



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**HIDROLISA TANDAN KOSONG KELAPA SAWIT MENJADI ETANOL  
MELALUI PROSES SAKARIFIKASI FERMENTASI SECARA  
SERENTAK**

**SKRIPSI**

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Teknik**

**YOGI HERMAWAN  
0606043345**

**FAKULTAS TEKNIK  
PROGRAM STUDI TEKNIK KIMIA  
EKSTENSI  
DEPOK  
DESEMBER 2008**

**HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS**  
**Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua sumber baik yang**  
**dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar**

**Nama : Yogi Hermawan**  
**NPM : 0606043345**  
**Tanda Tangan :**  
**Tanggal : 23 Desember 2008**

## HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh:

Nama : Yogi Hermawan  
NPM : 0606043345  
Program Stud : S1 Ekstensi Teknik Kimia  
Judul Skripsi : Hidrolisa Tandan Kosong Kelapa Sawit Menjadi Etanol Melalui Proses Sakarifikasi dan Fermentasi Secara Serentak

**Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Teknik pada Program Studi Ekstensi Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Indonesia**

### DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Ir. Dianursanti, MT ( )  
Pembimbing II : Dr. Yanni Sudiyani, M.Agr ( )  
Penguji I : Ir. Praswasti PDK Wulan, MT ( )  
Penguji II : Ir. Tania Surya Utami, MT ( )

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 23 Desember 2008

## KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, karena atas berkat dan rahmat-Nya, saya dapat menyelesaikan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Teknik Jurusan Teknik Kimia pada Fakultas Teknik Universitas Indonesia. Saya menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan skripsi ini. Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih kepada :

- (1) Ir. Dianursanti, MT, selaku dosen pembimbing I yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan saya dalam penyusunan skripsi ini.
- (2) Dr. Yanni Sudiyani, M. Agr, selaku dosen pembimbing II yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan saya dalam penyusunan skripsi ini.
- (3) Pusat Penelitian Kimia LIPI yang telah menyediakan fasilitas dalam pelaksanaan penelitian ini.
- (4) Orang tua, keluarga tercinta yang telah memberikan bantuan dukungan material dan moral
- (5) Rekan – rekan di Pusat Penelitian Kimia LIPI
- (6) Teman – teman Ekstensi Teknik Kimia Angkatan 2006

Akhir kata, saya berharap Tuhan Yang Maha Esa berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga skripsi ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu.

Depok, Desember 2008

Penulis

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI  
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

---

---

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Yogi Hermawan  
NPM : 0606043345  
Program Studi : S1 Ekstensi  
Departemen : Teknik Kimia  
Fakultas : Teknik  
Jenis Karya : Skripsi

demikian pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif ( *Non-exclusive Royalty-Free Right* )** atas karya ilmiah saya yang berjudul :

**HIDROLISA TANDAN KOSONG KELAPA SAWIT MENJADI ETANOL  
MELALUI PROSES SAKARIFIKASI FERMENTASI SECARA  
SERENTAK**

beserta perangkat yang ada ( jika diperlukan ). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data ( *database* ), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok  
Pada tanggal : Desember 2008  
Yang menyatakan

( Yogi Hermawan )

## ABSTRAK

Nama : Yogi Hermawan  
Program Studi : S1 Ekstensi Teknik Kimia  
Judul : Hidrolisa Tandan Kosong Kelapa Sawit Menjadi Etanol Melalui  
Proses Sarifikasi Fermentasi Secara Serentak

Hasil samping industri kelapa sawit yaitu tandan kosong kelapa sawit (TKKS) mempunyai kandungan selulosa yang cukup tinggi. Selulosa dalam TKKS dapat dimanfaatkan untuk membuat etanol dengan menggunakan enzim selulase dan ragi *Saccharomyces cerevisiae* melalui proses sakarifikasi dan fermentasi secara serentak (SSF). Proses SSF dilakukan pada temperatur 37°C, tekanan atmosfer, dan pH 5. Variasi proses yang dilakukan adalah konsentrasi enzim 20 FPU dan 40 FPU, penambahan glukosa awal 2% dan 4%. Sebelum proses SSF dilakukan perlakuan awal pada substrat TKKS untuk menyisihkan kandungan lignin agar menghasilkan konsentrasi gula pereduksi yang tinggi. Dalam penelitian ini konsentrasi etanol yang tertinggi yaitu 1,67 % dari 4 % (b/v) substrat TKKS diperoleh dari konsentrasi enzim 40 FPU dan penambahan glukosa awal 4% pada jam ke-24. sedangkan konversi total dari substrat mencapai 41,50%.

Kata kunci: TKKS, selulosa, etanol, selulase, *Saccharomyces cerevisiae*, SSF.

## ABSTRACT

Name : Yogi Hermawan  
Study Program : S1 Ekstensi Teknik Kimia  
Title : Hidrolysis of Pal Oil Empty Fruit Bunch to Produce Ethanol  
by Simultaneous Saccharification Fermentation Method

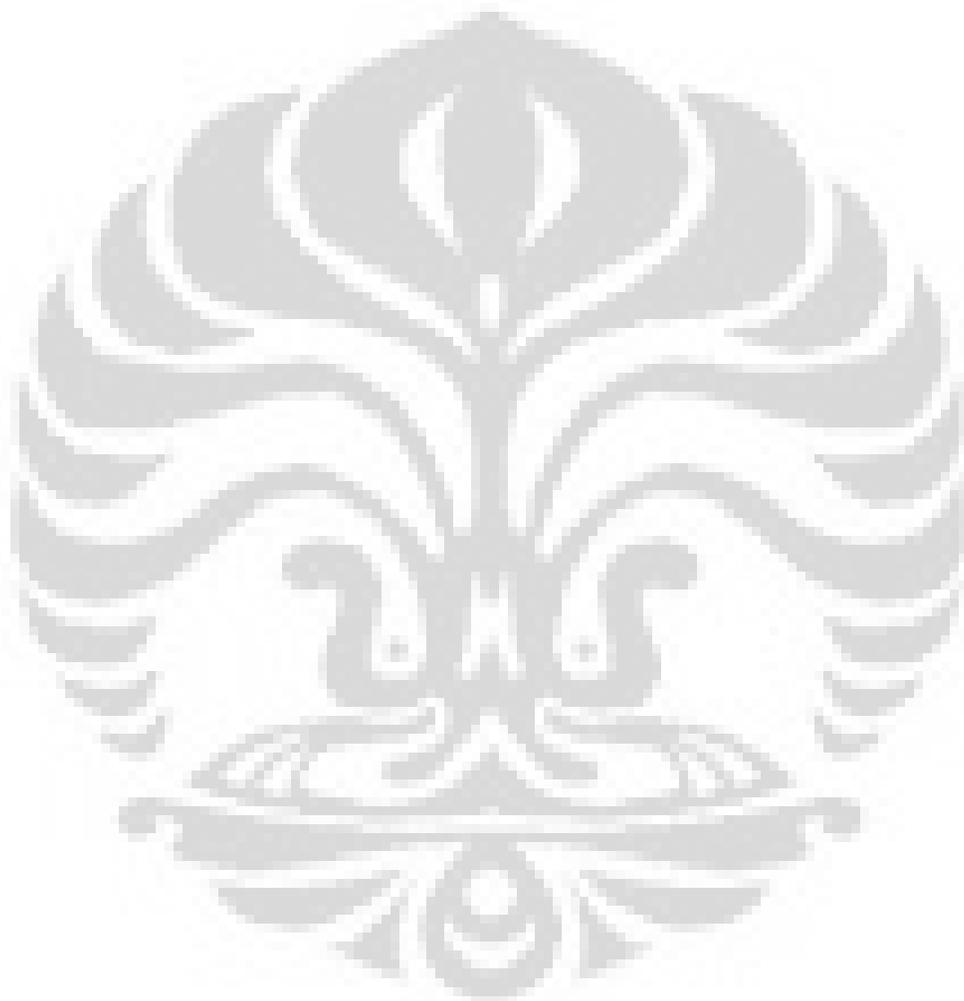
Palm oil empty fruit bunch (POEFB) as industrial Palm Oil waste has high content of cellulose which can be converted to ethanol. Two process is needed to convert cellulose to ethanol that is hidrolysis of cellulose to reducing sugar by cellulase and fermentation reducing sugar to ethanol by *Saccharomyces cereviseae*. This research used the combination of the two process called simultaneous saccharification and fermentation (SSF). The process was studied at 37°C, atmospheric pressure, and pH 5. Variation enzyme loading (20 FPU and 40 FPU) and glucose added (2% and 4%) were performed. Prior to SSF proses, POEFB underwent a pretreatment to remove the initial lignin present in the palm waste. The highest ethanol concentration achieved after 24 hour was 1,67% at a water-insoluble solids concentration of 4% obtained from 40 FPU enzyme loading and 4% initial glucose added. Total substrat conversion reached 41,50%.

Key words: Palm oil empty fruit buch, cellulose, ethanol, cellulase, *Saccharomyces cereviseae*, SSF

## DAFTAR ISI

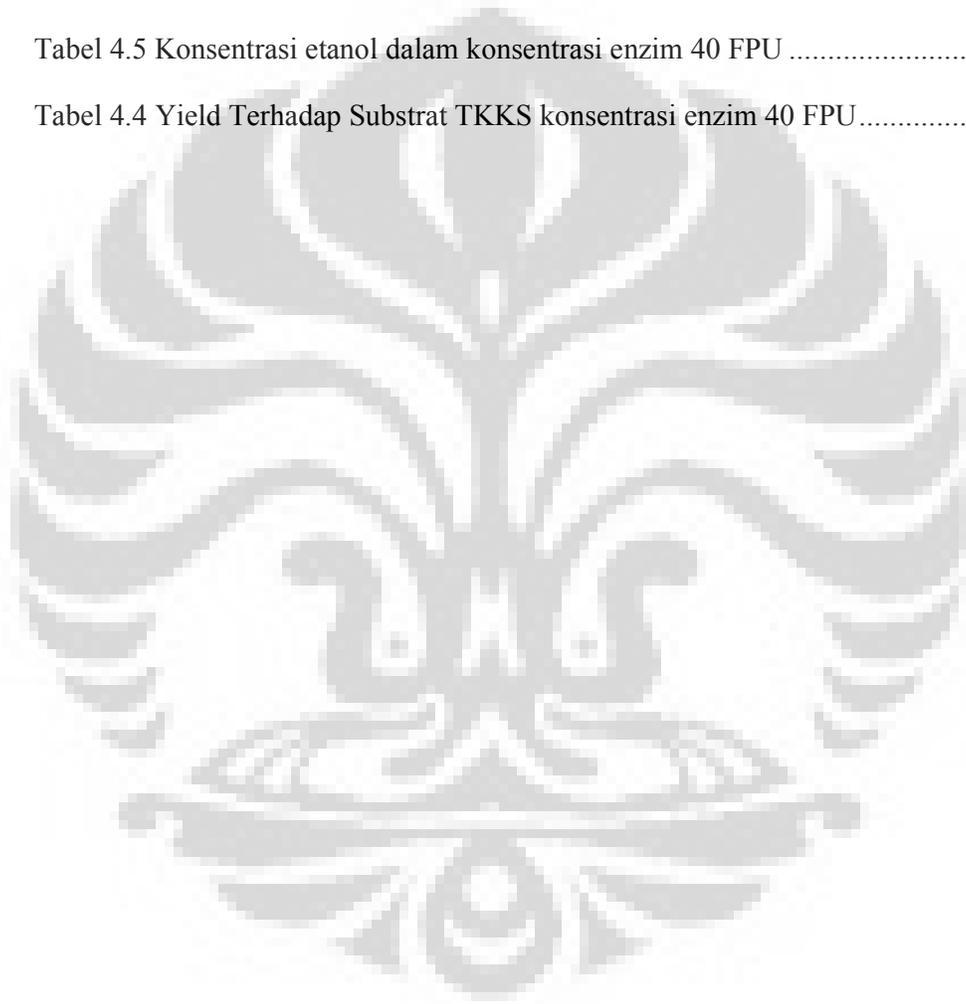
HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS .....	ii
HALAMAN PENGESAHAN .....	iii
KATA PENGANTAR .....	iv
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS .....	v
ABSTRAK .....	vi
DAFTAR ISI .....	viii
DAFTAR TABEL .....	x
DAFTAR GAMBAR .....	xi
DAFTAR LAMPIRAN .....	xii
BAB 1 PENDAHULUAN .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Perumusan Masalah .....	3
1.3 Tujuan Penelitian .....	3
1.4 Batasan Masalah .....	4
1.5 Sistematika Penulisan .....	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA .....	5
2.1 Etanol .....	5
2.2 Pembuatan Etanol .....	6
2.2.1 Bahan Baku Etanol .....	6
2.2.2 Kelapa Sawit Sebagai Bahan Baku Bioetanol .....	10
2.2.3 Enzim .....	11
2.2.4 Saccharomyces cerevisiae .....	14
2.2.5 Sakarifikasi .....	16
2.2.6 Fermentasi .....	17
BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN .....	19
Tempat dan Waktu Penelitian .....	19
Pelaksanaan Penelitian .....	19
Persiapan dan Perlakuan Pendahuluan Substrat TKKS .....	21
3.3.1. Alat dan Bahan yang digunakan .....	21
3.3.2 Prosedur Penelitian .....	21
3.4 Persiapan Fermentasi .....	21
3.4.1 Pembuatan Kultur Murni .....	21
3.4.2 Pembuatan Larutan Buffer Asetat pH 5 .....	22
3.4.3 Pembuatan Larutan Inokulum dan Larutan Enzim .....	22
3.4.4 Proses SSF .....	24
3.4.5 Analisa .....	25
3.5 Varibel Penelitian .....	28
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN .....	29
4.1 Pembahasan Umum .....	29
4.2 Hasil Analisa Penambahan Konsentrasi Enzim .....	30
4.2.1 Konsentrasi Enzim Terhadap Pembentukan Gula Pereduksi .....	30
4.2.2 Konsentrasi Enzim Terhadap Pembentukan Produk Etanol .....	32

4.3 Hasil Analisa Penambahan Glukosa .....	34
4.3.1 Konsentrasi Glukosa Terhadap Pembentukan Gula Pereduksi .....	35
4.3.2 Konsentrasi Glukosa Terhadap Pembentukan Produk Etanol .....	36
4.4 Yield terhadap substrat TKKS .....	37
4.5 Pengaruh Waktu SSF Terhadap pH larutan .....	38
BAB 5 KESIMPULAN .....	40
5.1 Kesimpulan .....	40
5.2 Saran .....	40
DAFTAR REFERENSI .....	41



## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Klasifikasi Enzim Secara Internasional .....	12
Tabel 3.1 Komposisi Medium Inokulum .....	23
Tabel 4.1 Kehilangan Berat pada TKKS setelah Perlakuan Awal .....	30
Tabel 4.3 Konsentrasi Gula Pereduksi dalam konsentrasi enzim 40 FPU .....	35
Tabel 4.5 Konsentrasi etanol dalam konsentrasi enzim 40 FPU .....	36
Tabel 4.4 Yield Terhadap Substrat TKKS konsentrasi enzim 40 FPU .....	37



## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Struktur molekul selulosa .....	9
Gambar 2.2	Kompleks dinding sel tumbuhan .....	9
Gambar 2.3	Reaksi enzim dengan substrat.....	14
Gambar 2.4	Skema pemutusan ikatan glikosida oleh enzim selulase.....	15
Gambar 2.5	Reproduksi pada <i>S. cerevisiae</i> .....	16
Gambar 2.6	Kurva pertumbuhan mikroorganisme .....	16
Gambar 2.7	Efek Perlakuan Awal pada lignoselulosa .....	18
Gambar 3.1	Diagram alir penelitian.....	21
Gambar 4.1	Konsentrasi gula pereduksi konsentrasi enzim 20 FPU.....	31
Gambar 4.2	Konsentrasi gula pereduksi konsentrasi 40 FPU .....	31
Gambar 4.3	Konsentrasi Etanol konsentrasi enzim 20 FPU .....	33
Gambar 4.4	Konsentrasi Etanol konsentrasi enzim 40 FPU .....	33
Gambar 4.5	Konsentrasi etanol selama proses SSF.....	36
Gambar 4.6	Yield terhadap substrat .....	39
Gambar 4.7	pH larutan selama proses SSF .....	40

## DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1 Kalibrasi Gula dan Etanol
- Lampiran 2 Data Proses SSF konsentrasi Enzim 40 FPU
- Lampiran 3 Data Proses SSF konsentrasi Enzim 40 FPU
- Lampiran 4 Contoh Perhitungan
- Lampiran 5 Kromatogram Analisa Etanol
- Lampiran 6 Gambar Alat GC – 9A
- Lampiran 7 Gambar Alat Spektrofotometer U – 2000
- Lampiran 8 Gambar Alat Rotary Shaker
- Lampiran 9 Gambar Alat Laminar Flow
- Lampiran 10 Gambar Substrat TKKS



# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Sumber daya energi nasional yang berupa sumber daya energi fosil tersedia secara terbatas. Eksploitasi sumber daya energi minyak bumi akan menguras cadangan minyak bumi dan gas alam. Oleh karena itu, pengembangan teknologi alternatif yang ramah lingkungan menjadi sangat penting dalam menjamin "National Security Supply".

Melihat kondisi tersebut, pemerintah telah mengumumkan rencana untuk mengurangi ketergantungan Indonesia pada bahan bakar minyak, dengan menerbitkan Instruksi Presiden No. 1 Tahun 2006 tertanggal 25 Januari 2006 tentang Penyediaan dan Pemanfaatan Bahan Bakar Nabati (Biofuel) sebagai bahan bakar alternatif. Kementerian Negara Riset dan Teknologi Republik Indonesia dalam Rencana Pembangunan Jangka Menengah (RPJM) 2004 – 2009 juga telah menetapkan arah kebijakan Peningkatan Kemampuan Iptek yang difokuskan pada enam prioritas, salah satunya yaitu sumber energi baru dan terbarukan.

Solusi alternatif untuk mengurangi ketergantungan pada bahan bakar berbasis fosil adalah dengan melakukan diversifikasi energi. Diversifikasi energi yang dilakukan adalah dengan mengembangkan sumber-sumber energi baru dengan mencari sumber bahan baku yang ketersediaannya lebih terjamin yaitu sumber daya yang mampu diperbarui (*renewable resources*) dan berkesinambungan (*sustainable resources*). Salah satu sumber daya tersebut adalah produksi bioetanol yaitu senyawa hasil fermentasi dari material hayati atau yang lebih dikenal dengan biomassa.

Teknologi berbasis biomassa yang berpeluang dikembangkan untuk mendukung pengadaan energi biofuel adalah produksi bioetanol. Bioetanol

diharapkan menjadi sumber energi baru yang dapat menunjang kegiatan industri karena merupakan sumber energi yang berkelanjutan (sumber energi yang dapat diperbarui). Bahan yang dapat digunakan dalam pembuatan bioetanol ini adalah jagung, singkong, dan hasil-hasil bumi yang mempunyai kandungan karbohidrat yang tinggi. Sumber tersebut merupakan bahan pangan utama masyarakat Indonesia, apabila digunakan sebagai bahan baku industri bioetanol maka akan terjadi masalah krisis bahan pangan.

Sumber lain yang berpotensi sebagai bahan baku untuk industri bioetanol sebagai sumber energi terbarukan tanpa menimbulkan krisis pangan salah satunya adalah melalui pemanfaatan limbah lignoselulosa tandan kosong kelapa sawit (TKKS). TKKS merupakan limbah industri *crude palm oil* (CPO) yang saat ini merupakan komoditi yang mengalami pertumbuhan yang sangat pesat. Sampai saat ini penanganan limbah TKKS masih sangat kecil, padahal kandungan selulosa pada TKKS cukup tinggi yaitu 41,3% - 46,6% (Syafwina dkk, 2002). Menurut Badger dalam Sudiyani (2007), 1 ton bahan yang mengandung 45% selulosa mampu menghasilkan 151 liter etanol. Selain bioethanol yang dihasilkan yang merupakan nilai tambah (*added value*), dengan memanfaatkan TKKS sebagai bahan baku maka masalah lingkungan juga dapat teratasi.

Terdapat beberapa proses untuk mengkonversi lignoselulosa menjadi glukosa, selanjutnya dikonversi menjadi bioetanol yaitu *separate hydrolysis and fermentation* (SHF) yang mana proses hidrolisis/sakarifikasi dengan proses fermentasi dilakukan dalam dua tahap. Sedangkan proses lainnya adalah *Simultaneous Saccharification and Fermentation* (SSF) dengan enzim selulase yang berasal dari sumber lain dimana sakarifikasi dan fermentasi dilakukan pada saat yang bersamaan dalam satu fermentor. Kelebihan dari proses SHF dibandingkan proses lainnya adalah tiap proses dapat dilakukan dalam kondisi pH dan temperatur yang optimum karena dilakukan dalam dua tempat yang berbeda. Akan tetapi pada proses sakarifikasi dapat terjadi akumulasi dari produk akhir sakarifikasi yaitu glukosa dapat menghambat aktivitas dari enzim selulase. Kelebihan dari proses SSF adalah laju hidrolisa semakin cepat karena glukosa hasil sakarifikasi oleh enzim selulosa dengan segera diubah menjadi etanol oleh mikroba. Selain itu, SSF membutuhkan enzim yang lebih sedikit, rendemen

produk etanol yang lebih tinggi yaitu  $0,388 \text{ g l}^{-1} \text{ jam}^{-1}$  sedangkan untuk SHF hanya  $0,109 \text{ g l}^{-1} \text{ jam}^{-1}$ , dan mengurangi resiko kontaminasi, waktu proses yang lebih cepat yaitu hanya 48 jam dan SHF 179 jam, dan volume fermentor yang lebih kecil dibandingkan proses SHF (Marques dkk, 2006).

Pada penelitian ini yang merupakan kegiatan Penelitian Kompetitif 2008 Pusat Penelitian Kimia LIPI dipilih proses SSF yang mempunyai lebih banyak keunggulan dibandingkan proses SHF. Kelemahan dari SSF adalah proses tidak dapat dilakukan pada kondisi yang optimum seperti pada proses SHF. Kondisi optimum untuk proses hidrolisa/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 mikroba yang toleran terhadap panas dan etanol seperti *Saccharomyces cerevisiae* sehingga proses SSF akan mempunyai kondisi optimum yang berbeda dengan proses SHF.

## 1.2 Perumusan Masalah

Perumusan masalah dari penelitian ini adalah :

1. Bagaimana memanfaatkan tandan kosong kelapa sawit sebagai bahan baku etanol melalui proses SSF dengan menggunakan enzim selulase dan ragi *S. cerevisiae*.
2. Bagaimana pengaruh penambahan konsentrasi enzim dan glukosa dalam proses SSF agar diperoleh produk bioetanol.

## 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah :

2. Mengolah TKKS yang merupakan limbah dari industri *Crude Palm Oil* menjadi produk yang mempunyai nilai jual yang lebih tinggi yaitu bioetanol.
3. Mendapatkan kondisi optimum pada proses SSF yang meliputi konsentrasi enzim, konsentrasi gula pereduksi dan waktu proses SSF untuk mendapatkan produk bioetanol.

## 1.4 Batasan Masalah

Batasan masalah yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

1. Penelitian dilakukan di Laboratorium Teknologi Lingkungan Pusat Penelitian Kimia Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia Serpong.
2. Mikroba yang digunakan adalah *Saccharomyces cerevisiae* yang berasal dari koleksi kultur Laboratorium Teknologi Lingkungan Pusat Penelitian Kimia LIPI Serpong, lalu dikultivasi lagi.
3. Contoh TKKS diperoleh dari PT. Perkebunan Nusantara VIII, Kebun Kertajaya, pandeglang.
4. Proses SSF dilakukan pada kondisi tekanan atmosfer
5. Suhu ruang sekitar 37°C.
6. Kecepatan *rotary shaker* yang dilakukan adalah 100 rpm.

### **1.5 Sistematika Penulisan**

Sistematika yang digunakan dalam penulisan skripsi ini adalah sebagai berikut:

#### **BAB I PENDAHULUAN**

Bab ini berisi latar belakang, rumusan masalah, tujuan penulisan, batasan masalah, dan sistematika penulisan.

#### **BAB II TINJAUAN PUSTAKA**

Bab ini berisi tinjauan pustaka mengenai etanol dan penggunaannya pada mesin oto, selulosa, hidrolisa selulosa dan fermentasi.

#### **BAB III METODOLOGI PENELITIAN**

Bab ini berisi pembahasan tentang diagram alir penelitian, alat dan bahan penelitian, variabel penelitian, dan prosedur penelitian.

#### **BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN**

Bab ini berisi tentang pembahasan pelaksanaan, pengamatan dan hasil penelitian.

#### **BAB V KESIMPULAN**

Bab ini berisi tentang kesimpulan dari seluruh isi makalah skripsi ini.

#### **DAFTAR PUSTAKA**

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. Etanol

Etanol merupakan senyawa kimia organik yang signifikan karena berbagai macam kegunaannya seperti sebagai pelarut, bahan bakar, pembunuh kuman, minuman keras, anti beku dan tentunya sebagai bahan intermediet dari berbagai bahan kimia lainnya. Etanol adalah salah satu senyawa yang banyak digunakan di industri ataupun kebutuhan sehari-hari. Kegunaan utama etanol adalah sebagai bahan intermediet dalam produksi bahan kimia lainnya dan sebagai pelarut. Sebagai pelarut, etanol memiliki tempat kedua setelah air. Etanol merupakan bahan terpenting dalam pembuatan plastik, *lacquer*, *polishes*, kosmetik dan parfum.

Etanol yang memiliki rumus kimia  $C_2H_5OH$  merupakan senyawa kimia dengan gugus *hidroksil*,  $-OH$ , yang terikat pada atom karbon. Berat jenis etanol pada  $20\text{ }^\circ C$  adalah  $0,789\text{ g/ml}$ , titik leleh etanol adalah  $-114,1\text{ }^\circ C$ , dan titik didihnya adalah  $78,5\text{ }^\circ C$ . Karena titik leleh yang rendah ini maka etanol dapat digunakan sebagai cairan pengisi termometer pada temperatur dibawah  $-40^\circ C$ .

Bahan mentah yang digunakan untuk membuat etanol melalui fermentasi dibedakan menjadi glukosa, karbohidrat dan selulosa ataupun *lignoselulosa*. Glukosa dapat dikonversi langsung menjadi etanol sedangkan karbohidrat dan selulosa harus dihidrolisis terlebih dahulu menjadi gula sederhana sebelum dapat difermentasi menjadi etanol.

Prospek pemanfaatan etanol ke depan diperkirakan akan lebih banyak diarahkan sebagai bahan bakar alternatif pengganti gasolin mengingat cadangan minyak bumi yang semakin menipis. Etanol bisa digunakan dalam bentuk murni ataupun sebagai campuran untuk bahan bakar gasolin (bensin) maupun hidrogen. Karena interaksinya dengan hidrogen, etanol dapat dimanfaatkan sebagai sumber

energi *fuel cell* ataupun dalam mesin pembakaran dalam (*internal combustion engine*) konvensional.

Secara umum terdapat beberapa keuntungan penggunaan bioetanol dibandingkan BBM sebagai bahan bakar, antara lain :

1. Bioetanol ramah lingkungan karena dapat terurai (*biodegradable*) dan jauh lebih aman dari BBM karena tidak beracun.
2. Bioetanol sangat fleksibel karena dapat dicampur dengan bahan bakar jenis lain dan tidak perlu modifikasi mesin bila digunakan pada komposisi sampai 5 % bioetanol.
3. Bioetanol dapat mengurangi emisi CO<sub>2</sub> yang dihasilkan dari proses pembakaran karena tanaman bahan baku-nya dapat mengabsorb CO<sub>2</sub>.
4. Pembakaran bioetanol lebih sempurna karena kandungan oksigen yang tinggi (35 %) sehingga emisi CO yang dihasilkan 19-25 % lebih rendah dibandingkan BBM.

## **2.2 Pembuatan Etanol**

Proses produksi etanol secara fermentasi umumnya menggunakan bahan yang mengandung sakarida, pati, dan atau selulosa sebagai bahan mentah (*raw material*) dengan bantuan mikroorganisme (umumnya ragi, jamur, atau bakteri) sebagai biokatalis.

### **2.2.1 Bahan Baku Bioetanol**

Sampai saat ini bahan baku pada proses fermentasi etanol adalah bahan yang mengandung karbohidrat (*starch*, pati, amilum) atau bahan yang mengandung gugus glukosa. Kecenderungan baru bahan baku bioetanol adalah bahan berpati. Bahan berpati yang sering digunakan sebagai bahan baku produksi etanol adalah biji-bijian seperti padi, jagung, sorgum, singkong, ubi jalar, dan gandum serta beberapa kentang, sedangkan untuk bahan baku yang mengandung selulosa dan hemiselulosa seperti bagas (limbah tebu), jerami, batang padi, batang gandum, limbah jagung, dan limbah pertanian lainnya (Demirbas, 2005). Sampai saat ini masih diteliti tentang proses konversi selulosa dan hemiselulosa menjadi gula, agar dapat difermentasikan menjadi etanol.

Biomassa berselulosa atau disebut juga lignoselulosa, merupakan bahan baku yang dapat diperbaharui serta tersebar luas dipermukaan bumi, dapat digunakan sebagai bahan baku pembuatan bioetanol. Biomassa berselulosa ini dianggap dapat menghasilkan biaya produksi etanol yang lebih rendah daripada produksi etanol dari biomassa berkarbohidrat. Alasannya adalah karena biomassa ini dapat dengan mudah diperoleh tanpa perlu menanam dan menunggu waktu panen, disamping itu karena biomassa ini berasal dari limbah, maka penggunaannya akan menurunkan jumlah limbah yang dibuang ke lingkungan.

Limbah lignoselulosa biasanya terdapat dalam jumlah besar di tempat yang telah dikembangkan sebagai lahan pertanian seperti lahan pertanian, lahan perkebunan kelapa sawit, dsb. Komponen utama dalam limbah lignoselulosa terdiri dari selulosa, hemiselulosa, dan lignin yang jumlahnya bervariasi tergantung dari sumber bahannya.

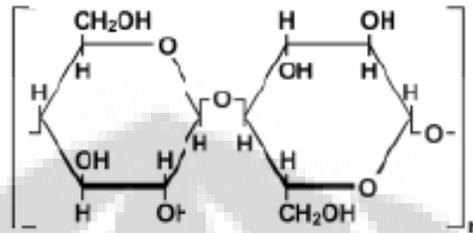
### 1. Selulosa

Selulosa merupakan salah satu bentuk karbohidrat yang termasuk dalam golongan polisakarida. Polisakarida merupakan polimer molekul-molekul monosakarida yang dapat berantai lurus atau bercabang dan dapat dihidrolisis dengan enzim-enzim tertentu. Selulosa banyak terdapat pada dinding sel tanaman dan zat ini merupakan serat tanaman yang tersusun oleh struktur rantai panjang dari unit gula glikosida.

Selulosa merupakan serat-serat panjang yang bersama-sama hemiselulosa, pektin, dan protein membentuk struktur jaringan yang memperkuat dinding sel tanaman. Karakteristik selulosa antara lain muncul karena adanya struktur kristalin dan amorf serta pembentukan *micro fibril* dan *fibril* yang pada akhirnya menjadi serat selulosa. Sifat selulosa sebagai polimer tercermin dari bobot molekul rata-rata, polidispersitas dan konfigurasi rantainya. Dalam praktek, parameter yang banyak diukur adalah berupa derajat polimerisasi (DP) dan kekentalan (viskositas) yang juga merupakan tolok ukur kualitas selulosa.

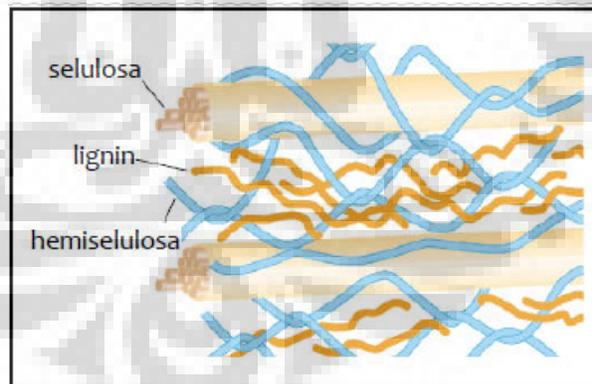
Selulosa adalah homopolimer linier dari *D-anhidroglukosa* (*glukosa-anhidrida*) dengan ikatan  $\beta$ -1,4-*glukosida* dan memiliki rumus empiris  $(C_6H_{12}O_5)_n$ , dimana  $n$  adalah jumlah satuan glukosa yang berikatan atau

menyatakan derajat polimerasi selulosa yang berkisar antara 15-1400 (Janes, 1996 ; Judoamidjojo dkk. , 1989 ; Sjostrom, 1981). Rumus struktur selulosa ditunjukkan pada Gambar 2.1



**Gambar 2.1. Struktur molekul selulosa**

Selulosa terdapat pada semua tanaman baik pohon tingkat tinggi hingga organisme primitif seperti rumput laut. Isolasi selulosa sangat dipengaruhi oleh senyawa-senyawa yang menyertai dinding sel. Senyawa-senyawa seperti lemak, lilin, protein dan pektin dapat dihilangkan dengan cara ekstraksi dengan pelarut organik dan alkali encer (Sastrohamidjojo, 1995). Komplek dinding sel tumbuhan ditampilkan pada Gambar 2.2



**Gambar 2.2. Kompleks dinding sel tumbuhan**

## 2. Hemiselulosa

Hemiselulosa termasuk dalam kelompok polisakarida heterogen yang dibentuk melalui biosintesis yang berbeda dari selulosa. Berbeda dengan selulosa yang merupakan homopolisakarida, hemiselulosa merupakan heteropolisakarida.

Hemiselulosa relatif mudah dihidrolisis dengan asam menjadi komponen-komponen monomernya yang terdiri dari D-glukosa, D-manosa, D-galaktosa, D-xilosa, L-arabinosa, dan sejumlah kecil L-ramnosa disamping menjadi asam D-glukuronat, asam 4-O-metil-glukuronat dan asam D-galakturonat. Derajat polimerasi hemiselulosa dapat mencapai 200 (Sastrohamidjojo, 1995).

Hemiselulosa merupakan polisakarida dengan bobot molekul lebih kecil dibandingkan selulosa. Molekul hemiselulosa lebih mudah menyerap air, bersifat plastis, dan mempunyai permukaan kontak antar molekul lebih luas dibandingkan dengan selulosa (Judoamidjojo dkk., 1989). Ikatan di dalam rantai hemiselulosa banyak bercabang karena gugus  $\beta$ -glukosida di dalam molekul yang satu berikatan dengan gugus hidroksil C2, C3, dan C4 dari molekul yang lain. Berbeda dengan selulosa, hemiselulosa berbentuk *amorf* (Tjokroadikoesoemo, 1986).

Berbeda dengan selulosa, hemiselulosa mempunyai derajat polimerasi lebih rendah dan mudah larut dalam alkali tetapi sukar larut dalam asam, sedangkan selulosa sebaliknya. Hidrolisis hemiselulosa dengan asam kuat encer akan menghasilkan gula heksosa dan pentosa seperti xilosa dan arabinosa. Hidrolisis lebih lanjut akan menghasilkan furfural dan produk terdekomposisi lainnya (Gong dkk., 1981). Hidrolisis hemiselulosa menghasilkan tiga jenis monosakarida yaitu, xilosa, arabinosa dan glukosa dalam jumlah sedikit (Gonzales, 1985).

Ikatan glikosida hemiselulosa lebih stabil terhadap hidrolisis asam daripada ikatan glikosida selulosa. Jika hidrolisis terus berlanjut, bagian-bagian hemiselulosa yang terdepolimerasi terlarut dalam pelarut dan lambat laun terhidrolisis menjadi monosakarida-monosakarida (Sjostrom, 1981).

### 3. Lignin

Lignin adalah polimer aromatik kompleks yang terbentuk melalui polimerasi tiga dimensi dari sinamil alkohol dengan bobot molekul 11.000 (Nevel dan Zeronian, 1985). Lignin terbentuk dari fenil propana, unit-unit fenil propana terikat satu dengan lainnya dengan ikatan eter (C-O-C) maupun ikatan karbon-karbon (Sjostrom, 1981).

Lignin bersifat hidrofobik dan melindungi selulosa sehingga strukturnya bersifat kaku (*rigid*). Adanya ikatan aril alkil dan ikatan eter di dalamnya menyebabkan lignin menjadi tahan terhadap proses hidrolisis dari asam-asam universal. Lignin dapat dioksidasi oleh larutan alkali dan oksidator lain. Pada suhu tinggi, lignin dapat mengalami perubahan menjadi asam format, metanol, asam asetat, aseton dan vanilin (Judoamidjojo dkk., 1989).

### 2.2.2 Kelapa sawit sebagai Bahan Baku Bioetanol

Tanaman kelapa sawit (*Elaeis guinensis Jacq*) termasuk golongan tumbuhan *palmae* yang berasal Nigeria, Afrika Barat. Kelapa sawit masuk ke Indonesia pada tahun 1848 sebagai tanaman hias di Kebun Raya Bogor. Tinggi tanaman ini dapat mencapai 24 meter. Bunga dan buahnya berupa tandan, dan bercabang banyak. Buahnya kecil, bila masak berwarna merah kehitaman. Daging buahnya padat. Daging dan kulit buahnya mengandung minyak. Minyak tersebut digunakan sebagai bahan minyak goreng, sabun, dan lilin. Ampasnya dimanfaatkan untuk makanan ternak. Ampas yang disebut bungkil itu digunakan sebagai salah satu bahan pembuatan makanan ayam. Tempurungnya digunakan sebagai bahan bakar dan arang ([http://id.wikipedia.org/wiki/minyak\\_goreng](http://id.wikipedia.org/wiki/minyak_goreng); Ibrahim dkk, 2007)

Taksonomi tanaman kelapa sawit :

Divisi	: Tracheopita
Subdivisi	: Pteropsida
Kelas	: Angiospermae
Subkelas	: Mono Cotyledoneae
Ordo	: Cocoideae
Famili	: Palmae
Subfamili	: Cocoideae
Genus	: Eleais
Spesies	: <i>Elaeis guinensis</i> Jacq.

Kelapa sawit memiliki beberapa jenis, berdasarkan ketebalan cangkangnya, yaitu *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 pertandannya berkisar 18%. *Pisifera* buahnya tidak memiliki cangkang namun bunga betinanya steril sehingga sangat jarang menghasilkan buah. *Tenera* adalah persilangan

antara induk *Dura* dan *Pisifera*. Jenis ini dianggap bibit unggul karena mampu melengkapi kekurangan masing-masing induk dengan sifat cangkang buah tipis namun bunga betinanya tetap fertil. Beberapa *tenera* unggul persentase daging perbuahnya dapat mencapai 90% dan kandungan minyak pertandannya dapat mencapai 28% ([http://id.wikipedia.org/wiki/kelapa\\_sawit](http://id.wikipedia.org/wiki/kelapa_sawit)).

Indonesia memiliki potensi besar untuk memanfaatkan produk samping sawit sebagai sumber energi terbarukan. Kelapa sawit Indonesia merupakan salah satu komoditi yang mengalami pertumbuhan sangat pesat. Pada periode tahun 1980-an hingga pertengahan tahun 1990-an luas areal kebun meningkat dengan laju 11% per tahun. Sejalan dengan luas area produksi CPO 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, (Dit.Jen. Perkebunan). Sampai dengan tahun 2010 produksi CPO diperkirakan meningkat dengan laju 5-6% per tahun, sedang untuk periode 2010 – 2020 pertumbuhan produksi berkisar antara 2% - 4%. Secara umum, industri kelapa sawit menghasilkan 1.1 ton tandan kosong untuk setiap ton *crude palm oil* (CPO) yang dihasilkan. Sampai saat ini kapasitas penanganan limbah tersebut masih sangat kecil dibandingkan dengan limbah yang terbentuk, padahal kandungan selulosa pada limbah TKKS cukup tinggi (41 – 46%) sehingga apabila dikonversi menjadi aneka produk bermanfaat seperti untuk produksi etanol sangat prospektif.

Selain itu, TKKS juga mengandung bahan-bahan organik seperti 42,8% C; 2,90% K<sub>2</sub>O; 0,8% N; 0,22% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>; 0,3% MgO serta mengandung unsur-unsur mikro seperti B, Cu, dan Zn ([http://id.wikipedia.org/wiki/kelapa\\_sawit](http://id.wikipedia.org/wiki/kelapa_sawit)).

### **2.2.3 Enzim**

Enzim merupakan protein yang bersifat katalis, sehingga sering disebut sebagai biokatalis. Enzim memiliki kemampuan mengaktifkan senyawa lain secara spesifik dan dapat meningkatkan kecepatan reaksi kimia yang akan berlangsung lama apabila tidak menggunakan enzim. Enzim memiliki ukuran yang sangat besar apabila dibandingkan dengan substrat atau gugus fungsional

targetnya. Beberapa enzim hanya terdiri dari polipeptida dan tidak mengandung gugus kimiawi selain residu asam amino.

Suatu penggolongan enzim secara sistematis telah dikemukakan oleh persetujuan internasional. Klasifikasi sistem ini dikenal sebagai klasifikasi sistem *Enzyme Commission* (EC). Sistem ini menempatkan semua enzim dalam enam kelas utama berdasarkan jenis reaksi yang dikatalisis. Enam kelas tersebut dapat dilihat pada tabel di bawah ini.

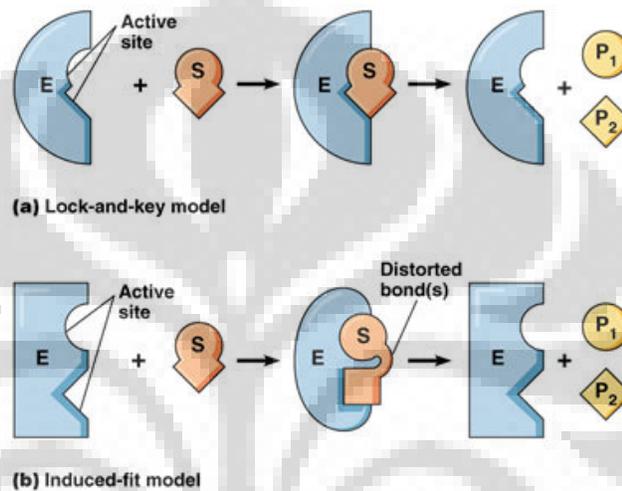
**Tabel 2.1 Klasifikasi Enzim secara Internasional (EC)**

No.	Kelas	Jenis reaksi yang dikatalisa
1.	Oksidoreduktase	Pemindahan elektron
2.	Transferase	Pemindahan gugus fungsional
3.	Hidrolase	Reaksi hidrolisis
4.	Liase	Penambahan gugus ke ikatan ganda atau sebaliknya
5.	Isomerase	Pemindahan gugus di dalam molekul, menghasilkan isomer
6.	Ligase	Pembentukan ikatan C-C, C-S, C-O, dan C-N oleh reaksi kondensasi yang berkaitan dengan penguraian ATP

Salah satu karakteristik dari enzim adalah memiliki spesififikasi yang tinggi. Artinya, satu enzim biasanya hanya dapat menjadi katalis untuk suatu reaksi yang terlibat dalam substrat tertentu. Tidak semua enzim bisa dipakai untuk semua substrat. Enzim juga memerlukan beberapa tambahan komponen kimia bagi aktivitasnya. Komponen ini disebut kofaktor. Kofaktor dapat berupa molekul anorganik seperti  $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  atau molekul organik kompleks yang disebut koenzim. Beberapa enzim membutuhkan baik koenzim maupun satu atau lebih ion logam bagi aktivitasnya.

Substrat dan enzim bergabung menjadi kompleks enzim substrat. Ikatan kompleks enzim – substrat ini menunjukkan ikatan kovalen dan sering disebut kompleks "Michaelis". Substrat terikat pada bagian tertentu dari enzim yang dikenal sebagai pusat aktif (*active center*) atau sisi aktif (*active site*). Terdapat dua

teori yang menyatakan pembentukan ikatan kompleks enzim – substrat. Teori yang pertama dikemukakan oleh Emil Fischer yaitu teori kunci dan gembok (*lock and key theory*) artinya substrat harus bagian yang sangat tepat dengan lokasi aktif enzim. Teori yang kedua diajukan oleh Koshlan pada tahun 1959 yaitu *induced fit model* yang menyatakan lokasi sisi aktif enzim mempunyai konfigurasi yang tidak kaku.

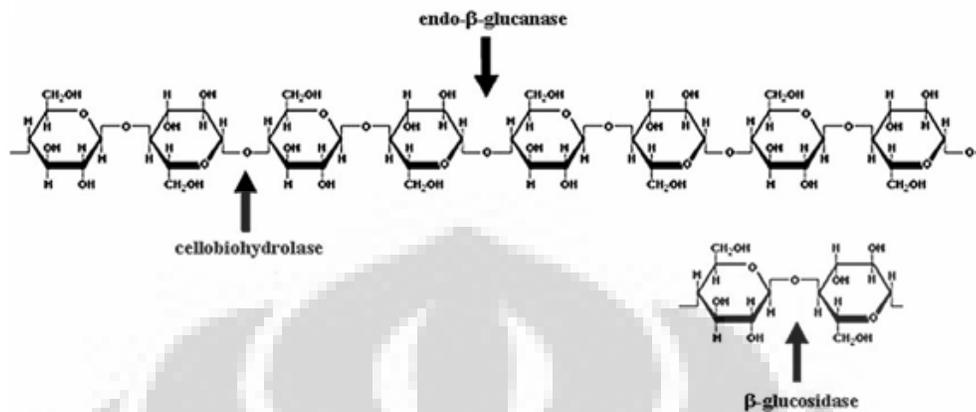


Gambar 2.3 Reaksi enzim dengan Substrat

Aktivitas dari enzim sangat dipengaruhi oleh temperatur. Untuk setiap kenaikan  $10^{\circ}\text{C}$ , aktivitas enzim akan bertambah menjadi dua kali lipat dari semula, dengan syarat tidak terjadi denaturasi pada enzim akibat temperatur yang terlalu tinggi. Sebagian besar enzim memiliki temperatur optimal antara  $40\text{-}60^{\circ}\text{C}$

Enzim yang berperan dalam konversi senyawa selulosa adalah enzim selulase. Enzim selulase terdiri dari *endoglucanase*, *exoglucanase*, dan  $\beta$ -*glucosidase*. *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) merupakan enzim yang berfungsi untuk mengubah satuan oligo sakarida menjadi molekul-molekul disakarida. Enzim yang terakhir adalah  $\beta$ -*glucosidase* berfungsi untuk mengkonversi atau memecah satuan disakarida menjadi dua molekul glukosa yang merupakan gula sederhana yang dapat diubah menjadi etanol.

Mekanisme reaksi yang terjadi antara selulosa dengan enzim selulosa adalah sebagai berikut:



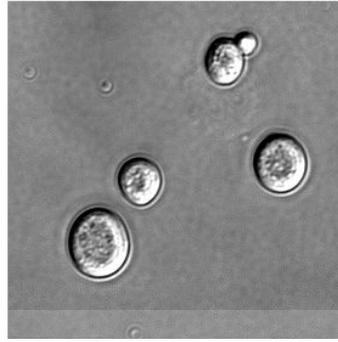
Gambar 2.4 skema pemutusan ikatan glikosida pada selulosa oleh enzim selulase

Satuan konsentrasi enzim untuk selulase dinyatakan dalam *Filter Paper Unit* (FPU). 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).

#### 2.2.4 *Saccharomyces cerevisiae*

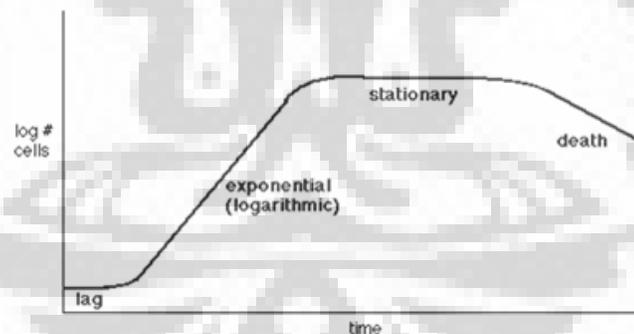
Ragi *Saccharomyces Cerevisiae*, atau di Indonesia lebih dikenal dengan nama jamur ragi, telah memiliki sejarah yang luar biasa di industri fermentasi. Karena kemampuannya dalam menghasilkan alkohol inilah, *S. Cerevisiae* disebut sebagai mikroorganisme aman (*Generally Regarded as Safe*) yang paling komersial saat ini.

*S. Cerevisiae* adalah jamur bersel tunggal bereproduksi dengan cara penyembulan (*budding*). *Budding* atau pembelahan biner vegetatif atau reproduksi aseksual sama dengan cara berkembang biak pada bakteri. Sel ragi memanjang, intinya membelah dan terbentuklah dua sel baru. Dalam periode pembelahan yang cepat memungkinkan terjadi pemisahan dari bagian luarnya sehingga seolah-olah menjadi terbentuk rantai panjang dari sel.



Gambar 2.5 Reproduksi pada *S. cerevisiae*

Dalam hal penggunaannya *S. Cerevisiae* merupakan organisme yang sangat berguna bagi berbagai industri. Terutama industri yang berhubungan dengan fermentasi seperti industri minuman beralkohol. *S. Cerevisiae* dapat memfermentasi glukosa, manosa, fruktosa, dan galaktosa dalam kondisi anaerobik dan pH yang rendah (Van Maris dkk, 2006). Ragi jenis ini lebih resistan terhadap produk yang dihasilkan dari hidrolisa selulosa daripada mikroorganisme lainnya yang dapat memproduksi etanol dari bahan lignoselulosa (Ollson dan Hahn-hagerdal, 1993)



Gambar 2.6 Kurva Pertumbuhan Mikroorganisme

Adapun penjelasan dari fase-fase pertumbuhan mikroorganisme adalah sebagai berikut :

1. Fase lag

Fase ini bergantung pada perubahan lingkungan terutama dari perubahan kandungan nutrisi. Selama fase ini, massa sel-sel meningkat namun tidak terjadi pembelahan sel atau perubahan jumlah sel.

## 2. Fase logaritmik

Pada fase ini terjadi pembelahan sel dan populasi meningkat berlipat ganda setiap waktu generasi. Sel akan tumbuh dan membelah diri secara eksponensial hingga jumlah maksimum. Jumlah sel yang terbentuk pada fase ini dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain, kandungan sumber nutrisi, temperatur, kadar oksigen, cahaya dan keberadaan mikroorganisme.

## 3. Fase Stasioner

Pada fase ini laju pembelahan sel sebanding dengan laju kematian sel, sehingga jumlah sel hidup tetap konstan. Fase ini akan terjadi akibat pengurangan sumber nutrisi.

## 4. Fase kematian

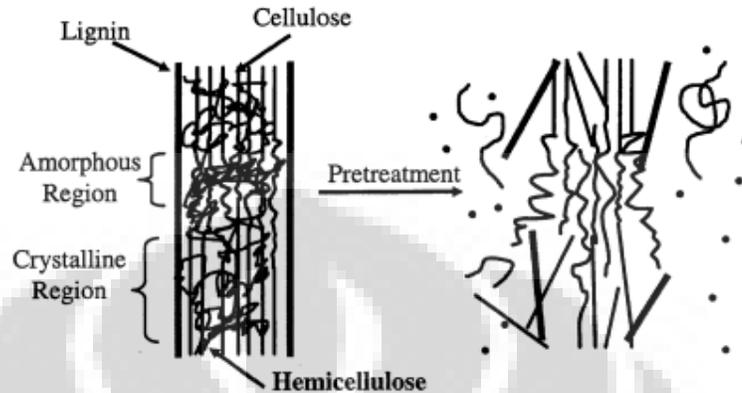
Pada fase ini tidak ada pembelahan sel dan sel-sel akan mati jika tidak dipindahkan ke media segarnya. Fase kematian juga terjadi secara eksponensial.

### 2.2.5 Sakarifikasi

Hidrolisis selulosa atau sakarifikasi dilakukan oleh asam maupun enzim, untuk menghasilkan glukosa diperlukan perlakuan pendahuluan. Pada prinsipnya perlakuan pendahuluan diperlukan untuk meningkatkan kerentanan selulosa terhadap bahan penghidrolisis (enzim atau asam) dan menghilangkan bahan-bahan yang tidak terhidrolisis (Rexen di dalam Ferranti dan Fiechter, 1983).

Hidrolisis selulosa secara asam dapat dilakukan dengan menggunakan asam kuat encer pada temperatur dan tekanan tinggi, dan dapat dilakukan dengan menggunakan asam pekat pada temperatur dan tekanan rendah. Asam yang biasanya digunakan untuk hidrolisis selulosa adalah asam sulfat, asam fosfat dan asam klorida. Sedangkan hidrolisis secara enzim dapat dilakukan dengan menggunakan enzim selulase. Enzim selulase merupakan campuran dari endo- $\beta$ -4,1-glukonase, exo- $\beta$ -1,4-selobiose dan  $\beta$ -glukosidase. Enzim endo- $\beta$ -4,1-glukonase akan menghidrolisis bagian amorf selulosa menjadi senyawa-senyawa dengan bobot molekul yang lebih kecil ( $\beta$ -oligomer), enzim exo- $\beta$ -1,4-selobiose akan menyerang struktur berkristal selulosa dan menghasilkan selobiosa

(disakarida). Sedangkan enzim  $\beta$ -glukosidase akan mengubah  $\beta$ -oligomer dan selobiosa menjadi glukosa (Parisi di dalam Lynd dkk. , 1976).



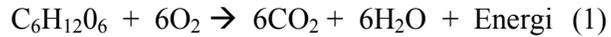
Gambar 2.7 Efek perlakuan awal pada Lignoselulosa

Perlakuan pendahuluan dapat berupa penghilangan hemiselulosa dan lignin, pembengkakan (*swelling*) serat selulosa, pengurangan struktur berkrystal pada selulosa, dan pengurangan derajat polimerasi pada rantai selulosa (Rexen di dalam Ferranti dan Fiechter, 1983)

### 2.2.6 Fermentasi

Fermentasi berasal dari kata latin *ferfere* yang artinya mendidihkan. Hal ini dapat dianggap sebagai peninggalan ketika ilmu pengetahuan masih sangat awal sehingga terbentuknya gas dari suatu cairan kimia hanya dapat dianalogikan dengan proses air mendidih. Pada masa itu memang belum diketahui bahwa kejadian tersebut dapat pula terjadi oleh terbentuknya gas-gas lain dalam cairan. Salah satunya adalah  $\text{CO}_2$  yang merupakan produk samping dari fermentasi, yaitu perubahan kimia dari senyawa organik dalam keadaan aerob atau anaerob melalui kerja enzim yang dihasilkan oleh mikroba menjadi suatu senyawa organik lainnya.

Reaksi pembentukan etanol terjadi karena adanya aktifitas dari mikroba pada substrat. Mikroba akan menggunakan materi yang mengandung karbon seperti glukosa untuk proses metabolisme. Proses ini menghasilkan energi bagi mikroba tersebut. Reaksi yang terjadi adalah sebagai berikut :



Dari reaksi di atas dapat dilihat bahwa reaksi tersebut memerlukan oksigen. Apabila kondisi ini tidak dipenuhi, artinya tidak ada oksigen, maka reaksi yang terjadi adalah sebagai berikut :



Terdapat beberapa proses untuk mengkonversi lignoselulosa menjadi glukosa, selanjutnya dikonversi menjadi bioetanol yaitu *separate hydrolysis and fermentation* (SHF) yang mana proses hidrolisis/sakarifikasi dengan proses fermentasi dilakukan dalam dua tahap. Sedangkan proses lainnya adalah *Simultaneous Saccharification and Fermentation* (SSF) dengan enzim selulase yang berasal dari sumber lain dimana sakarifikasi dan fermentasi dilakukan pada saat yang bersamaan dalam satu fermentor (Alfani, 2000). Kelebihan dari proses SHF dibandingkan proses lainnya adalah tiap proses dapat dilakukan dalam kondisi pH dan temperatur yang optimum karena dilakukan dalam dua tempat yang berbeda. Akan tetapi pada proses sakarifikasi dapat terjadi akumulasi dari produk akhir sakarifikasi yaitu glukosa dapat menghambat aktivitas dari enzim selulase. Kelebihan dari proses SSF adalah laju hidrolisa semakin cepat karena glukosa hasil sakarifikasi oleh enzim selulosa dengan segera diubah menjadi etanol oleh mikroba.

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

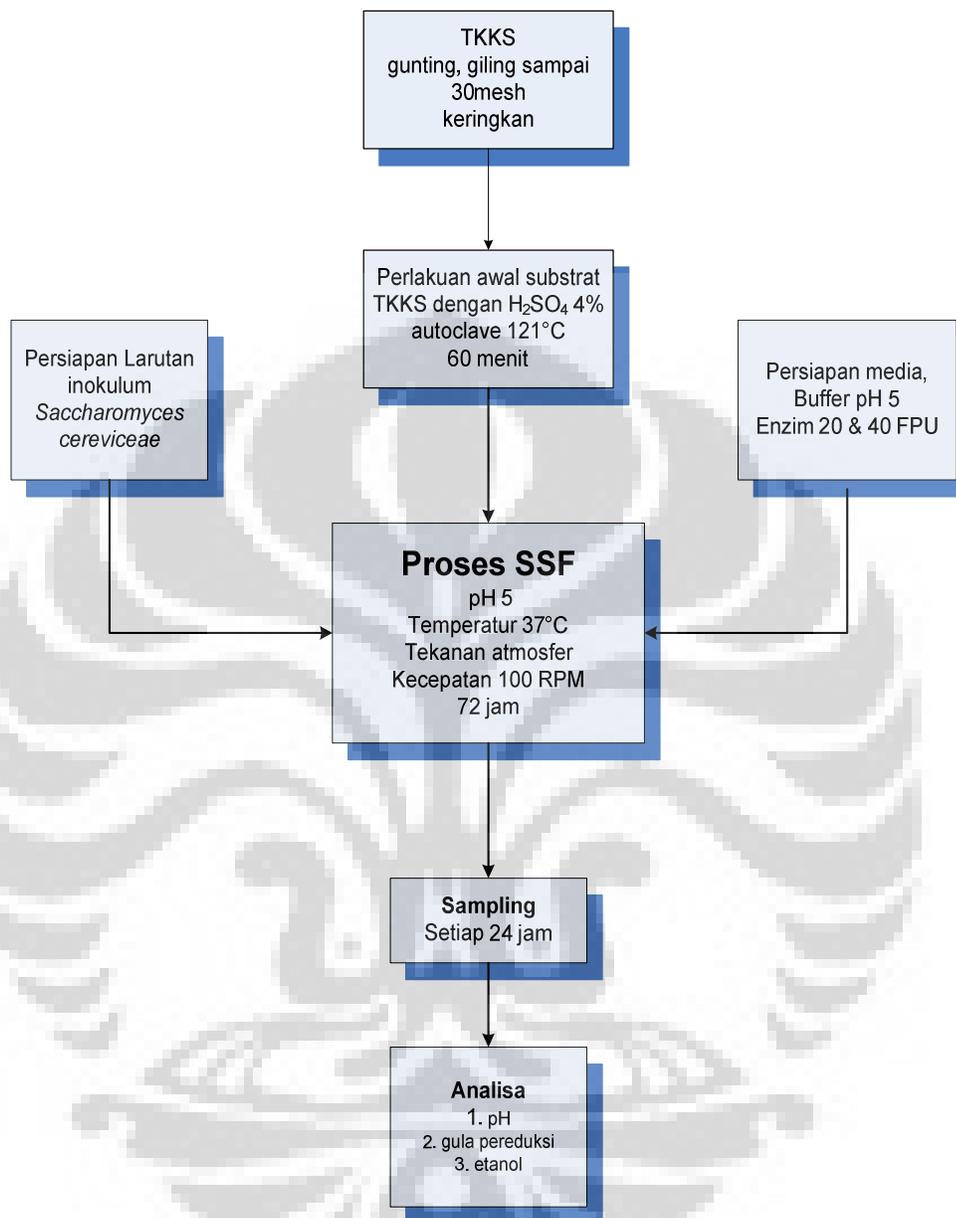
#### **3.1 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Teknologi Lingkungan Pusat Penelitian Kimia Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Serpong Tangerang dari bulan September 2008 sampai Desember 2008.

#### **3.2 Pelaksanaan Penelitian**

Tahapan penelitian optimasi pemanfaatan tandan kosong kelapa sawit sebagai penghasil etanol melalui proses *simultaneous saccharification fermentation* terdiri dari dua tahap yaitu tahap pendahuluan dan tahap penelitian utama.

Tahap Pendahuluan terdiri dari perlakuan awal secara fisika yaitu pengecilan ukuran TKKS dan dilanjutkan dengan pengeringan. Tahapan penelitian utama meliputi persiapan peralatan, persiapan dan pembuatan bahan yang digunakan, dan fermentasi. Diagram alir penelitian seperti pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian

### **3.3 Persiapan dan Perlakuan Awal Substrat TKKS**

#### **3.3.1 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 substrat tandan kosong kelapa sawit (TKKS) yang diambil dari PTPN VIII Malingping Banten, aquadest, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (p.a).

#### **3.3.2 Prosedur penelitian**

Pada tahap ini TKKS yang digunakan sebagai bahan baku mengalami beberapa perlakuan dimulai dengan pengeringan dilanjutkan dengan pencacahan menggunakan *crusher* dan gunting hingga diperoleh ukuran substrat sebesar ± 30 mesh.

Hidrolisa awal TKKS menggunakan larutan asam sulfat 4% dengan komposisi setiap 12,5 gram contoh TKKS ditambah dengan 87,5 ml larutan asam sulfat. Kemudian dipanaskan dalam *autoclave* pada temperatur 121°C selama 60 menit. Kemudian dicuci dan dibilas sampai pH larutan netral. Padatan dikeringkan pada temperatur 50°C sampai kadar air mencapai 8 – 10%.

### **3.4 Persiapan SSF**

Tahapan preparasi proses fermentasi meliputi pembuatan kultur murni *S. cerevisiae*, pembuatan larutan buffer asetat pH 5, pembuatan media starter, persiapan bahan untuk fermentasi

#### **3.4.1 Pembuatan Kultur Murni**

##### **3.4.1.1 Alat dan bahan yang digunakan**

Alat yang digunakan adalah neraca analitis, gelas kimia 100 ml, batang pengaduk, tabung reaksi, autoclave, kawat ose, bunsen, *laminar flow*.

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

### 3.4.1.2 Prosedur Pembuatan Kultur Murni *S. cerevisiae*

Kultur murni koleksi Pusat Penelitian Kimia LIPI dibiakkan dahulu dengan cara peremajaan dalam media agar miring dan ditumbuhkan selama  $\pm 48$  jam.

Cara membuat 100ml medium agar miring:

1. Menimbang PDA sebanyak 3,90 kemudian dilarutkan dalam 100 ml *aquadest*, diaduk sampai seluruh bahan larut.
2. Medium disterilisasi menggunakan *autoclave* selama  $\pm 15$  menit.
3. Medium yang telah steril kemudian didinginkan dengan cara dimiringkan dan media agar miring disimpan dalam lemari UV atau lemari pendingin bila tidak langsung digunakan.

Cara inokulasi kultur murni *S. cerevisiae*:

1. Menyalakan lampu uv dan kompresor laminar transfer box selama 15 menit.
2. Menyiapkan kultur murni *S. cerevisiae* yang akan diinokulasikan ke dalam agar miring
3. Menginokulasikan *S. cerevisiae* menggunakan kawat ose secara aseptis
4. Menginkubasikan selama 48 jam pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$

### 3.4.2 Pembuatan Larutan Buffer Asetat pH 5

#### 3.4.2.1 Alat dan bahan yang digunakan

Alat yang digunakan neraca analitis, spatula, gelas kimia 250 ml, gelas ukur 100 ml, botol reagen.

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

#### 3.4.2.2 Prosedur Pembuatan Larutan Buffer Asetat pH 5

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

1. Mengencerkan 11,5 ml  $\text{CH}_3\text{COOH}$  glacial dengan *aquadest* sampai volume larutan 1 liter (larutan A)

2. Melarutkan 16,4 gram  $\text{CH}_3\text{COONa}$  dalam 1 liter aquadest (larutan B)
3. Mencampurkan larutan A sebanyak 148 ml dan larutan B sebanyak 352 ml kemudian diencerkan dengan aquadest sampai 1 liter.
4. Menyimpan dalam botol reagent

### 3.4.3 Pembuatan Larutan Inokulum (Starter) dan Larutan Enzim

#### 3.4.3.1 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah neraca analitis, spatula, gelas kimia 1000ml, erlenmeyer 250 ml, kapas dan kain kasa.

Bahan yang digunakan adalah, *S. cerevisiae* dan bahan – bahan kimia seperti yang tercantum pada Tabel 3.1

**Tabel 3. 1 Komposisi Medium Inokulum**

No	Bahan	(g/L aquadest)
1	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,10
2	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,10
3	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,10
4	<i>Yeast Extract</i>	1,00
5	Glukosa	10,00

#### Prosedur Pembuatan Larutan Inokulum (Starter)

Cara membuat 1 liter medium starter:

1. Menyiapkan bahan-bahan dan timbang  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  100mg,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  100mg, *Yeast Extract* 1 g, glukosa 10g, lalu ke-4 bahan tersebut dilarutkan dalam 1 liter *aquadest*, diaduk sampai seluruh bahan larut.
2. Medium disterilisasi menggunakan *autoclave* selama  $\pm 15$  menit lalu didinginkan. Penganbilan bahan dilakukan setelah suhu *autoclave* dan tekanan *autoclave* turun.
3. Menambahkan  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  100mg secara aseptis
4. *S. cerevisiae* yang berumur 48 jam dalam agar miring diinokulasikan ke dalam medium starter yang akan digunakan kemudian diinkubasi

dalam *rotary shaker* dengan kecepatan 100 rpm dan temperature 37°C selama 24 jam.

#### **Pembuatan Larutan Medium Fermentasi**

Prosedur yang dilakukan pada tahap ini:

1. Timbang  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  50 mg,
2.  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  1000 mg
3. *Yeast Extract* 2000 mg
4. larutkan dalam 1 liter *aquadest*, kemudian diaduk sampai seluruh bahan larut.

#### **Pembuatan Larutan Enzim Selulase**

Cara pembuatan enzim selulase dengan konsentrasi 250 FPU

1. Timbang 11,63875 mg meicelase
2. Larutkan dalam 100 ml larutan buffer asetat pH 5 yang telah disterilisasi.

#### **3.4.4 Proses SSF**

Tahapan pada proses ini adalah:

1. Timbang sebanyak 4 gram substrat TKKS yang telah dilakukan perlakuan awal dengan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  4% ke dalam erlenmeyer.
2. Tambahkan 50 ml larutan medium fermentasi
3. Tambahkan 32 ml buffer asetat pH 5 untuk enzim 20 FPU dan 24 ml untuk enzim 40 FPU kedalam sample TKKS.
4. Tambahkan glukosa dengan variasi 0%; 2; 4% ke dalam sample
5. Sterilisasi menggunakan *autoclave* selama  $\pm$  15 menit lalu didinginkan. Medium yang telah steril dan dingin dapat disimpan dalam lemari UV atau lemari pendingin bila tidak langsung digunakan.
6. Tambahkan enzim selulase sebanyak 8 ml untuk enzim 20 FPU dan 16 ml untuk enzim 40 FPU.

7. Tambahkan Starter (inokulum) ditambahkan kedalam labu erlenmeyer yang berisi sampel sebanyak 10% dari volume total.
8. Lakukan SSF dalam inkubator dengan kondisi tekanan ruang, temperatur 37°C dan kecepatan *rotary shaker* 100 rpm. Sampling dilakukan setiap 24 jam.

### 3.4.5 Analisa

Analisa yang dilakukan pada penelitian ini adalah pengukuran pH larutan yang dilakukan dengan menggunakan indikator pH universal. Analisa glukosa yang dilakukan dengan menggunakan metoda somogyi-nelson (1952). Berikutnya adalah analisa Etanol menggunakan alat gas kromatografi.

#### 3.4.5.1 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 reaksi, *hot plate*, kelereng, gelas kima, spektrofotometer U-2000 Hitachi Jepang, GC GC – 9A Shimadzu dengan kolom PEG, SE 30 Chromosorb. W 80 – 100 mesh

Bahan yang digunakan untuk pereaksi nelson terdiri dari Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anhidrous, K. Tartrat, NaHCO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidrous, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(p.a), CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>HasO<sub>4</sub>.

#### 3.4.5.2 Pembuatan Pereaksi

Pereaksi Nelson A dibuat dengan Melarutkan 12,5 gram Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anhidrous; 12,5 gram K. Tartrat; 10,0 gram NaHCO<sub>3</sub>; dan 100,0 gram Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidrous dan encerkan sampai 500 ml dengan aquadest. Jika sukar larut lakukan dengan pemanasan.

Pereaksi Nelson B dibuat dengan melarutkan 15 gram CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O ditambah 1 – 2 tetes H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat (p.a) dan encerkan sampai 100 ml dengan aquades.

Pereaksi Nelson terdiri dari campuran Nelson A sebanyak 25 bagian dan Nelson B sebanyak 1 bagian

Pereaksi arseno molibdat dibuat dengan cara melarutkan 25,0 gram  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 21,0 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat (p.a) kemudian diencerkan sampai 400 ml dengan aquadest. (larutan A). Selanjutnya melarutkan 3 gram  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4$  dalam 25 ml aquadest. (larutan B), campurkan larutan A dan larutan B, biarkan semalam. Larutan siap digunakan.

### 3.4.5.3 Prosedur Analisa

Prosedur analisa penentuan pH larutan dilakukan dengan mencelupkan kertas pH kedalam larutan sample kemudian dibandingkan perubahan warna dengan standar dan catat pH larutan.

Konsentrasi gula pereduksi sebagai glukosa dianalisa dengan metode Smogyi Nelson dengan

1. 1 ml larutan standar glukosa dengan konsentrasi 0,02%; 0,04%; 0,06%; 0,08%; 0,10% ditambah dengan larutan nelson sebanyak 1 ml dalam tabung reaksi.
2. Panaskan sampel dalam air panas ( $90^\circ\text{C}$ ) selama 20 menit. Setelah 20 menit dinginkan
3. Tambahkan 1 ml larutan arseno molibdat. Kocok sampai semua endapan larut kembali.
4. Encerkan larutan sampai volumenya 10 ml dan
5. Ukur serapan larutan sampel dengan spektrofotometer U-2000 pada panjang gelombang 520 nm.
6. Buat kurva kalibrasi larutan standar
7. Lakukan langkah 1 – 5 untuk larutan sampel.
8. Plotkan hasil pengukuran

Konsentrasi etanol dilakukan dengan menggunakan GC yang dilakukan di Laboratorium Afiliasi MIPA UI dengan prosedur sebagai berikut:

1. Buka aliran gas pembawa  $\text{N}_2$  dari tangki. Alirkan gas pembawa tersebut ke dalam alat GC, lihat indikator sampai menunjukkan 6 kg/cm<sup>2</sup>.
2. Atur kecepatan aliran gas pembawa yang diinginkan.
3. Power di “on” kan.

4. Atur kondisi operasi, yaitu temperatur kolom dan temperatur injektor (temperatur harus sama atau lebih tinggi  $20^{\circ}\text{C}$  -  $50^{\circ}\text{C}$  dari pada temperatur kolom). Bila lampu injektor sudah menyala, berarti kondisi sudah siap.
5. On kan udara dari generator. Buka kran agar oksigen masuk ke dalam alat GC.
6. Buka kran gas  $\text{H}_2$  kedalam alat GC.
7. Atur kecepatan udara:  $0.5 \text{ mL}/\text{menit}$  dan kecepatan gas  $\text{H}_2$ :  $1.0 \text{ mL}/\text{menit}$ . Nyalakan pembakar, jika ada uap air yang keluar dari cerobong berarti api sudah menyala, adanya uap air tersebut dapat terlihat pada kaca atau stainless steel yang diletakkan diatas cerobong tersebut.
8. Atur kembali kecepatan udara menjadi  $1.0 \text{ mL}/\text{menit}$  dan kecepatan gas  $\text{H}_2$  menjadi  $0.5 \text{ mL}/\text{menit}$ .
9. Injeksikan sampel dan lihat kromatogram yang dihasilkan pada recorder.

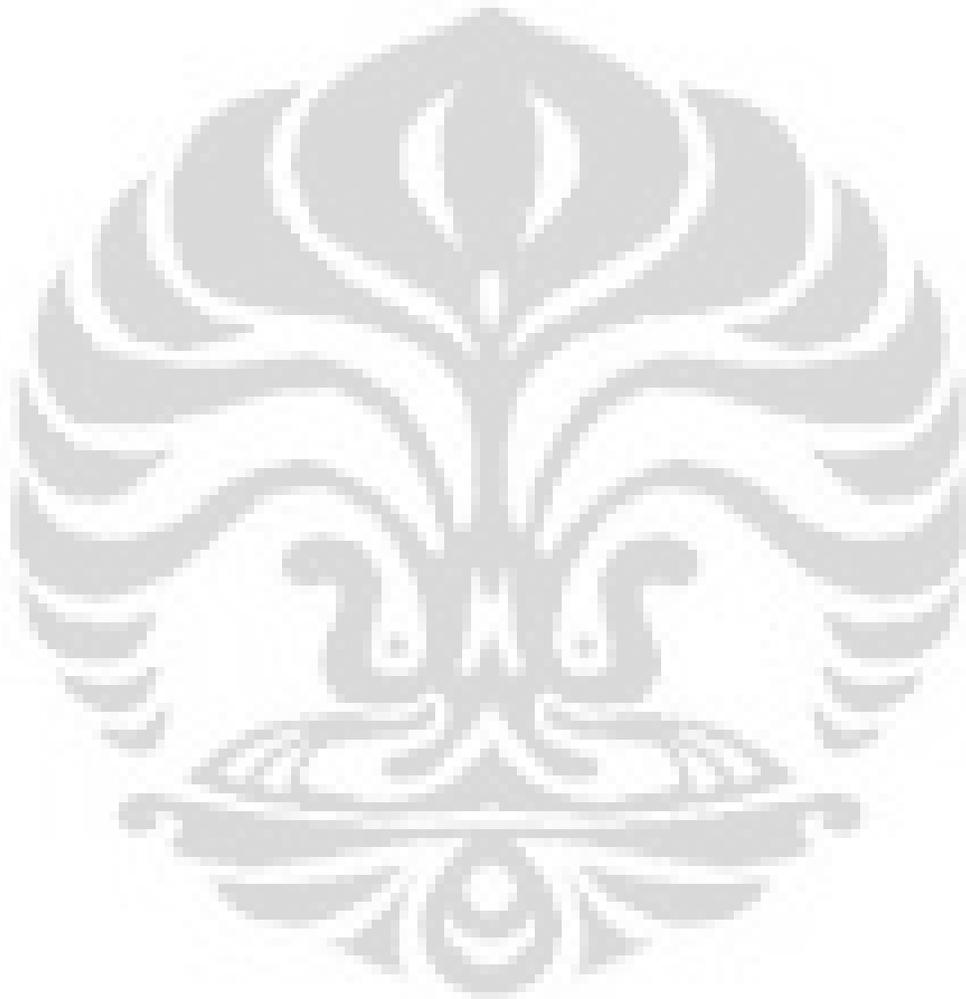
Prosedur analisa kandungan etanol dalam larutan sample dan standar dilakukan sebagai berikut:

1. Siapkan larutan alkohol yang akan dipakai dalam percobaan sebagai berikut: buatlah larutan standar etanol  $0,2\%$ ;  $0,3\%$ ;  $0,5\%$ ;  $1\%$ ; dan  $2\%$  volume.
2. Siapkan peralatan GC.
3. Lakukan langkah 1 sampai 3 (lihat prosedur mengoperasikan alat GC)
4. Atur kondisi temperatur kolom :  $70 - 100^{\circ}\text{C}$ ; temperatur detektor : minimal  $120^{\circ}\text{C}$ ; Temperatur injektor : minimal  $120^{\circ}\text{C}$ ; kecepatan alir optimum gas pembawa:  $30-60 \text{ liter}/\text{menit}$ .
5. Lakukan langkah 5 sampai 8 (lihat prosedur mengoperasikan alat GC).
6. Injeksikan masing-masing standar alkohol secara bergantian.
7. Injeksikan sampel hasil fermentasi.
8. Catat luas area pada hasil rekorder dan buat kurva regresi linear terhadap standar dan masukkan nilai luas area sampel.

### 3.5 Variabel Penelitian

Variabel yang dapat ditentukan dalam penelitian ini adalah :

1. Variabel tetap, yaitu: jumlah substrat TKKS yaitu 4%, temperatur inkubasi pada 37°C, kecepatan *rotary shaker* 100 rpm dan tekanan atmosfer
2. Variabel bebas, yaitu: konsentrasi enzim pada 20 FPU dan 40 FPU, dan konsentrasi glukosa pada 0%; 2%; dan 4%.
3. Variabel tergantung atau yang terukur yaitu: pH larutan, konsentrasi gula pereduksi, dan konsentrasi etanol.



## **BAB IV**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **4.1 Pembahasan Umum**

Pembahasan mengenai hasil penelitian ini akan ditekankan pada pengaruh konsentrasi enzim selulase terhadap pada substrat TKKS terhadap peningkatan glukosa yang terbentuk dalam hal ini sebagai sisa gula pereduksi karena langsung dikonversi oleh *Saccharomyces cerevisiae* menjadi etanol. Selain itu, pengaruh penambahan glukosa murni terhadap etanol yang dihasilkan, dimana sebagai pembandingnya adalah substrat yang sama tanpa penambahan glukosa murni dengan perlakuan, dan kondisi operasi yang sama.

Penelitian ini terdiri dari beberapa tahapan yaitu tahap persiapan, pelaksanaan penelitian dan pengolahan data. Tahapan persiapan terdiri dari persiapan bahan penelitian dan peralatan, selanjutnya sterilisasi bahan penelitian dan peralatan. Tahapan pelaksanaan penelitian memiliki beberapa tahapan sebelum sampai ke tahapan utama. Tahapan awal adalah perlakuan pendahuluan pada substrat TKKS. Perlakuan yang dilakukan pengecilan ukuran TKKS dengan cara *milling*, gunting, dan *crushing*. Perlakuan tersebut dilakukan berulang sampai didapatkan ukuran partikel TKKS yang diinginkan yaitu 30 mesh.

Langkah selanjutnya setelah mendapatkan ukuran partikel 30 mesh selanjutnya adalah hidrolisis awal menggunakan larutan  $H_2SO_4$  encer konsentrasi 4% (v/v) (Sudiyani dkk, 2008) Dimana terjadi perubahan komposisi terhadap komponen dalam substrat TKKS. Hasil dari analisis kandungan komponen TKKS dilakukan perlakuan pendahuluan disajikan pada Tabel 4.1

**Tabel 4.1 Kehilangan Berat pada TKKS  
Setelah Perlakuan Awal**

<b>Komponen</b>	<b>Kehilangan berat (%)</b>
Lignin	42,1
Hemiselulosa	80,1
Selulosa	23,7

Sumber: Sudiyani dkk 2008

Enzim yang digunakan dalam penelitian ini adalah enzim selulase. Dimana kinerja enzim dipengaruhi oleh pH. pH yang dipilih adalah pH 5 buffer asetat , yang merupakan pH optimal enzim untuk melakukan aktivitas. Dimana pH optimal enzim selulase mempunyai range 4,8 – 5,2 (Zimbardi dkk, 1997).

#### **4.2 Hasil Analisa Penambahan Konsentrasi Enzim**

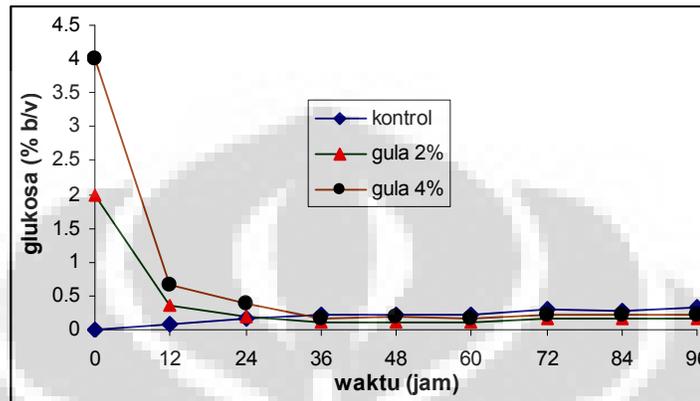
Pada penelitian ini dilakukan penambahan variasi konsentrasi enzim untuk mengetahui seberapa banyak konsentrasi gula pereduksi yang dihasilkan untuk bahan baku proses fermentasi oleh *S. cerevisiae*, sebelum dikonversi menjadi etanol, yang merupakan fungsi dari waktu. Konsentrasi enzim selulase yang ditambahkan yaitu 20 FPU dan 40 FPU dengan konsentrasi substrat 4 % terhadap volume medium, dan konsentrasi H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pada perlakuan pendahuluan adalah 4 %.

##### **4.2.1 Penambahan Konsentrasi Enzim Terhadap Pembentukan Gula Pereduksi**

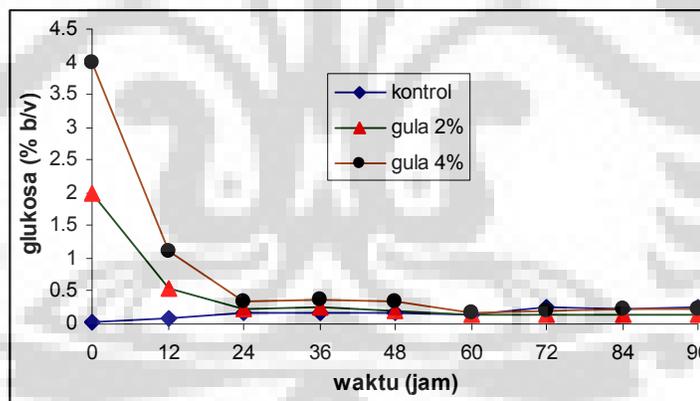
Adanya penambahan enzim pada substrat TKKS mengakibatkan terjadinya proses sakarifikasi selulosa oleh enzim selulase yang menghasilkan glukosa. Konsentrasi enzim yang ditambahkan untuk proses SSF pada pembentukan gula pereduksi baik 20 FPU maupun 40 FPU mempunyai pola yang sama. Pola yang terjadi yaitu penurunan konsentrasi gula pereduksi pada larutan yang mempunyai konsentrasi gula yang tinggi yaitu pada konsentrasi gula awal 2% dan 4%. Sedangkan pada kontrol terjadi peningkatan konsentrasi gula pereduksi.

Pada 12 jam pertama proses SSF, pada kontrol terjadi peningkatan jumlah gula sebanyak 0,073 gram baik pada konsentrasi enzim 20 FPU maupun pada

konsentrasi enzim 40 FPU. Untuk konsentrasi gula awal 2% pada 24 jam pertama terjadi penurunan konsentrasi gula pereduksi yang sangat tajam. Begitu juga untuk konsentrasi gula awal 4% yang menunjukkan penurunan yang signifikan pula.



Gambar 4.1 Konsentrasi Gula Pereduksi konsentrasi Enzim 20 FPU



Gambar 4.2 Konsentrasi Gula Pereduksi konsentrasi Enzim 40 FPU

Hasil proses SSF menunjukkan konsentrasi gula pereduksi yang terdapat dalam larutan untuk konsentrasi enzim 20 FPU lebih besar dibandingkan dengan konsentrasi gula untuk konsentrasi enzim 40 FPU. Hal ini berarti laju sakarifikasi untuk konsentrasi enzim 20 FPU lebih tinggi dibandingkan laju sakarifikasi dengan konsentrasi enzim 40 FPU. Konsentrasi yang tinggi dapat mengindikasikan kinerja enzim yang tinggi atau kinerja mikroba yang lambat.

Gambar 4.1 dan Gambar 4.2 menunjukkan peningkatan konsentrasi gula pereduksi pada kontrol. dimana terjadi proses sakarifikasi yaitu pemecahan polisakarida menjadi monosakarida. Akan tetapi terjadi penurunan konsentrasi gula pereduksi yang signifikan untuk konsentrasi gula awal yang tinggi yaitu 2% dan 4%. Pada saat proses SSF dimulai sampai proses dihentikan yang terjadi tidak hanya proses sakarifikasi yang ditunjukkan oleh kontrol tapi terjadi juga proses fermentasi yang ditunjukkan oleh konsentrasi gula awal 2% dan 4%. Laju penurunan konsentrasi yang paling tinggi sampai yang paling rendah berturut-turut terjadi pada konsentrasi gula yang paling tinggi yaitu 4%, 2%, dan puncak laju penurunan konsentrasi terjadi pada jam ke-36.

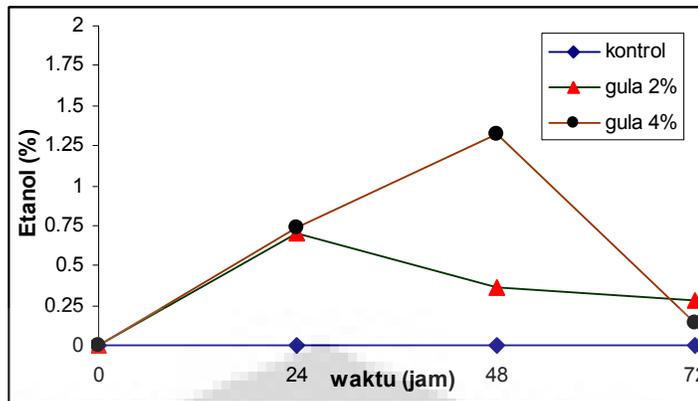
Penurunan konsentrasi gula pereduksi yang tinggi mengindikasikan pembentukan etanol oleh ragi *S. cerevisiae* yang tinggi. Hal ini disebabkan bahan baku untuk produksi etanol melalui fermentasi oleh *S. cerevisiae* adalah gula pereduksi dalam hal ini adalah monosakarida yang merupakan produk dari hasil sakarifikasi.

#### 4.2.2 Penambahan Konsentrasi Enzim Terhadap Perolehan Etanol

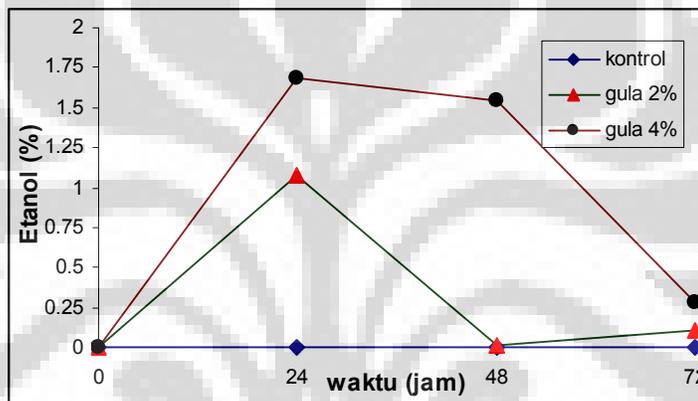
Menurut Demirbas (2005) monosakarida yang terbentuk dari proses sakarifikasi selanjutnya akan dikonversi oleh ragi *S. cerevisiae* menjadi etanol. Proses konversi ini dilakukan secara anaerobik reaksi yang terjadi adalah sebagai berikut:



Saat proses SSF dilakukan labu erlenmeyer ditutup kedap dengan plastik agar tidak terjadi pertukaran gas, baik gas masuk ke dalam labu yaitu gas oksigen dan gas yang terjadi karena reaksi yaitu gas karbondioksida. Selain itu, untuk mencegah penguapan etanol hasil fermentasi.



Gambar 4.3 Konsentrasi Etanol Enzim 20 FPU



Gambar 4.4 Konsentrasi Etanol Enzim 40 FPU

Konsentrasi etanol yang dihasilkan untuk kontrol menunjukkan peningkatan baik pada konsentrasi enzim 20 FPU maupun konsentrasi 40 FPU. Kondisi ini berbanding terbalik dengan penambahan gula awal 2% dan 4% baik konsentrasi enzim 20 FPU maupun konsentrasi enzim 40 FPU. Adanya penambahan gula sesaat sebelum dilakukan proses menunjukkan pengaruh yang berbeda. Terlihat pada jam ke-24 pertama pada konsentrasi enzim 20 FPU dan 40 FPU terjadi peningkatan konsentrasi etanol, tapi jam-jam berikutnya terjadi penurunan konsentrasi etanol sehingga mengakibatkan perolehan etanol menjadi berkurang. Khusus untuk konsentrasi 40 FPU konsentrasi awal glukosa 4% peningkatan terjadi sampai jam ke-48. Sedangkan pada kontrol tidak terbentuk etanol.

Penurunan konsentrasi etanol terjadi karena jumlah konsentrasi glukosa yang dihasilkan dari proses sakarifikasi kecil. Laju sakarifikasi oleh enzim selulase yang lambat tidak sebanding dengan laju fermentasi oleh mikroba *S. cerevisiae* yang cepat. Oleh karenanya *S. cerevisiae* tidak hanya mengambil sumber karbon dari glukosa yang terbentuk dari proses sakarifikasi tapi juga mengkonsumsi etanol yang terbentuk dalam larutan (Ramon-portugal, 2004; Piskur dkk, 2006).

Dari uraian di atas konsentrasi enzim yang lebih berpengaruh terhadap pembentukan gula pereduksi dan perolehan etanol adalah konsentrasi enzim 40 FPU.

#### **4.3 Hasil Analisa Penambahan Konsentrasi Glukosa**

Awal proses SSF yang bekerja adalah enzim selulase dimana terjadi pemecahan polisakarida menjadi oligosakarida dan akhirnya menjadi monosakarida. Monosakarida merupakan senyawa gula sederhana yang dapat dikonsumsi oleh mikroba secara langsung tanpa harus diolah terlebih dahulu untuk tetap hidup. Enzim memerlukan waktu untuk mengubah polisakarida menjadi monosakarida sehingga pada saat awal tidak terdapat sumber karbon yang dapat dikonsumsi oleh *S. cerevisiae*

Mikroba *S. cerevisiae* memerlukan sumber karbon dalam bentuk monosakarida untuk tetap berkembang biak karena unsur karbon tersebut merupakan sumber utama makanan bagi mikroba tersebut. Jika tidak terdapat sumber karbon maka ragi *S. cerevisiae* tidak akan bertambah jumlahnya akibatnya proses SSF berjalan lambat. Supaya *S. cerevisiae* berkembang biak sehingga proses SSF dapat berjalan lebih cepat maka ditambahkan glukosa dengan variasi 2% dan 4% terhadap volume larutan pada substrat, sedangkan sebagai pembanding dilakukan pula proses tanpa penambahan glukosa (kontrol). Hal ini dilakukan untuk melihat seberapa besar konversi enzimatik dari selulosa menjadi gula pereduksi selanjutnya diubah menjadi etanol dari substrat TKKS.

Tujuan lain penambahan glukosa pada awal proses SSF adalah untuk memicu lebih banyak etanol yang terbentuk dari proses SSF ini. Dengan adanya

glukosa pada awal proses SSF diharapkan hasil fermentasi akan lebih maksimum karena *S. cerevisiae* akan berkembang biak menggunakan sumber karbon yang berasal dari glukosa yang ditambahkan. Dengan bertambah banyaknya jumlah *S. cerevisiae* maka akan semakin besar etanol yang akan terbentuk karena hasil sakarifikasi akan langsung digunakan oleh mikroba yang saling berkompetisi untuk mencari makanan.

Akumulasi gula pereduksi yang terbentuk dari proses sakarifikasi dapat menghambat kinerja enzim akibatnya jumlah total gula pereduksi yang dihasilkan akan menjadi lebih kecil. *S. Cerevisiae* yang ada saling berkompetisi untuk mencari makanan menyebabkan inhibisi substrat menjadi berkurang. Hal ini disebabkan gula pereduksi yang dihasilkan oleh proses sakarifikasi langsung akan dikonsumsi oleh *S. cerevisiae*.

#### 4.3.1 Penambahan Glukosa Terhadap Pembentukan Gula Pereduksi

Hasil konversi substrat TKKS menjadi etanol pada konsentrasi enzim 40 FPU dengan variasi konsentrasi glukosa awal disajikan pada tabel dan gambar dibawah ini:

**Tabel 4.2 Konsentrasi Glukosa dalam larutan dari Substrat TKKS pada Konsentrasi Enzim 40 FPU**

Jam ke-	Kontrol	Gula 2%	Gula 4%
0	0	2,00	4,00
12	0,073	0,546	0,546
24	0,159	0,216	0,357
36	0,171	0,245	0,359
48	0,161	0,206	0,330
60	0,143	0,144	0,178
72	0,262	0,145	0,190
84	0,242	0,146	0,219
96	0,247	0,151	0,222

Keterangan: konsentrasi dinyatakan gram/100ml larutan

Konsentrasi gula pereduksi yang tertinggi pada tiap-tiap waktu sampling adalah pada penambahan glukosa awal 4%. Hasil ini dapat menjadi rujukan

seberapa banyak etanol yang dihasilkan oleh *S. cerevisiae* karena konsentrasi gula pereduksi yang tinggi mengindikasikan kinerja mikroba yang tidak optimal. Dengan kata lain mikroba tidak mengkonversi gula pereduksi menjadi etanol.

#### 4.3.2 Pengaruh Penambahan Glukosa Terhadap Perolehan Etanol

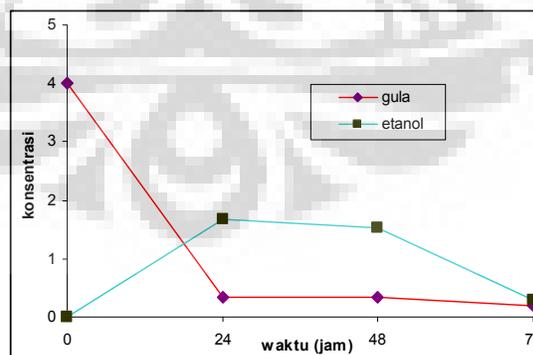
Hasil konversi substrat TKKS menjadi etanol pada konsentrasi enzim 40 FPU dengan variasi konsentrasi glukosa awal disajikan pada tabel dan gambar dibawah ini:

**Tabel 4.3 Konsentrasi Etanol dalam Larutan dari Substrat TKKS Pada Konsentrasi Enzim 40 FPU**

Jam ke-	Kontrol	Gula 2%	Gula 4%
0	0	0	0
24	0,0	1,07	1,67
48	0,0	0,02	1,54
72	0,0	0,11	0,29

Keterangan: konsentrasi dinyatakan dalam % volume

Dari hasil analisa di atas penambahan glukosa terlihat sangat signifikan. Etanol yang dihasilkan jauh lebih tinggi dibanding kontrol. Sehingga konsentrasi glukosa awal yang optimum adalah 4%.



**Gambar 4.5 Konsentrasi Gula pereduksi dan Etanol Enzim 40 FPU, Glukosa 4%**

Dari gambar di atas menunjukkan jika terjadi penurunan konsentrasi glukosa maka akan terjadi peningkatan konsentrasi etanol karena terjadi proses

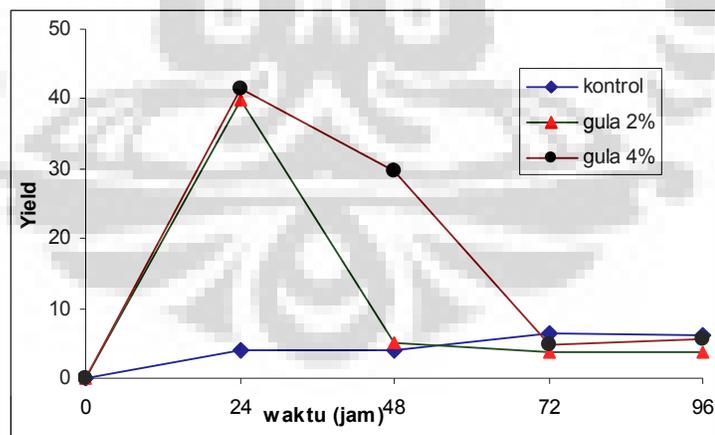
fermentasi oleh ragi. Akan tetapi terjadi penurunan konsentrasi etanol setelah jam ke-48 karena aktivitas ragi yang kekurangan sumber karbon dari glukosa.

#### 4.4 Yield Terhadap Substrat TKKS

TKKS mengandung komponen yang terdiri dari selulosa, hemiselulosa, lignin, dan ekstraktif lainnya seperti mineral. Selulosa dan hemiselulosa merupakan material yang dapat dikonversi enzim selulase menjadi gula pereduksi, selanjutnya diubah menjadi etanol oleh *S. Cerevisiae*. Data yang yield terhadap substrat disajikan pada tabel dan gambar berikut:

**Tabel 4.4 Yield Terhadap Substrat TKKS pada Konsentrasi Enzim 40 FPU**

Jam ke-	Kontrol	Gula 2%	Gula 4%
0	0 %	0 %	0 %
24	3,97 %	39.97 %	41.50 %
48	4,03 %	5,14 %	29.72 %
72	6,54 %	3,62 %	4,75 %
96	6,17 %	3,78 %	5,54 %



**Gambar 4.6 Yield terhadap TKKS selama SSF**

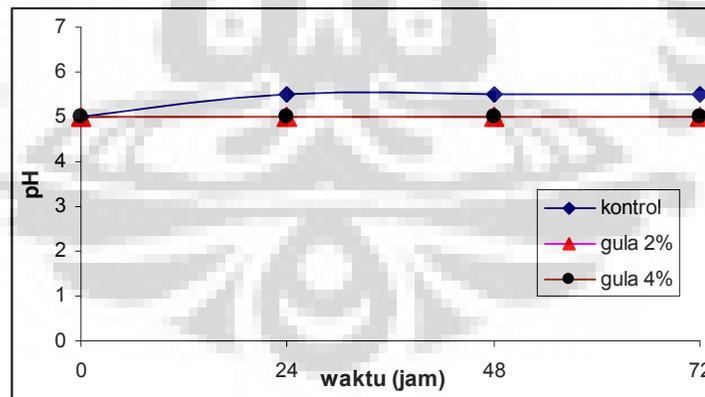
Tabel 4.4 dan Gambar 4.6 menunjukkan konversi yang paling tinggi terjadi pada jam ke-24 pada konsentrasi gula awal yang tertinggi yaitu glukosa dengan konsentrasi 4% dengan yield sebesar 41,50%. Seperti pada

penjelasan sebelumnya yaitu dengan jumlah glukosa yang tinggi pada saat awal proses akan menyebabkan jumlah ragi semakin banyak akibatnya terjadi kompetisi perebutan makanan dalam hal ini adalah sumber karbon. Selanjutnya konsentrasi gula awal 2% mempunyai konversi sebesar 60,46 % dan konversi yang paling kecil adalah kontrol dengan konversi sebesar 6,5 %.

Hasil yang didapatkan dari percobaan ini adalah semakin besar konsentrasi glukosa awal maka semakin banyak etanol yang dihasilkan. Hal ini ditunjukkan oleh Gambar 4.3; Gambar 4.4; dan Gambar 4.6 dengan waktu optimum SSF 24 jam.

#### 4.5 Pengaruh waktu SSF terhadap pH larutan

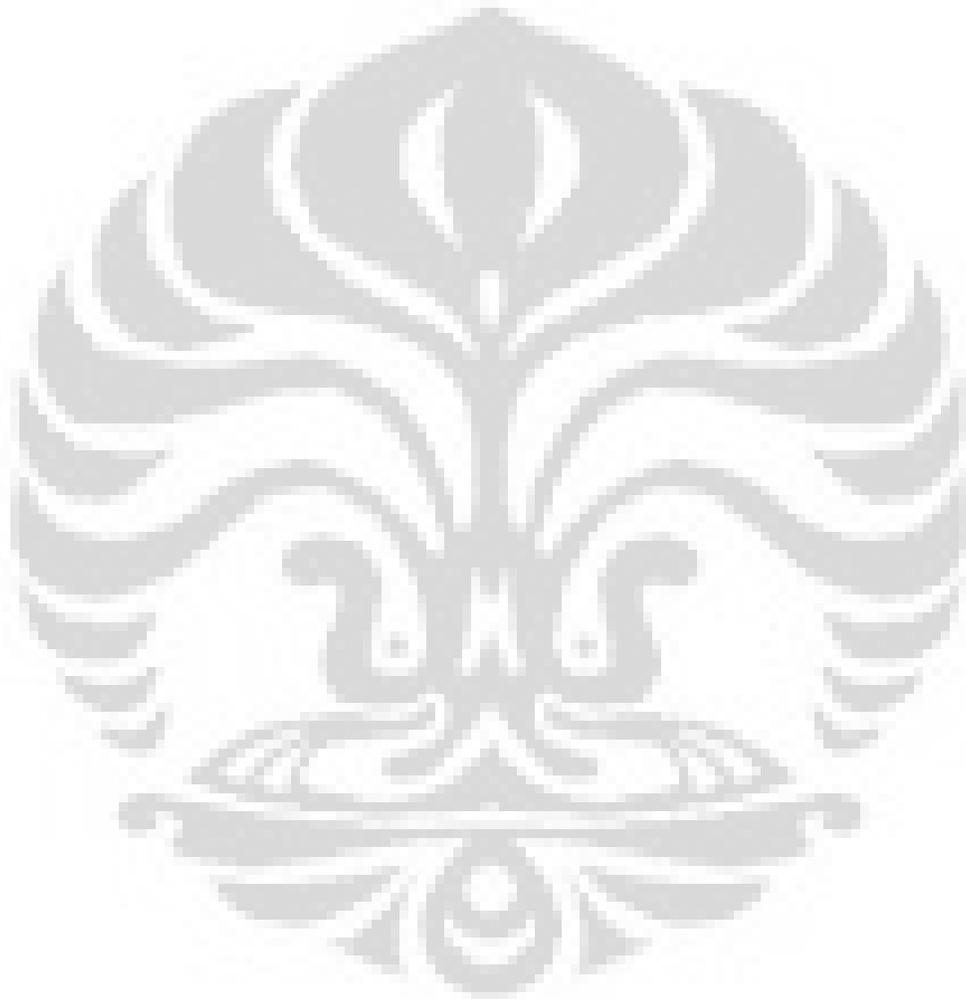
Adanya aktivitas mikroba dan enzimatis akan menyebabkan perubahan pada substrat. Bisa berupa perubahan komposisi baik substrat maupun produk. Perubahan lain yang terjadi adalah perubahan pH larutan karena produk dekomposisi biasanya menghasilkan asam-asam organik jika proses dilakukan melebihi waktu produk yang diinginkan. Gambar berikut perubahan yang terjadi selama proses SSF berlangsung.



Gambar 4.7 pH larutan selama proses SSF konsentrasi enzim 40 FPU

Larutan mempunyai pH awal 5 dari buffer asetat yang ditambahkan. Perubahan pH larutan hanya terjadi pada larutan kontrol. Dimana terjadi perubahan dari pH awal 5 menjadi 5. Sedangkan pada larutan yang ditambahkan glukosa tidak terjadi perubahan pH larutan. Hal ini disebabkan terjadinya

sakarifikasi dan fermentasi dalam jumlah yang kecil sedangkan dalam komponen TKKS terdapat mineral-mineral seperti  $K_2O$ ,  $MgO$  (Ibrahim dkk, 2007) menyebabkan pH larutan menjadi naik. Pada larutan yang ditambahkan glukosa pada awal proses, komponen yang tersakarifikasi dan terfermentasi lebih banyak dan terjadi proses lanjutan dari etanol sehingga menghasilkan asam karboksilat yang akan menetralkan mineral menyebabkan basa sehingga pH larutan tetap 5.



# **BAB V**

## **KESIMPULAN DAN SARAN**

Bab ini menjelaskan tentang kesimpulan dari penelitian yang telah dilakukan dan saran untuk penelitian selanjutnya.

### **5.1 Kesimpulan**

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan maka kesimpulan yang dapat diambil adalah

1. TKKS dapat diolah menjadi produk yang mempunyai nilai jual yang lebih tinggi karena mengandung selulosa yang tinggi.
2. Konsentrasi etanol paling tinggi diperoleh pada jam ke-24 yaitu 1,67% dengan konversi sebesar 41,50 % terhadap substrat TKKS
3. Kondisi optimum proses SSF terhadap substrat TKKS dilakukan selama 24 jam dengan konsentrasi enzim 40 FPU dan penambahan glukosa 4%.
4. Perubahan pH larutan tidak terjadi secara signifikan pada larutan yang ditambahkan glukosa pada awal proses

### **5.2 Saran**

Saran untuk penelitian selanjutnya untuk mendapatkan hasil yang lebih optimum terutama pada proses sakarifikasi sebaiknya dilakukan variasi ukuran partikel substrat TKKS agar penetrasi enzim pada selulosa lebih mudah. Selain itu sebaiknya dilakukan juga variasi kondisi pH larutan pada proses SSF agar enzim bekerja pH yang optimum.

## DAFTAR PUSTAKA

Alfani F., Gallifuoco A., Saporosi A., Spera A., Cantarella M. 2000. Comparison of SHF and SSF processes for bioconversion of steam-exploded wheat straw. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 25, 184 – 192.

Anonim. 2008. lignoselulosa <http://jajo66.wordpress.com/2008/10/15/degradasi-komponen-lignoselulosa/>.

Anonim. 2008. Enzim dan regulasinya. [http://faperta.ugm.ac.id/mikro/irfan\\_dp/fisiologi\\_mikrobia/enzim\\_dan\\_regulasinya.ppt](http://faperta.ugm.ac.id/mikro/irfan_dp/fisiologi_mikrobia/enzim_dan_regulasinya.ppt)

Ayhan Demirbas. 2005. Bioethanol from Cellulosic Materials: a renewable motor fuel from biomass. *energy sources* 27, 327 – 337.

Bailey James E., Olis David F. 1986. *Biochemical Engineering Fundamentals*. McGraw-Hill Book Company. Singapore

Berlin Alex et al. 2006. Inhibition of Cellulase, Xylanase and  $\beta$ -Glicosidase activities by Softwood Lignin Preparations. *Journal of Biotechnology* 125. p: 198 – 209

Fauzi, Yan dkk. 2007. *Kelapa Sawit*. Penebar Swadaya, Jakarta.

Galih KS. 2008. Kajian awal hidrolisis selulosa limbah selulosa pertanian menjadi glukosa menggunakan katalis asam. Skripsi Institut Pertanian Bogor.

Goldemberg Jose. 2007. Ethanol for a Sustainable Energy Future. Vol 315. [www.sciencemag.org](http://www.sciencemag.org)

<http://jajo66.wordpress.com/2008/10/15/degradasi-komponen-lignoselulosa/>.  
Diakses maret 2008

Ibrahim F., N. A., Abu Osman, J. Usman, N. A. Kadri . Bio-composting process development by SSF for utilization agro-industrial wastes. *Biomed 06, IFMBE proceedings* 15, 464 – 468.

Judoamidjojo, M., E. Gumbira sa'id, dan L. Hartoto. 1989. *Biokonversi*. Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi. Pusat antar Universitas Bioteknologi Institut Pertanian Bogor, Bogor.

Marques S., Alves L., Roserio J.C, Girio F.M. 2008. Conversion of recycled paper sludge to ethanol by SHF and SSF using *Pichia stipitis*. *Journal of Biomass and Bioenergy* 32, 400 – 4006.

Nieves, R.A. 1998. Technical Communication: Survey and Analysis of Commercial Cellulase Preparations suitable for Biomass Conversion to Ethanol. World of Journal of Microbiology and Biotechnology 14, 301 – 304.

Per Sassner, Mats Galbe, Guido Zacchi. 2006. Bioethanol production based on simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated *Salix* at high dry-matter content. Enzyme and Microbial Technology 39, 756 – 762.

Piskur J., Rozpedowska E., Polakova S., Merico A., Compagno C. 2006. How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer?. Trends in Genetics Vol. 22 No.4

Ramon-portugal F., Pingaud H., Strehaiano P. 2004. Metabolic transition from ethanol consumption to sugar/ethanol consumption by *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology letters 26, 1671 – 1674.

S. Hari Krishna, R.T. Janardhan, G.V.Chowdary. 2001. simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast. Bioresource Technology 77, 193 – 196.

Samsuri, M *et al.* 2005. Pretreatment for ethanol production from bagasse by simultaneous saccharification and fermentation. Proceeding of the 6<sup>th</sup> international Wood Science symposium, 288 – 294.

Stephanopoulos Gregory. 2007. Challenges in Engineering Microbes for Biofuels Production. Vol 315. [www.sciencemag.org](http://www.sciencemag.org)

Wilkins Mark R., Widmer Wilbur W., Grohmann Karel. 2007. Simultaneous saccharification and fermentation of citrus peel waste by *Saccaromyces cerevisiae* to produce ethanol. Process Biochemistry 42, 1614 – 1619.

Ye Sun, Jiayang Cheng. 2001. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production. Bioresource Technology 83, 1 – 11.

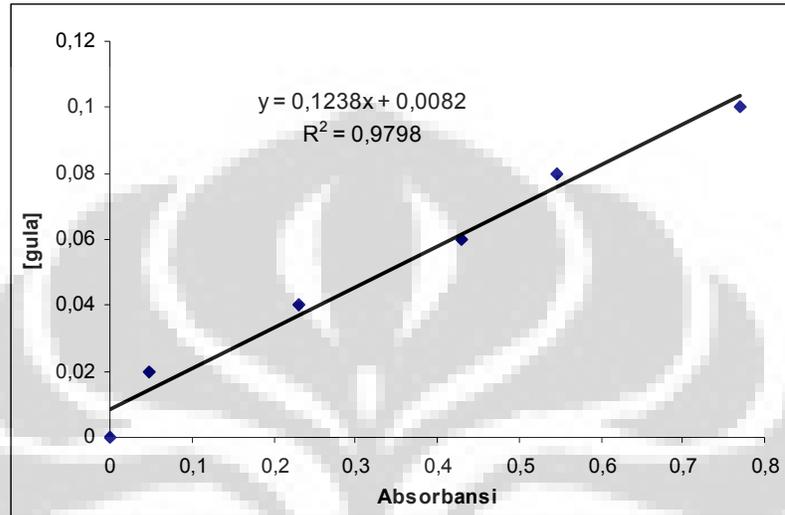
Yu Shen, Yan Zhang, Tao Ma, Xiaming Bao, Fengguang Du, Guoqiang Zhuang, Yinbo Qu. 2008. Simultaneous Saccharification and fermentation of acid-pretreated corncobs with a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing  $\beta$ -glucosidase. Bioresource Technology 99, 5099 – 5103.

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

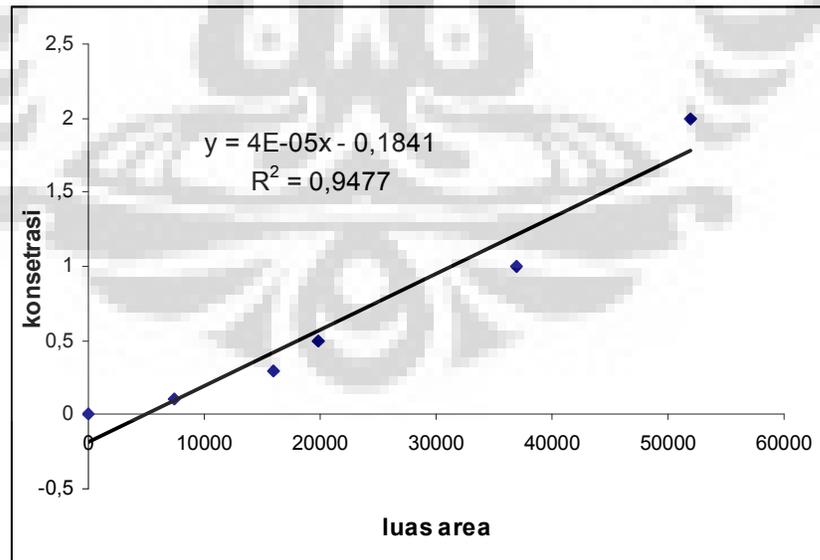
# LAMPIRAN 1

## KALIBRASI GLUKOSA DAN ETANOL

### 1. Kurva kalibrasi konsentrasi gula pereduksi



### 2. Data luas area pengukuran konsentrasi etanol



## LAMPIRAN 2

### DATA PROSES SSF KONSENTRASI ENZIM 20 FPU

#### 1. Data absorbansi pengukuran konsentrasi gula pereduksi

Jam ke-	Control			Gula 2%			Gula 4%		
	Abs	kons	Kons'	abs	kons	Kons'	abs	kons	Kons'
0	0	0	0			2,00			4,00
12	0,062	0,016	0,079	0,225	0,036	0,360	0,475	0,067	0,67
24	0,069	0,033	0,167	0,25	0,039	0,196	0,238	0,038	0,377
36	0,111	0,044	0,219	0,108	0,022	0,108	0,2	0,033	0,165
48	0,113	0,044	0,222	0,12	0,023	0,115	0,225	0,036	0,180
60	0,104	0,042	0,211	0,118	0,023	0,114	0,21	0,034	0,171
72	0,185	0,062	0,311	0,194	0,032	0,161	0,275	0,042	0,211
84	0,158	0,056	0,278	0,21	0,034	0,171	0,29	0,044	0,220
96	0,204	0,067	0,334	0,215	0,035	0,174	0,302	0,046	0,228

Y' adalah konsentrasi gula sebelum diencerkan

#### 2. Data luas area pengukuran konsentrasi etanol

Jam ke-	Control		Gula 2%		Gula 4%	
	Area	Kons %	area	Kons %	area	Kons %
0	0	0	4261	0	3900	0
24	0	0	22120	0,701	23158	0,742
48	0	0	13618	0,361	37597	1,32
96	0	0	11740	0,286	19461	0,594

### LAMPIRAN 3

#### DATA PROSES SSF KONSENTRASI ENZIM 60 FPU

3. Data absorbansi pengukuran konsentrasi gula pereduksi

Jam ke-	Control			Gula 2%			Gula 4%		
	Abs	kons	Kons'	abs	kons	Kons'	abs	kons	Kons'
0	0	0	0	-	-	2,00	-	-	4,00
12	0,062								
24	0.575	0.159	0.159	0.283	0.043	0.216	0.206	0.034	0.337
36	0.625	0.171	0.171	0.329	0.049	0.245	0.224	0.036	0.359
48	0.585	0.161	0.161	0.266	0.041	0.206	0.2	0.033	0.330
60	0.51	0.143	0.143	0.166	0.029	0.144	0.221	0.036	0.178
72	0.99	0.262	0.262	0.168	0.029	0.145	0.241	0.038	0.190
84	0.91	0.242	0.242	0.17	0.029	0.146	0.288	0.044	0.219
96	0.93	0.247	0.247	0.178	0.030	0.151	0.292	0.044	0.222

4. Data luas area pengukuran konsentrasi etanol

Jam ke-	Control		Gula 2%		Gula 4%	
	Area	Kons (%)	area	Kons (%)	area	kons (%)
0	0	0	7330	0.109	10379	0.231
24	0	0	31391	1.072	46826	1.689
48	0	0	5033	0.017	43083	1.539
72	0	0	1402	0	11732	0.285

## LAMPIRAN 4

### Contoh Perhitungan

1. Contoh perhitungan konsentrasi glukosa untuk konsentrasi enzim 20 FPU, konsentrasi glukosa awal 4%, pada jam ke- 24.

Diketahui :

Absorban larutan = 0,238  
Pengenceran = 10 kali

Dari kurva kalibrasi diperoleh

$$Y = 0,1238x + 0,0082$$
$$Y = (0,1238 \times 0,238) + 0,0082$$
$$Y = 0,038$$

Setelah 10 kali pengenceran maka konsentrasi gula

$$Y' = 10 \times 0,038$$
$$Y' = 0,380 \text{ gram}/100 \text{ ml}$$

2. Contoh perhitungan konsentrasi etanol untuk konsentrasi enzim 20 FPU, konsentrasi glukosa awal 4 %, pada jam ke- 24

Diketahui luas area sample adalah 23158  
densitas etanol 0,805 gram/ml

Dari kurva kalibrasi diperoleh

$$Y = 4 \times 10^{-5} x - 0,1841$$
$$Y = 4 \times 10^{-5} (23158) - 0,3532$$
$$Y = 0,742 \text{ ml} \times 0,805 \frac{\text{gram}}{\text{ml}}$$
$$Y = 0,597 \text{ gram}$$

3. Perhitungan yield terhadap substrat TKKS dari perhitungan sebelumnya didapat jumlah etanol 0,742 gram dengan gula awal yang ditambahkan 2 % yaitu 2 gram adanya *S. Cereviseae* dalam campuran mengakibatkan adanya faktor koreksi ( $Y_{x/s}$ ). Nilai untuk *S. Cereviseae* sebesar 0,5

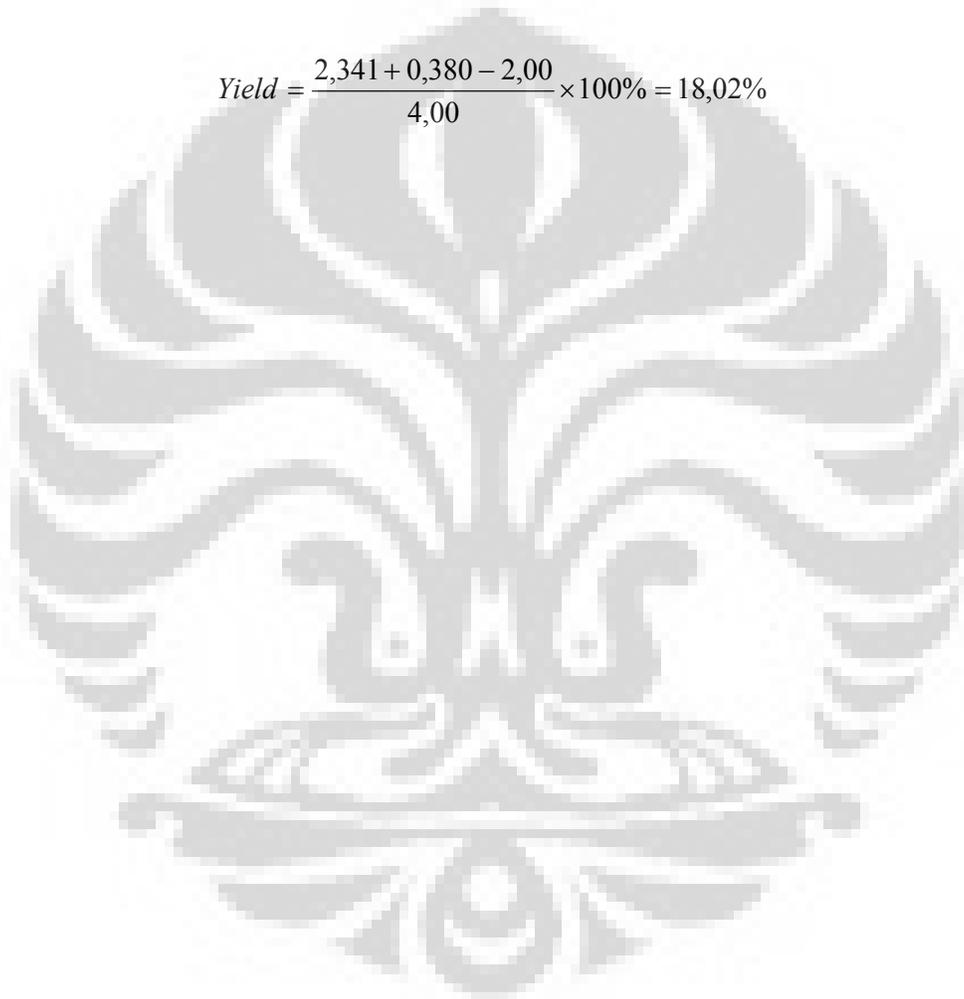
maka konversi untuk etanol dari glukosa adalah

$$Y'' = \frac{\text{massa EtOH}}{(\text{koreksi } Y_{x/s} \times \text{konversi stoikiometris})}$$

$$Y'' = \frac{0,597}{(0,5 \times 0,51)} = 2,341 \text{ gram}$$

$$\text{Yield} = \frac{Y'' + \text{massa gula pereduksi} - \text{glukosa yang ditambah}}{\text{massa substrat}} \times 100\%$$

$$\text{Yield} = \frac{2,341 + 0,380 - 2,00}{4,00} \times 100\% = 18,02\%$$

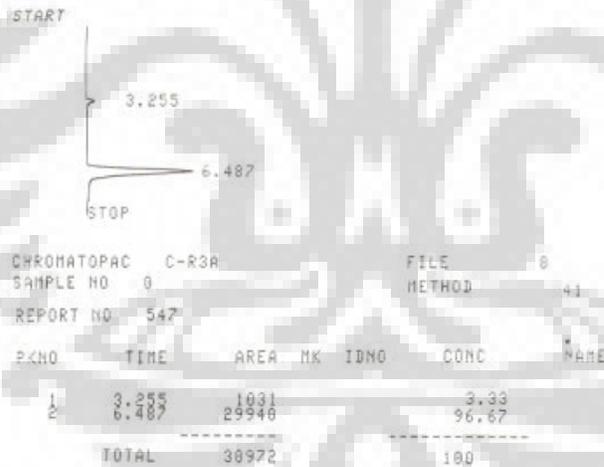


## LAMPIRAN 5 Kromatogram Analisa GC

1. kromatogram jam ke 24, 40 FPU, 4%glukosa



2. kromatogram jam ke 24, 40 FPU, 2% glukosa



3. kromatogram jam ke 24, 20 FPU, 4% glukosa



4. kromatogram jam ke 24, 20 FPU, 2% glukosa



5. kromatogram jam ke 0, 20 FPU, 2% glukosa



6. kromatogram jam ke 0, 20 FPU, 4% glukosa



7. kromatogram jam ke 48, 20 FPU, 4% glukosa



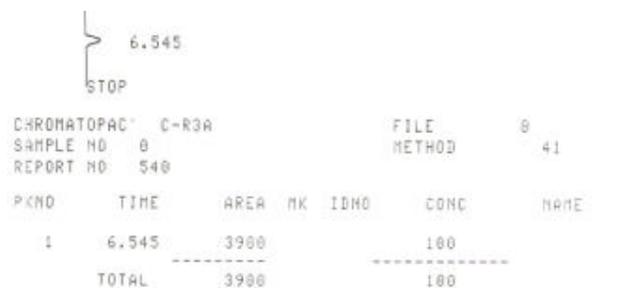
8. kromatogram jam ke 48, 20 FPU, 2% glukosa



9. kromatogram jam ke 24, 40 FPU, 2% glukosa



10. kromatogram jam ke 0, 40 FPU, 4% glukosa



11. kromatogram jam ke 0, 40 FPU, 2% glukosa



12. kromatogram jam ke 0, 40 FPU, 4% glukosa



13. kromatogram jam ke 72, 40 FPU, 4% glukosa



14. kromatogram jam ke 96, 20 FPU, 2% glukosa



15. kromatogram jam ke 48, 40 FPU, 4% glukosa



## LAMPIRAN 6

Gambar Alat Gas Kromatografi GC – 9A



## LAMPIRAN 7

Gambar Alat Spektrofotometer U – 2000



## LAMPIRAN 8

Gambar Alat Rotary Shaker



## LAMPIRAN 9

Gambar Alat Laminar Flow



## LAMPIRAN 10

### Substrat TKKS

#### 1. Inisial TKKS



#### 2. TKKS setelah Perlakuan awal

