

**KONVERSI LIMBAH KERTAS MENJADI
ETANOL DENGAN MENGGUNAKAN ENZIM
SELULASE MELALUI SAKARIFIKASI DAN
FERMENTASI SERENTAK**

SKRIPSI

Oleh

VASKO RUSEIMY

04 04 06 05 94



**DEPARTEMEN TEKNIK KIMIA
FAKULTAS TEKNIK UNIVERSITAS INDONESIA
GENAP 2008/2009**

**KONVERSI LIMBAH KERTAS MENJADI
ETANOL DENGAN MENGGUNAKAN ENZIM
SELULASE MELALUI SAKARIFIKASI DAN
FERMENTASI SERENTAK**

SKRIPSI

Oleh

VASKO RUSEIMY

04 04 06 05 94



**SKRIPSI INI DIAJUKAN UNTUK MELENGKAPI SEBAGIAN
PERSYARATAN MENJADI SARJANA TEKNIK**

**DEPARTEMEN TEKNIK KIMIA
FAKULTAS TEKNIK UNIVERSITAS INDONESIA
GENAP 2008/2009**

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Saya menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi dengan judul :

KONVERSI LIMBAH KERTAS MENJADI ETANOL DENGAN MENGUNAKAN ENZIM SELULASE MELALUI SAKARIFIKASI DAN FERMENTASI SERENTAK

Yang dibuat untuk melengkapi sebagian persyaratan menjadi Sarjana Teknik pada Departemen Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Indonesia, sejauh yang saya ketahui bukan merupakan tiruan atau duplikasi dari skripsi yang sudah dipublikasikan dan atau pernah dipakai untuk mendapatkan gelar kesarjanaan di lingkungan Universitas Indonesia maupun di Perguruan Tinggi atau Instansi manapun, kecuali bagian yang sumber informasinya dicantumkan sebagaimana mestinya.

Depok, 1 Juli, 2008



Vasko Ruseimy

NPM-04 04 06 059 4

PENGESAHAN

Skripsi dengan judul :

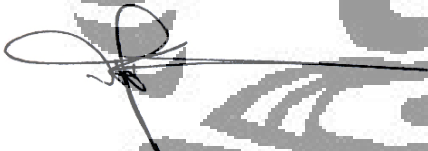
KONVERSI LIMBAH KERTAS MENJADI ETANOL DENGAN MENGUNAKAN ENZIM SELULASE MELALUI SAKARIFIKASI DAN FERMENTASI SERENTAK

Dibuat untuk melengkapi sebagian persyaratan menjadi Sarjana Teknik pada Departemen Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Indonesia. Skripsi ini telah diujikan pada sidang ujian skripsi tanggal 1 Juli 2008 dan dinyatakan memenuhi syarat/sah sebagai skripsi pada Departemen Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Indonesia.

Depok, 2 Juli 2008

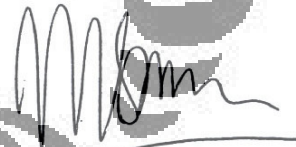
Pembimbing I

Pembimbing II



Dr. Ing. Misri Gozan, M.Tech.

NIP : 132 091 210



Ir. M. Syamsuri, M.T

NIP : 860 000 003

UCAPAN TERIMA KASIH

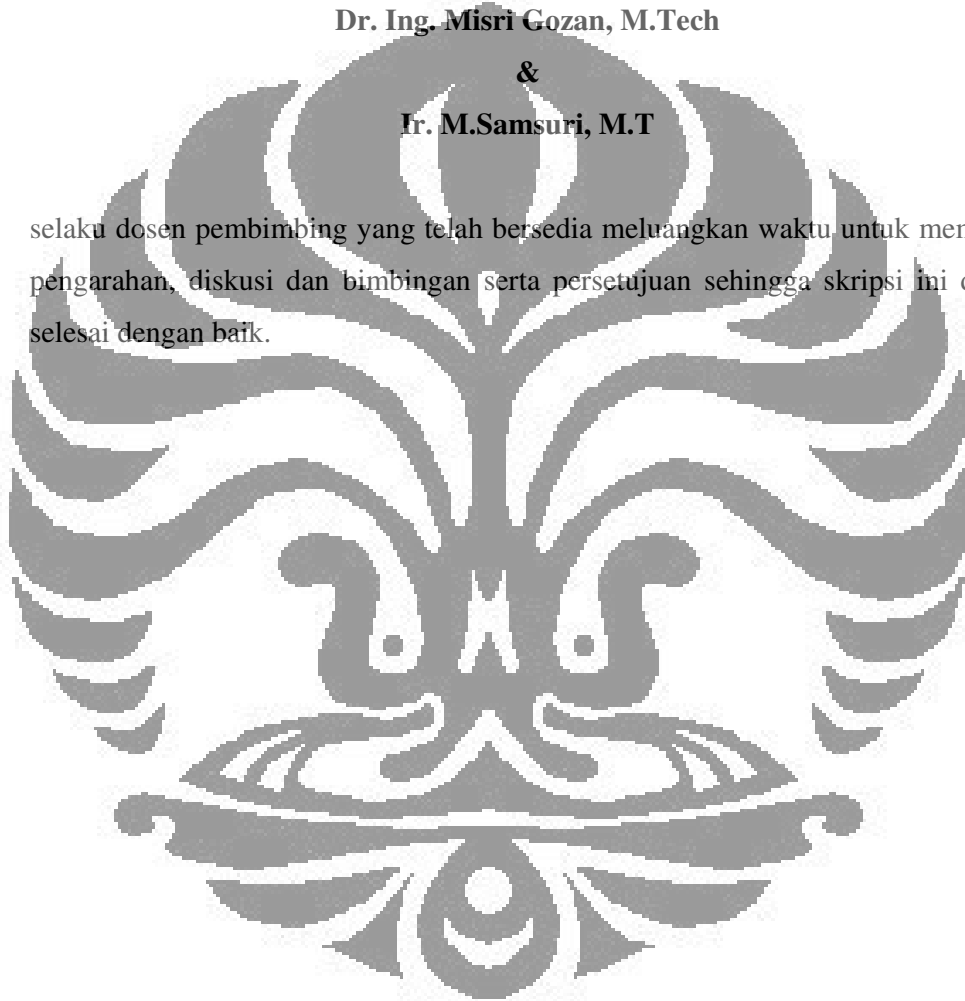
Penulis mengucapkan terima kasih kepada Bapak :

Dr. Ing. Misri Cozan, M.Tech

&

Ir. M.Samsuri, M.T

selaku dosen pembimbing yang telah bersedia meluangkan waktu untuk memberi pengarahan, diskusi dan bimbingan serta persetujuan sehingga skripsi ini dapat selesai dengan baik.



KONVERSI LIMBAH KERTAS MENJADI ETANOL DENGAN MENGGUNAKAN ENZIM SELULASE MELALUI SAKARIFIKASI DAN FERMENTASI SERENTAK

ABSTRAK

Penggunaan bahan bakar fosil oleh manusia menimbulkan ancaman serius, yaitu jaminan ketersediaan bahan bakar fosil untuk beberapa dekade mendatang dan polusi akibat emisi pembakaran bahan bakar fosil ke lingkungan. Kesadaran terhadap ancaman tersebut telah mengintensifkan berbagai riset yang bertujuan menghasilkan sumber-sumber energi alternatif yang berkelanjutan dan lebih ramah lingkungan. Salah satu energi alternatif yang relatif murah ditinjau aspek produksinya dan relatif ramah lingkungan adalah pengembangan bioetanol dari limbah kertas yang banyak mengandung lignoselulosa.

Penelitian pembuatan etanol dari kertas intinya adalah dengan proses Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak (SSF). Enzim selulase dan *yeast Saccharomyces cerevisiae* digunakan untuk hidrolisis dan fermentasi dalam proses SSF tersebut. PH yang digunakan adalah pH 5 karena pada penelitian konversi etanol sebelumnya pH 5 adalah pH optimum. Proses SSF dilakukan dengan waktu inkubasi selama 6, 12, 24, 36, 48, 72, 96 jam. Aktifitas yang digunakan adalah 0,2; 0,3; dan 0,5gr. Sebelum dilakukan proses hidrolisis dan fermentasi perlu adanya proses Pada penelitian ini jenis limbah kertas yang diuji adalah hanya limbah kertas HVS bertinta, HVS kosong dan kertas koran.

Penelitian konversi limbah kertas menjadi etanol dengan menggunakan enzim selulase yang akan dilakukan diharapkan mampu membantu riset-riset selanjutnya dan dikembangkan ke arah komersial untuk mendukung konservasi energi dan penggunaan energi alternatif bioetanol sebagai substitusi minyak bumi yang ketersediaannya mulai terbatas, serta diharapkan limbah-limbah khususnya limbah kertas yang menjadi permasalahan bagi beberapa Negara dapat tertangani dengan baik.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa etanol tidak dapat dihasilkan tanpa enzim selulase. Pada kertas HVS kosong kandungan selulosanya adalah sekitar 60,5 %, pada HVS bertinta kandungan selulosanya adalah sekitar 58,3 %, dan pada kertas koran kandungan selulosanya sekitar 49,1%. Pada kertas HVS bertinta, HVS kosong dan kertas koran diperoleh konsentrasi etanol tertinggi berturut-turut 1238,9 ppm, 669 ppm, 1428 ppm.

Kata Kunci : kertas, SSF, Enzim Selulase, *S.cerevisiae*

Vasko Ruseimy
NPM 040406 0594
Departemen Teknik Kimia

Dosen Pembimbing
I. Dr.Ing. Misri Gozan, M.Tech
II. Ir. M.Samsuri, M.T

THE CONVERSION OF WASTE PAPER TO ETHANOL USING THE CELLULOSE ENZYME THROUGH THE SIMULTANEOUS PROCESS OF SACCHARIFICATION AND FERMENTATION

The use of fossil fuel by humans threatens serious problems for the future such as the availability of fossil fuel for further decades and pollution to the environment by emissions from the burning of fossil fuel. Awareness of these problems has increased the intensity of research to produce an alternative energy resource that is both sustainable and environmentally friendly. One example of a sustainable alternative energy resource that is relatively cheap and environmentally friendly is the development of bio-ethanol from waste paper that contains large amounts of lignocelluloses.

The point of this research deals with the production of ethanol from paper using the simultaneous process of saccharification and fermentation (SSF.) The Cellulose enzyme and *Saccharomyces cerevisiae* were used to hydrolyse and ferment during the SSF process. The pH level used was pH 5 because previous research on ethanol conversion had shown that pH 5 is the optimum level. The SSF process was done with an incubation period of 6, 12, 24, 36, 48, 72, and 96 hours. The activity used was 0.2, 0.3, and 0.5gr. Before the hydrolyse and fermenting processes are done we need another process (???) For this research the type of waste paper tested was HVS paper with ink, blank HVS paper and newspaper.

Research about converting waste paper to ethanol using the cellulose enzyme will hopefully be used to help future research and commercial development to support energy conservation and the use of the alternative bio-ethanol as a substitute for a limited supply of oil. Also we hope that garbage specifically waste paper which has become a problem for so many countries can be handled in a positive way.

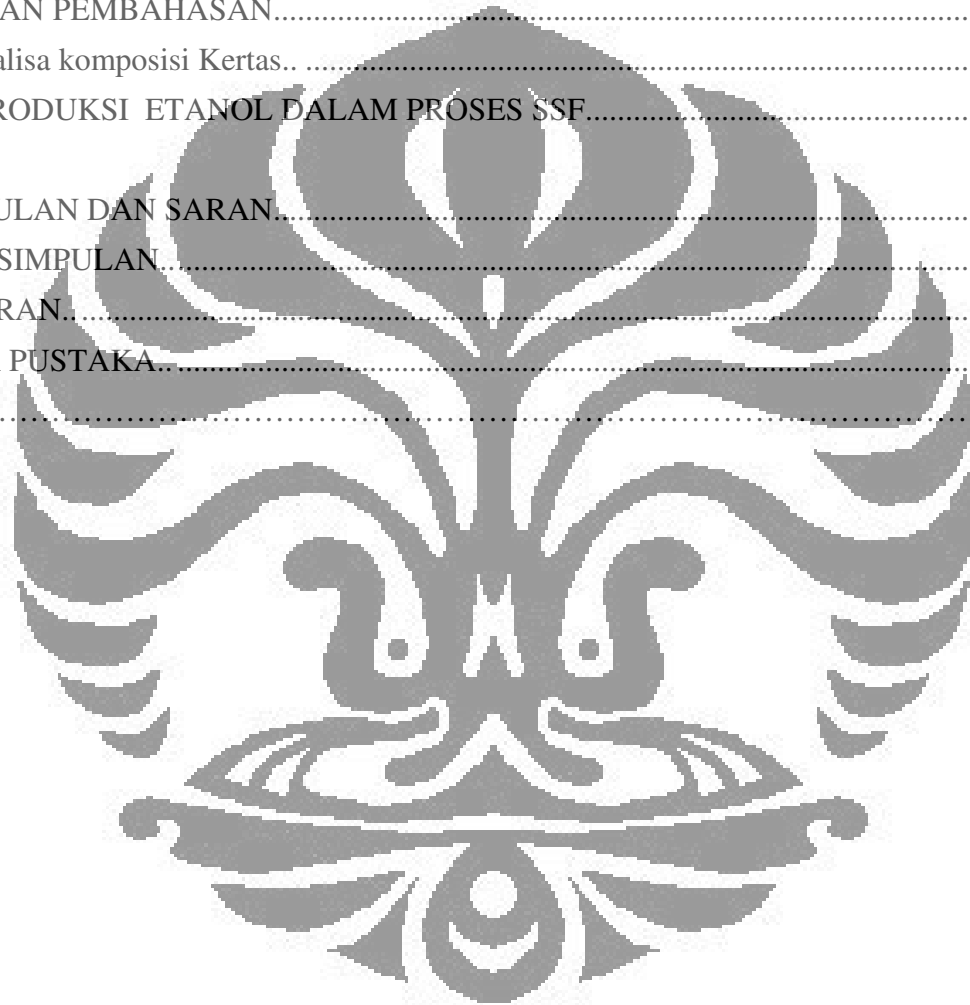
The results of this research show that blank HVS paper's cellulose content is around 60.5%, HVS paper with ink has a cellulose content of 58.3% and with newspapers the content is around 49.1%. In regards to blank HVS paper, HVS paper with ink, and newspaper, the highest ethanol concentration in succession is 1238.9ppm, 669 ppm, and 1428 ppm.

Key words : paper, SSF, cellulase enzyme, *S.cerevisiae*

DAFTAR ISI

| | |
|---|-----|
| PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI..... | ii |
| PENGESAHAN..... | iii |
| UCAPAN TERIMA KASIH..... | iv |
| ABSTRAK..... | v |
| ABSTRACT..... | vi |
| DAFTAR ISI..... | vii |
| DAFTAR GAMBAR..... | ix |
| DAFTAR TABEL..... | x |
| DAFTAR LAMPIRAN..... | x |
| | |
| BAB I | |
| PENDAHULUAN..... | 1 |
| 1.1 LATAR BELAKANG MASALAH..... | 1 |
| 1.2 RUMUSAN MASALAH..... | 3 |
| 1.3 TUJUAN PENELITIAN..... | 3 |
| 1.4 BATASAN MASALAH..... | 4 |
| 1.5 SISTEMATIKA PENULISAN..... | 4 |
| | |
| BAB II | |
| TINJAUAN PUSTAKA..... | 5 |
| 2.1 KERTAS..... | 5 |
| 2.2 REAKSI HIDROLISIS..... | 7 |
| 2.2.1 Hidrolisis Enzimatik..... | 7 |
| Enzim..... | 11 |
| 2.2.2 Hidrolisis Asam..... | 11 |
| 2.3 FERMENTASI..... | 12 |
| 2.4 MATERIAL LIGNOSELULASE..... | 14 |
| 2.4.1 Selulosa..... | 14 |
| 2.4.2 Hemiselulosa..... | 15 |
| 2.4.3 Lignin..... | 16 |
| 2.4.4 Etanol..... | 17 |
| 2.5 SAKARAFIKASI DAN FERMENTASI SERENTAK (SSF)..... | 18 |
| | |
| BAB III | |
| METODE PENELITIAN..... | 21 |
| 3.1 SKEMA PENELITIAN..... | 21 |
| 3.2 PERALATAN DAN BAHAN..... | 22 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2.1 Peralatan..... | 22 |
| 3.2.2 Bahan.. .. | 22 |
| 3.3 PROSEDUR PENELITIAN DAN ANALISIS.. .. | 23 |
| 3.3.1 Prosedur penelitian..... | 23 |
| 3.3.2 variabel pengamatan.. .. | 25 |
| 3.3.3 Analisis.. .. | 25 |
| BAB IV | |
| HASIL DAN PEMBAHASAN..... | 27 |
| 4.1 Analisa komposisi Kertas.. .. | 27 |
| 4.2 PRODUKSI ETANOL DALAM PROSES SSF..... | 29 |
| BAB V | |
| KESIMPULAN DAN SARAN..... | 35 |
| 5.1 KESIMPULAN..... | 35 |
| 5.2 SARAN..... | 35 |
| DAFTAR PUSTAKA..... | 36 |
| Lampiran..... | 41 |



DAFTAR GAMBAR

| | |
|---|----|
| GAMBAR 2. 1 MODE AKSI ENZIM SELULASE DALAM MENGKONVERSI SELULOSA MENJADI GLUKOSA | 9 |
| GAMBAR 2. 2 MEKANISME DEGRADASI DARI SELULOSA.. | 10 |
| GAMBAR 2. 3 STRUKTUR IKATAN SELULOSA..... | 15 |
| GAMBAR 2. 4 STRUKTUR HEMISELULOSA UNTUK HARDWOOD DAN SOFTWOOD.. | 16 |
| GAMBAR 2. 5 STRUKTUR KIMIA ETANOL..... | 17 |
| GAMBAR 2. 6 SKEMA REAKSI DALAM PROSES SIMULTANEOUS SACHARIFICATION AND FERMENTATION (SSF)..... | 19 |
| GAMBAR 3. 1 DIAGRAM ALIR DARI PENELITIAN..... | 21 |
| GAMBAR 3. 2 GRAFIK STANDAR PENENTUAN KONSENTRASI ETANOL.. | 26 |
| GAMBAR 4. 1 GRAFIK PERBANDINGAN KOMPOSISI KANDUNGAN KERTAS..... | 28 |
| GAMBAR 4. 2 GRAFIK PERBANDINGAN WAKTU INKUBASI DENGAN KONSENTRASI ETANOL PADA KERTAS KORAN..... | 31 |
| GAMBAR 4.3 GRAFIK PERBANDINGAN WAKTU INKUBASI DENGAN KONSENTRASI ETANOL PADA KERTAS HVS TINTA..... | 31 |
| GAMBAR 4.4 GRAFIK PERBANDINGAN WAKTU INKUBASI DENGAN KONSENTRASI ETANOL PADA KERTAS HVS KOSONG..... | 32 |
| GAMBAR 4.5 GRAFIK PERBANDINGAN WAKTU INKUBASI DENGAN KONSENTRASI ETANOL PADA KERTAS HVS TINTA DAN KORAN..... | 33 |

DAFTAR TABEL

| | |
|--|----|
| TABEL 1. 1 CAKUPAN PELAYAN PERLIMBAHAN DI INDONESIA TAHUN 2001.. | 1 |
| TABEL 1. 2 KOMPOSISI LIMBAH DI BEBERAPA KOTA BESAR.. | 3 |
| TABEL 3. 1 DATA STANDAR KROMATOGRAFI GAS.. | 26 |
| TABEL 4. 1 DATA KOMPOSISI KANDUNGAN KERTAS.. | 27 |
| TABEL 4. 2 DATA RATA RATA KOMPOSISI KANDUNGAN KERTAS.. | 28 |
| TABEL 4. 3 JENIS KERTAS DAN KONSENTRASI.. | 30 |

DAFTAR LAMPIRAN

| | |
|--|----|
| Lampiran 1 Gambar penelitian.. | 41 |
| Lampiran 2 Contoh Pengolahan (Perhitungan) Data Konsentrasi Etanol.. | 45 |
| Lampiran 3 Keseluruhan data konsentrasi etanol yang diperoleh.. | 47 |



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 LATAR BELAKANG MASALAH

Di sebagian besar negara didunia, limbah merupakan masalah yang besar, khususnya Indonesia. Sebagai contoh, setiap hari tidak kurang dari 6000 ton limbah diproduksi oleh ibu kota Jakarta. Jumlah yang sangat besar ini ternyata tidak diikuti dengan metode pengolahan yang tepat. Untuk Jakarta hanya sekitar 60% limbah, yang dapat ditangani setiap harinya. Merujuk pada tabel 1.1, jumlah itu lebih baik dibandingkan dengan total jumlah limbah dari Sumatera sampai Papua yang hanya 30% tertangani. Dalam 10 tahun terakhir, produksi kertas mengalami peningkatan yang signifikan. Dampak dari peningkatan produksi ini adalah meningkatnya jumlah limbah kertas bekas. Penanganan limbah kertas bekas yang selama ini dilakukan adalah dengan cara penimbunan dan pembakaran. Kedua metode ini memiliki dampak negatif terhadap lingkungan yang cukup besar.

Tabel 1. 1 Cakupan Pelayanan Perlimbahan di Indonesia tahun 2001

(Arianto Wibowo, "Penangan Limbah Perkotaan Terpadu")

| Pulau | Jumlah Kota | Cakupan (%) |
|------------|-------------|-------------|
| Sumatera | 100 | 46 |
| Jawa-Bali | 148 | 28,4 |
| Kalimantan | 45 | 34,4 |
| Sulawesi | 62 | 36,5 |
| Papua | 10 | 67,4 |



Sementara itu, Indonesia juga menghadapi masalah lain yaitu ketersediaan energi. Penggunaan bahan bakar minyak sebagai sumber energi primer menimbulkan beberapa ancaman serius. Ketersediaan minyak Indonesia yang diproyeksikan hanya sekitar 15 tahun lagi membuat bahan bakar migas tidak lagi dapat diandalkan. Harga bahan bakar migas yang fluktuatif dan cenderung naik membuat bahan bakar tersebut semakin jauh dari masyarakat menengah ke bawah. Bahan bakar ini juga menghasilkan polutan seperti CO, NO dan hidrokarbon yang menyebabkan pencemaran udara.

WTE (*waste-to-energy*) merupakan kebijakan negara-negara di dunia untuk mengatasi masalah keterbatasan bahan bakar fosil. Kebijakan ini diterapkan dengan cara mengklasifikasikan limbah untuk selanjutnya diubah menjadi bentuk energi sesuai karakter masing-masing. Energi yang dihasilkan dapat berupa tenaga listrik, bahan bakar cair atau biogas. Peran WTE akan semakin signifikan karena produksi limbah yang semakin meningkat dari tahun ke tahun. Beberapa negara di Eropa telah menerapkan kebijakan konversi limbah menjadi energi. Komposisi limbah Eropa yang dominan adalah 28,5% limbah organik dan 14% kertas. Limbah tersebut menyuplai beberapa pembangkit listrik yang ada di sana. WTE menjadikan limbah tidak lagi sebagai komoditas yang tidak berguna tapi justru sumber energi yang terbarukan. Sebagai perbandingan 12ton limbah dapat membangkitkan listrik sebesar 3,5 MW yang setara dengan 300 kg bahan bakar minyak.

Pada penelitian ini menguraikan proses pengolahan limbah kertas menjadi etanol. Dimana etanol ini adalah bahan bakar yang memiliki potensi yang besar di masa depan sebagai pengganti bensin. Nilai oktan etanol mencapai 102, lebih besar daripada premium dengan nilai oktan 88. Artinya dengan jumlah yang sama etanol memberikan energi yang lebih besar dari premium sehingga lebih hemat. Polusinya pun dapat dikatakan lebih aman karena tidak mengandung pengotor seperti sulfur.

Etanol sendiri dapat dibuat dari glukosa yang dikandung limbah kertas. Merujuk pada tabel 1.2, jumlah limbah kertas yang cukup besar membuat potensi produksi etanol juga besar. Hal ini diharapkan dapat membantu mengatasi solusi masalah limbah dan ketersediaan energi.



Tabel 1. 2 Komposisi Limbah di Beberapa Kota Besar

(www.tempointeraktif.com)

| | Jakarta | Makassar | Surabaya | Medan | Bandung |
|-----------------|---------|----------|----------|-------|---------|
| Makanan | 66,41 | 85,6 | 65,6 | 16,2 | 63,55 |
| Kertas | 10,11 | 4,5 | 13,3 | 17,5 | 10,42 |
| Karton | 3,12 | 0 | 4,9 | 0 | 0 |
| Plastik & Karet | 11,9 | 7,1 | 9,0 | 15,8 | 9,76 |
| Logam | 1,12 | 2,3 | 1,0 | 3,5 | 0,95 |
| Kaca | 1,6 | 0,3 | 1,0 | 2,3 | 1,45 |
| Tekstil | 0,55 | 0 | 1,0 | 0 | 1,7 |

1.2 RUMUSAN MASALAH

Meskipun dari kajian literatur di atas didapatkan bahwa limbah kertas sangat potensial, namun belum banyak ditemukan kajian konversi limbah kertas menjadi etanol. Di samping itu, metode SSF yang selama ini dikembangkan di laboratorium Teknologi Bioproses belum pernah diujikan pada limbah kertas untuk menjadi bioetanol.

1.3 TUJUAN PENELITIAN

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk:

- Menganalisis konversi limbah kertas menjadi etanol dengan enzim selulosa
- Membandingkan beberapa jenis kertas untuk menghasilkan etanol.
- Mengetahui waktu inkubasi optimum.
- Mengetahui aktifitas enzim optimum



1.4 BATASAN MASALAH

Permasalahan pada seminar ini dibatasi pada:

- Pada penelitian ini jenis limbah kertas yang diuji adalah hanya limbah kertas kantor, HVS kosong dan kertas koran.
- Mengingat dugaan bahwa limbah kertas sangat kaya akan selulosa, maka enzim yang digunakan pada tahap penelitian ini hanyalah selulase. Pengkajian manfaat enzim lain dalam konversi limbah kertas menjadi bioetanol tidak dilakukan dalam penelitian ini.
- Beberapa informasi dari hasil penelitian sebelumnya di laboratorium Teknologi Bioproses seperti pH optimum dan metode persiapan medium digunakan dalam penelitian ini tanpa menguji kesesuaiannya.
- Perlakuan awal tidak dilakukan mengingat kandungan lignin dalam kertas cukup kecil.

1.5 SISTEMATIKA PENULISAN

Sistematika penulisan dalam makalah ini adalah sebagai berikut :

Bab I : PENDAHULUAN

Latar belakang masalah, Menjelaskan bahwa dikertas mengandung senyawa selulos, Perumusan masalah, Tujuan penulisan, Batasan masalah dan Sistematika penulisan.

Bab II : TINJAUAN PUSTAKA

Menjelaskan kertas, Proses pembuatan etanol, Hidrolisis, Fermentasi, enzim selulase, Material Lignocelulase , dan SSF.

Bab III : METODE PENELITIAN

Menjelaskan diagram alir penelitian, peralatan dan bahan, prosedur Penelitian



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 KERTAS

Secara sederhana proses pembuatan kertas dimulai dengan menguliti bahan baku kertas, yaitu kayu gelondongan dengan menggunakan mesin debarker. Kemudian kayu tersebut dipotong-potong ke dalam ukuran yang kecil (kurang lebih $\frac{1}{4}$ inchi) di dalam *chipper*. Potongan-potongan kayu tersebut lalu dimasak bersama-sama sodium sulfide, sodium carbonate, dan sodium hidroksida di dalam *digester* untuk mendapatkan pulp atau bubur kertas.

Pulp kemudian dibersihkan dan diputihkan di dalam *bleacher* dan selanjutnya diaduk dengan bahan-bahan aditif seperti bahan pencelup, lem, resin, dan kanji di dalam *beater* untuk menghasilkan *furnish*. Setelah itu *furnish* masuk ke dalam *finishing roll* melalui *Fourdrinier machine* untuk diproses menjadi *continuous sheet of paper*.

Salah satu alternatif untuk mengatasi kelangkaan dan semakin mahalnya bahan baku kertas dari pulp asli (*virgin pulp*), yaitu dengan pemakaian kembali kertas bekas sebagai bahan baku kertas. Untuk memperoleh serat dari kertas bekas biasanya dilakukan melalui proses *deinking* yaitu proses penghilangan tinta dari serat. Proses penghilangan tinta secara konvensional dengan menggunakan bahan kimia akan berdampak terhadap lingkungan karena akan menghasilkan limbah. Dengan adanya kemajuan dibidang bioteknologi, memberikan alternatif baru dalam pengembangan industri pulp dan kertas. Enzim telah digunakan untuk *biopulping*, *biobleaching*, konversi *starch*, *waste water treatment*, *pitch* kontrol, dan banyak lainnya. Penggunaan enzim dalam proses penghilangan tinta menunjukkan kemampuan pengurangan penggunaan bahan kimia dan pengolahan air limbah. Keuntungan pemakaian enzim antara lain *drainage stock* lebih cepat, mempercepat waktu penggilingan, derajat putih yang dihasilkan mendekati/melebihi derajat putih yang diperoleh dengan proses konvensional.



Kertas bekas dapat dikumpulkan dari berbagai sumber antara lain perkantoran, rumah tangga, pembuangan limbah, dan lain-lain. Kertas bekas merupakan salah satu sumber serat yang potensial dan mempunyai prospek ekonomis tinggi. Kertas bekas yang telah mengalami pengolahan merupakan bahan baku serat yang dikenal dengan istilah serat sekunder (*secondary fiber*). Penggunaan serat sekunder berkembang seiring dengan perkembangan teknologi, faktor ekonomis, dan keterbatasan sumber daya alam dalam penyediaan serat primer. Pemakaian serat dari kertas bekas atau serat sekunder untuk pembuatan lembaran kertas mempunyai beberapa keuntungan antara lain meningkatkan stabilitas dimensi, opasitas dan formasi yang lebih baik serta kecenderungan *curl* yang rendah. Sedangkan kerugiannya antara lain derajat putih dan kekuatan relatif lebih rendah, mengandung kontaminan yang beragam dan derajat giling yang tidak seragam, serta seratnya relatif pendek.

Kertas koran merupakan salah satu jenis kertas yang banyak digunakan sebagai media massa cetak yang diterbitkan setiap hari dengan jumlah yang besar dan setelah dibaca biasanya langsung dibuang. Kertas koran mengandung sekitar 80-85 % pulp mekanis dan 15-20 % pulp kimia yang berfungsi untuk meningkatkan kekuatan kertas. Kertas koran dapat dibuat dari berbagai bahan baku diantaranya kertas koran bekas (ONP), campuran kertas bekas (MWP), CPO, campuran pulp dan kertas bekas. Pada kertas koran bekas, kontaminan utamanya adalah tinta cetak yang umumnya terdiri dari pigmen atau butiran tinta yang berperan sebagai pembawa warna berbentuk partikel padatan kecil, *vehicle* atau zat pembawa pigmen berfungsi mengalirkan pigmen tinta pada kertas selama pencetakan sehingga dapat berikatan dengan serat. *Vehicle* umumnya berupa resin, minyak nabati, dan larutan *volatile*.

Proses cetak pada kertas koran umumnya dilakukan secara *offset* atau *letterpress*. Sistem pencetakan pada kertas memakai tinta dengan zat pembawa pigmen tidak mengering tetapi hanya diadsorpsikan pada serat dan dicetak pada kertas yang tidak disalut (*uncoated*). Zat pembawa pigmen tersebut dapat disabunkan dengan alkali untuk melepaskan pigmen sehingga partikel karbon pecah menjadi partikel-partikel halus yang dapat dihilangkan secara efisien dengan proses *deinking* konvensional yakni cara *flotasi* atau *washing*. Dengan perkembangan dalam bidang bioteknologi, *biodeinking* semakin diminati dengan penggunaan enzim selulase dan



hemiselulase untuk menghilangkan kontaminan tinta dari kertas bekas karena lebih ramah lingkungan dan tidak banyak limbah dari penggunaan bahan kimia.

Berdasarkan uraian yang disebutkan sebelumnya maka limbah kertas dapat diubah menjadi etanol. Proses yang harus dilalui limbah kertas adalah hidrolisis kertas menjadi glukosa kemudian difermentasi dengan ragi *Saccharomyces cerevisiae*. 1 kg limbah kertas dapat menghasilkan 4 mL etanol. Maka untuk daerah Jakarta saja limbah kertas dapat menghasilkan sekitar 2400 liter etanol.

2.2 REAKSI HIDROLISIS

Hidrolisis adalah suatu reaksi kimia dimana air bereaksi dengan substansi/zat lain untuk membentuk dua atau lebih senyawa baru. Reaksi ini melibatkan ionisasi air seperti halnya pemisahan komponen hidrolisis (Hawley's Condensed Chemical Dictionary 12th Ed, 1993). Hidrolisis juga dikenal sebagai reaksi kation atau anion atau keduanya dengan air, dimana terjadi perubahan pada derajat keasaman/pH air.

2.2.1 Hidrolisis enzimatik

Hidrolisis selulosa adalah tahapan mengkonversi polimer selulosa menjadi glukosa. Reaksi sederhananya adalah sebagai berikut:



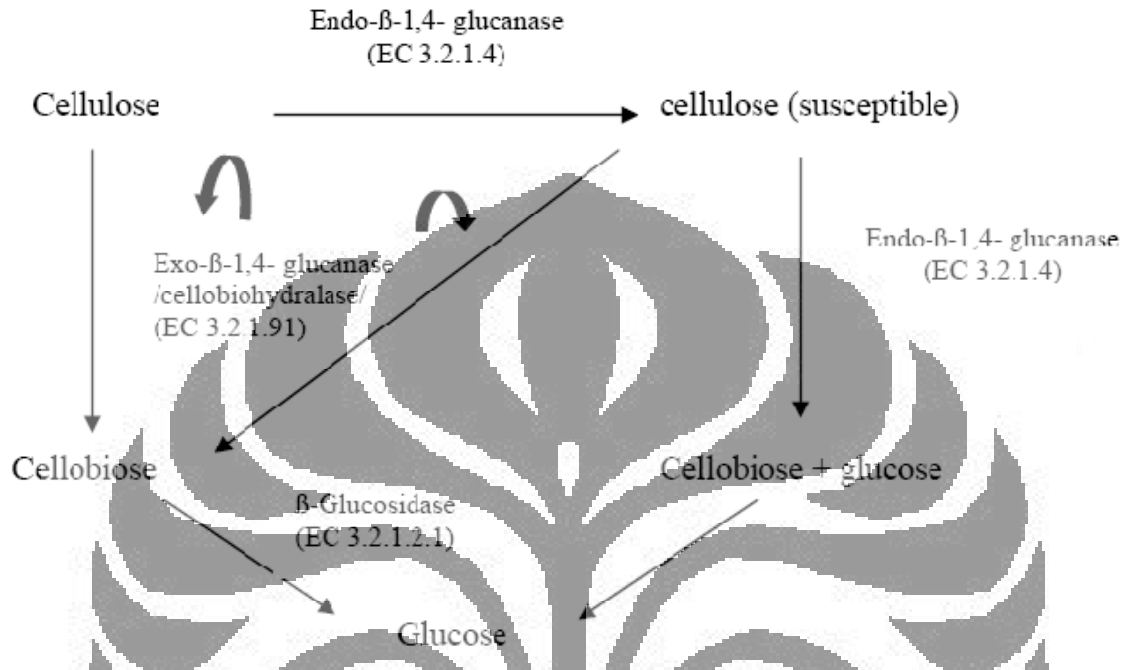
Salah satu mekanisme yang dapat mengkonversi selulosa menjadi glukosa adalah dengan hidrolisis enzim. Enzim yang digunakan adalah enzim selulase. Pada perang dunia II, tepatnya di Pasifik Selatan, sebuah jamur dapat menghancurkan pakaian dan merusak tenda. Jamur tersebut adalah *Trichoderma reesei*, yang pada kenyataannya jamur ini menghasilkan enzim selulase yang dapat menghidrolisis selulosa (US DOE, 2003). Aplikasi pertama dari enzim ini adalah untuk menghidrolisis kayu dalam proses pembuatan etanol yang menggantikan hidrolisis asam. Proses hidrolisis ini cukup menguntungkan, karena kondisi proses yang ringan dan menghasilkan *yield* etanol yang tinggi serta biaya yang cukup rendah dibandingkan dengan hidrolisis asam ataupun alkali. Selain itu, proses ini juga cocok untuk beberapa perlakuan awal.



Enzim adalah katalis biologis atau biokatalis pada reaksi biokimia. Katalis sendiri didefinisikan sebagai suatu bahan atau zat yang meningkatkan kecepatan reaksi kimia dengan menurunkan energi aktivasi. Reaktan dari reaksi yang dikatalis oleh enzim disebut substrat. Berbeda dengan katalis sintetik, enzim meningkatkan laju reaksi pada kondisi biasa atau fisiologis (pH, tekanan dan suhu) dengan selektifitas yang tinggi terhadap reaktan yang dikatalisa dan jenis reaksi, sehingga di dalam suatu sel atau organisme hidup terdapat banyak enzim yang dalam suatu sel atau organisme hidup tersebut terdapat banyak enzim yang masing-masing mempunyai fungsi tersendiri. Sifat selektifitas ini sangat penting dalam menjaga keharmonisan sistem dalam sel hidup. Bagaimana sel memilih substrat yang akan digunakan untuk sintesa atau degradasi biomolekul (misalnya lipid, polisakarida, asam nukleat ataupun protein), seberapa banyak jumlahnya, kapan dan dimana sangat ditentukan oleh enzim yang ada dalam sel tersebut.

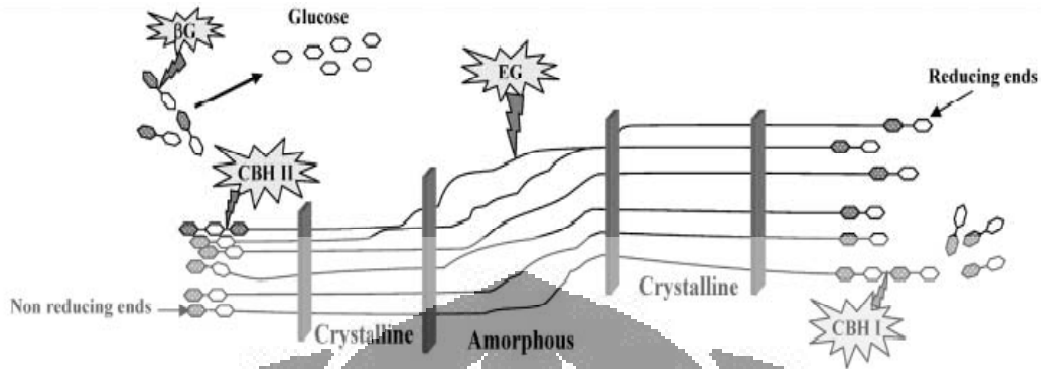
Sistem enzim selulase dapat terbentuk dari sebagian besar mikroorganisme, termasuk diantaranya adalah jamur (*Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Sclerotium*, *Schizophyllum*, *Monilia*, dan lain sebagainya) dan bakteri (*Clostridium*, *Cellulomonas*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Actinomycetes*, dan lain-lain). Diantara mikroorganisme ini, jamur menjadi pusat perhatian dalam menghasilkan enzim selulase. Sistem enzim selulase terdiri dari tiga tipe enzim, yaitu *endo-1,4-glukanase* (EGs, *CMCase* atau C_x selulase), *cellobiohydrolase* atau *exoglucanase* (CBHs, *Avicelase* atau C_1 selulase), dan β -*glucosidase* (selobiase).

Enzim ini terjadi dalam banyak bentuk dari preparasi enzim dan bertindak secara sinergis pada proses sakarifikasi selulosa. Untuk lebih jelasnya, dapat dilihat pada Gambar 2.1. Proses degradasi dari selulosa dimulai dari serangan secara acak oleh endoglukanase pada daerah yang rendah kristalinitasnya dan menciptakan daerah yang bebas pada bagian ujungnya untuk penyerangan oleh selobiohidrolase.



Gambar 2. 1 Mode aksi enzim selulase dalam mengkonversi selulosa menjadi glukosa
(Ryu dan Mandels, 1980)

Selobiohidrolase juga memecah unit selobiosa dari bagian akhir rantai selulosa. Endoglukanase juga dapat menyerang daerah *amorphous* dari selulosa dan menggenerasi oligosakarida. Eksoglukanase dapat menghidrolisis keduanya, yaitu daerah *amorphous* dan kristalin (Teeri, 1997). Mekanisme proses hidrolisis enzim endoglukanase dan eksoglukanase menjadi glukosa dapat dilihat pada Gambar 2.2.



Gambar 2. 2 Mekanisme degradasi dari selulosa

Enzim selobiase merupakan bagian dari sistem enzim selulase, yaitu β -glucosidase. Fungsi enzim ini adalah menghidrolisis selobiosa dan selo-oligosakarida yang dilepaskan menjadi glukosa (Ghani dan Richard, 1990). Komponen enzim selobiosa mempunyai peran yang cukup substansial dalam sakarifikasi selulosa terutama menghilangkan selobiosa. Dimana selobiosa dapat menjadi penghalang proses hidrolisis dari komponen enzim yang lainnya dari reaksi campuran. Selobiosa terdapat pada level yang rendah dari media kultur karena lokalisasi *periplasmic* dan hal ini dihalangi oleh glukosa. Selain itu, enzim selobiase memiliki kerentanan yang cukup tinggi pada inaktivasi termal dibandingkan dengan komponen enzim yang lainnya (Ghani dan Richard, 1990).

Beberapa faktor yang mempengaruhi laju hidrolisis enzim adalah :

a. Ukuran partikel / area permukaan spesifik

Proses sakarifikasi enzimatik tergantung dari kontak enzim dengan substrat. Jika sampel dihaluskan hingga ukuran partikel, maka fraksi dengan partikel kecil akan mempunyai luas area yang lebih tinggi sehingga enzim lebih mudah diadsorp oleh substrat dan meningkatkan proses sakarifikasi.



b. Kristalin selulosa

Daerah kristalin selulosa sangat sulit untuk didegradasi dibandingkan daerah *amorphous* selulosa. Jika kristalin selulosa semakin besar, maka akan mengurangi kemampuan hidrolisis dari enzim.

c. Lignin

Lignin dapat melindungi polimer gula dari proses hidrolisis enzim. Lignin melindungi mikrofibril selulosa sehingga laju hidrolisis menjadi berkurang.

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 termasuk hidrolisis yang akan berlangsung lama apabila tidak menggunakan enzim. Enzim memiliki ukuran yang sangat besar dibanding gugus fungsional targetnya. Beberapa enzim menggunakan tambahan akhiran ase pada nama substratnya. Seperti selulose yang menjadi katalis hidrolisis selulosa. Namun ada juga yang tidak seperti tripsin dan renin.

Enzim memiliki spesifikasi tinggi. Artinya satu enzim hanya dapat menjadi katalis bagi satu reaksi tertentu. Enzim juga memerlukan beberapa tambahan kofaktor atau koenzim untuk mempercepat kinerjanya.

2.2.2 Hidrolisis asam

Hidrolisis menggunakan asam dalam proses SSF adalah salah satu metode hidrolisis dalam memproduksi etanol dari polisakarida. Asam kuat yang biasa digunakan adalah asam sulfat dan asam klorida. Konsentrasi asam dan hidrolisis larutan asam dapat digunakan untuk menghidrolisis polisakarida menjadi monomer-monomer gula yang dapat difermentasikan oleh *yeast*. Penggunaan asam berkonsentrasi rendah pada suhu kamar akan menghasilkan *yield* gula yang cukup tinggi, tetapi membutuhkan volume yang besar selama proses *recovery* dan penggunaan asam kembali. Proses *recovery* asam sulfat sangat kompleks karena titik didih asam sulfat yang tinggi, sedangkan proses *recovery* asam klorida dapat dilakukan dengan distilasi



(Brown, 2003). Penambahan asam kuat dalam proses SSF hanya dibutuhkan dalam jumlah yang sedikit dan proses hidrolisis asam sangat bergantung dengan suhu, dimana penurunan suhu akan menurunkan kemampuan asam dalam menghidrolisis selulosa.

Hidrolisis asam pada selulosa akan menghasilkan pemecahan ikatan glukosidik yang mengandung grup asetal dan hidroksil. Hidrolisis asam pada selulosa bergantung pada konsentrasi H^+ yang dimiliki asam. Hidrolisis asam membutuhkan temperatur yang tinggi dan/atau waktu reaksi yang lebih lama. Penambahan asam kuat dalam proses SSF dapat menaikkan indeks kristalin dari selulosa, dimana indeks kristalin ini akan menghambat kerja enzim dalam menghidrolisis selulosa. Penambahan asam kuat juga dapat mengurangi derajat polimerisasi selulosa. Derajat polimerisasi yang besar dapat mengurangi kerja enzim dalam menghidrolisis selulosa (Carrasco *et al.*, 1994).

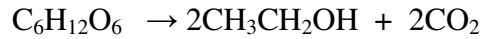
Hidrolisis hemiselulosa menggunakan asam kuat lebih mudah dibandingkan dengan selulosa. Hemiselulosa lebih mudah dihidrolisis pada temperatur tinggi dalam suasana asam dan gula hemiselulosa seperti xilosa, arabinosa, glukosa, mannososa, dan galaktosa akan dilepaskan pada hidrolisis hemiselulosa dalam keadaan asam. Hidrolisis hemiselulosa pada suasana asam akan menghasilkan produk samping, yaitu 5-hidroksimetil-2-furaldehid (HMF) dari gula heksosa dan 2-furaldehid (furfural) dari gula pentosa (Carrasco *et al.*, 1994).

2.3 FERMENTASI

Fermentasi berasal dari kata *fervere* yang artinya mendidih. Pada zaman dahulu para ahli berpendapat bahwa terbentuknya gas dari suatu cairan dianalogikan sebagai air mendidih, oleh karena itu proses tersebut dinamakan fermentasi. Fermentasi adalah salah satu proses terpenting dalam memproduksi etanol. Fermentasi merupakan perubahan kimia dari senyawa organik dalam keadaan aerob atau anaerob melalui kerja enzim yang dihasilkan melalui mikroba. Dalam produksi alkohol, fermentasi adalah proses konversi dari molekul gula menjadi alkohol dan gas karbondioksida (CO_2). Faktor penting yang berperan dalam proses ini adalah enzim yang



berasal dari sel ragi (*yeast*). Meskipun reaksi yang terjadi unruk menghasilkan alkohol dari gula sangatlah kompleks, secara garis besar persamaan reaksinya adalah sebagai berikut:



Produk samping dari reaksi ini yaitu CO_2 akan berubah menjadi gelembung yang langsung dilepaskan ke udara bebas. Sementara alkohol yang dihasilkan tertinggal dalam larutan dan jumlahnya terus meningkat sampai batas tertentu, dimana pada batas tersebut kadar alkohol menyebabkan kematian pada sel ragi sehingga produksi pun terhenti. Secara umum batas kadar alkohol yang dapat ditoleransi oleh ragi bervariasi antara 5 % sampai dengan 21 % tergantung dari jenis (strain) ragi yang digunakan. Faktor yang mempengaruhi proses fermentasi dengan ragi adalah pH, temperatur, komposisi kimia dari medium fermentasi dan konsentrasi dari nutrien medium (Lawford, 1988).

Fase Pertumbuhan ragi:

1. Fase lambat

Pada fase ini massa sel meningkat tapi tidak terjadi pembelahan sel

2. Fase cepat

Pada fase ini terjadi pembelahan sel sel akan tumbuh dan membelah diri secara eksponensial hingga jumlah maksimum. Faktor yang mempengaruhi :

- Kandungan nutrien
- Temperatur
- Kadar oksigen
- Cahaya
- Keberadaan mikroorganisme lain



3. Fase stasioner

Pada fase ini laju pembelahan sel sebanding dengan laju kematian sel, sehingga jumlah sel hidup tetap konstan. Fase ini terjadi akibat pengurangan sumber-sumber nutrisi atau penumpukan zat racun sebagai akhir metabolisme.

4. Fase kematian

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

2.4 MATERIAL LIGNOSELULASE

Material Lignocelulase disini adalah suatu Biomassa yang mengandung senyawa senyawa seperti Lignin, selulosa, Hemiselulosa, dan senyawa abu. Senyawa – senyawa tersebut adalah senyawa yang terkait dalam reaksi pembentukan etanol.

2.4.1 Selulosa

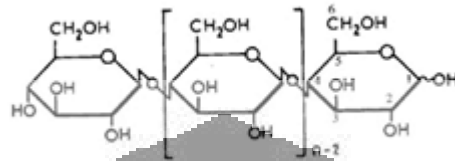
Selulosa merupakan jenis polisakarida yang sering ditemukan di tanaman. Selulosa tidak larut di dalam air. Molekul selulosa merupakan mikro fibril dari glukosa yang terikat satu sama lain. Ikatan antar glukosa ini sangat panjang membentuk rantai polimer. Walaupun terdiri dari banyak glukosa selulosa tidak dapat dicerna manusia. Hal ini disebabkan karena anzim pencernaan manusia tidak dapat memutus ikatan beta pada selulosa. Berbeda dengan manusia, hewan dapat mencerna selulosa karena memiliki enzim pencernaan yang dapat menguraikan ikatan beta tersebut.

Pada selulosa terdapat enam atom karbon yang membentuk cincin yang disebut pyranose. Unit pyranose tersebut dihubungkan oleh molekul oksigen tunggal, oksigen tersebut menghubungkan atom karbon nomor satu dengan atom karbon nomor empat di pyranose selanjutnya.

Hidrolisis sempurna dari selulosa akan menghasilkan monomer glukosa sedangkan hidrolisis tak sempurna akan menghasilkan disakarida yaitu selobiosa. Selobiosa dapat



dihidrolisis kembali menjadi D-glukosa. Proses ini dapat berlangsung dengan bantuan asam atau enzim.



Gambar 2.3 Struktur ikatan selulosa

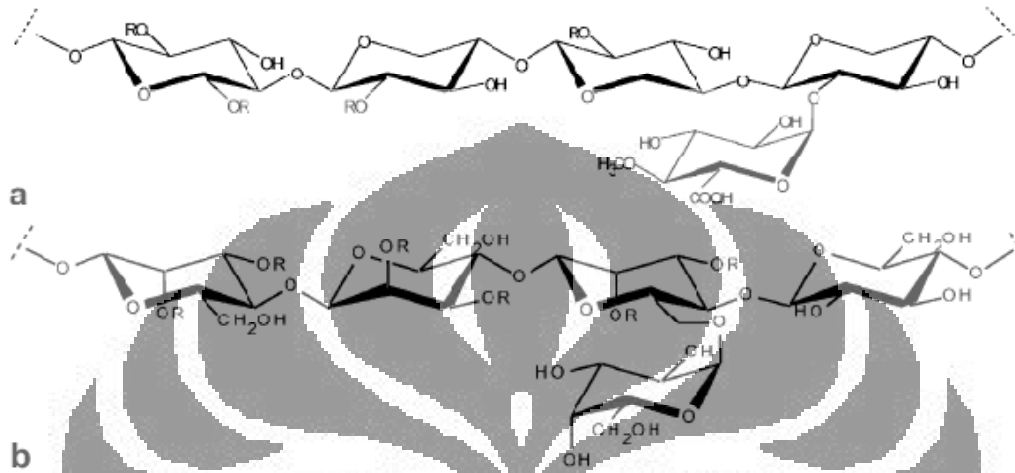
(Sumber: Fesenden, 1997)

2.4.2 Hemiselulosa

Hemiselulosa merupakan rantai cabang dari polisakarida yang mengandung pentosa seperti L-arabinosa dan D-xilosa dan heksosa D-glukosa, D-galaktosa, D-mannosa, 4-O-*methylglucuronic* dan turunan dari asetil. Hemiselulosa tidak membentuk daerah kristalin dan hal ini menyebabkan hemiselulosa menjadi lebih mudah dihidrolisis menjadi gula. Tetapi pentosa sangat sulit difermentasi menjadi etanol (Lynd *et al.*, 1999). Derajat polimerisasi dari hemiselulosa berada pada *range* dari 20 – 300, yakni lebih rendah dari selulosa. Struktur kimia dari hemiselulosa membuatnya sangat hidrofilik sehingga mudah menyerap air. Hal ini juga menjelaskan mengapa hemiselulosa sangat mudah dibedakan dengan selulosa. Hemiselulosa mempunyai ikatan kovalen dengan lignin dan ikatan hidrogen dengan selulosa. Sehingga hemiselulosa bertindak sebagai perekat antara selulosa dengan lignin. *Xylan* adalah karbohidrat utama pada hemiselulosa karena merupakan grup utama yang menyusun rantai polimer hemiselulosa. Untuk mendegradasi *xylan* dibutuhkan kerja sama dari beberapa enzim hidrolitik. Dua enzim yang berperan penting untuk memecah *xylan* menjadi xilosa adalah endo-1,4- β -*xylanase* dan *xylan* 1,4- β -*xylosidase*. Kedua enzim ini membentuk oligosakarida dari pemutusan ikatan *xylan* dan *xylan* oligosakarida akan memproduksi xilosa (Jeffries, 1994). Hemiselulosa pada *hardwood* (angiospermae) adalah *glucuronoxylan* (gambar 2.4A) dan pada *softwood* (gymnospermae) adalah *glucomannan* (gambar 2.4B). Perbedaan utama antara hemiselulosa dan



selulosa adalah bahwa selulosa mempunyai cabang dengan rantai lateral yang pendek dan mengandung gula yang berbeda.



Gambar 2. 4 Struktur Hemiselulosa untuk hardwood dan softwood

Pada material lignoselulosa, secara umum monosakarida dari hemiselulosa yang terbanyak adalah xilosa, termasuk juga pada bagas. Hemiselulosa memiliki karakteristik yang berbeda dengan selulosa karena memiliki ikatan yang lebih kuat dan relatif sulit untuk terhidrolisis menjadi monomernya. Oleh karena itu diperlukan enzim dan *yeast* yang spesifik dalam mengkonversi hemiselulosa menjadi etanol.

2.4.3 Lignin

Lignin adalah bahan yang mempersulit proses hidrolisis selulosa. Kandungan lignin pada kayu sekitar 25-30%. Ligin merupakan jaringan polimer fenolik yang berfungsi merekatkan serat selulosa. Kekuatan jaringan lignin membuat bahan ini sulit ditembus sanyawa lain. Keberadaan lignin membuat reaksi hidrolisis pada selulosa tidak berjanalan maksimal.



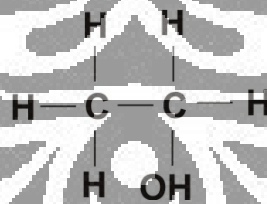
2.4.4 Etanol

Etanol (C_2H_5OH) adalah golongan senyawa alcohol yang memiliki 2 atom karbon. Etanol merupakan salah satu alternatif bahan bakar pengganti bahan bakar minyak yang kian lama kian menipis. Produksi etanol yang pada umumnya dapat dibuat secara sintesis dari minyak bumi



Etanol juga dapat dibuat melalui proses fermentasi biomassa yang tersusun dan karbohidrat atau fraksi glukosa. Material yang umum digunakan sebagai bahan mentah umumnya adalah tanaman yang berkadar glukosa tinggi seperti jagung, singkong atau ubi. Etanol yang diproduksi dari biomassa dan digunakan sebagai campuran bahan bakar lebih dikenal dengan istilah Bioetanol (Kim *et al*, 2003).

Etanol juga langsung dapat dicampurkan dengan bensin pada berbagai komposisi sehingga memberikan peningkatan efisiensi serta memberikan emisi gas buang yang lebih ramah lingkungan. Pencampuran etanol dengan bensin ini sering disebut sebagai gasohol, seperti gasohol BE-10 artinya bahan bakar campuran antara premium 90% volume, dengan bioetanol sebanyak 10%.



Gambar 2. 5 Struktur kimia Etanol

Sumber: Fessenden, Kimia Organik

Etanol juga bersih dari pengotor seperti timbal dan sulfur. Pencampuran etanol pada bahan bakar minyak menyebabkan bertambahnya suplai oksigen ekstra yang akan menurunkan kadar CO. Akibatnya, jumlah CO semakin sedikit sehingga lebih ramah lingkungan.



Di Indonesia, berdasarkan data Departemen Perindustrian dan Perdagangan tahun 2002 menunjukkan bahwa jumlah produksi bioetanol di Indonesia adalah sekitar 180 juta liter dengan derajat kualitas etanol teknis yang berkadar sekitar 95-97%. Sebagian produksi tersebut yakni sekitar 62,5 juta liter diserap untuk kebutuhan dalam negeri, antara lain dipergunakan sebagai bahan industri *Carboxy Methyl Cellulose (CMC)*, Industri pengolahan rumput laut, industri minuman beralkohol, industri cat, industri farmasi, industri kosmetika dan lain-lain. Di negara-negara penghasil etanol terbesar di dunia seperti Brasil dan USA, etanol sudah banyak digunakan sebagai pengganti bahan bakar minyak (*renewable energy resources*), baik sebagai *gasoline* (campuran minyak) atau sebagai murni bahan bakar pengganti minyak

2.5 SAKARAFIKASI DAN FERMENTASI SERENTAK (SSF)

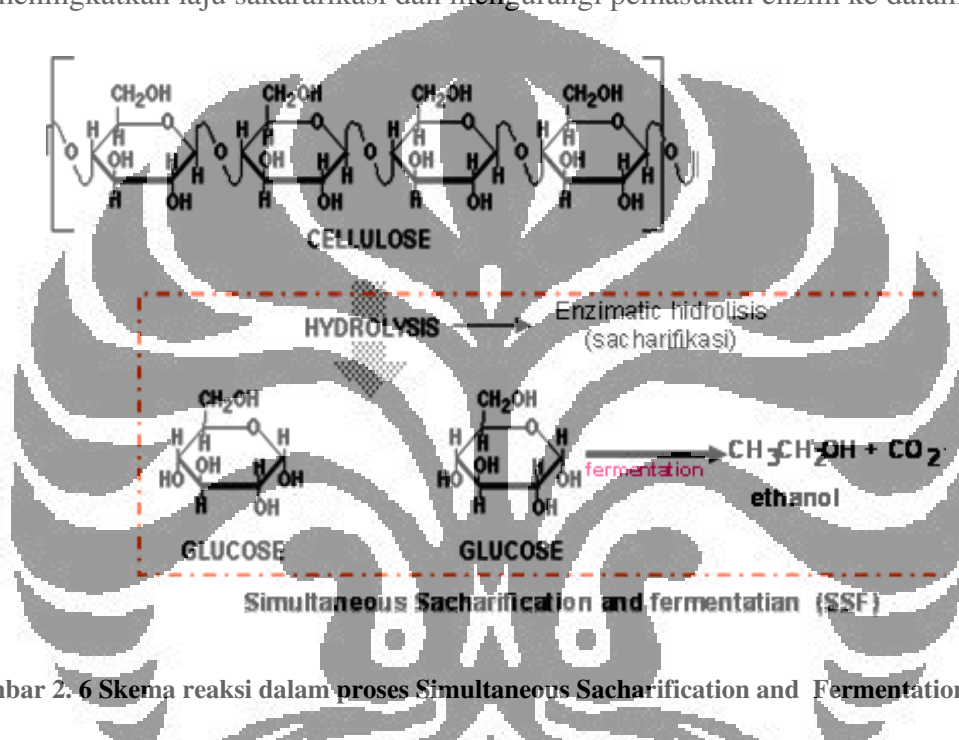
Proses hidrolisis umumnya digunakan pada industri etanol adalah menggunakan hidrolisis dengan asam (*acid hydrolysis*) dengan menggunakan asam sulfat (H_2SO_4) atau dengan menggunakan asam klorida (HCl) (Lee *et al.*, 1997). Proses hidrolisis dapat juga dilakukan dengan menggunakan enzim yang sering disebut dengan *enzymatic hydrolysis* menggunakan enzim jenis selulase atau yang lain. Keuntungan dari hidrolisis dengan enzim dapat mengurangi penggunaan asam sehingga dapat mengurangi efek negatif terhadap lingkungan. Kemudian setelah proses hidrolisis dilakukan fermentasi menggunakan *yeast* seperti *Saccharomyces cerevisiae* atau *P. stipitis* untuk mengkonversi menjadi etanol. Proses hidrolisis dan fermentasi ini akan sangat efisien dan efektif jika dilaksanakan secara berkelanjutan tanpa melalui tenggang waktu yang lama, hal ini yang sering dikenal dengan istilah *Simultaneous Sacharification and Fermentation (SSF)*.

SSF pertama kali dikenalkan oleh Takagi (Takagi *et al.*, 1977) yaitu kombinasi antara hidrolisis menggunakan enzim dengan fermentasi gula menjadi etanol secara simultan. Proses SSF sebenarnya hampir sama dengan dengan proses yang terpisah antara hidrolisis dengan enzim dan proses fermentasi, hanya dalam proses SSF hidrolisis dan fermentasi dilakukan dalam satu



reaktor. Secara singkat reaksi yang terjadi melalui proses *Simultaneous Saccharification and Fermentation* (SSF) dapat dilihat pada gambar 2.6.

Pada proses ini glukosa dilepaskan oleh aksi hidrolisis enzim dalam sakarifikasi yang dipindahkan langsung oleh *yeast* dan efek penghalang glukosa pada enzim dapat dikurangi. Hasil ini dapat meningkatkan laju sakarifikasi dan mengurangi pemasukan enzim ke dalam reaktor.

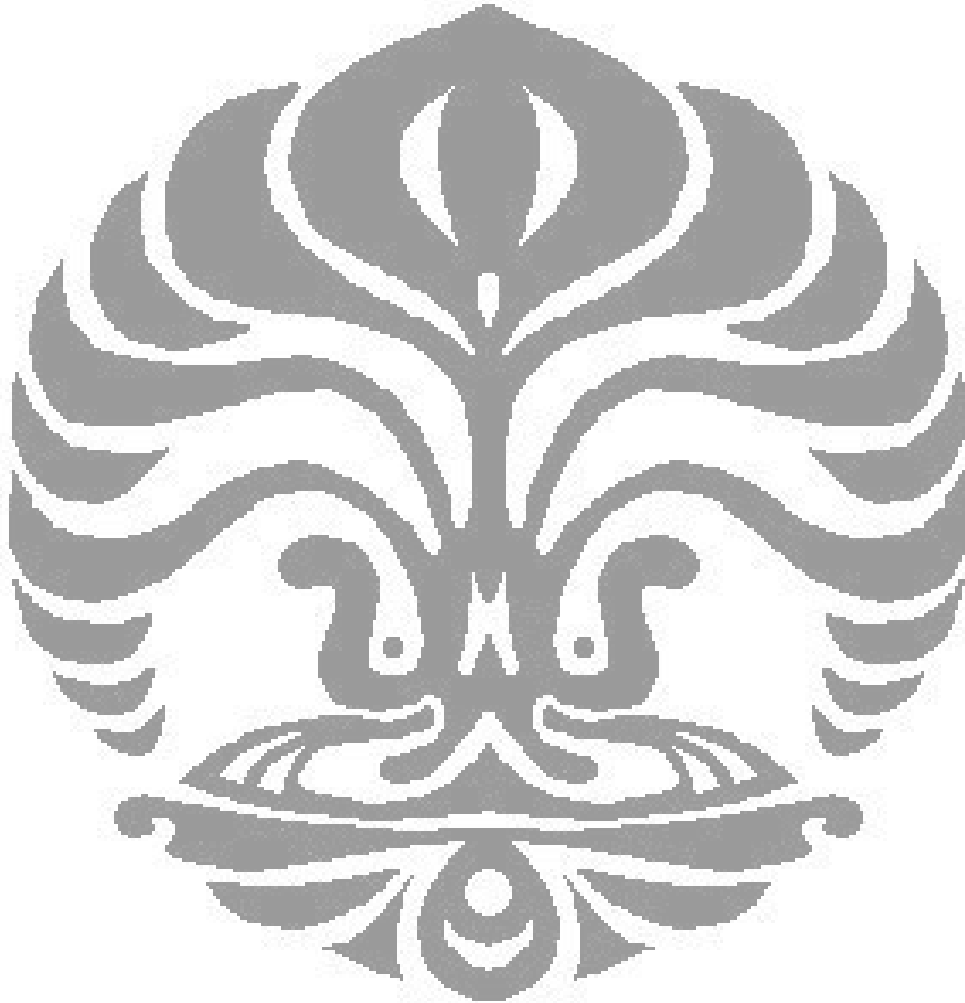


Gambar 2. 6 Skema reaksi dalam proses Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF)

Keuntungan dari proses ini adalah selulosa yang terkonversi menjadi monosakarida tidak kembali menjadi selulosa karena monosakaridanya langsung difermentasi menjadi etanol. Selain itu dengan menggunakan satu reaktor dalam prosesnya akan mengurangi biaya peralatan yang digunakan. pH optimum untuk enzim adalah 4,8 dan untuk *yeast* adalah antara 4-5. Sehingga pada proses SSF pH dijaga antara 4,5-5; dimana pH ini sangat tepat untuk kondisi enzim dan *yeast* (Grohmann, 1993). Temperatur untuk media pertumbuhan *yeast* pada umumnya adalah 30-35⁰C (Maiorella, 1985). Tetapi enzim untuk selulosa temperatur optimalnya adalah 50⁰C. Sehingga temperatur optimum untuk SSF adalah 37⁰-41⁰C. Jika temperaturnya lebih rendah dari 37⁰C, maka laju sakarifikasi berkurang cukup signifikan. Sebagai contohnya, pada temperatur 30⁰C enzim selulase hanya melakukan hidrolisis dengan 50% aktifitas kemampuannya. Jika



temperaturnya lebih tinggi, maka kemampuan *yeast* untuk dapat hidup menjadi berkurang yang mengakibatkan *yield* etanol juga berkurang (Grohmann, 1993).



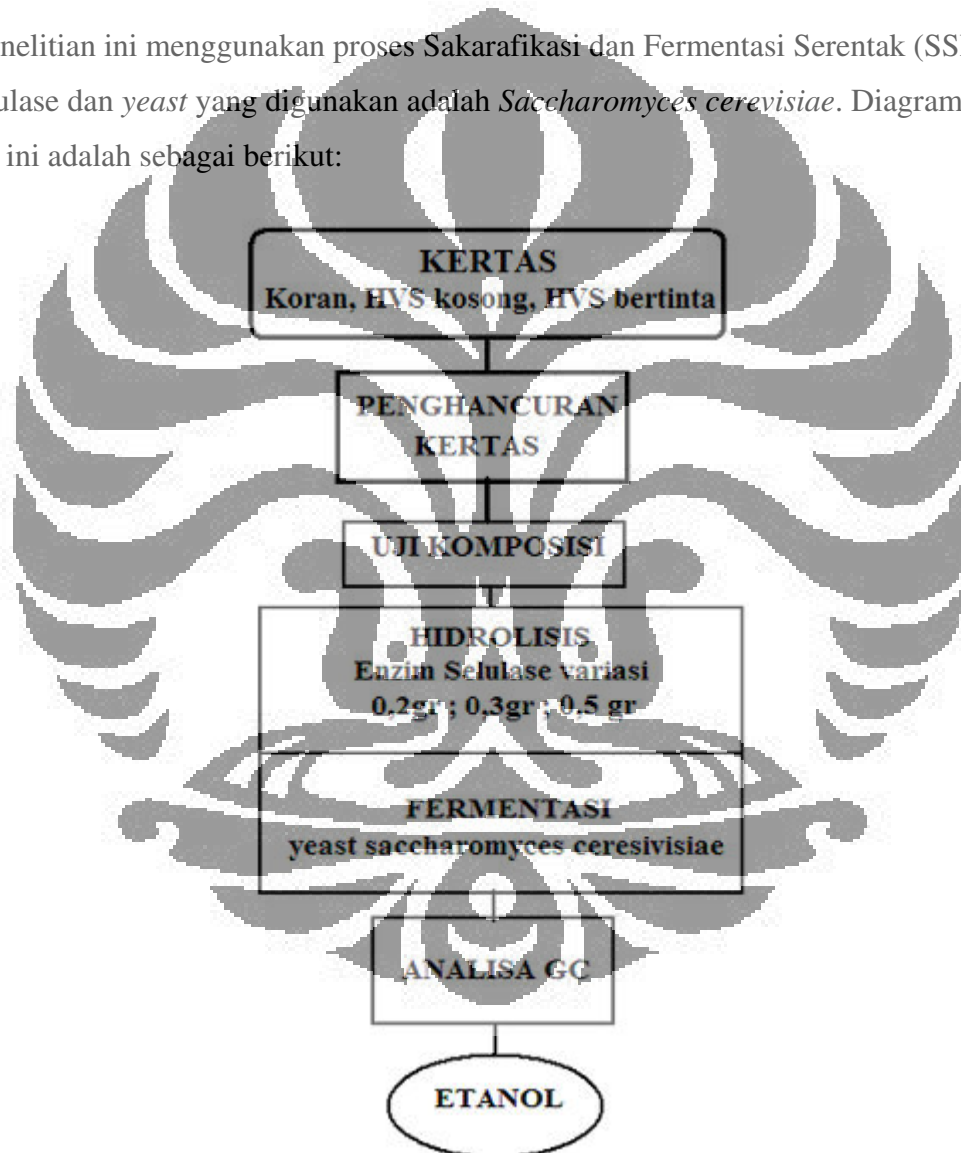


BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 SKEMA PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan proses Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak (SSF) dengan enzim selulase dan *yeast* yang digunakan adalah *Saccharomyces cerevisiae*. Diagram alir penelitian ini adalah sebagai berikut:



Gambar 3. 1 Diagram alir dari penelitian



3.2 PERALATAN DAN BAHAN

3.2.1 Peralatan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- Tabung reaksi
- *Hot plate* Labu Erlenmeyer
- GC dan alat injeksi
- Cawan porselin
- Pipet ukur
- pH meter
- Pipet mikro
- *Autoclave*
- *Shaker*
- Gelas kimia
- *Micro centrifuge tube*
- Timbangan
- *Clean Bench (transfer box)*

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini:

- Kertas koran, HVS kosong, HVS tinta
- Potato Dekstro Agar
- Aquades
- Enzim selulase



- *Sachharomyces cerevisiae*
- Agar
- *Yeast extract*
- KH_2PO_4
- $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- NaOH
- HCl
- *Na-citrate buffer*
- Etanol

3.3 PROSEDUR PENELITIAN DAN ANALISIS

3.3.1 Prosedur penelitian

Prosedur penelitian untuk pembuatan etanol dari kertas dengan hidrolisis enzim melalui proses SSF adalah:

1. Persiapan sampel

Kertas dihaluskan sampai membentuk partikel kecil.

2. Sterilisasi Alat dan Medium

Mensterilisasi alat dan medium sampel yang akan digunakan dalam proses SSF dengan cara dipanaskan dalam *autoclave* selama 15-20 menit. Semua prosedur dilakukan di dalam *transfer box*.



3. Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak (SSF)

Pada proses ini hidrolisis dan fermentasi dilakukan dalam satu reaktor. Proses ini menggunakan enzim selulase dan yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

- Stock pembiakan *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae AM12 di-*preculture* pada *Potato Dextrose Agar* (PDA) 2%, Agar (0,25 g), Aquades (50ml) dan diinkubasi selama 3-4 hari pada suhu kamar, kemudian digunakan sebagai yeast pada proses SSF.

- Persiapan yeast inoculum

Saccharomyces cerevisiae AM12 fresh dari stock pembiakan di-*preculture* pada 300 ml medium (glukosa, 3 g l⁻¹; yeast extract ; 0,3 g l⁻¹; KH₂PO₄, 0,03 g l⁻¹; MgSO₄.7H₂O, 0,03 g l⁻¹; dan (NH₄)₂SO₄, 0,03 g l⁻¹) dalam 100 ml erlenmeyer. sebelum di inokulasi, medium di *autoclave* selama 20 menit, kemudian diinkubasi pada suhu 35⁰C dan 120rpm selama 24 jam menggunakan *shaker*.

- Pengkondisian selama SSF

Medium untuk SSF sebanyak 100 ml terdiri dari sampel kertas (5 g), *nutrients* medium (80 ml), 10 ml Na-*citrate buffer* (pH 5), enzim selulase (0,2 ; 0,3 ; 0,5)gr dan 10 ml yeast inoculum. Sampel, *nutrients* medium dan *buffer* disterilisasi selama 20 menit pada *autoclave*. Namun enzim ditambahkan tanpa sterilisasi. *Nutrients* medium terdiri dari 1,0 g l⁻¹ (NH₄)₂PO₄; 0,05 g l⁻¹ MgSO₄.7H₂O dan 2 g l⁻¹ yeast extract. Kultivasi diambil dan dimasukkan dalam *micro sentrifuge tube*. Cairan bersih dari sampel diambil dengan sampling 6, 12, 24, 36, 48, 72 dan 96 jam dan dilakukan pengujian konsentrasi etanol yang dihasilkan.

Proses ini menggabungkan antara hidrolisis enzim dengan fermentasi yang dilakukan dalam satu reaktor atau *vessel*. Proses ini menggunakan enzim selulase dan yeast *Saccharomyces cerevisiae*.



3.3.2 variabel pengamatan

- Variabel Bebas
 - Kertas koran, HVS tinta, Hvs kosong
 - Konsentrasi enzim 0,2 , 0,3 , 0,5
 - Waktu 6, 12, 24, 36, 48, 72, 96 jam
- Variabel Terikat : Jumlah etanol

3.3.3 Analisis

- Analisis lignin, holoselulosa dan α -selulosa

Lignin dianalisis dengan metode klason lignin yang termodifikasi yaitu dengan menambahkan asam sulfat 72% pada sampel dan diaduk sampai hancur, kemudian di-*autoclave* pada suhu 121°C selama 30 menit. Setelah itu disaring dengan kertas saring, dibungkus dengan aluminium foil dan dikeringkan di dalam oven selama 1 jam serta ditimbang berat akhirnya.

Analisis holoselulosa dan α -selulosa dianalisis dengan metode *wise* yaitu sampel dicampur dengan natrium klorat, asam asetat dan aquades, diinkubasi dengan menggunakan air panas pada suhu 80°C, didinginkan, difiltrasi dengan aquades dan terakhir dibilas dengan aseton. Kemudian bagian padat dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C selama 1-2 malam dan ditimbang beratnya.

- Penentuan Konsentrasi Etanol

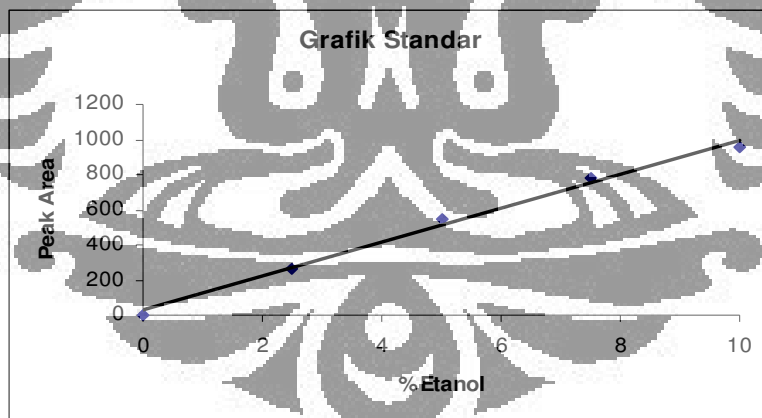
Konsentrasi etanol ditentukan dengan *Gas Chromatography* jenis SUPELCOWAX-10 (Supelco Inc., 0,53 mm i.d., 15 m, 0,5 mm, FID) pada temperature 50°C. Sebelum pengujian, sampel diambil 50 μ l dan ditambah 200 μ l *distilled water* (5 kali pengenceran). Standar yang digunakan dengan konsentrasi 2,5 , 5, 7,5 dan 10 %.



Tabel 3. 1 Data standar kromatografi gas

| Konsentrasi etanol % | Peak Area |
|----------------------|-----------|
| 0 | 0 |
| 2,5 | 268 |
| 5 | 547 |
| 7,5 | 778 |
| 10 | 955 |

Dari data pada tabel di atas, dibuat ke dalam grafik regresi linear sehingga diperoleh persamaan $y = ax + b$. Dimana y adalah *peak area* dan x adalah konsentrasi etanol. Grafik dari tabel di atas adalah sebagai berikut:



Gambar 3. 2 Grafik standar penentuan konsentrasi etanol



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Analisa komposisi Kertas

Sebagian besar kertas tersusun atas polisakarida dan senyawa berbasis fenol terutama selulosa, hemiselulosa, lignin dan senyawa yang mudah larut atau sering dikenal sebagai senyawa abu. Lignin merupakan senyawa yang kompleks, mempunyai berat molekul yang tinggi dan tidak mudah larut, sehingga membuat lignin sulit untuk dibiodegradasi. Tetapi pada sampel kertas yang diuji menggunakan analisa lignin, jumlah kandungan lignin pada kertas tidaklah begitu berarti dan dapat diabaikan. Dari ketiga sampel yang diambil, pada kertas HVS tak bertinta kandungan ligninnya adalah 1,2 % , HVS bertinta kandungan ligninnya 1,3 % dan pada kertas koran kandungan ligninnya 1,6 %. Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada tabel 4.2.

Tabel 4. 1 Data komposisi kandungan kertas

| <i>Kertas HVS tinta</i> | | | <i>Kertas koran</i> | | |
|-------------------------|--------------|----------|---------------------|--------------|----------|
| Lignin | Hemiselulosa | Selulosa | Lignin | Hemiselulosa | Selulosa |
| 1,4 | 30,2 | 58,2 | 1,5 | 31,2 | 48,2 |
| 1,3 | 31,0 | 57,4 | 1,7 | 32,1 | 48,1 |
| 1,2 | 29,5 | 59,3 | 1,6 | 30,2 | 51,1 |

| <i>Kertas HVS</i> | | |
|-------------------|--------------|----------|
| Lignin | Hemiselulosa | Selulosa |
| 1,3 | 30,2 | 60,1 |
| 1,2 | 31,0 | 61,3 |
| 1,0 | 29,5 | 60,1 |

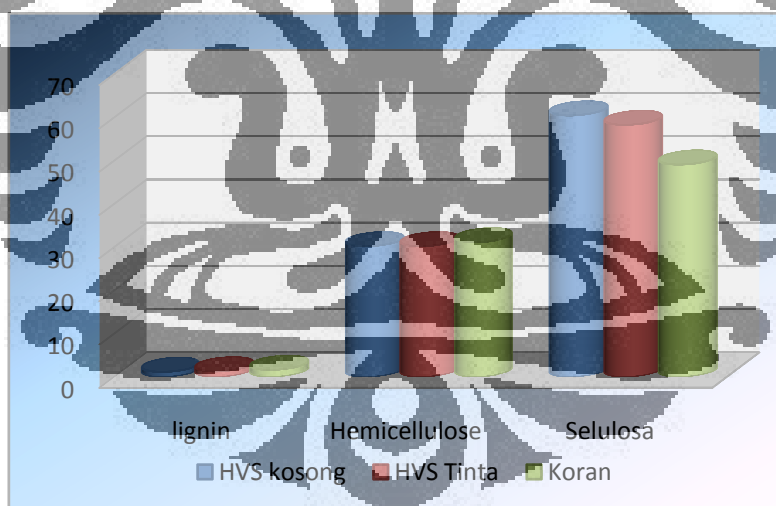
Pada tabel 4.1 Masing-masing sampel kertas yang diuji melalui 3 kali pengujian yang akan diambil rata ratanya untuk mendapatkan keakuratan data yang lebih baik. Dapat dilihat



pada tabel 4.2 kandungan selulosa untuk dikonversikan menjadi monomer-monomer gula berupa glukosa yang dapat difermentasikan untuk menghasilkan etanol pada kertas cukup besar, pada kertas HVS kosong kandungan selulosanya adalah sekitar 60,5 %, pada HVS bertinta kandungan selulosanya adalah sekitar 58,3 %, dan pada kertas koran kandungan selulosanya sekitar 49,1%. Untuk memperjelas pengamatan data dapat dilihat pada tabel 4.2 dibawah ini.

Tabel 4. 2 Data rata rata komposisi kandungan kertas

| Sampel | Lignin | Hemiselulosa | Selulosa |
|------------|--------|--------------|----------|
| HVS kosong | 1,2 | 30,2 | 60,5 |
| HVS Tinta | 1,3 | 30,2 | 58,3 |
| Koran | 1,6 | 31,1 | 49,1 |



Gambar 4. 1 Grafik perbandingan komposisi kandungan kertas



4.2 PRODUKSI ETANOL DALAM PROSES SSF.

Secara umum sintesis bioetanol yang berasal dari biomassa terdiri dari dua tahap utama, yaitu hidrolisis 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). Satu diantara beberapa keuntungan dari proses SSF adalah hidrolisis dan fermentasi dilakukan dalam satu wadah atau reaktor sehingga dapat berlangsung secara efisien. Hidrolisis bertujuan untuk memecah polisakarida menjadi monosakarida sehingga dapat langsung difermentasi oleh yeast. Pada penelitian ini hidrolisis dilakukan secara biologis, yaitu menggunakan enzim. Enzim merupakan protein yang bersifat katalis, sehingga sering disebut biokatalis. Enzim memiliki kemampuan mengaktifkan senyawa lain secara spesifik dan dapat meningkatkan kecepatan reaksi kimia yang akan berlangsung lama apabila tidak menggunakan enzim. Enzim yang digunakan harus sesuai dengan polisakarida yang akan dihidrolisis.

Derajat keasaman atau pH mempunyai pengaruh yang cukup penting dalam proses sakarifikasi dan fermentasi serentak (SSF). Besarnya pH larutan akan mempengaruhi kuantitas etanol yang akan dihasilkan, terutama proses yang memakai hidrolisis enzim. Selain berpengaruh pada proses hidrolisis enzim, pH larutan akan mempengaruhi proses fermentasi glukosa menjadi etanol.

Pada hidrolisis enzim, jika pH terlalu tinggi ataupun terlalu rendah maka enzim akan sulit menghidrolisis selulosa menjadi glukosa. Jika pH pada proses fermentasi terlalu rendah, maka aktifitas yeast akan mengalami penurunan yang cukup signifikan. Jika pH terlalu tinggi, maka laju reaksi yeast dalam mengkonversi glukosa menjadi etanol akan semakin lambat (Grohmann, 1993). pH optimum untuk enzim adalah 4,8 dan untuk yeast adalah antara 4-5. Sehingga pada proses SSF pH dijaga pada pH 5; dimana pH ini sangat tepat untuk kondisi enzim dan yeast (Grohmann, 1993). Selain pH, temperatur dalam proses SSF juga berpengaruh terhadap proses SSF. Temperatur untuk media pertumbuhan yeast pada umumnya adalah 30-35⁰C (Maiorella, 1985). Tetapi enzim untuk selulosa temperatur optimalnya adalah 50⁰C. Sehingga temperatur



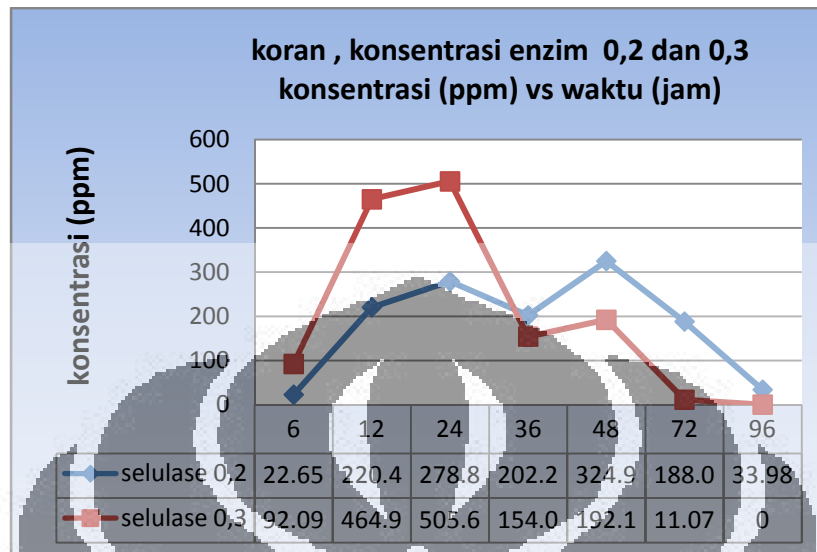
optimum untuk SSF adalah 37-41⁰C. Jika temperaturnya lebih rendah dari 37⁰C, maka laju sakarifikasi berkurang cukup signifikan. Sebagai contohnya, pada temperatur 30⁰C enzim selulase hanya melakukan hidrolisis dengan 50% aktifitas kemampuannya. Jika temperaturnya lebih tinggi, maka kemampuan *yeast* untuk dapat hidup menjadi berkurang yang mengakibatkan *yield* etanol juga berkurang (Grohmann, 1993).

Adapun kendala yang dihadapi dalam penelitian ini salah satunya adalah pemilihan jenis limbah kertas yang digunakan. Dalam penelitian ini digunakan 3 jenis kertas, yaitu kertas HVS kosong, HVS bertinta dan kertas koran. Data yang diperoleh dari hasil analisis GC (kromatografi gas) kemudian diolah, sehingga diperoleh konsentrasi etanol seperti ditunjukkan oleh tabel 4.3 yaitu pengaruh jenis kertas dengan hasil konsentrasi etanol yang didapat.

Tabel 4. 3 Jenis Kertas dan konsentrasi

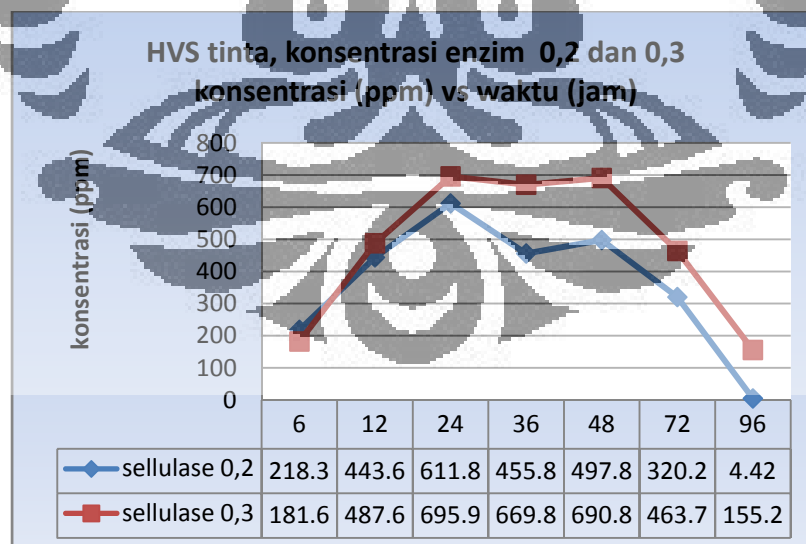
| Selulase 0,2 | | | | Selulase 0,3 | | | |
|--------------|-------------|--------|-----------|--------------|-------------|--------|-----------|
| waktu | Konsentrasi | | | waktu | konsentrasi | | |
| jam | koran | hvs | hvs tinta | jam | koran | hvs | hvs tinta |
| 6 | 22,65 | 83,12 | 218,3 | 6 | 92,09 | 352,53 | 181,66 |
| 12 | 220,41 | 342,76 | 443,69 | 12 | 464,99 | 555,27 | 487,64 |
| 24 | 278,81 | 642,22 | 611,85 | 24 | 505,63 | 568,68 | 695,97 |
| 36 | 202,26 | 669,04 | 455,81 | 36 | 154,06 | 576,67 | 669,89 |
| 48 | 324,9 | 557,2 | 497,85 | 48 | 192,17 | 610,2 | 690,87 |
| 72 | 188,04 | 381,29 | 320,21 | 72 | 11,07 | 398,11 | 463,74 |
| 96 | 33,98 | 6,57 | 4,42 | 96 | 0 | 241,14 | 155,24 |

| Selulase 0,5 | | |
|--------------|---------|-----------|
| Konsentrasi | | |
| waktu | koran | Hvs tinta |
| 6 | 1103,95 | 1045,84 |
| 12 | 890,41 | 1238,89 |
| 24 | 1304,53 | 897,98 |
| 36 | 1428,02 | 710,32 |
| 72 | 1468,8 | 107,01 |



Gambar 4.2 Grafik perbandingan Waktu inkubasi dengan konsentrasi etanol pada kertas koran

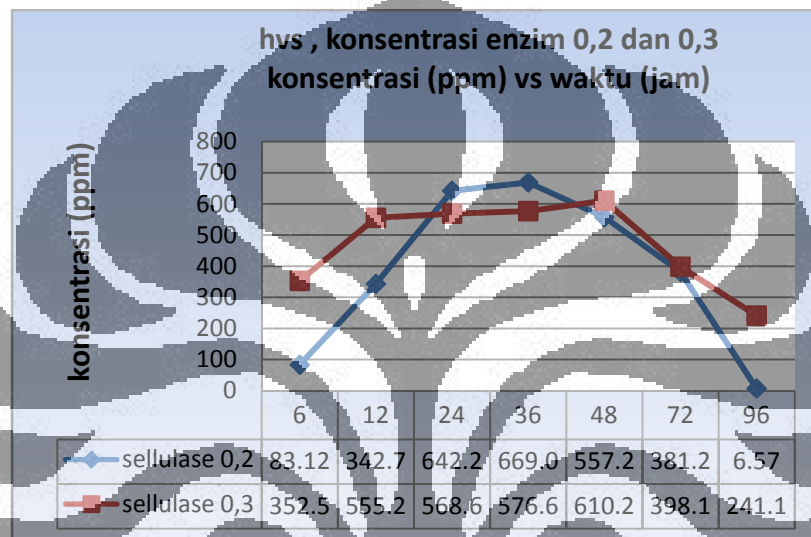
Pada gambar 4.2 grafik menunjukkan hubungan antara lamanya waktu inkubasi dengan konsentrasi etanol pada sampel kertas koran dengan perbandingan aktivitas enzim 0,2 dan 0,3 gr. Hasil etanol yang paling optimum dialami pada aktivitas enzim 0,3 gr yaitu sebesar 505,6 ppm dengan waktu inkubasinya pada jam ke 24.



Gambar 4.3 Grafik perbandingan waktu inkubasi dengan konsentrasi etanol pada kertas HVS tinta



Pada gambar 4.3 grafik yang menunjukkan hubungan antara lamanya waktu inkubasi dengan konsentrasi etanol pada HVS tinta, ditunjukkan bahwa jenis sampel kertas HVS tinta dengan perbandingan aktivitas enzim 0,2 dan 0,3 gr. Hasil etanol yang paling optimum dialami pada aktivitas enzim 0,3 gr yaitu sebesar 695,97 ppm dengan waktu inkubasinya pada jam ke 24.



Gambar 4.4 Grafik perbandingan Waktu inkubasi dengan konsentrasi etanol pada kertas HVS kosong

Pada gambar 4.4 Grafik yang menunjukkan hubungan antara lamanya waktu inkubasi dengan konsentrasi etanol pada HVS kosong, ditunjukkan bahwa jenis sampel kertas HVS kosong dengan perbandingan aktivitas enzim 0,2 dan 0,3 gr. Hasil etanol yang paling optimum dialami pada aktivitas enzim 0,2 gr yaitu sebesar 669,04 ppm dengan waktu inkubasinya pada jam ke 36.

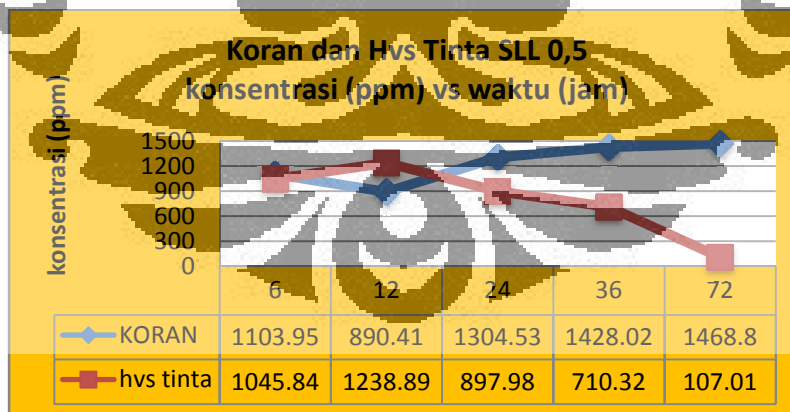
Proses hidrolisis dengan enzim adalah suatu proses hidrolisis yang lebih ramah lingkungan dibandingkan dengan hidrolisis menggunakan asam kuat. Hidrolisis enzim menggunakan enzim selulase mampu menghidrolisis selulosa menjadi glukosa. Berdasarkan metode aksi katalitiknya, sistem enzim selulase terdiri dari tiga tipe enzim, yaitu *endoglucanase* atau *endo-1,4-glukanase* (EGs.), *cellobiohydrolase* atau *exoglucanase* (CBHs.), dan β -*glucosidase* (selobiase, BGL). *Endoglucanase* mampu memotong struktur mikrofibril selulosa



secara acak pada internal *amorphous* rantai selulosa. *Exoglucanases* menguraikan selulosa menjadi monomer (glukosa) atau dimernya (selobiosa). β -*glucosidase* menghidrolisis *cellobiose* yang terlarut menjadi glukosa (Teeri, 1997).

Keefektifan enzim selulase dalam menghidrolisis selulosa dipengaruhi oleh adsorpsi ireversibel enzim ke dalam substrat, inaktivasi termal dan hambatan produk. Enzim selulase mempunyai dua struktur utama, yaitu *Catalytic Domain* (CD) dan *Cellulose Binding Domain* (CBD). Adsorpsi enzim selulase ke permukaan difasilitasi oleh *Cellulose Binding Domain* (CBD). CBD bereaksi dengan mikrofibril selulosa dan melepaskan rantai selulosa dari permukaan melalui mekanisme non-hidrolitik. Penghilangan CBD dapat mengurangi efisiensi hidrolitik dan penambahan CBD dapat menaikkan efisiensi enzim selulase (Mansfield *et al.*, 1999).

Dapat kita lihat dari perbandingan tiga grafik diatas (gambar 4.2 , 4.3 , 4.4) konsentrasi etanol yang terbaik berada pada waktu inkubasi sekitar 24 – 36 jam. Untuk mendapatkan hasil konsentrasi etanol yang lebih baik lagi, dicobakan dengan enzim selulase 0,5 gr karena menurut rujukan dan penelitian-penelitian sebelumnya didapatkan enzim 0,5 gr adalah nilai yang terbaik untuk menghasilkan etanol.



Gambar 4.5 Grafik perbandingan Waktu inkubasi dengan konsentrasi etanol pada kertas HVS tinta dan koran



Pada gambar 4.5 Grafik yang menunjukkan hubungan antara lamanya waktu inkubasi dengan konsentrasi etanol pada HVS tinta, ditunjukkan bahwa jenis sampel kertas HVS tinta dengan perbandingan aktivitas enzim 0,5 gr. Hasil etanol yang paling optimum dialami pada waktu inkubasi jam ke 12 yaitu sebesar 1238,89 ppm. Sedangkan hubungan antara lamanya waktu inkubasi dengan konsentrasi etanol pada kertas koran pada aktifitas enzim 0,5 gr nilai optimumnya adalah pada waktu inkubasi jam ke 72 yaitu 1468,8 ppm.

Nilai kandungan optimum etanol yang didapat dari hasil penelitian ini adalah pada kertas koran yaitu pada waktu inkubasi 72 jam sekitar 2,9 % , kertas koran mempunyai kandungan selulosa yang dapat dikonversikan menjadi etanol sebesar 58,3 %. Pada penelitian ini sudah dapat dibuktikan bahwa etanol yang terkonversi optimum adalah sekitar 5 % dari selulosa yang berada pada kertas koran. Apabila seluruh kandungan selulosa yang terdapat pada kertas bisa seluruhnya dikonversi tanpa adanya hambatan maka akan didapatkan hasil etanol yang cukup besar dan lebih optimal.

Secara umum dalam penelitian ini hasil etanol yang didapat sudah cukup baik, tetapi masih tergolong rendah. Rendahnya hasil ini disebabkan oleh proses SSF tidak berjalan dengan optimal karena penelitian ini suhu yang digunakan untuk proses SSF adalah suhu kamar. Menurut Grohmann, 1993, pada temperatur 30⁰C atau suhu kamar enzim selulase hanya melakukan hidrolisis dengan 50% aktifitas kemampuannya. Selain itu hal hal yang dapat menghambat pembentukan etanol adalah etanol memiliki sifat toksik yang dapat menghambat enzim.



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh dan pembahasannya, maka dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut :

1. Konsentrasi etanol tertinggi adalah 1468,8 ppm pada pH 5, aktifitas enzim 0,5gr dan waktu inkubasi selama 72 jam.
2. Pada penelitian ini sudah dapat dibuktikan bahwa etanol yang terkonversi optimum adalah sekitar 5 % dari selulosa yang berada pada kertas koran.
3. Kertas memiliki kandungan selulosa yang cukup besar, pada kertas HVS kosong kandungan selulosa mencapai 60,5 %.
4. Jenis kertas terbaik dalam penelitian ini adalah kertas koran, selain dari hasil konsentrasi etanol yang didapat limbah kertas koranpun lebih mudah dan murah didapat dibanding dengan kertas HVS.
5. Waktu inkubasi optimum yang paling efektif dalam penelitian ini adalah sekitar 24 – 36 jam.
6. Aktifitas enzim optimum adalah pada 0,5 gr.

5.2 SARAN

Beberapa saran yang dapat diajukan untuk lebih menyempurnakan tulisan ini adalah :

1. Penggunaan enzim selulase hanya mampu menghidrolisis selulosa sedangkan hemiselulosa tidak terhidrolisis. Maka, diperlukan penelitian dengan kombinasi enzim selulase dan xilanase atau kombinasi enzim selulase dengan celubiase dalam menghidrolisis polisakarida menjadi monomer-monomer gula.
2. Proses SSF yang dilakukan dalam penelitian ini menggunakan suhu kamar, dimana proses hidrolisis enzim akan berkurang hingga 50% sehingga perlu dilakukan penelitian dengan menjaga suhu proses SSF pada temperatur antara 37⁰ – 41⁰C.



DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 1990, PT Capricorn Indonesia Consult Inc (CIC) : Kertas dan Pulp, Jakarta.
- Anonim, Kantor Pemasaran Bersama PTPN, www.kpbptpn.com
- Atalla, RH dan Vanderhalt, DL. 1984. *Native Cellulose: A Composite of Two Distinct Crystalline Form*. Science, 223, pp. 283-285.
- Berita Iptek, 12 Juli 2005. <http://www.energi.lipi.go.id>
- Be'guin, P, dan Aubert, JP (1994). *The biological degradation of cellulose*. FEMS Microbiol Rev 13:25-58.
- Blanchette, R.A., Burnes, T.A., Eerdmans, M.M., Akhtar, M., 1992. *Evaluating Isolates Of Phanerochaete Chrysosporium And Ceriporiopsis Subvermitspora For Use In Biological Pulping Process*. Holzforschung 46, 105-115.
- Brunow, G., Karhunen, P., Lundquist, K., Olson, S. dan Stomberg, R., 1995. *Investigation of Lignin Models of the Biphenyl Type by X-Ray Crystallography and NMR Spectroscopy*, J. Chem. Crystallogr. 25, 1-10.
- Brunow, G. (2001). *Methods to reveal the structure of lignin*. In M. Hofrichter dan A. Steinbüchel (eds.), Biopolymers, vol. 1. Wiley-VCH, Weinheim, Germany. p. 89-116.
- Buswell, J.A., Cai, Y.J. dan Chang, S.T. 1995. *Effect of nutrient and manganese on manganese peroxidase and laccase production by Lentinula (Lentinus) edodes*. Microbiol. Let. 128:81-88.



- Carrasco, J.E.; Saiz, M.C.; Navarro., A.; Soriano, P.; Saef, F. dan Martinez, M. (1994) *Effect of dilute acid and steam explosion pretreatments on the cellulose structure and kinetics of cellulosic fraction hydrolysis by dilute acids in lignocellulosic materials*. Applied biochemistry and biotechnology. 45/46, 23-34.
- Costello, R., dan Chum, H. 1998. *Biomass, Bioenergi And Carbon Management*. In "Bioenergi '98: Expanding Bioenergi Partnerships" (D. Wichert, ed.). pp. 11-17.
- Eggert, C., Temp, U., Dean, J.F. dan Eriksson, K.-E. (1996a). *A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase*. FEBS Lett. 391:144-148.
- Fessenden & Fessenden. 1997. *Kimia Organik Jilid 1*: Erlangga
- Fengel, D dan Wegener, G. 1984. *Wood: Chemistry, Ultrastructure And Reaction*. Berlin:Walter de Gruyter & Co. 613 p.
- Ghani, B. A. dan Richard, P.A.D. 1990 *Enzymatic hydrolysis of lignocellulose: 64 contribution of β -glucosidase*. Asean Food J. 5(2): 51-70.
- Gibbs, RD. 1958. *The maule reaction, lignins, and the relationship between woody plant*. In: thimann ky (ed). *The physiology of forest trees*. Ronald Press Comp. New York. Pp 269-312.
- Grohmann, K. 1993. *Simultaneous saccharification and fermentation of cellulosic substrates to ethanol*. Biotechnol. Agric. Ser. 9: 183-209.
- Hatakka, A. (2001) *Biodegradation of lignin*. In M. Hofrichter and A. Steinbüchel (eds.), Biopolymers, vol. 1. Wiley-VCH, Weinheim, Germany. p. 129-180.
- Hofrichter, M. (2002) Review: *Lignin conversion by manganese peroxidase (MnP)*. Enzyme Microb. Technol. 30:454-466.



- Itoh. H., Wada. M., Honda. Y., Kuwahara. M., Watanabe. T., 2003. *Bioorganosolve pretreatments for simultaneous saccharification and fermentation of beech wood by ethanolysis and white rot fungi*. J. Biotechnol. 103, 273-280.
- Jeffries TW (1994). *Biodegradation of lignin and hemicelluloses*, In: Ratledge C (ed.) *Biochemistry of microbial degradation*. Kluwer, Dordrecht, pp 233–277
- Kim. S, Dale. B.E. 2003. *Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues*. Biomass dan Bioeng. 26, 361-375.
- Lawford, H.G. 1988. *A new approach to improving the performance of Zymomonas in continuous ethanol fermentations*. Appl. Biochem. Biotechnol. 17, 203-219.
- Lee, S. S., J. K. Ha, H. S. Kang, T. McAllister, dan K.-J. Cheng. 1997. *Overview of energy metabolism, substrate utilization and fermentation characteristics of ruminal anaerobic fungi*. Korean J. Anim. Nutr. Feedstuffs 21:295–314.
- Lynd, L.R., Bothast, R.J., Wyman, C.E. 1991. *Fuel ethanol from cellulosic biomass*. Science 251: 1318-1323.
- Lynd, L.R., Wyman, C.E., dan Gerngross, T.U. 1999. *Biocommodity engineering*. Biotechnology. Prog. 15:777–793.
- Maiorella, B. L. 1985. *Industrial chemical, biochemical and fuels: Ethanol*. -In: *Comprehensive biotechnology. The principles, applications and regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine*. M.-M. Young (ed.), Pergamon Press Ltd. University of Waterloo, Ontario, Canada, Vol. 3. Chapter 43, 861-914.
- Makanjuola, D. B., Tymon, A. dan Springham, D. G. 1992. *Some effects of lactic acid bacteria on laboratory-scale yeast fermentations*. Enzyme Microb. Technol. 14: 350-357.
- Mansfield SD, Mooney C, Saddler JN (1999) *Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis*. Biotechnology Progress 15: 804-816.



- Mardias, Richi., 2007 *Studi Awal Produksi Bioetanol Dari Bagas Dengan Enzim Selulase* 8-39
- Martín, C., Galbe, M., Nilvebrant, N.O., Jönsson, L.J., 2002. *Comparison of the fermentability of enzymatic hydrolyzates of sugarcane bagas pretreated by steam explosion using different impregnating agents*. *Applied Biochemistry dan Biotechnol.* 99, 699-716.
- Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., Galbe, M., Larsson, M., Stenberg, K., Szengyel, Zs., Tengborg, C. dan Zacchi, G. 1996a. *Design and operation of a bench-scale process development unit for the production of ethanol from lignocellulosics*. *Biores. Technol.* 58: 171-179.
- Ryu, D.D.Y., Mandels, M. 1980. *Cellulases: biosynthesis and applications*. *Enzyme Microb. Technol.* 2: 91-102.
- Samsuri, M., Hermiati, E., Prasetya, B., Honda, Y., Watanabe, T., 2005 *Effects of fungal treatment on ethanol production from bagas using Simultaneous Sacharification and Fermentation*. *Preceeding of fifth international wood science seminar, 29-31 Agustus 2005*.
- Stone, J. E., dan A. M. Scallan. 1968. *A structural model for the cell wall of water-swollen wood pulp fibres based on their accessibility to macromolecules*. *Cellulose Chem. Technol.* 3:343-358.
- Sun, Y., Cheng, J. 2002. *Hydrolysis of lignocellulosic materials for etanol production: review*. *Biores. Technol* 83, 1-11.
- Takagi, M., Abe, S., Suzuki, S., Emert, G.H., Yata, N. 1977. *A method for production of etanol directly from cellulose using cellulose and yeast*. *Proceedings of Bioconversion symposium, Delhi, 551-571*.



Teeri, T. T. 1997. *Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases*. *Focus* 15, 160-167.

The Columbia Electronic Encyclopedia, 6th ed. 2006. Columbia University Press. (<http://www.factmonster.com/encyclopedia/ethanol/properties>, diakses pada 17 Mei 2006).

Tuia, Davis .,2005, *How green is WTE?*, Waste Mangement World, Maret 2005.

US DOE. 2003. *Advanced bioethanol technology*. Website: www.ott.doe.gov/biofuels/, US Department of Energy, Office of Energy Efficiency and Renewable Energy, Office of Transportation Technologies, Washington DC, USA.

Vinzant, T. B.; Ponfick, L.; Nagle, N. J.; Ehrman, C. J.; Reynolds, J. B.; Himmel, M. 1994. *SSF comparison of selected woods from southern sawmills*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 45-46, 611-626.

Wibawa, Susanto. 2001 *Indonesia Tidak Lagi Negara Minyak*, Jawa Pos, 20 Juli.

Wooley,R., Ruth,M., Sheehan, J., Ibsen, K., Majdeski,H., dan Galvez,A. 1999b. *Lignocellulosic and biomass to ethanol – Process design and economics utilizing co-current dilute acid prehydrolysis and enzymatic hydrolysis-current and futuristic scenarios*. National Renewable Energi Laboratory, Golden Colorade USA, 72 pp ± annexes.



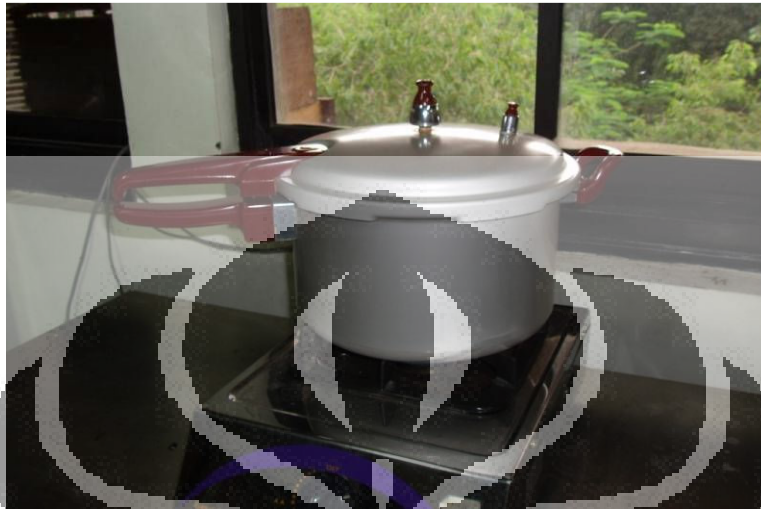
LAMPIRAN

Lampiran 1

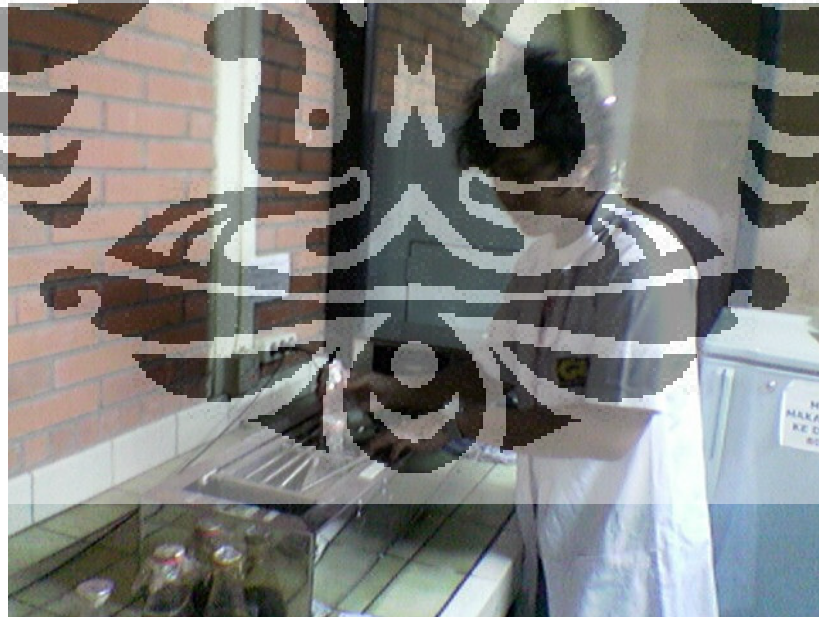
Gambar Penelitian



enzim selulase



Autoclave (Panci Presto)



Shaker



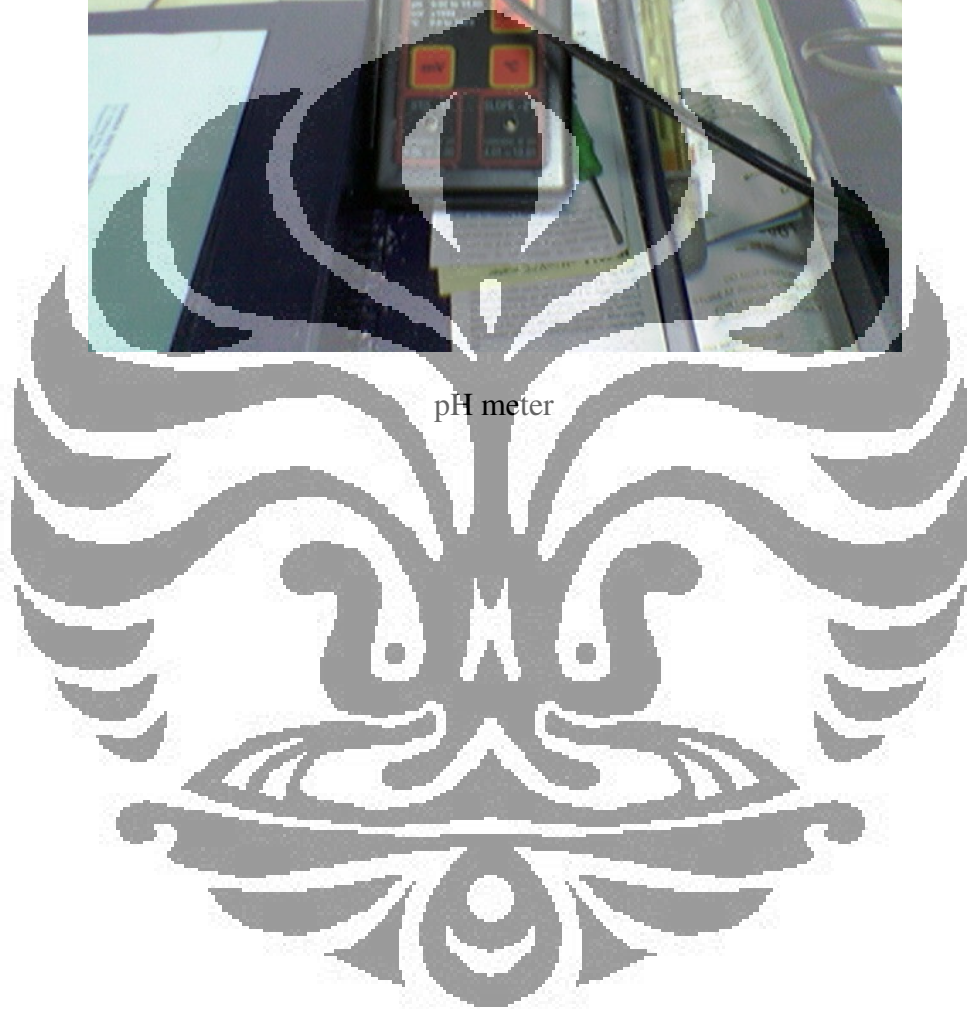
Proses Sakarifikasi dan fermentasi Serentak (SSF)



Transfer box



pH meter

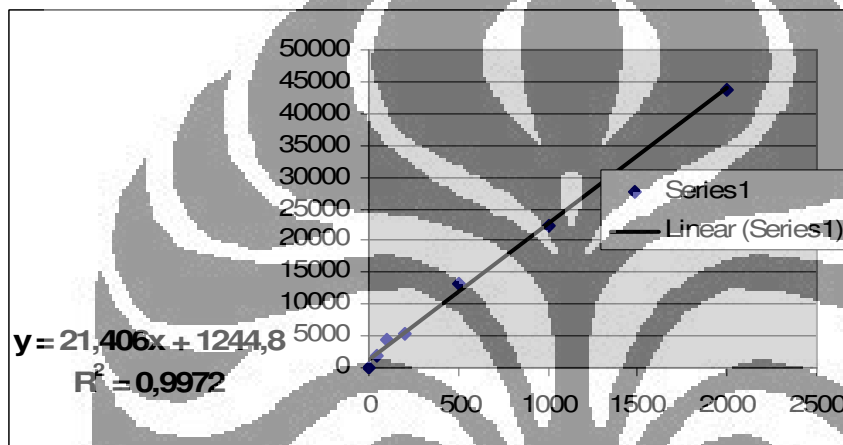




Lampiran 2

CONTOH PENGOLAHAN (PERHITUNGAN) DATA KONSENTRASI ETANOL

1. Setelah dilakukan kalibrasi terhadap beberapa konsentrasi etanol, maka diperoleh kurva kalibrasi dengan persamaan garis sebagai berikut :



$$y = 21,406x + 1244,8$$

dimana :

y = luas peak

x = % volume etanol

2. Kemudian dilakukan penginjeksian sample dan diperoleh data luas peak. Data tersebut disubsitusikan ke dalam persamaan di atas maka didapatkan % volume dari sample.

Contoh : data luas peak = y = 24876

$$24876 = 21,406 x + 1244,8 \text{ maka } x = \frac{(24876 - 1244,8)}{21,406} = 1103,95 \text{ ppm}$$



3. Dari hasil pengujian analisa lignin dengan menggunakan analisa *wise* ,terdapat beberapa kandungan di dalamnya :

| Jenis Kertas | Lignin | Hemilulosa | Selulosa | Residu |
|--------------|--------|------------|----------|--------|
| Koran | 1,66 | 31,19 | 49,14 | 8,01 |
| HVS tinta | 1,33 | 30,26 | 58,33 | 10,08 |
| HVS kosong | 1,21 | 30,26 | 60,51667 | 18,01 |

perhitungan kadar etanol dalam kertas HVS tinta:
dari sampel telah diketahui volume 100ml , dengan kandungan tertinggi sebesar 1468,8 ppm

jadi kadar etanol dalam 5 gr kertas HVS tinta :

$$1468,8 \text{ ppm} \times 100 \text{ ml} \times 10^{-3} = 146,88 \text{ mg etanol}$$

Maka :

$$\frac{0,14688 \text{ gr}}{5 \text{ gr}} \times 100\% = 2,94 \%$$

maka kadar etanol dalam selulosa (sampel kertas koran) yaitu :

$$m = \frac{2,94}{49,1} \times 100\% \\ = 5,9 \%$$



Lampiran 3

KESELURUHAN DATA KONSENTRASI ETANOL YANG DIPEROLEH :

Penggunaan Enzim Selulase

Jenis kertas dan konsentrasi

| Selulase 0,2 | | | | Selulase 0,3 | | | |
|--------------|--------|-------------|-----------|--------------|--------|-------------|-----------|
| waktu | | konsentrasi | | waktu | | konsentrasi | |
| jam | koran | hvs | hvs tinta | jam | koran | hys | hvs tinta |
| 6 | 22,65 | 83,12 | 218,3 | 6 | 92,09 | 352,53 | 181,66 |
| 12 | 220,41 | 342,76 | 443,69 | 12 | 464,99 | 555,27 | 487,64 |
| 24 | 278,81 | 642,22 | 611,85 | 24 | 505,63 | 568,68 | 695,97 |
| 36 | 202,26 | 669,04 | 455,81 | 36 | 154,06 | 576,67 | 669,89 |
| 48 | 324,9 | 557,2 | 497,85 | 48 | 192,17 | 610,2 | 690,87 |
| 72 | 188,04 | 381,29 | 320,21 | 72 | 11,07 | 398,11 | 463,74 |
| 96 | 33,98 | 6,57 | 4,42 | 96 | 0 | 241,14 | 155,24 |

Selulase 0,5
konsentrasi

| waktu | koran | Hvs tinta |
|-------|---------|-----------|
| 6 | 1103,95 | 1045,84 |
| 12 | 890,41 | 1238,89 |
| 24 | 1304,53 | 897,98 |
| 36 | 1428,02 | 710,32 |
| 72 | 1468,8 | 107,01 |