diberi perlakuan uap jenuh bertekanan tinggi, kemudian tekanannya diturunkan secara cepat sehingga bahan mengalami dekompresi eksplosif.

- *Ammonia fiber explosion* (AFEX). Metoda ini mirip dengan *steam explosion*, yaitu dengan cara memaparkan biomassa pada suhu dan tekanan tinggi selama jangka waktu tertentu, kemudian tekanan diturunkan dengan cepat. Bedanya, pada metoda ini digunakan ammonia cair.
- *CO<sub>2</sub> explosion*. Metoda ini mirip dengan *steam explosion* dan *ammonia fiber explosion*. Metoda ini biayanya lebih efektif dari *ammonia fiber explosion* serta tidak menghasilkan senyawa penghambat hidrolisis seperti yang dihasilkan pada *steam explosion*.

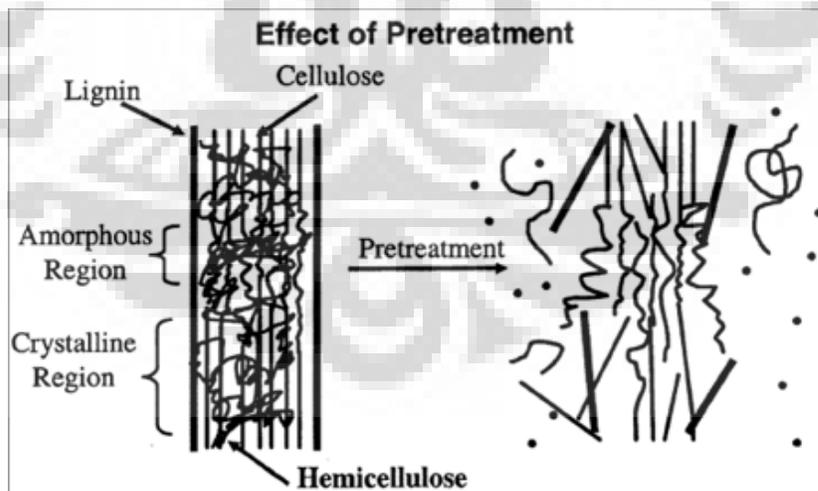
### 2.7.3 *Pretreatment* secara kimia

- Ozonolisis. Metoda ini menggunakan ozon untuk mendegradasi lignin dan sedikit hemiselulosa dengan proses reaksi yang berlangsung pada suhu dan tekanan ruang biasa, namun diperlukan jumlah ozon yang cukup banyak, sehingga biayanya menjadi mahal.
- Hidrolisis asam. Pada metoda ini biasanya digunakan asam kuat encer, biayanya lebih tinggi dari metoda *steam explosion* maupun *ammonia fiber explosion*. Disamping itu, diperlukan netralisasi pH agar proses hidrolisis dan fermentasi selanjutnya dapat berlangsung dengan baik.
- Hidrolisis alkalis.
- Delignifikasi oksidatif.
- Proses organosolv. Pada proses ini larutan organik seperti metanol, etanol, aseton, etilen glikol dan tetrahidrofurfuril alkohol dicampur

dengan katalis anorganik seperti HCl atau H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> atau katalis organik seperti asam oksalat, asam asetil salisilat dan asam salisilat, untuk memecahkan ikatan-ikatan lignin internal dan hemiselulosa.

#### 2.7.4 *Pretreatment* secara biologis

Pada metoda ini mikroorganismenya yang digunakan adalah jamur pelapuk coklat, jamur pelapuk putih dan jamur pelunak untuk mendegradasi lignin dan hemiselulosa yang ada dalam bahan berlignoselulosa. Di antara ketiganya, yang paling efektif untuk perlakuan pendahuluan pada bahan berlignoselulosa adalah jamur pelapuk putih. Beberapa enzim juga dapat mendegradasi lignin, antara lain *polifenol oksidase* dan *laccase*. Keuntungan proses biologis adalah kebutuhannya energi rendah dan kondisi proses atau lingkungan yang ringan, sedangkan keterbatasannya adalah kecepatan hidrolisis pada sebagian besar proses biologis sangat rendah.



Gambar 2.9 Efek *pretreatment* pada bahan berlignoselulosa (Mosier, *et al.* 2005).

## 2.8 Hidrolisis selulosa

Pada tahap ini terjadi proses sakarifikasi dimana selulosa diubah menjadi selobiosa dan selanjutnya menjadi gula-gula sederhana seperti glukosa. Gula-gula sederhana yang terbentuk dengan bantuan khamir seperti *Saccharomyces cerevisiae* atau bakteri *Zymomonas mobilis* selanjutnya difermentasi menjadi etanol. Hidrolisis selulosa dapat dilakukan menggunakan larutan asam atau dilakukan secara enzimatis. Proses hidrolisis secara enzimatis biasanya berlangsung pada kondisi yang ringan (pH sekitar 4.8 dan suhu 45 – 50 °C) dan tidak menimbulkan masalah korosi.

Enzim selulase biasanya merupakan campuran beberapa enzim, sedikitnya ada tiga kelompok enzim yang terlibat dalam proses hidrolisis selulosa, yaitu *endoglukanase* yang bekerja pada wilayah serat selulosa yang mempunyai kristalinitas rendah dan membentuk ujung rantai yang bebas, *eksoglukanase* atau *selobiohidrolase* yang mendegradasi lebih lanjut molekul tersebut dengan memindahkan unit-unit selobiosa dari ujung-ujung rantai yang bebas tadi, dan *β-glukosidase* yang menghidrolisis selobiosa menjadi glukosa. Hidrolisis selulosa juga dapat dilakukan dengan menggunakan mikroba yang menghasilkan enzim selulase, misalnya *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viride* dan *Aspergillus niger*.

Komponen hemiselulosa pada bahan berlignoselulosa dapat juga dihidrolisis dan selanjutnya difermentasi untuk menghasilkan etanol. Dalam hal ini dapat digunakan enzim yang menyerang hemiselulosa seperti

*glukuronidase, asetil esterase, xilanase,  $\beta$ -xilosidase, galaktomannanase* dan *glukomannanase* (Duff and Murray, 1996). Beberapa mikroba dapat menghasilkan enzim tersebut, misalnya jamur *Trichoderma* sp. dan *Aspergillus niger*, bakteri *Bacillus* sp dan *Streptomyces* sp. penghasil *xilanase*, jamur *Thielavia terrestris* dan *Polyporus versicolor*, bakteri *Bacillus*, *Aeromonas hydrophila*, *Streptomyces* sp dan *Pseudomonas* sp penghasil *mannanase* (Viikari *et al.* 1993). Selanjutnya, untuk proses fermentasi hasil hidrolisis komponen hemiselulosa seperti xilosa menjadi etanol dapat digunakan beberapa khamir *Pichia stipitis* atau *Candida shehatae* (Hahn Hagerdal, 1993).

## **2.9 Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak (SFS)**

Proses hidrolisis selulosa dan fermentasi gula dapat dilakukan secara terpisah atau bertahap, dapat pula dilakukan secara serentak dengan satu proses yang dikenal dengan Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak (SFS). Mikroba yang digunakan pada proses SFS biasanya jamur *T. reesei* dan khamir *S. cerevisiae*. Suhu optimum proses SFS adalah sekitar 38°C yang merupakan perpaduan suhu optimum hidrolisis (45 – 50 °C) dan suhu optimum fermentasi (30 °C) (Sun and Cheng, 2002).

Proses SFS memiliki keunggulan dibandingkan dengan proses hidrolisis dan fermentasi bertahap. Beberapa keuntungan itu antara lain: 1)

meningkatkan kecepatan hidrolisis dengan mengkonversi gula yang terbentuk dari hasil hidrolisis selulosa yang menghambat aktivitas enzim *selulase*, 2) mengurangi kebutuhan enzim, 3) meningkatkan rendemen produk, 4) mengurangi kebutuhan kondisi steril karena glukosa langsung dikonversi menjadi etanol, 5) waktu proses yang lebih pendek dan 6) volume reaktor lebih kecil karena hanya digunakan satu reaktor saja (Sun and Cheng, 2002). Adapun beberapa kendala yang perlu diatasi pada proses SFS adalah: 1) suhu hidrolisis dan fermentasi yang tidak sama, 2) toleransi mikroba terhadap etanol dan 3) penghambatan kerja enzim oleh etanol (Sun and Cheng, 2002).

## 2.10 Etanol

Etanol (disebut juga etil-alkohol atau alkohol saja), adalah alkohol yang paling sering digunakan dalam kehidupan sehari-hari. Karena sifatnya yang tidak beracun, bahan ini banyak dipakai sebagai pelarut dalam dunia farmasi dan industri makanan dan minuman. Etanol tidak berwarna dan tidak berasa tapi memiliki bau yang khas. Bahan ini dapat memabukkan jika diminum. Etanol sering ditulis dengan rumus EtOH. Rumus molekul etanol adalah  $C_2H_5OH$  atau rumus empiris  $C_2H_6O$ .

Etanol telah digunakan manusia sejak zaman prasejarah sebagai bahan pemabuk dalam minuman beralkohol. Residu yang ditemukan pada peninggalan keramik yang berumur 9000 tahun dari China bagian utara menunjukkan bahwa minuman beralkohol telah digunakan oleh manusia

prasejarah dari masa Neolitik (Roach, 2005). Etanol dan alkohol membentuk larutan azeotrop. Karena itu pemurnian etanol yang mengandung air dengan cara penyulingan biasa hanya mampu menghasilkan etanol dengan kemurnian 96%. Etanol murni (absolut) dihasilkan pertama kali pada tahun 1796 oleh Johan Tobias Lowitz yaitu dengan cara menyaring alkohol hasil distilasi melalui arang. Lavoisier menggambarkan bahwa etanol adalah senyawa yang terbentuk dari karbon, hidrogen dan oksigen. Pada tahun 1808 Saussure dapat menentukan rumus kimia etanol. Lima puluh tahun kemudian (1858), Couper menerbitkan rumus bangun etanol. Dengan demikian etanol adalah salah satu senyawa kimia yang pertama kali ditemukan rumus bangunnya (Couper, 1858).

Etanol untuk konsumsi umumnya dihasilkan dengan proses fermentasi atau peragian bahan makanan yang mengandung pati atau karbohidrat, seperti beras dan umbi. Alkohol yang dihasilkan dari proses fermentasi biasanya berkadar rendah. Untuk mendapatkan alkohol dengan kadar yang lebih tinggi diperlukan proses pemurnian melalui penyulingan atau distilasi. Etanol untuk keperluan industri dalam skala lebih besar dihasilkan dari fermentasi tetes, yaitu hasil samping dalam industri gula tebu atau gula bit. Proses lain yaitu dengan melalui sintesis kimia melalui antara reaksi gas etilen dan uap air dengan asam sebagai katalis. Katalis yang dipakai misalnya asam fosfat. Asam sulfat dapat juga dipakai sebagai katalis, namun dewasa ini sudah jarang dipakai.

Bioetanol adalah salah satu bahan bakar nabati yang saat ini menjadi primadona untuk menggantikan minyak bumi yang harganya semakin meningkat. Dibanding minyak bumi, bioetanol mempunyai kelebihan lebih ramah lingkungan dan penggunaannya sebagai campuran BBM terbukti dapat mengurangi emisi karbon monoksida dan asap lainnya dari kendaraan. Bertolak dari keadaan tersebut, bisnis bioetanol di Indonesia mempunyai prospek yang cerah karena melimpahnya bahan baku, seperti singkong, tebu, aren, jagung maupun hasil samping dari tanaman kelapa sawit yaitu tandan kosong kelapa sawit (TKKS).  
([http://www.joglotekagama.com/Files/Plthn\\_%20bioetanol.pdf](http://www.joglotekagama.com/Files/Plthn_%20bioetanol.pdf))

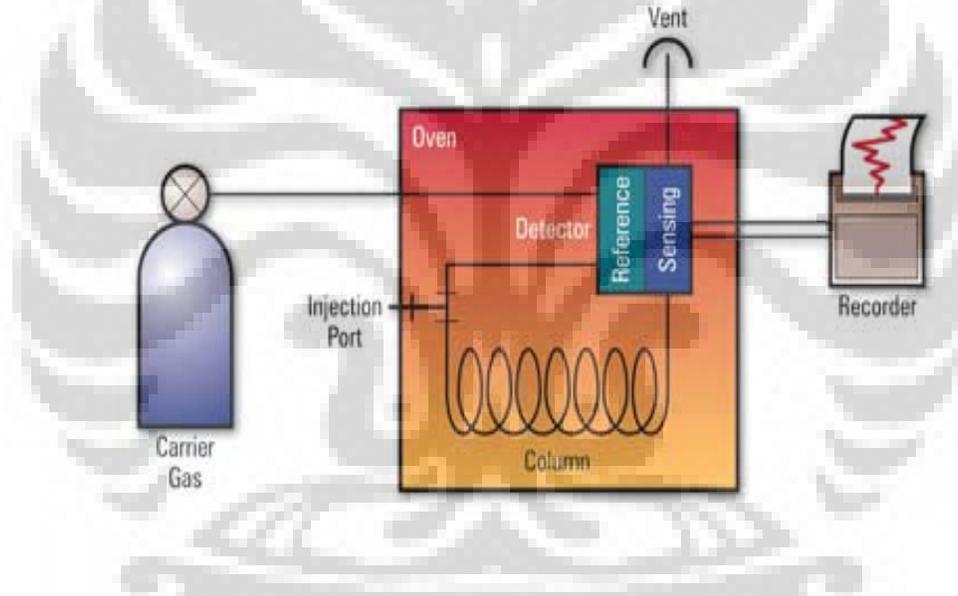
### **2.11 Kromatografi gas (GC)**

Dasar pemisahan pada kromatografi adalah pendistribusian sampel diantara dua fasa, yaitu fasa diam dan fasa bergerak. Proses pemisahan komponen-komponen dalam kromatografi berlangsung di dalam kolom berdasarkan pada interaksi komponen sampel dan fasa diam. Interaksi tersebut dapat berupa absorpsi atau partisi. Jika fase diam berupa padatan berpori disebut peristiwa absorpsi dan jika fasa diamnya berupa cairan disebut peristiwa partisi gas-cair.

Proses kromatografi gas mirip dengan peristiwa gabungan antara ekstraksi dan destilasi. Proses pemisahannya dapat dipandang sebagai serangkaian peristiwa partisi, dimana sampel masuk ke dalam fase cair, dan

selang beberapa waktu akan teruapkan kembali. Interaksi antara sampel dengan fase diam (cair) sangat menentukan berapa lama komponen-komponen sampel akan ditahan. Komponen-komponen yang mempunyai afinitas lebih rendah terhadap fase diam akan keluar dari kolom lebih dulu. Sedangkan komponen-komponen dengan afinitas lebih besar terhadap fase diam akan keluar dari kolom lebih lama (Sunardi, 2007).

Diag susunan peralatan kromatografi gas yang sederhana meliputi :



Gambar 2.10 Skema peralatan kromatografi gas

(<http://www.oilanalysis.com/backup/200207/GasChroma-Fig2.jpg>)

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Desain Penelitian**

Penelitian dilandaskan pada metode eksperimental. Seluruh data yang diperoleh digunakan sebagai data karakteristik awal *pretreatment* (perlakuan awal), sakarifikasi, karakteristik proses SFS, dan karakteristik etanol yang diperoleh dengan kromatografi gas (GC).

#### **3.2 Metode Penelitian**

Dalam penelitian, digunakan limbah lignoselulosa TKKS sebagai bahan baku untuk produksi bioetanol. Prinsip yang digunakan ialah dengan sistem *pretreatment*, sakarifikasi, dan Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak (SFS). Konsentrasi enzim dinyatakan dalam FPU (*Filter Paper Units*). FPU menyatakan aktivitas dari enzim selulase yaitu konsentrasi enzim yang diperlukan untuk menghasilkan 2 mg gula pereduksi dari 50 mg kertas saring Whatman selama 60 menit (Ghose, 1987).

Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ialah konsentrasi NaOH pada 2%; 4%; dan 6%, konsentrasi enzim pada 20, 40, 60, dan 80 FPU. Konsentrasi glukosa pada 0%; 2%; dan 4%, dan pH buffer asetat pada pH 4,5 dan pH 5 serta waktu reaksi pada 0 jam, 6 jam, 12 jam, 18 jam, 24 jam, 30 jam, 36 jam, 42 jam, 48 jam, 54 jam, 60 jam, 66 jam, 72 jam, dan 96

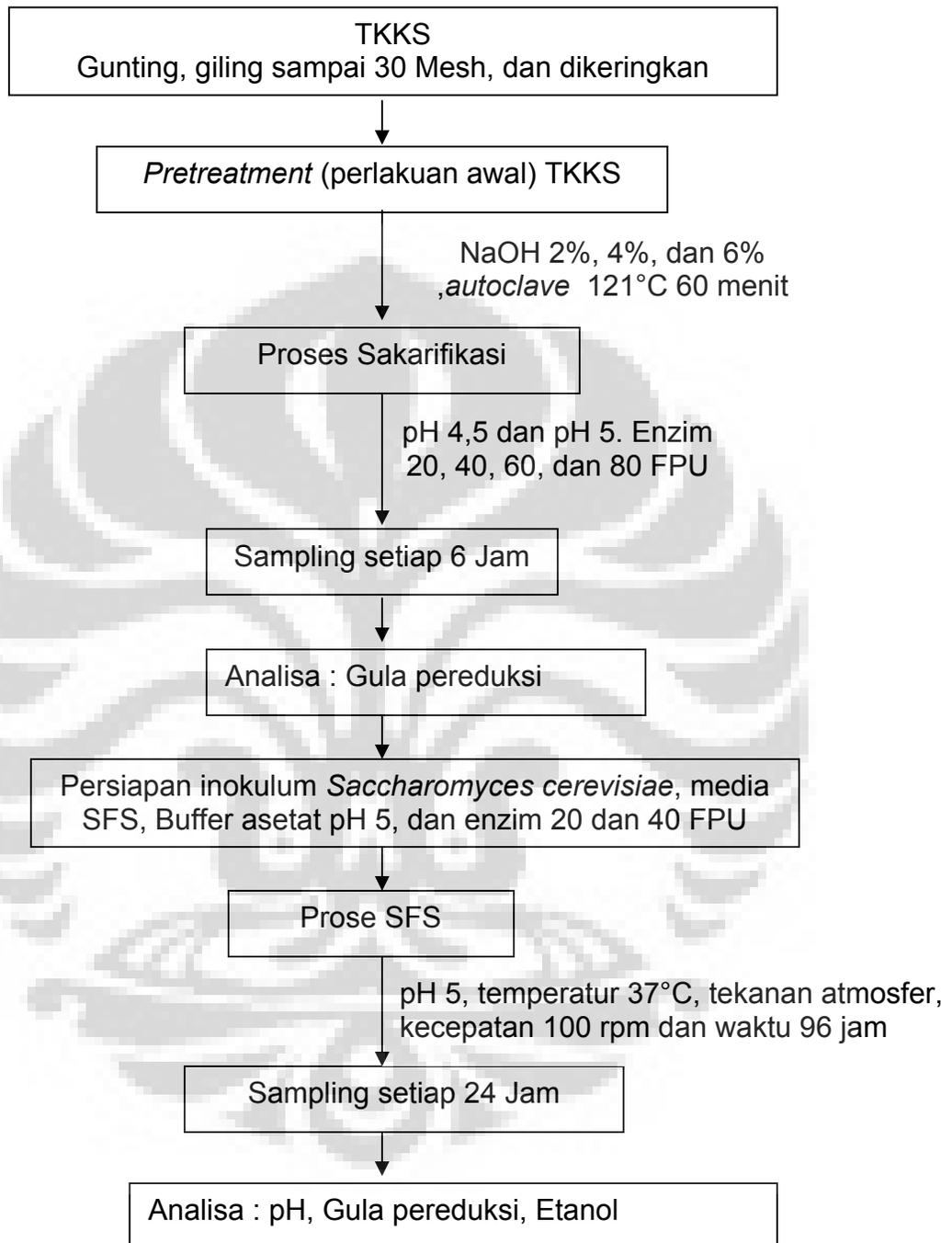
jam. Variabel tetap yang digunakan ialah jumlah substrat TKKS yaitu 5% (b/v), temperatur inkubasi pada 37°C, kecepatan *rotary shaker* 100 rpm dan tekanan atmosfer. Variabel yang terukur ialah pH larutan, konsentrasi gula produksi, dan konsentrasi etanol.

### **3.3 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Teknologi Lingkungan Pusat Penelitian Kimia Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (P2K LIPI) Serpong Tangerang dan Laboratorium Afiliasi Kimia UI Depok dari bulan Agustus 2008 sampai Februari 2009.

### **3.4 Pelaksanaan Penelitian**

Tahapan penelitian dilakukan melalui dua tahap yaitu tahap pendahuluan dan tahap penelitian utama. Tahapan pendahuluan terdiri atas perlakuan awal yaitu *pretreatment* dan sakarifikasi. Tahapan penelitian utama meliputi Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak (SFS). Diag alir penelitian terdapat pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Diag Alir Penelitian

### **3.5 Persiapan dan Perlakuan awal (*pretreatment*) Substrat TKKS**

#### **3.5.1 Alat dan bahan yang digunakan**

Alat yang digunakan pada tahap ini adalah gunting, *crusher*, botol leher besar, gelas ukur 100 mL, *autoclave*, neraca analitis, gelas kimia 2000 mL, magnet, *hotplate*, dan oven.

Bahan yang digunakan adalah tandan kosong kelapa sawit (TKKS) yang diambil dari PTPN VIII Malingping Banten, aquadest, NaOH teknis.

#### **3.5.2 Prosedur penelitian**

Pada tahapan ini TKKS mengalami perlakuan dimulai dengan pengeringan yang dilanjutkan dengan pencacahan menggunakan gunting dan *crusher* hingga diperoleh ukuran substrat sebesar  $\pm 30$  mesh.

*Pretreatment* TKKS menggunakan larutan NaOH 2%, 4%, dan 6% dengan masing-masing komposisi setiap 12,5 g TKKS ditambah dengan 87,5 mL larutan NaOH. Kemudian dipanaskan dalam *autoclave* pada temperatur 121°C selama 60 menit, dicuci dan dibilas sampai pH larutan netral. Padatan dikeringkan dalam oven pada temperatur 50 °C selama  $\pm 1$  hari.

### **3.6 Karakterisasi awal pada TKKS hasil *pretreatment***

Tahapan karakterisasi pada TKKS hasil *pretreatment* meliputi penentuan kadar air, kadar zat ekstraktif, kadar lignin, kadar holoselulosa, kadar  $\alpha$ -selulosa, dan kadar Hemiselulosa.

#### **3.6.1 Alat dan bahan yang digunakan**

Alat yang digunakan dalam tahapan ini adalah oven, cawan ukur, desikator, labu didih, pendingin sokhlet, kertas saring, tali pengikat, gunting, kapas, *magnetic stirer*, *stirer plate*, gelas filter IG3, erlenmeyer 500 mL, pompa vakum, dan *waterbath*.

Bahan yang digunakan adalah TKKS, alkohol benzena (1:2),  $H_2SO_4$  95%, akuades, air panas, larutan Natrium klorit ( $NaClO_2$ ), Asam asetat glasial, aseton, dan NaOH (p.a).

#### **3.6.2 Prosedur analisa**

##### **3.6.2.1 Penentuan kadar air**

Sebanyak 2 g TKKS (A) hasil *pretreatment* ditimbang dan dimasukkan ke dalam cawan yang sudah ditimbang sebelumnya (B). Kemudian dimasukkan ke dalam oven 100 °C selama 24 jam. Setelah pemanasan, sampel beserta cawan dimasukan ke dalam desikator selama 30 menit. Sampel beserta cawan ditimbang kembali hingga diperoleh bobot konstan (C).

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{A - (C - B)}{A} \times 100\%$$

### 3.6.2.2 Penentuan Kadar Zat Ekstraktif

Sebanyak 3 g TKKS (A) yang sudah diketahui kadar airnya (Ka) ditimbang dan dibungkus dalam kokon kertas saring. Siapkan labu didih 250 mL yang sudah diketahui beratnya (B). Kemudian TKKS diekstraksi dengan Soxhlet menggunakan pelarut etanol:benzen (1:2) sebanyak 2/3 labu didih selama 6 jam. dikeringkan labu didih yang sudah berisi ekstrak dalam oven suhu 100 °C selama 24 jam kemudian ditimbang (C).

$$\text{Kadar zat ekstraktif (\%)} = \frac{(C - B) \times (Ka + 100)}{100 \times A} \times 100$$

### 3.6.2.3 Penentuan Kadar Lignin

Sebanyak 1 g TKKS bebas ekstraktif (A) yang sudah diketahui kadar airnya (Ka) dan kadar ekstraktifnya (KE) dimasukkan ke dalam beaker glass 50 mL dan ditambahkan 15 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72%, kemudian diaduk sesekali pada suhu ruang selama 4 jam. Setelah pengadukan, isi beaker glass dipindahkan ke dalam erlenmeyer 1 L dan ditambahkan 560 mL air aquades. Erlenmeyer ditutup dengan aluminium foil dan dipanaskan dengan autoklave pada suhu 121°C selama 15 menit. Isi erlenmeyer disaring dengan menggunakan gelas filter IG-3 yang beratnya sudah diketahui (B). Endapan lignin dicuci dengan

air panas 500 mL. Filter gelas yang berisi endapan lignin tersebut dikeringkan dalam oven suhu 100°C selama 24 jam dan kemudian ditimbang (C).

$$\text{Kadar Lignin (\%)} = \frac{(C - B) \times (K_a + 100)}{100 \times A} \times (100 - K_E)$$

#### 3.6.2.4 Penentuan Kadar Holoselulosa

Sebanyak 2 g TKKS bebas ekstraktif (A) yang sudah diketahui kadar airnya ( $K_a$ ) dan kadar ekstraktifnya ( $K_E$ ) dimasukkan ke dalam erlenmeyer 300 mL. Kemudian ditambahkan 150 mL aquadest, 1 g  $\text{NaClO}_2$  dan 0,2 mL asam asetat glasial sampai sampel berwarna putih. Sampel disaring dengan menggunakan gelas filter IG-3 yang sudah diketahui beratnya (B). Endapan holoselulosa dicuci dengan menggunakan 500 mL air dingin dan dibilas dengan aseton sampai berwarna kuning pudar. Gelas filter berisi endapan holoselulosa dikeringkan dalam oven suhu 100°C selama 24 jam dan kemudian ditimbang (C).

$$\text{Kadar Holoselulosa (\%)} = \frac{(C - B) \times (K_a + 100)}{100 \times A} \times (100 - K_E)$$

### 3.6.2.5 Penentuan Kadar $\alpha$ -Selulosa

Sebanyak 1 g kering oven sampel holoselulosa (A) yang sudah diketahui kadar holoselulosannya (KH) dimasukkan dalam beaker glass 100 mL. Kemudian ditambahkan 25 mL NaOH 17,5% lalu diaduk setiap 5 menit selama 30 menit pada suhu ruang. Ditambahkan 25 mL aquadest dan dibiarkan selama 5 menit. Kemudian disaring dengan menggunakan gelas filter IG-3 yang sudah diketahui beratnya (B). Dicuci endapan alfa selulosa dengan air aquadest selama 3 menit, dengan 40 mL asam asetat 10% dan dilanjutkan dengan 1 L air panas. Gelas filter yang berisi endapan alfa selulosa dikeringkan dalam oven suhu 100°C selama 24 jam dan kemudian ditimbang (C).

$$\text{Kadar Alfa selulosa (\%)} = \frac{(C - B)}{A} \times KH$$

### 3.6.2.6 Penentuan Kadar Hemiselulosa

Kadar Hemiselulosa (%) = Kadar Holoselulosa – Kadar alfa selulosa

### **3.7 Persiapan SFS**

Tahapan preparasi proses fermentasi meliputi pembuatan kultur murni *S. cerevisiae*, pembuatan larutan buffer asetat pH 5, pembuatan media starter, larutan enzim dan medium fermentasi.

#### **3.7.1 Pembuatan kultur murni**

##### **3.7.1.1 Alat dan bahan yang digunakan**

Alat yang digunakan adalah neraca analitik, gelas kimia 100 mL, batang pengaduk, tabung reksi, *autoclave*, kawat ose, bunsen, laminar flow.

Bahan yang digunakan adalah *S. cerevisiae*, potato dextrose agar (PDA), kapas steril, etanol, dan aquadest.

##### **3.7.1.2 Prosedur pembuatan kultur murni *S. cerevisiae***

Kultur murni dibiakan terlebih dahulu dengan cara peremajaan dalam media agar miring dan ditumbuhkan selama  $\pm 48$  jam.

#### **Prosedur Pembuatan agar miring meliputi tahapan sebagai berikut**

- Ditimbang PDA sebanyak 3,90 g, kemudian dilarutkan dalam 100 mL *aquadest* dan diaduk sampai semua bahan larut.
- Medium disterilisasi dengan menggunakan *autoclave* selama  $\pm 20$  menit.

- Medium yang telah steril kemudian didinginkan dengan cara dimiringkan. Media agar miring disimpan dalam lemari pendingin jika tidak langsung digunakan.

**Prosedur Inokulasi kultur murni *S. cerevisiae* meliputi tahapan sebagai berikut**

- Lampu UV dan blower laminar transfer box dinyalakan selama  $\pm 20$  menit
- Disiapkan kultur murni *S. cerevisiae* yang akan diinokulasikan ke dalam agar miring
- Diinokulasikan *S. cerevisiae* dengan menggunakan kawat ose secara aseptis
- Hasil inokulasi diinkubasi selama 48 jam pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$ .

### **3.7.2 Pembuatan larutan buffer asetat pH 5**

#### **3.7.2.1 Alat dan bahan yang digunakan**

Alat yang digunakan adalah neraca analitik, spatula, gelas kimia, 250 mL, gelas ukur 100 mL, dan botol reagen.

Bahan yang digunakan adalah  $\text{CH}_3\text{COONa}$ ,  $\text{CH}_3\text{COOH}$  glasial, dan aquadest.

### 3.7.2.2 Prosedur pembuatan larutan buffer asetat pH 5

Komposisi larutan buffer asetat pH 5 terdiri dari  $\text{CH}_3\text{COONa}$ ,  $\text{CH}_3\text{COOH}$  glasial, dan aquadest. Cara pembuatannya sebagai berikut:

- Diencerkan 11,5 mL  $\text{CH}_3\text{COOH}$  glasial dengan aquadest sampai volume 1 L (larutan A)
- Dilarutkan 16,4 g  $\text{CH}_3\text{COONa}$  dalam 1 L aquadest (larutan B)
- Dicampurkan larutan A sebanyak 148 mL dan larutan B sebanyak 352 mL kemudian diencerkan dengan aquadest sampai 1 L
- Larutan buffer disimpan dalam botol reagent.

### 3.7.3 Pembuatan larutan inokulum (Starter)

#### 3.7.3.1 Alat dan bahan

Alat yang digunakan adalah neraca analitik, spatula, gelas kimia 1000 mL, erlenmeyer 250 mL, gelas ukur 500 mL, kapas, dan kain kasa.

Bahan yang digunakan adalah *S. cerevisiae*,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , *Yeast Extract*, dan Glukosa.

#### 3.7.3.2 Prosedur pembuatan larutan inokulum (Starter)

- Disiapkan bahan-bahan dan ditimbang  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,1 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 g, *Yeast Extract* 1 g, dan Glukosa 10 g. Kemudian bahan-bahan tersebut dilarutkan dalam 1 liter aquadest, dan diaduk sampai seluruh bahan larut.

- Medium disterilisasi dengan menggunakan autoclave selama  $\pm 20$  menit dan kemudian didinginkan.
- Ditambahkan  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,1 g secara aseptis
- *S. cerevisiae* yang berumur 48 jam dalam agar miring diinokulasikan ke dalam medium starter dan kemudian diinkubasikan dalam rotary shaker dengan kecepatan 100 rpm dan temperatur 37°C selama 24 jam.

### **3.7.4 Pembuatan larutan enzim *selulase***

#### **3.7.4.1 Alat dan bahan**

Alat yang digunakan adalah neraca analitik, spatula, erlenmeyer 250 mL, gelas ukur 500 mL, kapas, dan kain kasa.

Bahan yang digunakan adalah selulase komersial *meiselase* meiji seica-Jepang dan buffer asetat pH 5.

#### **3.7.4.2 Prosedur pembuatan larutan enzim *selulase* dengan konsentrasi 250 FPU**

- Ditimbang 11,63875 mg enzim *selulase* (*Meiselase*, Co Ltd, Japan)
- Dilarutkan dalam 100 mL larutan buffer asetat pH 5 yang telah disterilisasi

### 3.7.5 Pembuatan medium SFS

#### 3.7.5.1 Alat dan bahan

Alat yang digunakan adalah neraca analitik, spatula, gelas kimia 1000 mL, dan gelas ukur 500 mL.

Bahan yang digunakan adalah  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , *Yeast Extract*, dan aquadest.

#### 3.7.5.2 Prosedur pembuatan medium SFS

- Ditimbang  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,05 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  1g, dan *Yeast Extract* 2 g
- Dilarutkan dalam 1 liter aquadest, diaduk sampai seluruh bahan larut, kemudian disterilisasi menggunakan autoclave selama □ 20 menit lalu didinginkan.

### 3.8 Proses SFS

Tahapan pada proses SFS adalah:

- Ditimbang sebanyak 5 g substrat TKKS yang telah dilakukan perlakuan awal dengan NaOH 6% ke dalam erlenmeyer
- Ditambahkan 50 mL larutan medium fermentasi ke dalam sampel TKKS
- Ditambahkan 32 mL buffer asetat pH 5 untuk enzim 20 FPU dan 24 mL untuk enzim 40 FPU ke dalam sampel TKKS
- Ditambahkan glukosa dengan variasi 0%, 2%, dan 4%

- Disterilisasi menggunakan autoclave selama  $\pm$  20 menit lalu didinginkan
- Ditambahkan larutan enzim selulase sebanyak 8 mL untuk enzim 20 FPU dan 16 mL untuk enzim 40 FPU
- Ditambahkan inokulum (starter) sebanyak 10% dari volume total
- Diinkubasi dengan kondisi tekanan ruang, temperatur 37°C, dan kecepatan rotary shaker 100 rpm
- Disampling setiap 24 jam dengan sistem cuplik habis.

### **3.9 Proses analisis**

Proses analisa yang dilakukan pada penelitian ini adalah pengukuran pH larutan dengan menggunakan indikator pH universal, analisa glukosa dengan menggunakan metode Somogyi-Nelson (1952), dan analisa etanol dengan menggunakan alat gas kromatografi (GC).

#### **3.9.1 Alat dan bahan yang digunakan**

Alat yang digunakan untuk analisa adalah indikator pH Universal, pipet ukur 5 mL, pipet mikro, tabung reaksi, botol reagen, rak tabung reksi, *hot plate*, kelereng, gelas kimia, spektrofotometer U-2000 Hitachi Jepang, kromatografi gas GC-9A Shimadzu dengan kolom PEG, SE 30 Chromosorb W80-100 mesh.

Bahan yang digunakan adalah pereaksi Nelson dan pereaksi arseno molibdat yang terdiri dari  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  anhidrous, K.Tartrat,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidrous,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat,  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{HASO}_4$ , dan aquadest.

### 3.9.2 Pembuatan pereaksi

Pereaksi Nelson A dibuat dengan dilarutkan 12,5 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  anhidrous; 12,5 g K.Tartrat; 10,0 g  $\text{NaHCO}_3$ ; dan 100,0 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidrous di encerkan sampai 500 mL dengan aquadest.

Pereaksi Nelson B dibuat dengan dilarutkan 15 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  dan ditambah dengan 1-2 tetes  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat diencerkan sampai 100 mL dengan aquadest.

Pereaksi Nelson terdiri dari campuran Nelson A dan Nelson B (2:1) yang masing-masing terdiri dari 25 mL Nelson A dan 1 mL Nelson B.

Pereaksi arseno molibdat dibuat dengan cara dilarutkan 25,0 g  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 21,0 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat kemudian diencerkan dengan 400 mL aquadest (larutan A). Selanjutnya dilarutkan 3,0 g  $\text{Na}_2\text{HASO}_4$  dalam 25,0 mL aquadest (larutan B). Campurkan larutan A dan larutan B, disimpan terlebih dahulu selama  $\pm 24$  jam kemudian pereaksi siap untuk digunakan.

### **3.9.3 Prosedur analisis**

#### **3.9.3.1 Pengukuran pH larutan**

Prosedur pengukuran pH larutan dilakukan dengan cara mencelupkan kertas pH universal ke dalam masing-masing larutan sampel. Kemudian dibandingkan perubahan warna dengan warna standar yang tercantum dalam kemasan dan dicatat pH yang dihasilkan.

#### **3.9.3.2 Pengukuran konsentrasi gula pereduksi sebagai glukosa dengan metode Somogyi-Nelson**

- 1 mL larutan standar glukosa dengan konsentrasi masing-masing 0,1%; 0,2%; 0,3%; 0,5%; dan 0,7% ditambah dengan pereaksi Nelson sebanyak 1 mL dalam tabung reaksi
- Sampel dipanaskan dalam air panas ( $\pm 100^{\circ}\text{C}$ ) selama 20 menit, lalu didinginkan
- Ditambahkan 1 mL pereaksi arseno molibdat, diencerkan dengan aquadest sampai volume 10 mL kemudian dikocok sampai endapan larut kembali
- Diukur serapan larutan sampel dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 520 nm
- Dibuat kalibrasi larutan standar
- Dilakukan langkah 1-5 untuk larutan sampel
- Hasil pengukuran diplot

### 3.9.3.3 Pengukuran konsentrasi etanol

Pengukuran konsentrasi etanol dilakukan dengan menggunakan GC yang dilakukan di Laboratorium Afiliasi Kimia UI, dengan prosedur pengoperasian alat GC sebagai berikut :

- Dibuka aliran gas pembawa  $N_2$  dari tangki hingga gas mengalir ke alat GC dan indikator menunjukkan angka 6 kg/cm<sup>2</sup>
- Diatur kecepatan aliran gas pembawa yang diinginkan
- Power dinyalakan
- Diatur kondisi operasi, yaitu temperatur kolom dan temperatur injektor. Bila lampu injektor sudah menyala berarti alat siap untuk digunakan lebih lanjut
- Dinyalakan udara dari generator, kran dibuka agar oksigen masuk ke dalam alat GC
- Kran gas  $H_2$  dibuka sehingga  $H_2$  dapat mengalir ke alat GC
- Diatur kecepatan udara, yaitu 0,0 mL/menit dan kecepatan gas  $H_2$  0,5 mL /menit. Pembakar dinyalakan dan jika ada uap air yang keluar dari cerobong berarti api dalam pembakar sudah menyala. Adanya uap air tersebut terlihat pada kaca yang diletakan di atas cerobong
- Diatur kembali kecepatan udara menjadi 0,5 mL/menit dan kecepatan gas  $H_2$  0,5 mL /menit
- Diinjeksikan sampel dan diamati kromatogram yang dihasilkan pada recorder.

Prosedur analisa kandungan etanol dalam larutan sampel dan standar dilakukan sebagai berikut:

- Disiapkan larutan etanol standar dengan konsentrasi 0,5%; 1%; 1,5%; 2%; 2,5%; dan 3% (v/v)
- Disiapkan peralatan GC
- Dilakukan langkah 1-3 (lihat prosedur pengoperasian alat GC)
- Diatur kondisi temperatur kolom pada suhu 120°C dan temperatur injektor pada 150°C serta kecepatan alir optimum gas pembawa pada 30-60 mL/menit
- Dilakukan langkah 5-8 (lihat prosedur pengoperasian alat GC)
- Diinjeksikan masing-masing standar etanol
- Diinjeksikan sampel hasil fermentasi
- Dicatat luas area dari hasil rekorder dan dibuat kurva regresi linear terhadap standar dan dimasukkan nilai luas area masing-masing.

### 3.10 Perhitungan Nilai Yield (%)

Nilai Yield merupakan nilai konversi karbohidrat (selulosa dan hemiselulosa) menjadi etanol. Nilai tersebut dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut (Zhu, *et al.* 2006).

$$Y = \frac{E \times 0,9}{S \times 0,51} \times 100\%$$

Dimana

Y = Nilai Yield (%)

E = Konsentrasi etanol yang dihasilkan (g/L)

S = Kadar selulosa dan hemiselulosa pada TKKS yang diberikan (g/L)

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Komposisi Kimia TKKS

Hasil analisis komposisi kimia TKKS dapat dilihat pada Tabel 4.1, yang memperlihatkan bahwa tumbuhan ini termasuk dalam kelas dengan kandungan holoselulosa tinggi yaitu 56,49%, yang terdiri dari selulosa 33,25% dan hemiselulosa 23,24%. Kadar lignin pada tanaman ini adalah 25,83% (Sudiyani dkk, 2008).

Tabel 4.1 Data komposisi kimia TKKS inisial

Komposisi	Kadar (%)
Kadar air	8,56
Lignin	25,83
Holoselulosa	56,49
$\alpha$ -selulosa	33,25
Hemiselulosa	23,24
Zat ekstraktif	4,19

Seperti tertera pada Tabel 4.1 di atas, maka jenis biomassa TKKS ini baik digunakan sebagai bahan baku untuk pembuatan etanol karena

mengandung selulosa yang tinggi, dengan kadar lignin yang termasuk sedang. Lignin mempunyai struktur yang kompleks dan heterogen yang berikatan dengan selulosa dan hemiselulosa dalam jaringan tanaman. Lebih dari 30% tanaman tersusun atas lignin yang memberikan bentuk yang kokoh. Selain itu, lignin juga membentuk ikatan yang kuat dengan polisakarida yang melindungi polisakarida dari degradasi (Orth *et al.* 1993). Proses delignifikasi dilakukan agar diperoleh selulosa yang benar-benar murni, terpisah dari lignin. Biomassa berkadar selulosa tinggi dengan pengolahan yang tepat dapat menghasilkan rendemen etanol yang tinggi.

#### **4.2 Perubahan Kandungan Kimia TKKS Akibat *Pretreatment***

Komponen TKKS terdiri dari selulosa, hemiselulosa, dan lignin. Agar selulosa dapat terhidrolisis dengan baik oleh enzim *selulase*, perlu dilakukan *pretreatment* dengan tujuan untuk proses penghilangan lignin (delignifikasi). Hal ini dilakukan karena lignin dalam TKKS bisa menghalangi interaksi enzim dengan selulosa dan akhirnya menghambat kerja enzim yang akan menghidrolisa selulosa menjadi gula sederhana. Tahapan yang dilakukan dalam proses *pretreatment*, meliputi *pretreatment* fisik maupun *pretreatment* kimia. Dalam *pretreatment* fisik, proses yang dilakukan adalah pencacahan atau perajangan dengan menggunakan golok, pengguntingan dengan menggunakan gunting, dan penggilingan dengan menggunakan *crusher*. Pencacahan bertujuan untuk mengubah ukuran TKKS yang berukuran besar menjadi sederhana. Pengguntingan bertujuan untuk mengubah ukuran TKKS

hasil pencacahan menjadi lebih sederhana. Penggilingan bertujuan untuk mengubah ukuran TKKS hasil pengguntingan menjadi lebih kecil hingga diperoleh ukuran yang diinginkan yaitu  $\pm 30$  mesh. Dengan ukuran TKKS  $\pm 30$  mesh, diharapkan bisa memperluas luas permukaan sehingga interaksi antara TKKS baik dengan bahan kimia dan enzim pada proses *pretreatment* kimia dan proses hidrolisis dapat berlangsung dengan baik.

Proses *pretreatment* kimia dilakukan dengan tujuan untuk menghilangkan lignin, memecah selulosa dan hemiselulosa, mengurangi kristalinitas selulosa sehingga dapat meningkatkan luas bidang kontak sampel pada saat hidrolisis. Dalam penelitian ini dilakukan *pretreatment* kimia menggunakan larutan NaOH dengan variabel konsentrasi 2%; 4%; dan 6% dan dipanaskan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C, 1,2 kpa selama 60 menit. Hal ini dilakukan berdasarkan hasil penelitian terbaik sebelumnya. Hasil analisis komposisi kimia TKKS setelah *pretreatment* disajikan pada Tabel 4.2.

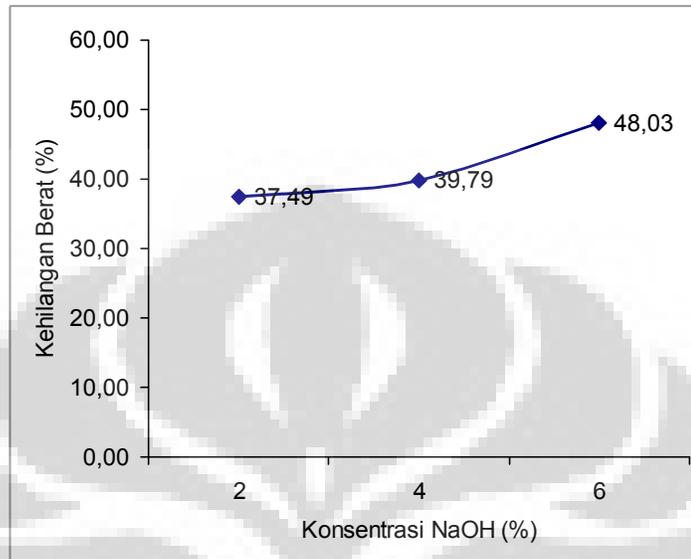
Tabel 4.2 Data komposisi kimia TKKS setelah *pretreatment* dengan NaOH

Komposisi	Kadar (%)		
	NaOH 2%	NaOH 4%	NaOH 6%
Kadar air	5,36	4,77	5,72
Lignin	23,68	23,28	21,97
Holoselulosa	73,38	73,62	90,12
$\alpha$ -selulosa	50,20	52,30	73,67
Hemiselulosa	23,18	21,32	16,45
Zat ekstraktif	3,48	3,61	3,26

Hasil analisa kimia TKKS sebelum *pretreatment* dan setelah *pretreatment* dengan NaOH 2%; 4%; dan 6% menunjukkan bahwa terjadi perubahan kandungan kimia (Tabel 4.1 dan 4.2). Perubahan yang terjadi adalah penurunan kadar hemiselulosa dan lignin. Penurunan kadar hemiselulosa dan lignin terjadi akibat adanya larutan NaOH dan pemanasan.

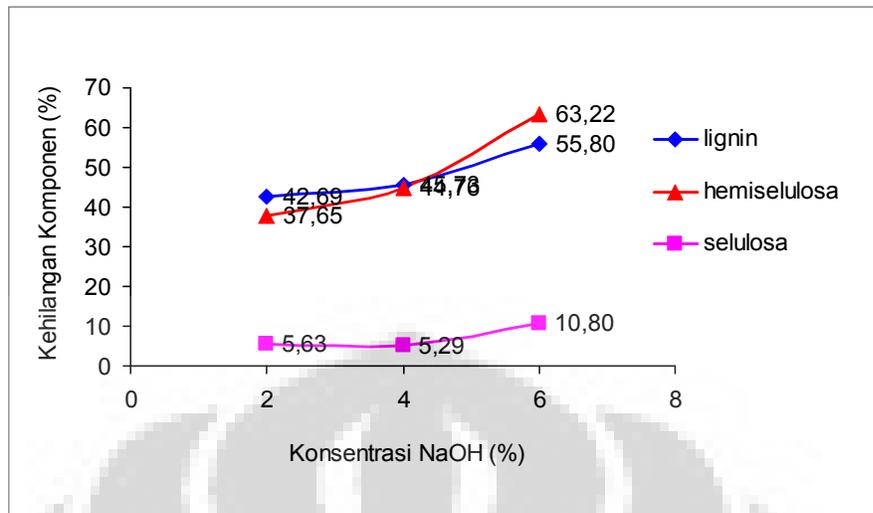
Kadar selulosa sebelum *pretreatment* adalah 33,25%, sedangkan setelah *pretreatment* dengan larutan NaOH 2%; 4%; dan 6% berturut-turut adalah sebesar 50,20%; 52,30%; dan 73,67%. Peningkatan kadar selulosa paling tinggi terjadi pada *pretreatment* dengan larutan NaOH 6%. Dengan tingginya kadar selulosa, diharapkan akan menyebabkan tingginya kadar gula pereduksi yang terbentuk pada saat proses hidrolisis dengan enzim *selulase*.

Kehilangan berat TKKS akibat *pretreatment* dengan larutan NaOH 2%; 4%; dan 6% disajikan pada gambar 4.1.



Gambar 4.1. Kehilangan berat TKKS akibat *pretreatment* dengan NaOH

Pada proses *pretreatment* diharapkan degradasi lignin sebesar-besarnya dan degradasi selulosa sekecil-kecilnya. Gambar 4.1 menunjukkan nilai kehilangan berat total TKKS akibat *pretreatment* dengan NaOH. Semakin tinggi konsentrasi larutan NaOH yang diberikan, semakin tinggi pula nilai kehilangan berat total yang dihasilkan. Nilai kehilangan berat total tertinggi diperoleh pada nilai konsentrasi larutan NaOH 6% yaitu sebesar 48,03%.



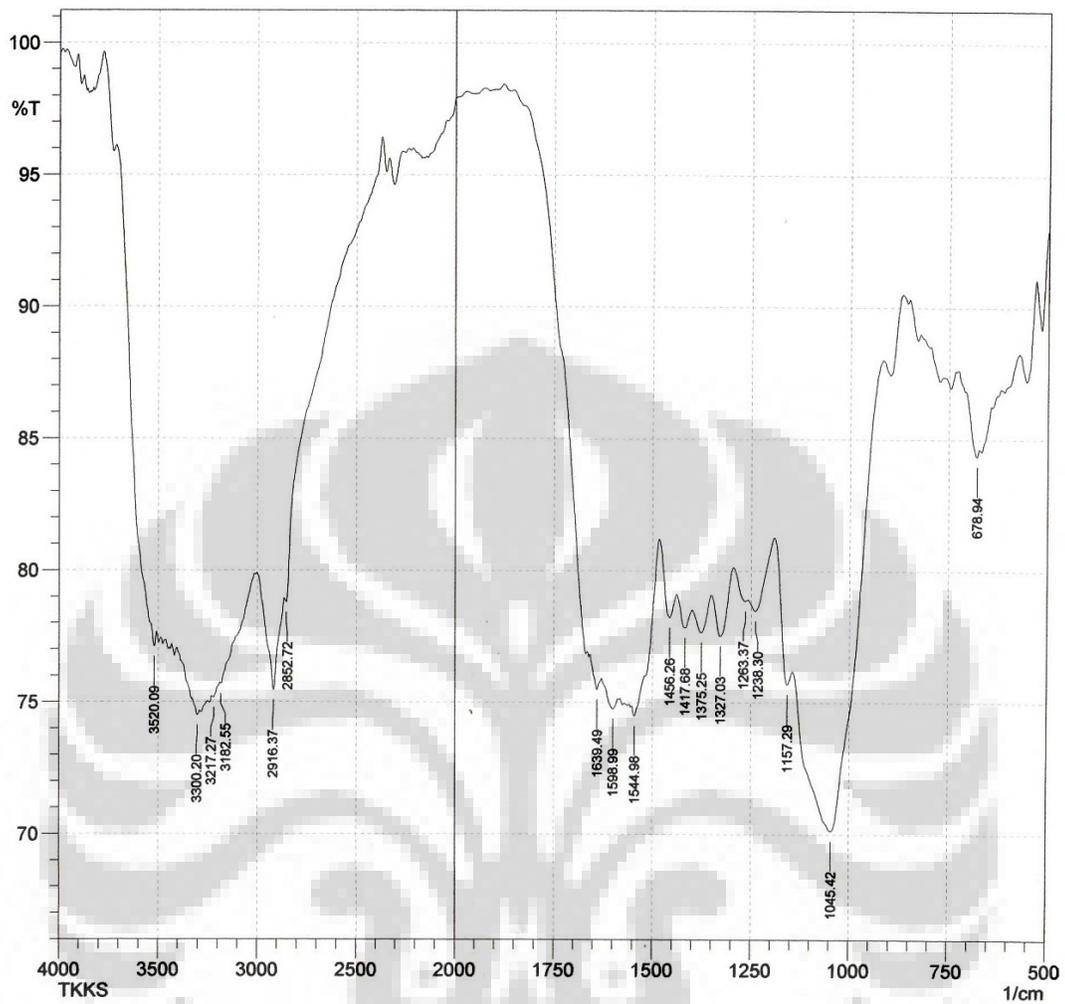
Gambar 4.2. Kehilangan komponen TKKS akibat *pretreatment* dengan NaOH

Nilai kehilangan komponen TKKS akibat *pretreatment* dengan NaOH ditunjukkan pada Gambar 4.2. Kecenderungan degradasi komponen pada TKKS mengarah pada komponen lignin dan hemiselulosa. Hal ini terlihat dari nilai kehilangan komponen terbesar adalah pada komponen lignin dan hemiselulosa dari setiap konsentrasi larutan NaOH yang digunakan. Sedangkan komponen selulosa memiliki nilai kehilangan komponen yang relatif kecil. Untuk variabel konsentrasi larutan NaOH, hasil yang terbaik diperoleh pada konsentrasi larutan NaOH 6% yaitu dengan kehilangan komponen lignin dan hemiselulosa masing-masing sebesar 55,80% dan 63,22%. Sedangkan kehilangan komponen selulosa hanya 10,80%.

Berdasarkan dari nilai kehilangan komponen TKKS akibat *pretreatment* dengan NaOH 6% tersebut, hasil yang diperoleh cukup signifikan. Nilai pembeda dengan masing-masing konsentrasi NaOH 2 dan

4% adalah sebesar 13,11% dan 10,07%. Hal ini berarti dengan konsentrasi larutan NaOH 6%, lignin dan hemiselulosa dapat terdegradasi dengan baik sedangkan selulosa hanya sedikit terdegradasi, artinya bahwa kadar lignin dan hemiselulosa sebagai penghambat dalam hidrolisis selulosa dengan enzim *selulase* dapat terminimalisir, sehingga selulosa secara maksimal dapat terhidrolisis menjadi gula-gula yang lebih sederhana.

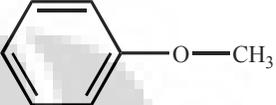
Analisis kehilangan komponen lignin pada TKKS akibat *pretreatment* dapat dilakukan dengan cara analisis gugus fungsi lignin menggunakan FT-IR (*Fourier Transform Infra Red*). Analisis dengan alat tersebut bertujuan untuk mendukung data hasil analisis sebelumnya yaitu analisis dengan metode klasik. Menggunakan alat FT-IR bisa mengidentifikasi adanya gugus fungsi yang hilang akibat adanya *pretreatment* dengan larutan NaOH. Daerah infra merah terletak pada bilangan gelombang  $4000-400\text{ cm}^{-1}$ . Senyawa organik memiliki spektrum yang khas, artinya bahwa dengan senyawa yang berbeda akan memiliki spektrum yang berbeda pula. Hasil analisis FT-IR dari TKKS sebelum dan sesudah *pretreatment* disajikan pada Gambar 4.3; 4.4; 4.5; dan 4.6.

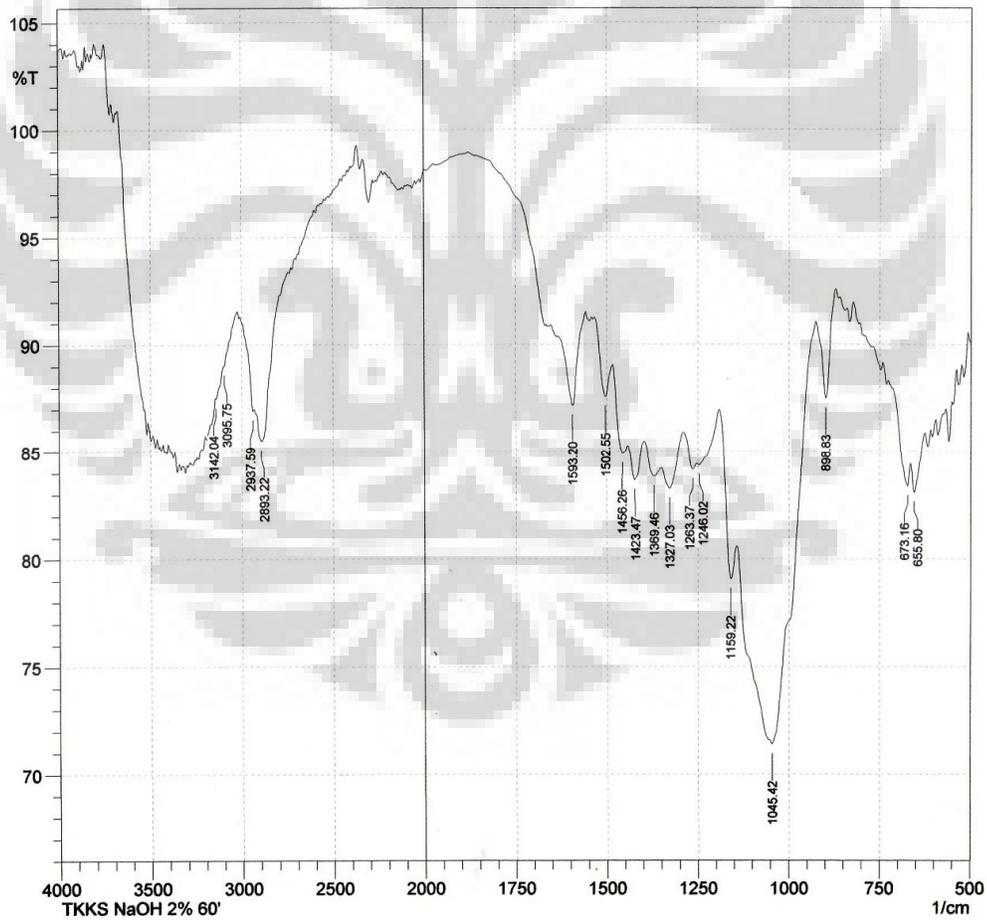


Gambar 4.3 Spektrum IR TKKS inisial

Berdasarkan hasil spektrum IR dari TKKS, dapat dilakukan identifikasi gugus fungsi yang terdapat pada tiap-tiap spektrum. Hasil identifikasi tersebut disajikan pada Tabel 4.3.

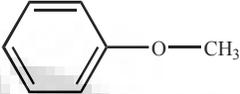
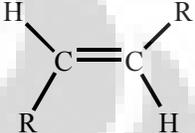
Tabel 4.3 Identifikasi gugus-gugus fungsi pada lignin TKKS inisial

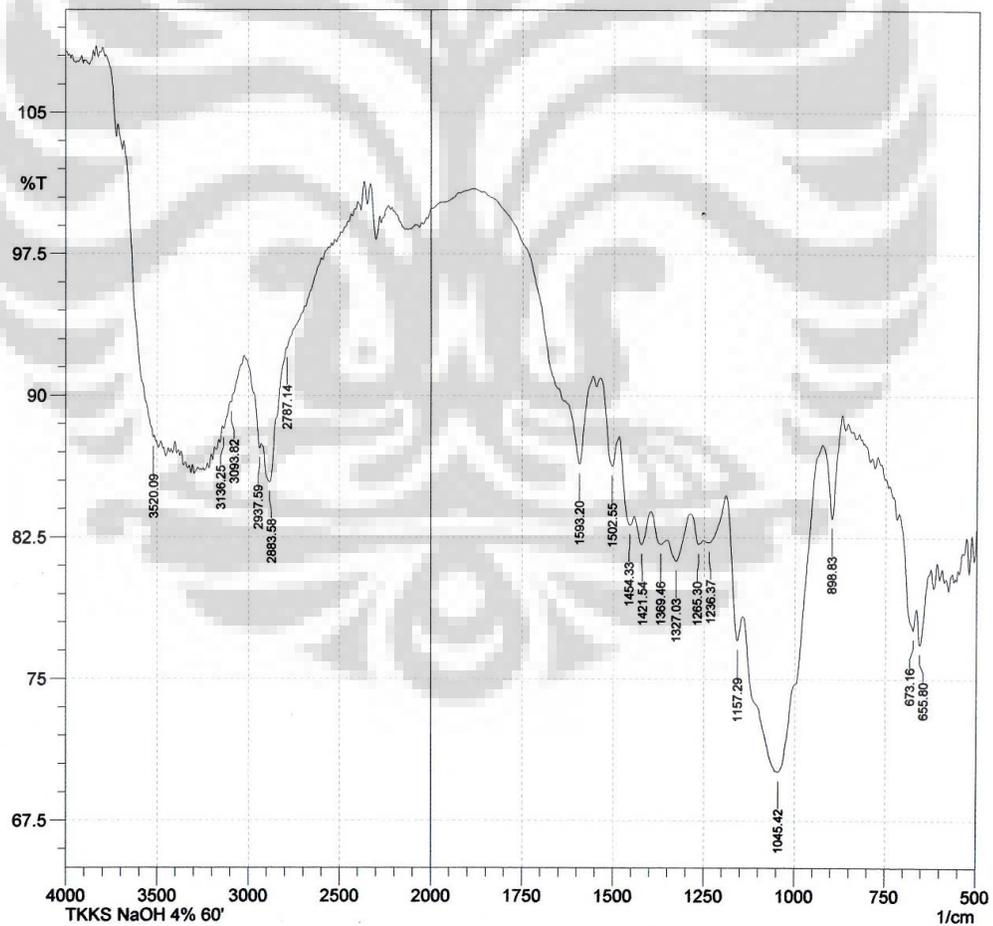
Frekuensi absorpsi ( $\nu = \text{cm}^{-1}$ )	Identifikasi gugus fungsi
3520,09	OH
2916,37	C-O-CH <sub>3</sub>
1375,25	CH <sub>3</sub>
1238,30	



Gambar 4.4 Spektrum IR TKKS dengan *pretreatment* NaOH 2%.

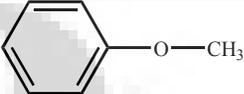
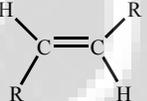
Tabel 4.4 Identifikasi gugus-gugus fungsi pada lignin TKKS dengan *pretreatment* NaOH 2%

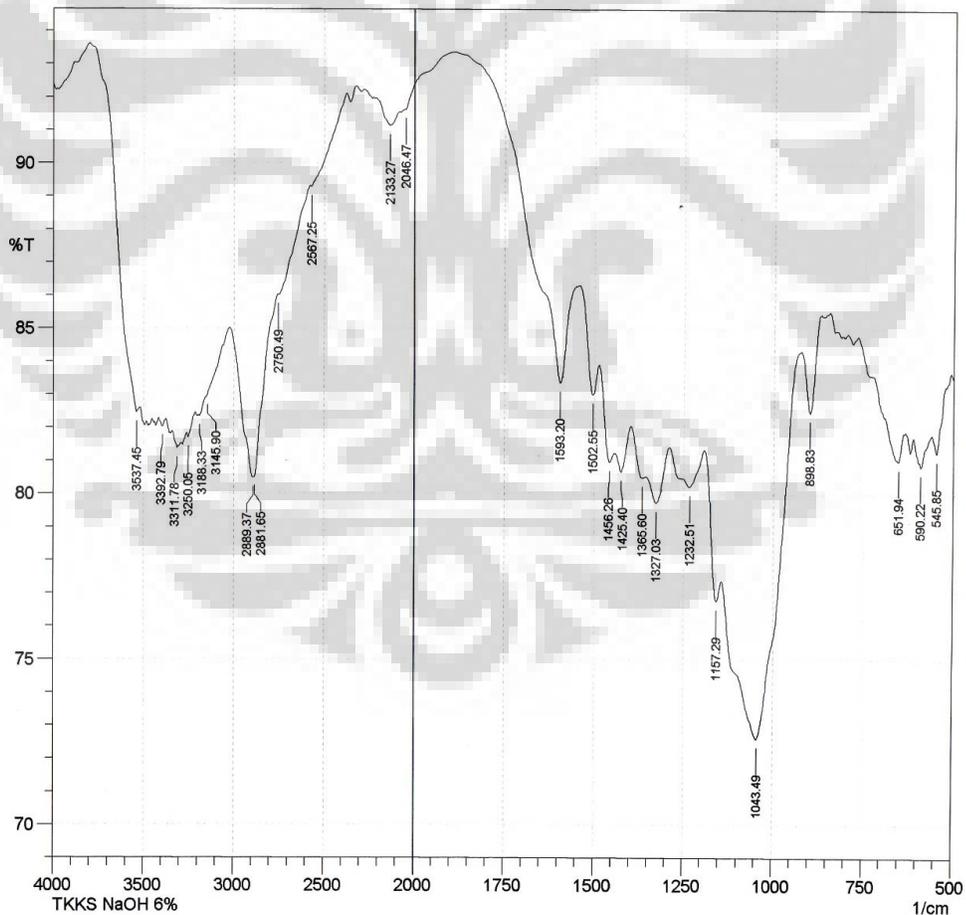
Frekuensi absorpsi ( $\nu = \text{cm}^{-1}$ )	Identifikasi gugus fungsi
2937,59	C-O-CH <sub>3</sub>
1369,46	CH <sub>3</sub>
1246,02	
898,83	



Gambar 4.5 Spektrum IR TKKS dengan *pretreatment* NaOH 4%.

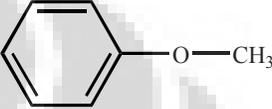
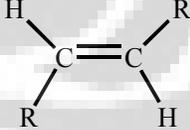
Tabel 4.5 Identifikasi gugus-gugus fungsi pada lignin TKKS dengan *pretreatment* NaOH 4%

Frekuensi absorpsi ( $\nu = \text{cm}^{-1}$ )	Identifikasi gugus fungsi
3520,09	OH
2937,59	C-O-CH <sub>3</sub>
1369,46	CH <sub>3</sub>
1236,37	
898,83	



Gambar 4.6 Spektrum IR TKKS dengan *pretreatment* NaOH 6%.

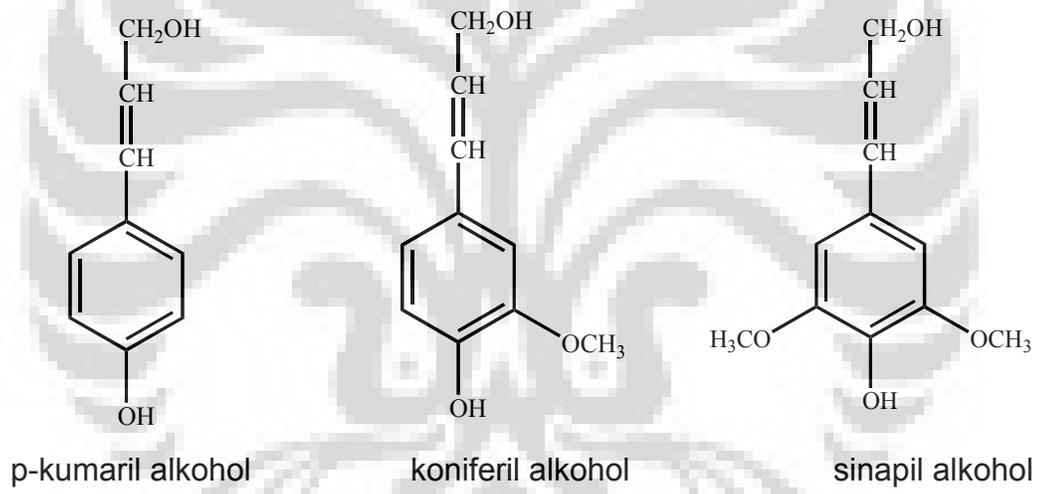
Tabel 4.6 Identifikasi gugus-gugus fungsi pada lignin TKKS dengan *pretreatment* NaOH 6%

Frekuensi absorpsi ( $\nu = \text{cm}^{-1}$ )	Identifikasi gugus fungsi
3537,45	OH
2889,37	C-O-CH <sub>3</sub>
1365,60	CH <sub>3</sub>
1232,51	
898,83	

Gugus-gugus fungsi pada Tabel 4.3 menunjukkan adanya gugus hidroksil, eter, alkil, dan eter aromatik. Sedangkan gugus-gugus fungsi pada Tabel 4.4-4.5 menunjukkan adanya gugus hidroksil, eter, alkil, eter aromatik dan alkena. Vibrasi yang terjadi pada gugus fungsi hidroksil, eter, dan alkil adalah vibrasi ulur, sedangkan vibrasi yang terjadi pada gugus fungsi eter aromatik dan alkena adalah vibrasi tekuk. Perbedaan jenis vibrasi yang terjadi pada masing-masing gugus fungsi disebabkan oleh jenis perubahan yang terjadi pada masing-masing gugus fungsi. Gugus fungsi yang mengalami vibrasi ulur adalah gugus fungsi yang mengalami perubahan jarak dua atom dalam molekul. Misalnya gugus fungsi O-H yang akan mengalami vibrasi ulur pada frekuensi absorpsi sekitar  $3520,09 \text{ cm}^{-1}$ . Gugus fungsi yang mengalami vibrasi tekuk adalah gugus fungsi yang mengalami perubahan

sudut antara dua ikatan kimia dengan molekul lebih dari dua atom. Misalnya gugus fungsi C=C yang akan mengalami vibrasi tekuk pada frekuensi absorpsi sekitar  $898,83\text{ cm}^{-1}$ .

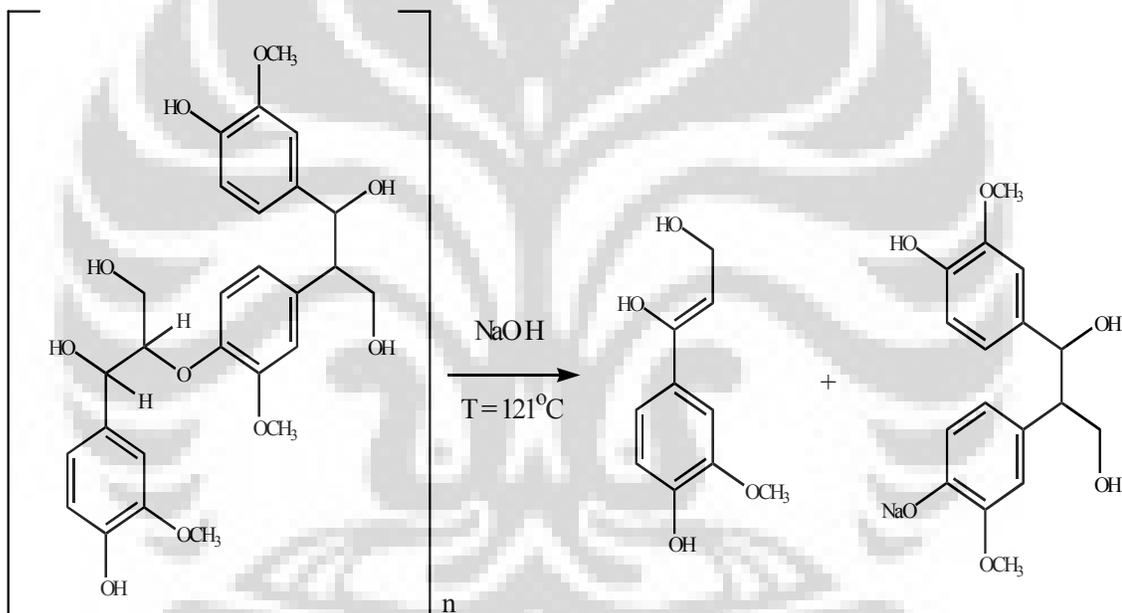
Gugus-gugus fungsi hidroksil, eter, alkil, eter aromatik dan alkena merupakan gugus yang terdapat pada monomer penyusun lignin. Monomer penyusun lignin terdiri dari koniferil alkohol, p-kumaril alkohol, dan sinapil alkohol. Pada TKKS sendiri yang merupakan jenis kayu lunak, monomer terbanyak penyusun lignin adalah koniferil alkohol (Palonen, 2004).



Gambar 4.7 Monomer penyusun lignin

Apabila dilihat dari hasil identifikasi terhadap gugus-gugus fungsi monomer penyusun lignin, tidak terdapat gugus alkena yang teridentifikasi pada Gambar 4.3. Hal ini jelas berbeda dengan adanya gugus alkena yang terdapat pada koniferil alkohol. Tidak teridentifikasinya gugus alkena tersebut

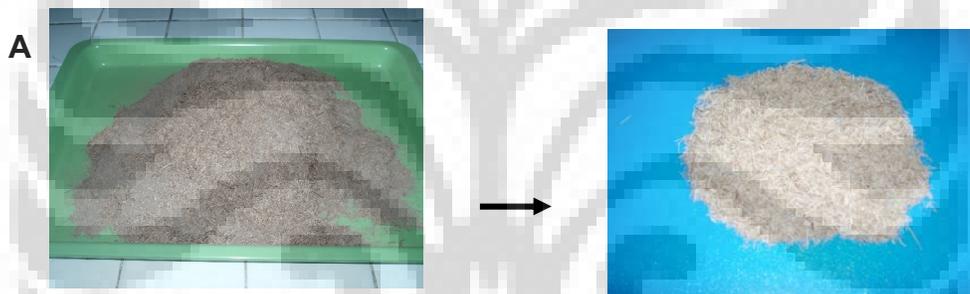
pada TKKS inisial, disebabkan karena lignin pada TKKS inisial masih utuh dan tidak mengalami pemutusan ikatan  $\beta$ -O-4 aril eter. Berbeda dengan lignin pada TKKS yang mengalami *pretreatment* dengan adanya larutan NaOH dan pemanasan (Gambar 4.4-4.6), akan mengalami pemutusan ikatan  $\beta$ -O-4 aril eter yang akan menyebabkan terbentuknya gugus baru yaitu gugus alkena yang muncul pada  $898,83\text{ cm}^{-1}$ . Reaksi yang terjadi, disajikan pada Gambar 4.8.



Gambar 4.8 Reaksi degradasi lignin oleh NaOH

Reaksi diawali dengan adanya NaOH disertai dengan adanya pemanasan. Pada NaOH,  $\text{OH}^-$  akan menyerang atom H yang relatif bersifat positif membentuk  $\text{H}_2\text{O}$  dan diikuti dengan terjadinya penataan ulang ke arah yang lebih stabil sehingga terbentuknya ikatan rangkap. Terbentuknya ikatan

rangkap mendorong pemutusan ikatan  $\beta$ -O-4 aril eter. Sedangkan untuk  $\text{Na}^+$  akan berikatan dengan atom oksigen yang bermuatan negatif. Produk yang diperoleh terdiri dari monomer-monomer penyusun lignin dan berupa garam, yang bersifat larut dalam air. Oleh karena itu pada proses *pretreatment*, monomer tersebut akan terbuang bersamaan dengan larutan NaOH. Hal ini terbukti dengan keruhnya larutan NaOH setelah proses pemanasan dengan *autoclave*. Dan didukung dengan semakin pucatnya warna TKKS setelah proses *pretreatment*.



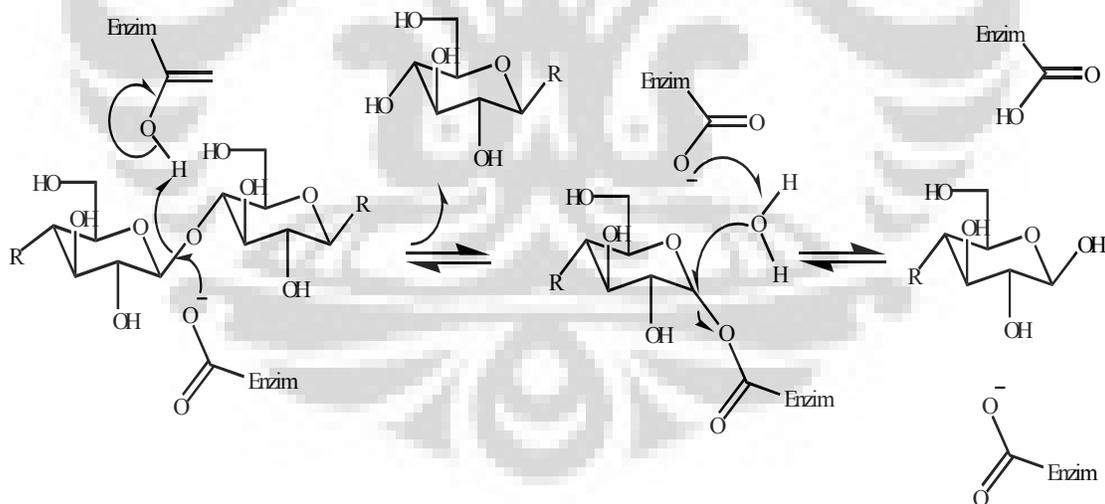
Gambar 4.9 Tampilan TKKS (A) sebelum *pretreatment* dan (B) sesudah *pretreatment*

#### 4.3 Pengaruh pH dan Penambahan Konsentrasi Enzim *Selulase* Terhadap Konsentrasi Gula pereduksi pada Proses Hidrolisis

Pada proses hidrolisis terjadi proses sakarifikasi dimana selulosa diubah menjadi gula pereduksi dengan adanya enzim *selulase*. Proses hidrolisis secara enzimatis ini, biasanya berlangsung pada kondisi range pH 4,8-5,2 (Zimbardi *et al.* 1997). Dalam penelitian yang dilakukan, pH yang digunakan adalah pH 4,5 dan 5. Hal ini dilakukan berdasarkan pada range pH

4,8-5,2 yang memiliki nilai pembeda yang cukup signifikan jika digunakan nilai pH 4,5 dan 5 sebesar 0,5. Berbeda jika mengambil nilai pH 4,8 dan 5 hanya memiliki nilai pembeda yang tidak cukup signifikan yaitu sebesar 0,2. Contoh lain jika digunakan nilai pH 5 dan 5,2 hanya memiliki nilai pembeda sebesar 0,2. Dengan kecilnya nilai pembeda tersebut, kemungkinan tidak akan memberikan pengaruh yang terlalu signifikan.

Besar kecilnya nilai konsentrasi gula pereduksi yang dihasilkan, tergantung seberapa besar enzim *selulase* dapat menghidrolisis selulosa, sehingga diperlukan kondisi optimum agar enzim dapat bekerja dengan baik. Reaksi hidrolisis enzimatik pada selulosa disajikan pada Gambar 4.10.



Gambar 4.10 Reaksi hidrolisis enzimatik pada selulosa

([www.answers.com/topic/cellulase](http://www.answers.com/topic/cellulase))

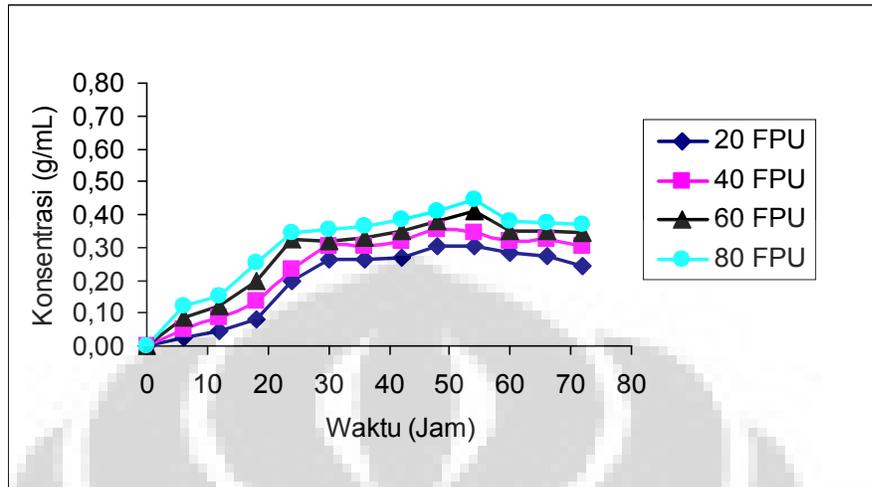
Seperti tertera pada Gambar 4.10 di atas, reaksi hidrolisis enzimatis pada selulosa diawali dengan pemutusan ikatan  $\beta$ -1,4-glikosidik. Pemutusan ikatan disebabkan karena adanya muatan elektron negatif pada enzim yang menyerang ikatan  $\beta$ -1,4-glikosidik sehingga ikatan tersebut mengalami pemutusan ikatan. Oksigen (O) yang bermuatan negatif dari enzim akan berikatan dengan karbon (C), sedangkan Oksigen yang terikat pada molekul selulosa yang lainnya akan berikatan dengan ion  $H^+$  yang terputus dari enzim. Hal tersebut menyebabkan terbentuknya enzim dengan atom oksigen bermuatan negatif dan selulosa lain hasil pemutusan.

Proses selanjutnya adalah selulosa yang terikat dengan enzim akan mengalami pelepasan enzim kembali dengan cara penataan ulang. Hal ini terjadi dengan cara elektron negatif pada Oksigen yang terdapat pada enzim akan menyerang ikatan O-H pada air sehingga ikatan tersebut mengalami pemutusan. Kemudian ion  $H^+$  yang berasal dari air akan berikatan dengan Oksigen yang bermuatan negatif dari enzim. Sedangkan ion  $OH^-$  dari air akan berikatan dengan C pada selulosa. Hal tersebut menyebabkan enzim terdorong keluar dengan oksigen bermuatan negatif. Hal tersebut akan terus berlangsung sampai selulosa benar-benar terpecah menjadi selobiosa dan akhirnya menjadi gula-gula sederhana.

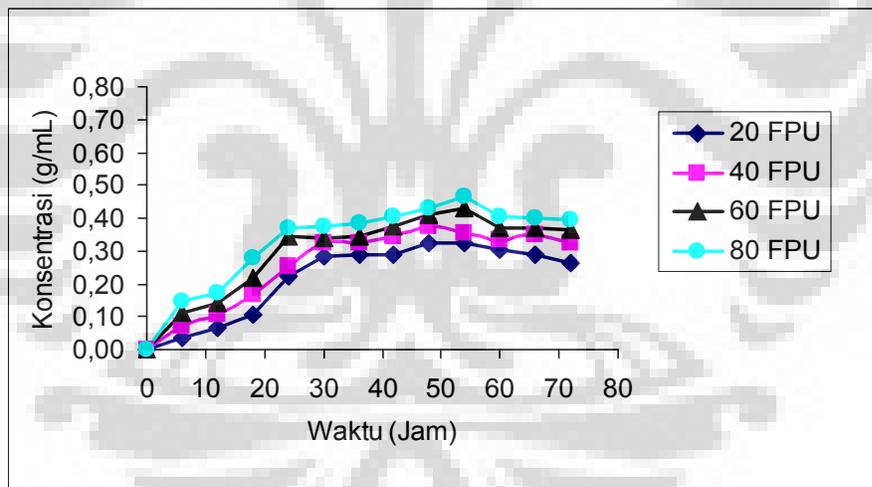
#### **4.3.1 Hidrolisis pada TKKS hasil *pretreatment* dengan NaOH 2%**

Hasil hidrolisis selulosa menjadi gula pereduksi pada TKKS hasil *pretreatment* dengan NaOH 2%, disajikan pada Gambar 4.11 dan 4.12 di

bawah ini.



Gambar 4.11 Pengaruh penambahan konsentrasi enzim dan pH 4,5 terhadap konsentrasi gula pereduksi yang dihasilkan



Gambar 4.12 Pengaruh penambahan konsentrasi enzim dan pH 5 terhadap konsentrasi gula pereduksi yang dihasilkan

Seperti tertera pada gambar 4.11 dan 4.12, terlihat nilai konsentrasi gula pereduksi dari hasil hidrolisis dengan enzim *selulase*. Dari kedua gambar tersebut terlihat bahwa nilai konsentrasi gula pereduksi mengalami

peningkatan yang cukup tajam dari mulai 0 jam sampai 24 jam. Pada 0 jam, nilai konsentrasi gula pereduksi bernilai nol. Hal ini disebabkan karena pada saat 0 jam enzim belum bekerja, sehingga tidak ada selulosa yang terhidrolisis menjadi gula pereduksi.

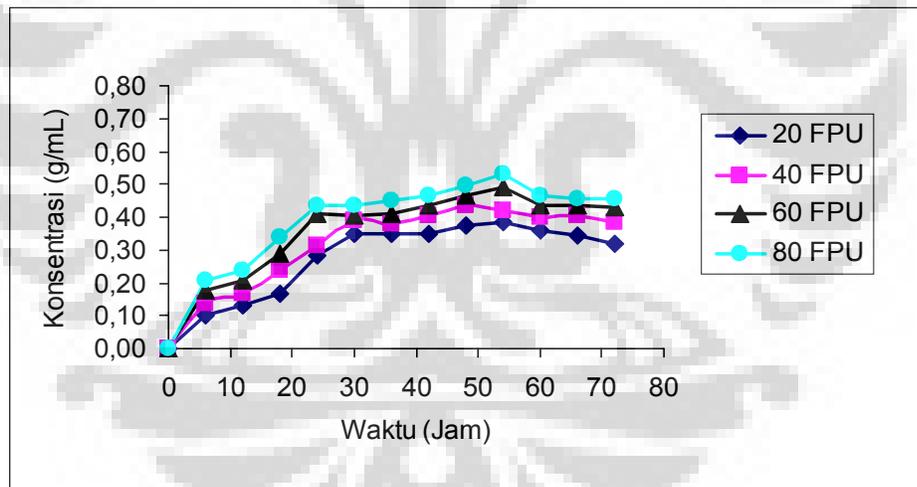
Pada perlakuan dengan pH 4,5 terlihat nilai konsentrasi gula pereduksi tertinggi dihasilkan pada penambahan konsentrasi enzim 80 FPU, diikuti dengan konsentrasi enzim 60 FPU, 40 FPU, dan 20 FPU. Nilai konsentrasi gula pereduksi yang diperoleh dari penambahan konsentrasi enzim 80 FPU, 60 FPU, 40 FPU, dan 20 FPU masing-masing adalah 0,3443 g/mL, 0,3219 g/mL, 0,2313 g/mL, dan 0,1964 g/mL. Nilai-nilai tersebut merupakan nilai konsentrasi gula pereduksi pada 24 jam. Apabila dilihat untuk jam-jam berikutnya yaitu dari 30 jam sampai 72 jam, relatif mengalami peningkatan konsentrasi gula pereduksi tetapi tidak terlalu besar. Misalnya pada penambahan konsentrasi enzim 80 FPU, nilai konsentrasi gula pereduksi bernilai konstan dari 24 jam sampai 72 jam dan hanya berbeda sekitar 0,0091 g/mL.

Sama halnya pada perlakuan dengan pH 5, nilai gula pereduksi mengalami peningkatan dari 0 jam sampai 24 jam. Nilai konsentrasi gula pereduksi tertinggi dihasilkan pada penambahan konsentrasi enzim 80 FPU. Misalnya pada 24 jam, diperoleh nilai konsentrasi gula pereduksi sebesar 0,3701 g/mL. Apabila dibandingkan dengan nilai konsentrasi gula pereduksi pada perlakuan dengan pH 4,5 pada 24 jam sebesar 0,3443 g/mL, nilai pembedanya adalah sekitar 0,0258 g/mL. Berdasarkan data tersebut, jelas

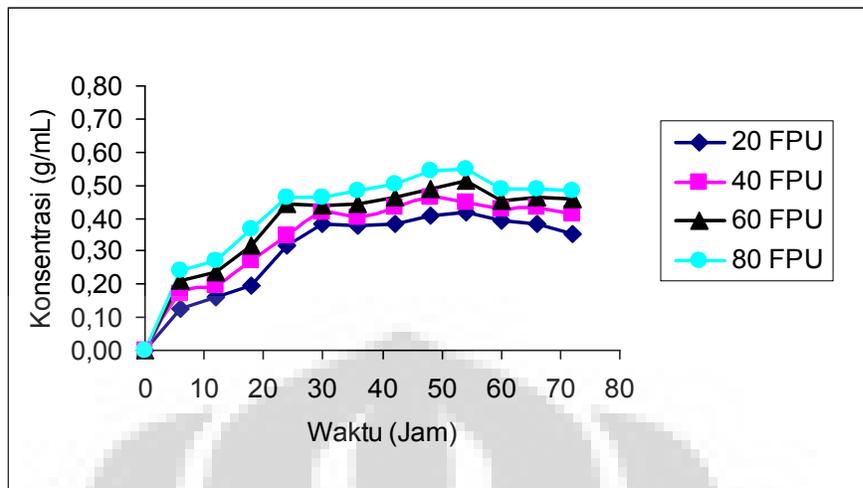
bahwa dengan perbedaan pH yang digunakan akan memberikan nilai konsentrasi gula pereduksi yang dihasilkan. Dengan kata lain, pada TKKS dengan *pretreatment* NaOH 2% enzim *selulase* bekerja dengan baik menghidrolisis selulosa pada pH 5 dengan berbagai konsentrasi enzim.

#### 4.3.2 Hidrolisis pada TKKS hasil *pretreatment* dengan NaOH 4%

Hasil proses hidrolisis pada TKKS hasil *pretreatment* dengan NaOH 4%, nilai konsentrasi gula pereduksi yang dihasilkan disajikan pada Gambar 4.13 dan 4.14.



Gambar 4.13 Pengaruh penambahan konsentrasi enzim dan pH 4,5 terhadap konsentrasi gula pereduksi yang dihasilkan



Gambar 4.14 Pengaruh penambahan konsentrasi enzim dan pH 5 terhadap konsentrasi gula pereduksi yang dihasilkan

Perlakuan dengan pH 4,5 pada berbagai nilai konsentrasi enzim yang ditambahkan memberikan nilai konsentrasi gula pereduksi yang relatif memiliki pola nilai yang sama dengan TKKS pada *pretreatment* NaOH 2%. Pola nilai tersebut adalah mengalami peningkatan nilai konsentrasi gula pereduksi yang cukup tajam dari mulai 0 jam sampai 24 jam. Nilai konsentrasi gula pereduksi pada 0 jam adalah 0 g/mL, sedangkan pada 24 jam adalah 0,3119 g/mL pada penambahan konsentrasi enzim 40 FPU. Untuk jam-jam berikutnya yaitu dari 30 jam sampai 72 jam memiliki nilai konsentrasi gula pereduksi yang relatif linear walaupun mengalami peningkatan dan penurunan nilai konsentrasi gula pereduksi.

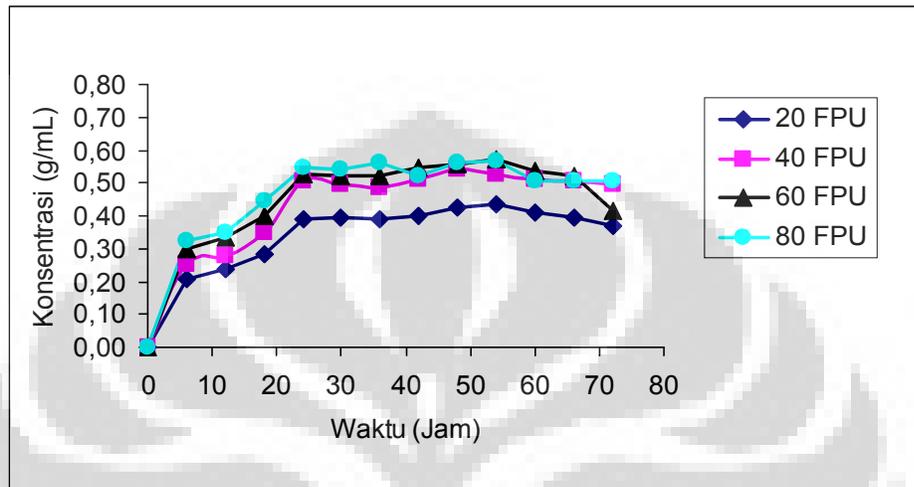
Penurunan konsentrasi gula pereduksi terjadi pada 30 jam ke 36 jam yaitu dari 0,3883 g/mL ke 0,3817 g/mL dengan nilai pembeda sebesar 0,0066

g/mL. Nilai konsentrasi gula pereduksi yang tertinggi diperoleh pada perlakuan dengan penambahan konsentrasi enzim 80 FPU pada berbagai kondisi waktu. Misalnya pada 24 jam, nilai konsentrasi gula pereduksi sebesar 0,4332 g/mL. Nilai ini lebih besar jika dibandingkan dengan perlakuan penambahan konsentrasi enzim pada 60 FPU, 40 FPU, dan 20 FPU dengan nilai konsentrasi gula pereduksi masing-masing sebesar 0,4108 g/mL, 0,3119 g/mL, dan 0,2836 g/mL.

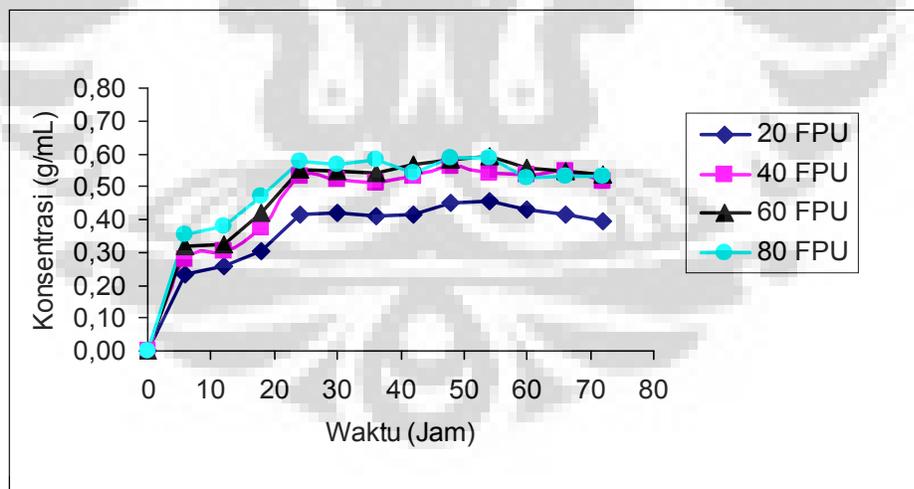
Pada perlakuan dengan pH 5, memberikan nilai konsentrasi gula pereduksi yang lebih besar jika dibandingkan dengan perlakuan pada pH 4,5. Peningkatan nilai konsentrasi gula pereduksi ini terjadi pada semua perlakuan dengan penambahan konsentrasi enzim dan pada kondisi waktu. Misalnya pada penambahan konsentrasi enzim 40 FPU, 24 jam pada pH 4,5 memiliki nilai konsentrasi gula pereduksi sebesar 0,3119 g/mL, sedangkan pada pH 5 memiliki nilai sebesar 0,3476 g/mL dengan nilai pembeda sebesar 0,0357 g/mL. Dengan kata lain pada perlakuan dengan pH 5 memiliki nilai konsentrasi gula pereduksi lebih tinggi dibanding dengan perlakuan pH 4,5 pada berbagai penambahan konsentrasi enzim dan kondisi waktu. Hal ini disebabkan pada pH 5 memberikan kondisi yang optimum kepada enzim *selulase* sehingga enzim tersebut dapat bekerja dengan baik.

### 4.3.3 Hidrolisis pada TKKS hasil *pretreatment* dengan NaOH 6%

Nilai konsentrasi gula pereduksi hasil hidrolisis pada TKKS hasil *pretreatment* dengan NaOH 6%, disajikan pada Gambar 4.15 dan 4.16.



Gambar 4.15 Pengaruh penambahan konsentrasi enzim dan pH 4,5 terhadap konsentrasi gula pereduksi yang dihasilkan



Gambar 4.16 Pengaruh penambahan konsentrasi enzim dan pH 5 terhadap konsentrasi gula pereduksi yang dihasilkan

Nilai konsentrasi gula pereduksi dengan perlakuan pH 4,5 pada TKKS dengan *pretreatment* NaOH 6%, memiliki nilai yang cukup besar jika dibandingkan pada TKKS dengan *pretreatment* NaOH 4 dan 2%. Misalnya pada penambahan konsentrasi enzim 40 FPU, 24 jam adalah 0,5047 g/mL. Nilai ini cukup besar jika dibandingkan pada TKKS dengan *pretreatment* NaOH 4 dan 2% dengan nilai konsentrasi gula pereduksi masing-masing sebesar 0,3119 g/mL dan 0,2313 g/mL.

Sama halnya dengan perlakuan pH 5 pada TKKS dengan *pretreatment* NaOH 6%, memiliki nilai yang cukup besar jika dibandingkan pada TKKS dengan *pretreatment* NaOH 4 dan 2%. Misalnya pada penambahan konsentrasi enzim 40 FPU, 24 jam adalah 0,5312 g/mL. Nilai ini cukup besar jika dibandingkan pada TKKS dengan *pretreatment* NaOH 4 dan 2% dengan nilai konsentrasi gula pereduksi masing-masing sebesar 0,3476 g/mL dan 0,2512 g/mL. Dan apabila dilihat nilai konsentrasi gula pereduksi tertinggi pada 24 jam, diperoleh dengan perlakuan pH 5 dengan penambahan konsentrasi enzim 80 FPU pada TKKS dengan *pretreatment* NaOH 6% sebesar 0,5761 g/mL.

Hal ini disebabkan karena pada TKKS dengan *pretreatment* NaOH 6% memiliki nilai selulosa yang tinggi yaitu sebesar 73,67% yang memungkinkan diperolehnya nilai konsentrasi gula pereduksi yang tinggi pula. Berbeda pada TKKS dengan *pretreatment* NaOH 4 dan 2% dengan kadar selulosa yang lebih rendah yaitu masing-masing sebesar 52,30% dan 52,20%, yang memungkinkan diperoleh nilai konsentrasi gula pereduksi lebih

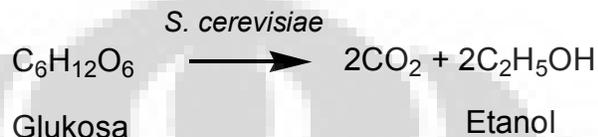
rendah dibanding pada TKKS dengan *pretreatment* NaOH 6%. Oleh sebab itu untuk proses SFS selanjutnya hanya digunakan TKKS dengan *pretreatment* NaOH 6% pada kondisi pH 5. Sedangkan untuk konsentrasi enzim yang digunakan adalah 20 dan 40 FPU, hal ini dilakukan karena apabila dilihat dari nilai konsentrasi gula pereduksi yang dihasilkan pada penambahan konsentrasi enzim 60 dan 80 FPU memiliki nilai pembeda yang tidak cukup jauh yaitu sekitar 0,0100 g/mL. Hal lain yang menjadi alasan digunakannya konsentrasi enzim 20 dan 40 FPU adalah mengingat harga enzim yang cukup mahal jika digunakan dalam jumlah banyak.

#### **4.4 Hidrolisis Selulosa Menjadi Gula Pereduksi dan Fermentasi Gula Pereduksi Menjadi Etanol Pada Proses SFS**

Degradasi lignin pada bahan berlignoselulosa (TKKS) akan mempengaruhi jumlah selulosa yang terurai menjadi gula pereduksi. Apabila kadar lignin dalam TKKS tinggi (tanpa *pretreatment*), akan menyebabkan sulitnya enzim *selulase* berinteraksi dengan selulosa dan menyebabkan selulosa yang terhidrolisis oleh enzim menjadi gula pereduksi sangat rendah yaitu kurang dari 20%, sedangkan dengan *pretreatment* akan meningkat menjadi 90% (Mosier, *et al.* 2005). Semakin tinggi lignin yang terdegradasi, maka semakin mudah selulosa terurai membentuk gula pereduksi selama hidrolisis menggunakan enzim *selulase*. Pada tahapan ini, terjadi proses sakarifikasi dimana selulosa akan diubah menjadi selobiosa selanjutnya

menjadi gula-gula sederhana seperti glukosa.

Glukosa yang terbentuk akan diubah oleh yeast (*S. cerevisiae*) menjadi etanol dan karbondioksida (CO<sub>2</sub>). Secara umum persamaan reaksinya dapat ditulis sebagai berikut:



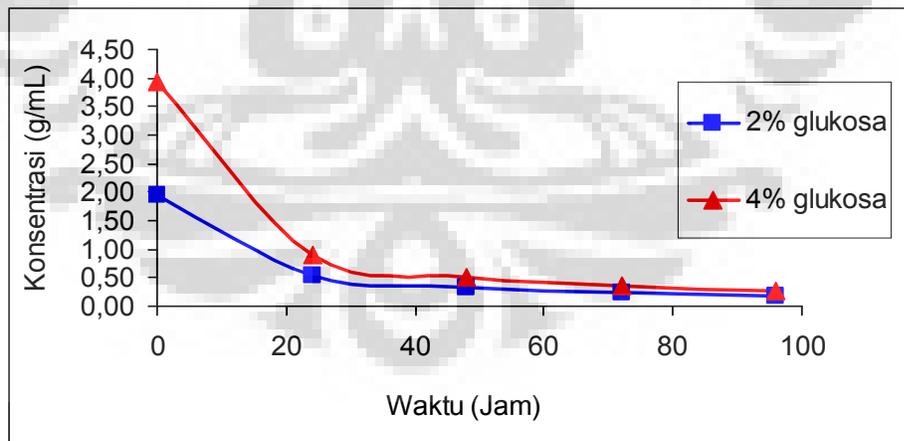
Gambar 4.17 Reaksi fermentasi glukosa

#### 4.4.1 Pengaruh Penambahan Konsentrasi Enzim *Selulase* Terhadap Konsentrasi Gula Pereduksi

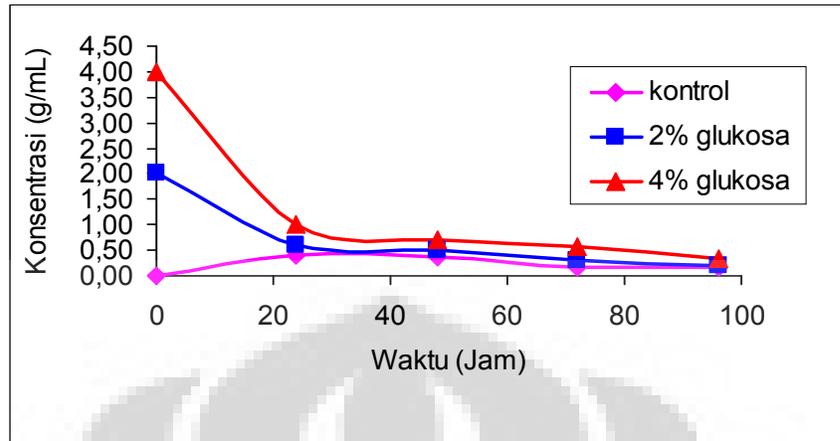
Adanya penambahan konsentrasi enzim *selulase* pada proses sakarifikasi adalah untuk mengetahui seberapa besar efektifitas kerja enzim untuk menghidrolisa selulosa menjadi gula pereduksi. Konsentrasi enzim yang ditambahkan adalah 20 dan 40 FPU. Penambahan konsentrasi enzim 20 dan 40 FPU pada proses SFS pada dasarnya diperoleh nilai gula pereduksi yang mempunyai pola yang sama. Pola tersebut adalah penurunan gula pereduksi setiap 24 jam reaksi. Hal ini terjadi pada perlakuan dengan penambahan glukosa pada media SFS dengan konsentrasi masing-masing 2 dan 4% (w/v). Berbeda dengan gula produksi yang dihasilkan oleh perlakuan

yang hanya TKKS saja tanpa penambahan glukosa. Pada perlakuan ini, gula preduksi yang dihasilkan semakin meningkat pada awal reaksi saja yaitu pada 24 jam pertama. Tetapi setelah 24 jam reaksi, baik pada perlakuan dengan penambahan glukosa atau tanpa penambahan glukosa mengalami penurunan nilai gula pereduksi.

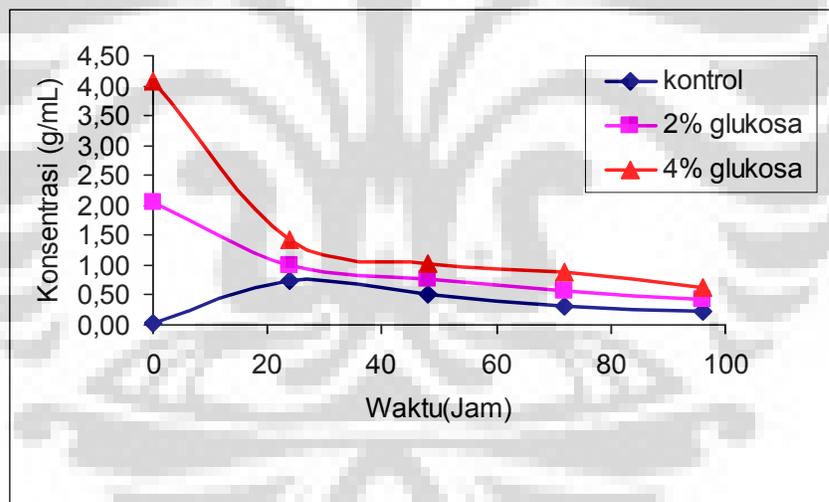
Sebagai pembandingan dilakukan pula proses SFS yang hanya menambahkan glukosa saja tanpa menambahkan TKKS dan enzim ke dalam media SFS. Hasil yang diperoleh untuk nilai gula pereduksi sama dengan perlakuan yang telah disebutkan di atas yaitu mengalami penurunan gula pereduksi pada 24 jam reaksi. Dalam proses ini hanya mengalami proses fermentasi saja yaitu merubah glukosa menjadi etanol dengan adanya *S. cerevisiae*.



Gambar 4.18 Pengaruh penambahan glukosa 2 dan 4% terhadap konsentrasi gula pereduksi yang dihasilkan



Gambar 4.19 Pengaruh penambahan 20 FPU enzim *selulase* serta glukosa 2 dan 4% terhadap konsentrasi gula pereduksi yang dihasilkan



Gambar 4.20 Pengaruh penambahan 40 FPU enzim *selulase* serta glukosa 2 dan 4% terhadap konsentrasi gula pereduksi yang dihasilkan

Hasil analisis gula pereduksi di atas menunjukkan bahwa konsentrasi gula pereduksi yang dihasilkan pada enzim 40 FPU lebih besar dibandingkan dengan enzim 20 FPU. Hal ini menunjukkan bahwa dengan semakin

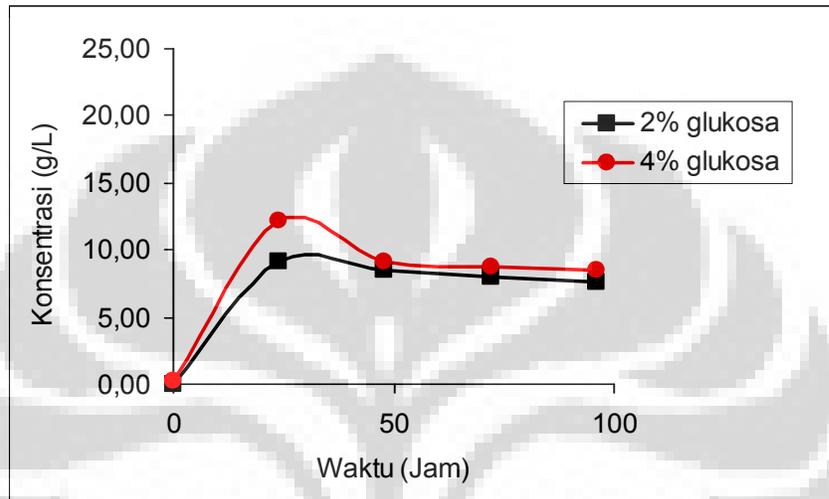
banyaknya enzim yang diberikan, akan mengalami sakarifikasi yang tinggi. Dalam kata lain sakarifikasi pada enzim 40 FPU lebih tinggi dibandingkan dengan sakarifikasi pada enzim 20 FPU. Menurunnya kadar gula pereduksi pada setiap perlakuan di atas, terjadi pada 24 jam reaksi tetapi pada jam ke-0 tidak mengalami penurunan. Hal ini disebabkan karena proses fermentasi mulai berjalan ketika *S. cerevisiae* mulai tumbuh dan berkembang setelah jam ke-24. Hal ini ditunjukkan dengan menurunnya konsentrasi gula pereduksi disertai dengan meningkatnya konsentrasi etanol. Hal ini jelas bahwa dengan semakin banyaknya gula pereduksi yang dihasilkan, akan mempengaruhi proses fermentasi dan kadar etanol yang dihasilkan.

#### **4.4.2 Pengaruh Penambahan Konsentrasi Enzim *Selulase* dan *S. cerevisiae* Terhadap Konsentrasi Etanol**

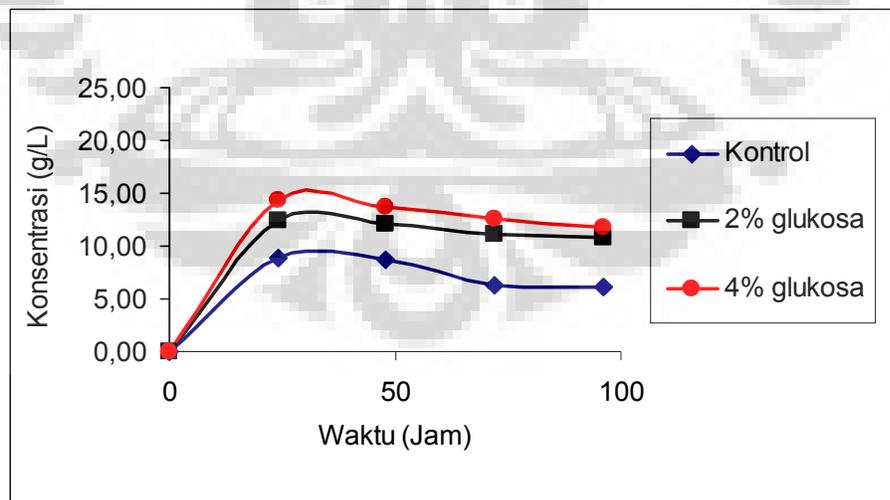
Tahapan awal dalam proses SFS adalah enzim *selulase* yang bekerja untuk merubah selulosa menjadi gula pereduksi yang sederhana. Gula pereduksi yang dihasilkan akan dilanjutkan ke dalam proses fermentasi yang dilakukan oleh *S. cerevisiae* yang akan merubah gula sederhana tersebut menjadi etanol.

Dalam prosesnya, *S. cerevisiae* tidak dapat secara langsung merubah gula pereduksi tersebut menjadi etanol. Sebagai langkah awal, *S. cerevisiae* memerlukan sumber makanan untuk tetap hidup dan berkembang. Sumber yang dibutuhkan adalah berupa sumber karbon, dimana sumber tersebut dapat diperoleh dari hasil sakarifikasi yang dilakukan oleh enzim

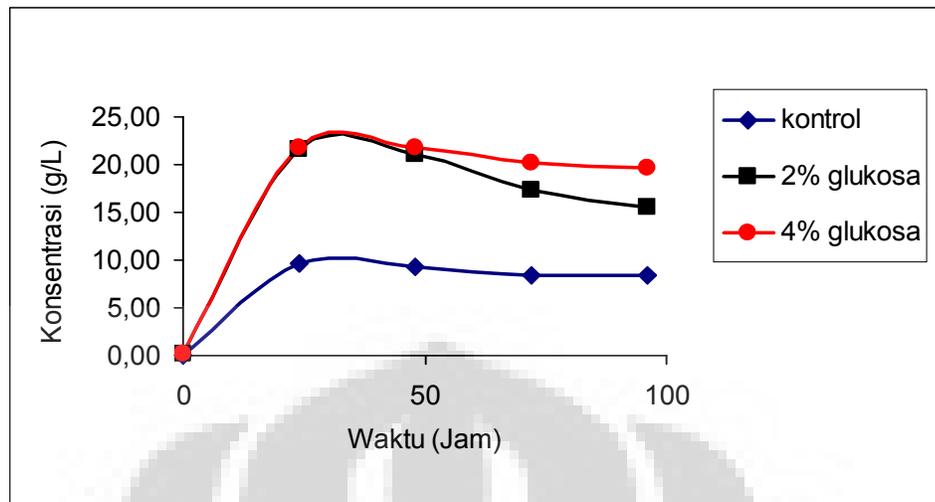
*selulase*. Apabila sumber tersebut tidak terpenuhi, akan menyebabkan proses SFS menjadi lambat. Hal ini terlihat dari pembentukan etanol yang lambat di awal proses fermentasi. Untuk mengatasi hal tersebut, dilakukan penambahan glukosa pada media SFS yaitu sebanyak 2% dan 4%(w/v).



Gambar 4.21 Pengaruh penambahan glukosa 2 dan 4% terhadap konsentrasi etanol yang dihasilkan



Gambar 4.22 Pengaruh penambahan 20 FPU enzim *selulase* serta glukosa 2 dan 4% terhadap konsentrasi etanol yang dihasilkan



Gambar 4.23 Pengaruh penambahan 40 FPU enzim *selulase* serta glukosa 2 dan 4% terhadap konsentrasi etanol yang dihasilkan

Konsentrasi etanol yang dihasilkan baik pada perlakuan dengan glukosa saja, perlakuan dengan penambahan enzim *selulase*, dan perlakuan tanpa penambahan glukosa menunjukkan peningkatan konsentrasi. Peningkatan dimulai pada jam ke-24 dan mengalami perubahan konsentrasi yang relatif menurun pada jam-jam berikutnya. Hal ini sesuai dengan penurunan glukosa yang sebelumnya telah dijelaskan. Bersamaan dengan penurunan gula pereduksi yang dihasilkan, bersamaan pula peningkatan konsentrasi etanol yang dihasilkan. Peningkatan konsentrasi etanol terjadi karena pada saat gula pereduksi sudah cukup sebagai sumber karbon bagi *S. cerevisiae*, maka *yeast* tersebut akan bekerja dengan baik untuk merubah gula-gula tersebut menjadi etanol. Konsentrasi etanol terbesar diperoleh pada konsentrasi enzim 40 FPU dengan penambahan glukosa 4%. Konsentrasi etanol yang diperoleh adalah sebesar 21,83 g/L pada jam ke-24. Hal yang

sama pada konsentrasi enzim 20 FPU dengan penambahan glukosa 4%, diperoleh konsentrasi etanol yang cukup besar yaitu 14,28 g/L. Apabila dilihat dari kedua perlakuan tersebut diatas, jelas bahwa dengan konsentrasi enzim 40 FPU dengan penambahan glukosa 4% memiliki nilai konsentrasi etanol yang paling besar.

Nilai konsentrasi etanol pada perlakuan tanpa penambahan glukosa (kontrol) diperoleh nilai konsentrasi lebih rendah baik pada konsentrasi enzim 20 dan 40 FPU. Nilai konsentrasi yang diperoleh masing-masing adalah 8,92 g/L dan 9,61 g/L. Hal ini bisa terlihat bahwa dengan tanpa penambahan glukosa pada media SFS sebagai pemicu kerja *S. cerevisiae*, kerja yeast tersebut tidak efektif dikarenakan kekurangan sumber karbon. Walaupun demikian, nilai konsentrasi etanol yang diperoleh pada konsentrasi 40 FPU memiliki nilai yang lebih besar jika dibanding dengan konsentrasi etanol yang diperoleh pada konsentrasi 20 FPU pada perlakuan sama-sama tanpa penambahan glukosa. Hal ini menunjukkan bahwa, konsentrasi enzim yang ditambahkan pada media SFS sangat berpengaruh terhadap nilai konsentrasi etanol yang diperoleh.

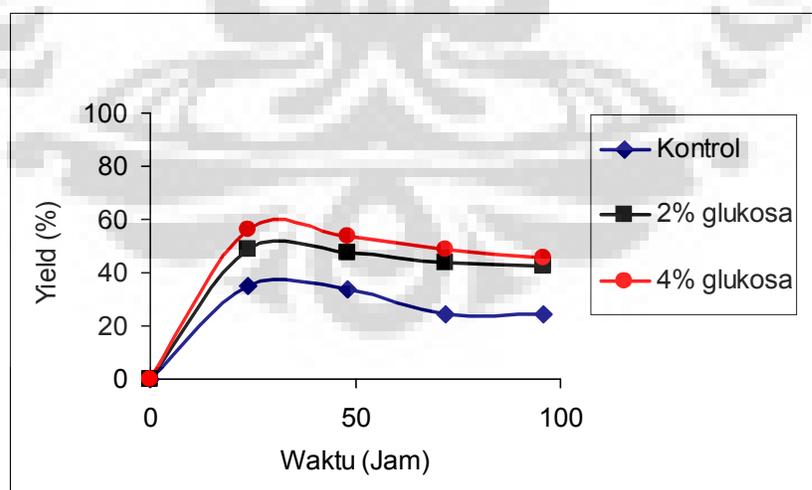
#### **4.5 Yield Etanol**

Selulosa yang terdapat pada TKKS memiliki kadar yang cukup tinggi. Hal tersebut terbukti dengan cukup tingginya nilai konsentrasi etanol yang diperoleh yaitu sebesar 21,83 g/L. Jika dibandingkan dengan nilai konsentrasi etanol pada penelitian sebelumnya yaitu sebesar 19,3 g/L (Zhu et al, 2006).

Selulosa dari TKKS dapat terkonversi menjadi etanol karena adanya enzim *selulase* dan *S. cerevisiae*. Kemampuan *S. cerevisiae* dalam prosesnya mengkonversi glukosa menjadi etanol terlihat dari nilai yield etanol yang diperoleh. Data tersebut disajikan pada Tabel 4.7 dan 4.8 serta Gambar 4.24 dan 4.25.

Tabel 4.7 Yield etanol pada penambahan enzim 20 FPU

Jam ke-	Yield (%)		
	kontrol	2% glukosa	4% glukosa
0	0,00	0,14	0,18
24	34,95	48,70	55,94
48	33,99	47,59	53,72
72	24,57	43,53	48,97
96	24,18	42,36	45,90

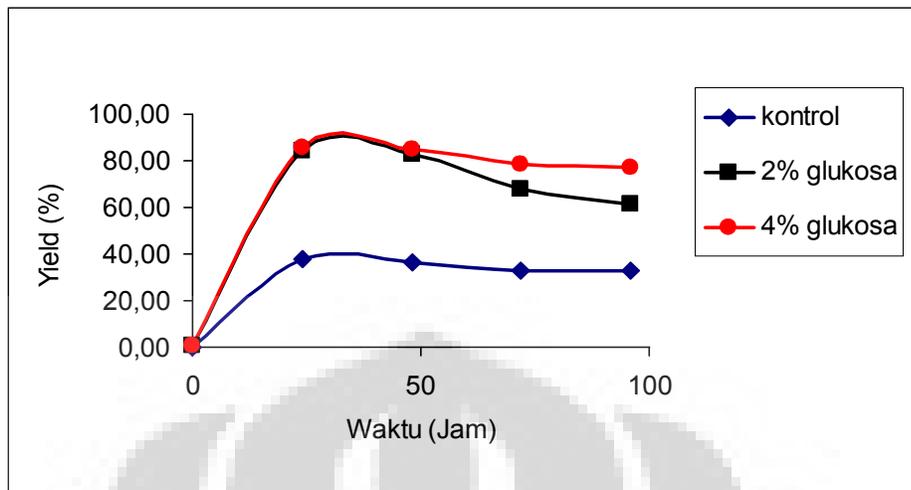


Gambar 4.24 Yield etanol pada penambahan enzim 20 FPU

Tabel dan gambar di atas menunjukkan yield etanol dengan adanya penambahan glukosa 2 dan 4% pada konsentrasi enzim 20 FPU. Nilai yield terbesar adalah pada jam ke-24 baik pada kontrol, 2% maupun 4% glukosa. Nilai yield yang diperoleh masing-masing adalah 34,95%; 48,70%; dan 55,94%. Untuk jam-jam berikutnya yaitu dari jam ke-48 sampai jam ke-96 nilai yield mengalami penurunan. Hal ini sesuai dengan nilai konsentrasi etanol yang dihasilkan relatif mengalami penurunan. Apabila dilihat dari gambar dan pola grafik pada gambar 4.24 di atas memiliki pola yang mirip dengan gambar grafik pada konsentrasi etanol.

Tabel 4.8 Yield etanol pada penambahan enzim 40 FPU

Jam ke-	Yield (%)		
	Kontrol	2% glukosa	4% glukosa
0	0,00	0,73	0,74
24	37,62	84,39	85,51
48	36,15	82,74	85,02
72	33,09	67,84	78,87
96	32,54	61,13	77,11



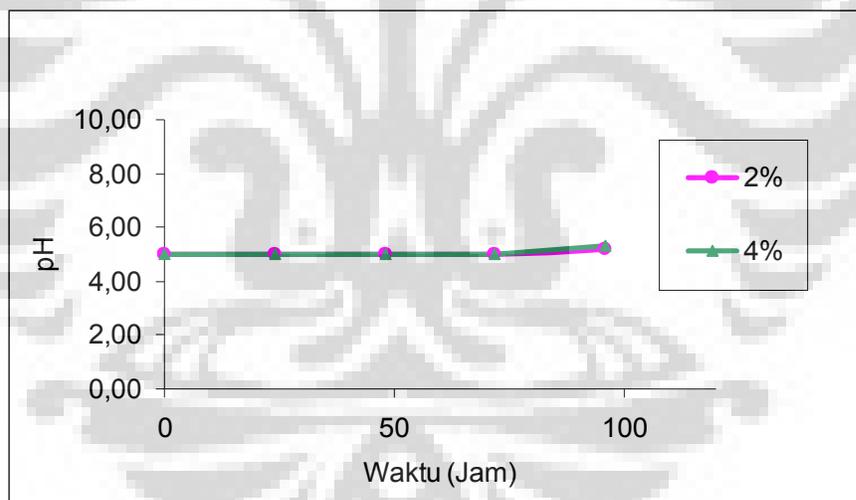
Gambar 4.25 Yield etanol pada penambahan enzim 40 FPU

Hal yang sama dengan gambar 4.24, pada gambar 4.25 menunjukkan nilai yield terbesar terdapat pada jam ke-24 baik pada kontrol, glukosa 2% dan glukosa 4%. Nilai yield terbesar pada gambar 4.25 untuk kontrol, glukosa 2% dan glukosa 4% masing-masing adalah 37,62%; 84,39%; dan 85,51%.

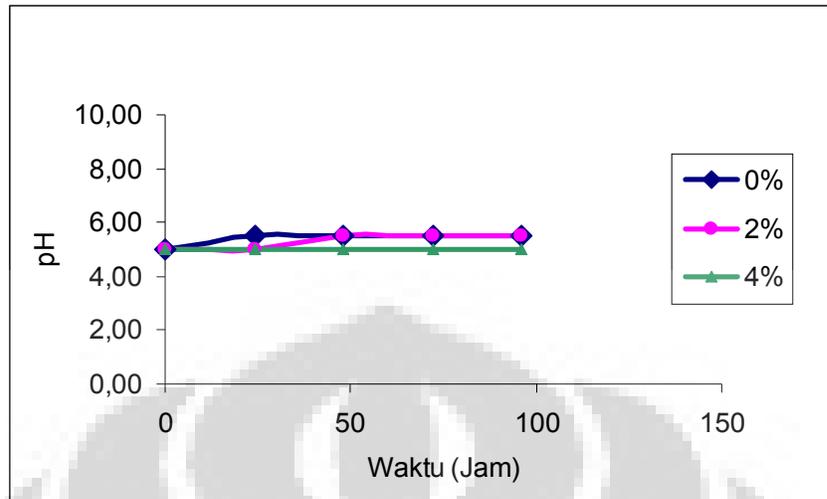
Apabila dilihat dari nilai yield tersebut, dapat dikatakan bahwa dalam prosesnya selulosa yang berasal dari TKKS saja maupun dari TKKS yang ditambahkan glukosa memiliki nilai yield yang cukup tinggi. Hal ini disebabkan karena cukup tingginya kadar gula pereduksi yang terkonversi dari selulosa yang berasal dari TKKS dan efektifnya kerja dari *S. cerevisiae* mengkonversi gula pereduksi menjadi etanol.

#### 4.6 Pengaruh waktu reaksi terhadap pH larutan media SFS

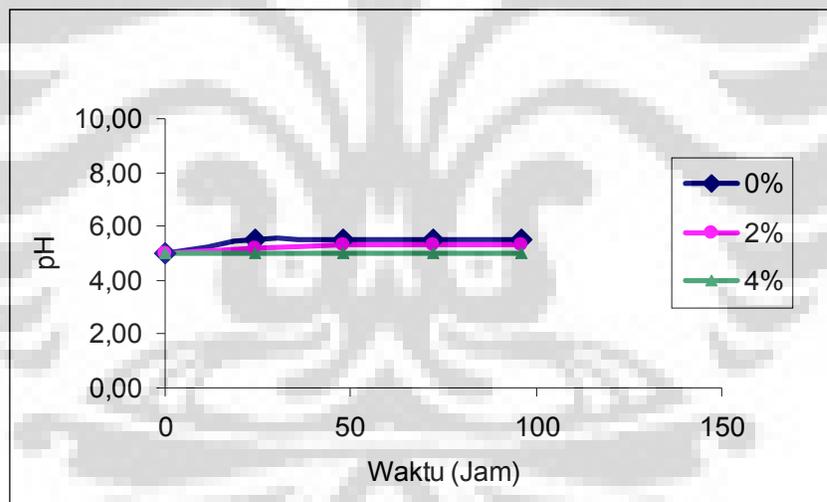
Proses SFS merupakan proses hidrolisis dan fermentasi yang di dalamnya melibatkan enzim dan mikroba. Adanya aktifitas enzimatik dan mikroba tersebut, menyebabkan perubahan pH media SFS yang dapat mempengaruhi aktivitas enzim dan produk yang dihasilkan. Hal tersebut bisa terjadi karena produk kemungkinan akan mengalami dekomposisi dengan menghasilkan asam-asam organik apabila waktu reaksi melebihi waktu maksimum. Dalam hal ini waktu maksimum yang digunakan adalah selama 96 jam. Data hasil analisa pH selama waktu 96 jam disajikan pada gambar-gambar di bawah ini.



Gambar 4.26 pH media SFS pada penambahan glukosa 2 dan 4%



Gambar 4.27 pH media SFS pada penambahan konsentrasi enzim 20 FPU serta glukosa 2 dan 4%



Gambar 4.28 pH media SFS pada penambahan konsentrasi enzim 40 FPU serta glukosa 2 dan 4%

Media SFS pada awalnya mempunyai pH 5 yaitu dengan penambahan buffer asetat. Tujuan penambahan buffer pada media SFS adalah untuk memberikan suasana pH asam dan menjaga agar pH dari mulai

awal reaksi sampai batas maksimum waktu yang ditentukan mempunyai pH 5 (pH tetap). Apabila dilihat dari hasil pengujian pH dengan menggunakan indikator pH universal, terlihat bahwa pH medium SFS relatif tetap. Hal ini ditunjukkan pada gambar 4.26-4.28 mempunyai pH yang relatif tetap di pH 5. Walaupun demikian ada beberapa hasil pengukuran yang memberikan nilai pH tidak sama dengan pH 5. Misalnya pada gambar 4.26 jam ke-96 mempunyai nilai pH rata-rata sebesar pH 5,17 untuk glukosa 2% dan pH 5,33 untuk glukosa 4%. Pada gambar 4.27 jam ke-24, 48, 72, dan 96 pada 0% glukosa mempunyai nilai pH rata-rata sebesar pH 5,50. Pada jam ke-48, 72, dan 96 pada 2% glukosa mempunyai nilai pH 5,50. Pada gambar 4.28 jam ke-24, 48, 72, dan 96 pada 0% glukosa mempunyai nilai pH rata-rata sebesar pH 5,50. Pada jam ke-48, 72, dan 96 pada 2% glukosa mempunyai nilai pH 5,33. Pada jam ke-24 pada 2% glukosa mempunyai nilai pH 5,17.

Kondisi pH pada masing-masing perlakuan tidak mengalami perubahan yang sangat berarti. Hal ini dimungkinkan karena dalam TKKS selain komponen-komponen seperti selulosa, hemiselulosa, dan lignin adapula komponen lain yang terkandung di dalam TKKS tersebut. Komponen-komponen tersebut berupa mineral-mineral seperti MgO dan K<sub>2</sub>O (Ibrahim dkk, 2007 dalam yogi, 2008) yang dapat menyebabkan pH medium SFS menjadi naik.

## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1 Kesimpulan

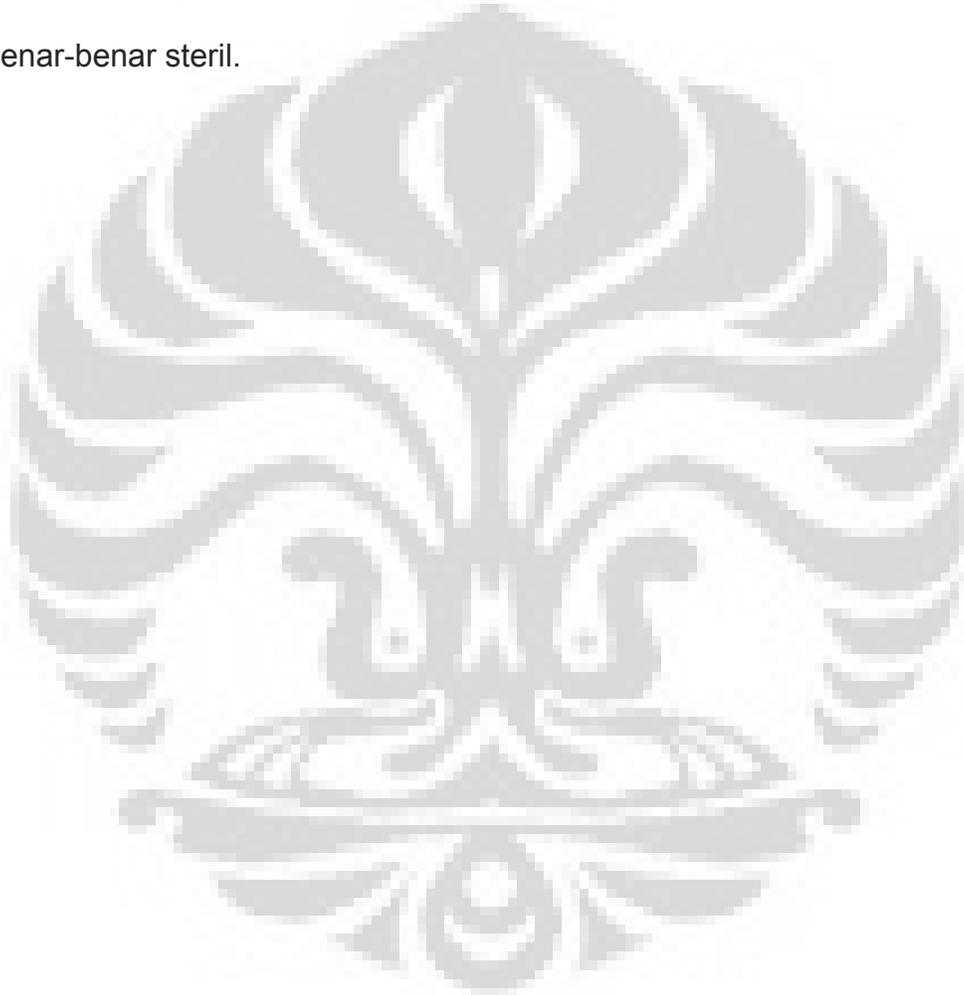
Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan maka kesimpulan yang dapat diambil adalah

- Kondisi optimum proses *pretreatment* adalah dengan NaOH 6%
- Kehilangan komponen lignin akibat *pretreatment* dengan NaOH 6% sebesar 55,80%
- Kondisi optimum proses SFS dilakukan selama 24 jam dengan konsentrasi enzim 40 FPU dan penambahan glukosa 4%.
- Konsentrasi etanol tertinggi diperoleh pada jam ke-24 yaitu 21,83 g/L dengan nilai yield sebesar 85,51%.
- Perubahan pH larutan media SFS tidak terjadi secara signifikan.
- Limbah lignoselulosa TKKS dapat dikonversi menjadi produk yang mempunyai nilai jual yang lebih tinggi.

#### 5.2 Saran

Saran penelitian selanjutnya untuk mendapatkan hasil yang lebih baik adalah dalam proses *pretreatment*, untuk menghindari pencemaran lingkungan yang diakibatkan oleh limbah B3 perlu dilakukan proses *pretreatment* yang lebih ramah lingkungan misalnya dengan proses *pretreatment* secara biologi

dengan menggunakan kapang pelapuk putih. Dalam proses hidrolisis dengan menggunakan enzim *selulase*, mengingat harga enzim yang cukup mahal perlu dicoba dengan menggunakan mikroba yang dapat menghasilkan enzim selulase secara alami misalnya *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viride*, dan *Aspergillus niger*. Dalam proses SFS, perlu dilakukan modifikasi reaktor agar benar-benar steril.



## DAFTAR PUSTAKA

- Attala, R.H. and Vanderhart, D.L.1984. *Native Cellulose: A Composite of Two Distinct Crystalline Form*. Science, Vol. 223, pp. 283-285
- Aziz, Astimar Abdul, Mohamad Husin and Anis Mokhtar. 2002. *Preparation of Cellulose from Oil Palm Empty Fruit Bunches Via Ethanol Digestion: Effect of Acid and Alkali Catalysts*. Journal of Oil Palm Research, Vol. 14 (1),pp.9-14.jopr14n1-9.pdf.
- Barnet, J.A. 1990. *Characteristic and Identification Yeast*. New York: Cambridge University Press.
- Bioetanol. [http://www.joglotekagama.com/Files/Plthn\\_%20bioetanol.pdf](http://www.joglotekagama.com/Files/Plthn_%20bioetanol.pdf). 17 Oktober 2008
- Costello, R., and Chum, H.1998. *Biomass, bioenergy and carbon management*. In "Bioenergy '98: Expanding Bioenergy Partnerships" (D. Wichert, ed.). pp. 11-17. Omnipress, Madison, WI.
- Couper, A.S.1858. *On a new chemical theory*. Philosophical magazine 16, 104–116.
- DiPardo, J. 2000. *Outlook for biomass ethanol production and demand*. Tersedia di <http://www.eia.doe.gov/oiaf/analysispaper/biomass.html>.

Duff, S.J.B. and W.D. Murray. 1996. *Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review*. Bioresource Technology 55:1 – 33.

Enzim. <http://id.wikipedia.org/wiki/Enzim>. 04 Oktober 2008

Grohmann, K. 1993. *Simultaneous Saccharification and Fermentation of Cellulosic Substrates to Ethanol*. Dalam: Saddler, J.N. (Ed.), Bioconversion of forest and agricultural plant Residues. CAB International, Wallingford.

Hahn-Hagerdal, B., J. Hallborn, H. Jeppsson, L. Olsson, K. Skoog and M. Walfridsson. 1993. *Pentose fermentation to alcohol*. Dalam: Saddler, J.N. (Ed.), Bioconversion of forest and agricultural plant Residues. CAB International, Wallingford.

Hammel K.E. 1997. *Fungal degradation of lignin*. CAB international, hlm. 33-45

Hayn, M., W. Steiner, R. Klinger, H. Steinmuller, M. Sinner and H. Esterbauer. 1993. *Basic research and pilot studies on the enzymatic conversion of lignocellulose*. Dalam: Saddler, J.N. (Ed.), Bioconversion of forest and agricultural plant Residues. CAB International, Wallingford.

- Hermiati,E. dan Sukara,E. 2005. *Konversi Bahan Berlignoselulosa Menjadi Bioenergi Etanol*. Prosiding Seminar Nasional Biomassa Lignoselulosa, hal.14-21
- Higuchi, Takayoshi. 2004. *Microbial degradation of lignin: Role of lignin peroxidase, manganese peroxidase, and laccase*. Proc. Jpn. Acad., Vol. 80, pp. 204-211. 80\_204.pdf
- Hu, Gang, John A Heitmann, and Orlando J Rojas. 2008. *Feedstock Pretreatment Strategies for Producing Ethanol from Wood, Bark, and Forest Residues*. Bioresources 3(1), pp. 270-294.
- Itoh, H., M. Wada, Y. Honda, M. Kuwahara, T. Watanabe. 2003. *Bioorganosolve pretreatments for simultaneous saccharification and fermentation of beech wood by ethanolysis and white rot fungi*. J. of Biotechnology 103: 273 – 280.
- Judoamijojo, M., Abdul A.D., dan Endang G.S. 1992. *Teknologi Farmasi*. Jakarta: Rajawali Press.
- Kelapa sawit. [http://id.wikioedia.org/kelapa\\_sawit/](http://id.wikioedia.org/kelapa_sawit/). 13 Agustus 2008.
- Kromatografi gas. <http://www.oilanalysis.com/backup/200207/GasChroma-Fig2.jpg>. 21 Oktober 2008
- Laser, M., D. Schulman, S.G. Allen, J. Lichwa, M.J. Antal Jr., and L.R. Lynd. 2002. *A comparison of liquid hot water and steam pretratments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol*. Bioresource Technology 81: 33 – 44.

Law, Kwei Nam, War Rosli Wan Daud, and Arniza Ghazali.2008.

*Morphological and Chemical Nature of Fiber Strand of Oil Palm Empty Fruit Bunch(OPEFB)*. Bioresource 2(3). pp. 351-362.

Marchessault, R.H., et al.1981.*Characterization of Aspen exploded wood lignin*. Can. J. Chem. Vol. 60, pp. 2372-3282

Marques S., Alves L., Roserio J.C, Girio F.M. 2008. *Conversion of recycled paper sludge to ethanol by SHF and Using Pichia stiptis*. Journal of Biomassa and Bioenergy 32, 400-406

Mc.Kendry, P. 2002. *Energy production from biomass (part1): overview of biomass*. 2002. Bioresource Technology 83: 37 – 46.

Model molekul selulosa. <http://www.lsbu.ac.uk/water/hycl.html>. 17  
September 2008

Mosier, N., Charles Wymen, Bruce Dale, Richard Elandes, Y.Y. Lee, Mark Holtzapple, Michael Ladish. 2005. *Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass*. Bioresource Tecnology 96: 673-686

Nishimura, H., T. Ougi, T. Watanabe, Y. Honda, and T. Watanabe. 2004. *A selective lignin-degrading fungus, Ceriporiopsis subvermispora, produces extracellular amphipathic metabolites*. Proceedings of the 5<sup>th</sup> International Wood Science Symposium. pp. 373.

- Novikora, L.N., et al. 2002. *Changes in Macromolecular Characteristics and biological activity of hydrolytic lignin in the course of composting*. App. Biochem. Microbiol. Vol. 38, pp. 181-185.
- Orth A.B., D.J. Royse, M. Tien. 1993. *Ubiquity of lignin-degrading peroxidases among various wood degrading fungi*. APPL Environ Microbiol 59:4017-4023.
- Palonen, Hetti. 2004. *Role of Lignin in the Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulose*. VTT Biotechnology.
- Pandey, A., C.R. Soccol, P. Nigam, and V. T. Soccol. 2000. *Biotechnological potential of agro-industrial residues*. I: sugarcane bagasse. Bioresource Technology 74: 69 – 80.
- Ramos, L. P., Breuil, C. and Saddler, J. N. 1992. Comparison of steam pretreatment of Eucalyptus, Aspen, and spruce wood chips and their enzymatic hydrolysis. Appl. Biochem. Biotechnol., Vol. 34/35, pp. 37-47.
- Reaksi Enzim. <http://suharjawanasuria.tripod.com>. 25 September 2008
- Roach, J. 2005. *9,000-Year-Old Beer Re-Created From Chinese Recipe*. National Geographic News. diakses 14 November 2008.
- Saccharomyces cerevisiae*. [www.chateauneuf.dk/artikler/vini15.jpg](http://www.chateauneuf.dk/artikler/vini15.jpg). 19 September 2008
- Samsuri, M., B. Prasetya, E. Hermiati, T Idiyanti, K. Okano, Syafwina, Y. Honda and T. Watanabe. 2004. *Effects of fungal treatments on*

*ethanol production from bagasse by simultaneous saccharification and fermentation.* Proceedings of the 5<sup>th</sup> International Wood Science Symposium. pp. 317 – 323.

Selulase. [www.answers.com/topic/cellulase](http://www.answers.com/topic/cellulase). 11 Oktober 2008

Selulosa. <http://www.scientificpsychic.com/fitness/carbohydrates.html>. 08 September 2008

Sjöström, E. 1981. *Wood Chemistry, fundamentals and applications*. s.l. : London: Academic Press. p. 223.

Sun, Y. and Cheng, J. 2002. *Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review.* Bioresource Technology 83: 1 – 11.

Sunardi. 2007. *Analisa Instrumentasi*. Depok: Departemen Kimia FMIPA UI.

Syafwina, E.D. Wong, Y. Honda, T. Watanabe and M. Kuwahara. 2002. *Pre-treatment of empty fruit bunch of oil palm by white-rot fungi for the utilization of its component.* Proceedings of the 4<sup>th</sup> International Wood Science Symposium. pp. 351 – 356.

Syafwina, T. Watanabe, Y. Honda, M. Kuwahara and T. Watanabe. 2004. *Simultaneous saccharification and fermentation of oil palm empty fruit bunch pretreated by white rot fungi for ethanol production.* Proceedings of the 5<sup>th</sup> International Wood Science Symposium. pp. 313 – 316.

Syafwina, Y. Honda, T. Watanabe and M. Kuwahara. 2002. *Pretreatment of oil palm empty fruit bunch by white-rot fungi for enzymatic saccharification*. Wood Research 89: 19 – 20.

Tanabe, T., U. Baba, N. Shinohara, T. Mitani, Y. Honda and T. Watanabe. 2004. *Pretreatments of softwood by microwave irradiation and white rot fungi for ethanol production*. Proceedings of the 5<sup>th</sup> International Wood Science Symposium. pp. 379.

Tanahashi, M., et al. 1983. *Characterization of explosion wood. 1. Structure and physical properties*. Wood Research, Vol. 69, pp. 36-51.

TKKS. <http://elearning.unej.ac.id/courses/PNU1705/document/bab1klpswt.doc>.

21 Agustus 2008

Viikari, L., M. Tenkanen, J. Buchert, M. Ratto, M. Bailey, M. Siika-aho and M. Linko. 1993. *Hemicellulases for industrial applications*. Dalam: Saddler, J.N. (Ed.), *Bioconversion of forest and agricultural plant Residues*. CAB International, Wallingford.

Walker, G.M. 1995. *Yeast Physiology and Biotechnology*. New York: John Wiley & Sons.

Wilke, D. 1999. *Chemicals from biotechnology: Molecular plant genetics will challenge the chemical and fermentation industry*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**, 135-145.

Yan, F, dkk. 2007. *Kelapa sawit*. Penebar Swadaya. Jakarta.

Zhu, Shengdong, Yuanxin Wu, Ziniu Yu, Xuan Zhang, Cunwen Wang, Faquan Yu, and Shiwei Jin. 2006. *Production of ethanol from microwave-assisted alkali pretreated wheat straw*. *Biochemistry*, 41: 869-873

Zimbardi F, M Demichele, D Cuna, L D'ercole, A Gallifuoco, E Ricci and Aspera. 1997. *Fractionation and bioconversion of steam-exploded lignocellulosic materials*. IEA Workshop-Biotechnology for the Conversion of Lignocellulose, Curitiba Brasil.

