

PRODUKSI BIOETANOL DARI BAGAS TEBU (*Saccharum officinarum*) OLEH *Saccharomyces cerevisiae* TERIMOBILISASI DAN *Trichoderma viride*

**PURNAMA LAURENTINA
0305030506**



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

PRODUKSI BIOETANOL DARI BAGAS TEBU (*Saccharum officinarum*) OLEH *Saccharomyces cerevisiae* TERIMOBILISASI DAN *Trichoderma viride*

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

Oleh :

PURNAMA LAURENTINA

0305030506



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

SKRIPSI : PRODUKSI BIOETANOL DARI BAGAS TEBU
(*Saccharum officinarum*) OLEH
Saccharomyces cerevisiae TERIMOBILISASI DAN
Trichoderma viride

NAMA : PURNAMA LAURENTINA

NPM : 0305030506

SKRIPSI INI TELAH DIPERIKSA DAN DISETUJUI

DEPOK, NOVEMBER 2009

Dra. SISWATI SETIASIH, Apt., M.si
PEMBIMBING I

SRI HANDAYANI, MbioMed
PEMBIMBING II

Tanggal lulus Ujian Sidang Sarjana:

Penguji I :

Penguji II :

Penguji III :

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur kepada Bapa di sorga atas setiap berkat, kasih dan penyertaan-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi ini tepat pada waktunya.

Penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada ibu Dra. Siswati Setiasih, Apt.,M.si dan ibu Sri Handayani, MbioMed sebagai pembimbing pertama dan kedua, yang dengan tulus ikhlas, penuh kesabaran dan pengertian telah memberikan bimbingan, arahan, waktu dan ilmu yang tak ternilai selama penelitian ini.

Ucapan terima kasih penulis juga sampaikan kepada Prof Usman Sumo Friend Tambunan sebagai pembimbing akademik, Dr. Ridla Bakri selaku ketua Departemen Kimia FMIPA UI, dosen-dosen biokimia yang telah membuka wawasan di bidang ilmu biokimia ini, serta kepada seluruh dosen Departemen Kimia FMIPA UI yang tidak hanya memberikan begitu banyak ilmu yang bermanfaat, tetapi juga telah menjadi sumber inspirasi yang berarti bagi penulis.

Rasa terimakasih yang begitu dalam juga penulis sampaikan kepada orang-orang tercinta yang sangat berarti bagi penulis, yaitu kepada:

1. Mama dan papa yang telah berkorban begitu besar dalam segala hal, yang telah menanamkan cinta kasih, mengajarkan kesabaran, kerja keras dan semangat hidup yang sangat berarti bagi penulis.

2. Saudara-saudara terkasih serta kepada seluruh keluarga besar yang selalu mendoakan dan mendukung penulis.
3. Sahabat-sahabat kimia 2005.
4. Kawan-kawan seperjuangan di lantai 4, ka Atika, Meta, Riyanti, Ardi Syarif, dan Fery.
5. Semua orang yang telah sepenuh hati melayani dan membantu penulis menyelesaikan penelitian dan skripsi.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna, maka dengan segala kerendahan hati penulis memohon maaf bila terdapat kesalahan dalam penulisan. Penulis membuka diri bila ada saran dan pendapat untuk perbaikan. Semoga skripsi ini bukan hanya akan menjadi koleksi di perpustakaan Departemen Kimia, namun bermanfaat dan memberikan inspirasi bagi siapapun yang membacanya.

Depok, November 2009

Penulis

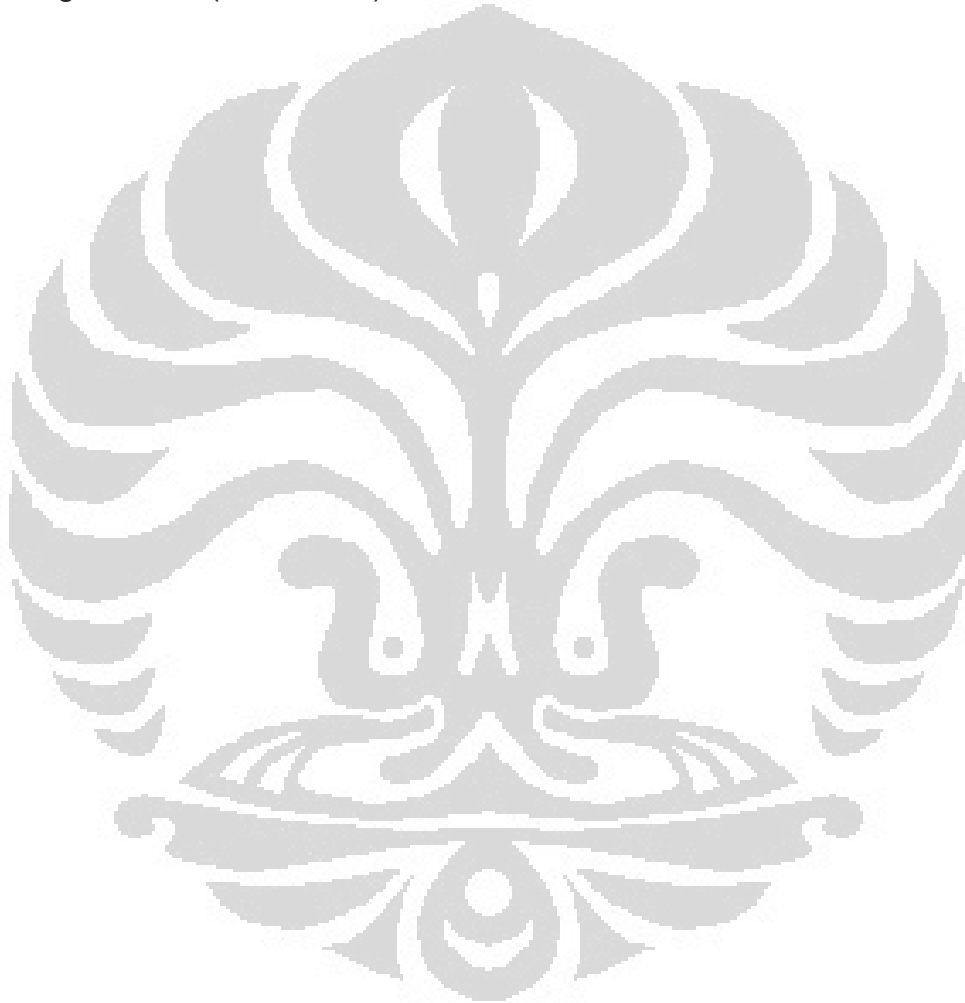
ABSTRAK

Bagas dan jerami merupakan limbah pertanian yang mengandung lignoselulosa sehingga dapat dimanfaatkan untuk produksi bioetanol. Pada penelitian ini, untuk menghidrolisis selulosa pada bagas dan jerami, digunakan jamur *Trichoderma viride* yang dapat menghasilkan enzim selulase. Namun, adanya kandungan lignin dalam sampel bagas dan jerami akan menghalangi aktivitas enzim selulase untuk mendegradasi selulosa menjadi senyawa gula yang lebih sederhana yaitu glukosa. Untuk menurunkan kandungan lignin, sampel terlebih dahulu didelignifikasi dengan NaOH 3 %. Konsentrasi senyawa gula pereduksi ditentukan dengan metode Somogyi Nelson. Konsentrasi gula pereduksi paling tinggi adalah 0,230 mg/mL yang dihasilkan dari hidrolisis sampel bagas pada konsentrasi 7,5 %, waktu inkubasi 48 jam dengan urea 0,3 % sebagai sumber nitrogennya. Hasil fermentasi hidrolisat bagas oleh *Saccharomyces cerevisiae* yang terimobilisasi dalam Ca alginat, menghasilkan kadar etanol yang lebih tinggi dibandingkan dengan fermentasi oleh *Saccharomyces cerevisiae* tanpa imobilisasi. Kondisi optimum proses fermentasi diperoleh pada waktu inkubasi 48 jam dan konsentrasi alginat 4 % yang menghasilkan kadar etanol sebesar 2,705%. Kadar etanol ditentukan dengan *Gas Chromatography* (GC).

Kata kunci : bioetanol, *Trichoderma viride*, *Saccharomyces cerevisiae*,
bagas tebu, selulosa, immobilisasi sel, fermentasi, hidrolisis,
delignifikasi

xi + 77 hlm .; gbr.; tab.; lamp.

Bibliografi : 31 (1981-2009)



DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR.....	i
ABSTRAK.....	iii
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR GAMBAR.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar belakang masalah.....	1
1.2 Perumusan masalah	3
1.3 Tujuan penelitian	5
1.4 Hipotesis	5
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 Bioetanol.....	7
2.2 Padi.....	9
2.2.1 Morfologi padi.....	9
2.2.2 Taksonomi padi.....	10
2.2.3 Jerami padi.....	11
2.3 Tebu.....	12
2.3.1 Morfologi tebu.....	12
2.3.2 Taksonomi tebu.....	13
2.3.3 Ampas tebu (bagas).....	14

2.4	Lignoselulosa.....	15
2.5	Selulosa.....	15
2.6	Hemiselulosa.....	18
2.7	Lignin.....	19
2.8	<i>Trichoderma viride</i>	20
2.8.1	Taksonomi <i>Trichoderma viride</i>	21
2.9	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23
2.9.1	Taksonomi <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24
2.10	Delignifikasi (<i>Pretreatment</i>).....	25
2.11	Hidrolisis.....	26
2.12	Fermentasi.....	27
2.13	Imobilisasi Sel.....	31
BAB III. METODE PENELITIAN.....		33
3.1	Bahan-bahan.....	33
3.1.1	Mikroorganisme.....	33
3.1.2	Substrat dan Bahan Kimia.....	33
3.2	Peralatan yang digunakan.....	35
3.3	Prosedur Kerja.....	35
3.3.1	Persiapan sampel (substrat).....	35
3.3.2	Delignifikasi sampel.....	35
3.3.3	Pembuatan media pemeliharaan <i>Trichoderma viride</i> dan <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36

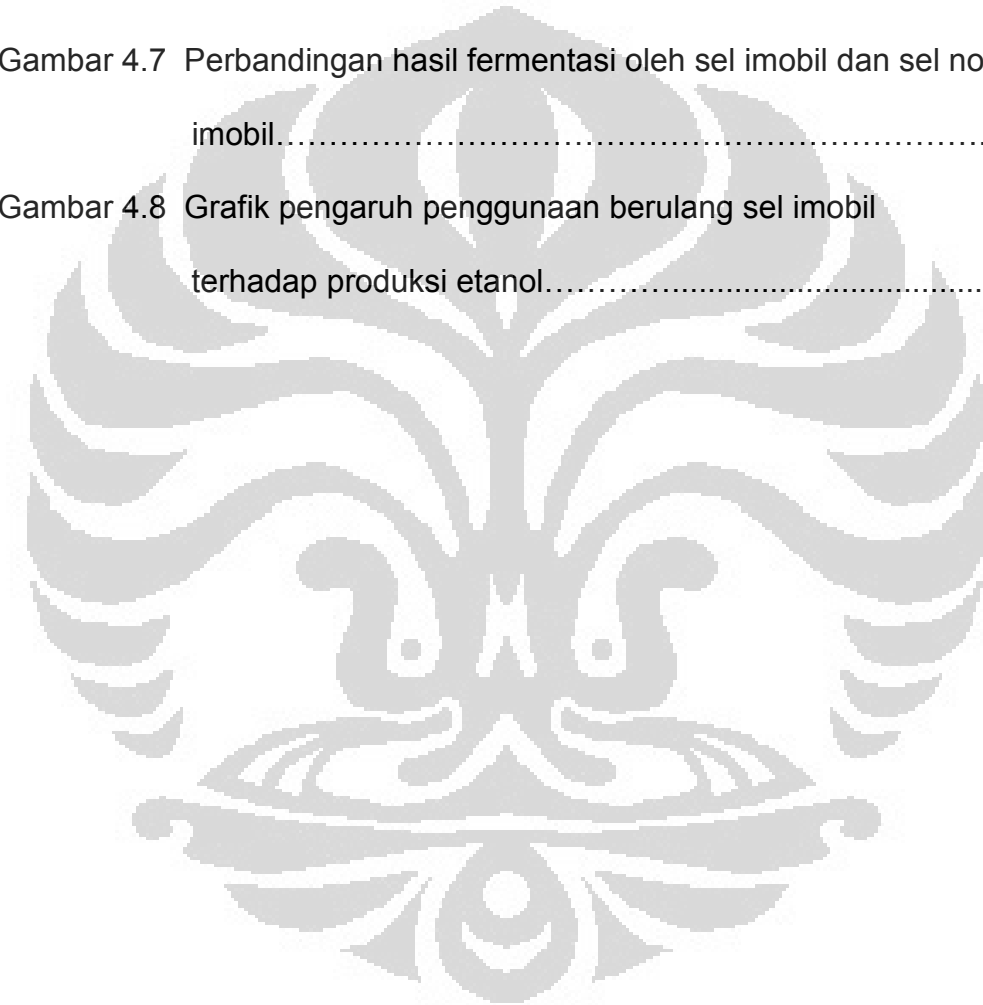
3.3.4	Pembuatan bikan sediaan dan biakan kerja <i>Trichoderma viride</i> dan <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36
3.3.5	Pembuatan suspensi sel <i>Trichoderma viride</i> dan <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	37
3.3.6	Hidrolisis substrat selulosa oleh <i>Trichoderma viride</i>	37
3.3.6.1	Pembuatan media aktivasi untuk <i>starter</i>	37
3.3.6.2	Pembuatan media produksi.....	37
3.3.6.3	Proses hidrolisis substrat.....	38
3.3.7	Penentuan kadar gula pereduksi dengan menggunakan metode Somogyl Nelson.....	38
3.3.7.1	Pembuatan pereaksi tembaga alkali.....	38
3.3.7.2	Pembuatan pereaksi arsenomolibdat.....	38
3.3.7.3	Langkah kerja metode Somogyi Nelson.....	39
3.3.8	Fermentasi hidrolisat untuk produksi etanol oleh <i>Saccharomyces cerevisiae</i> terimobilisasi.....	39
3.3.8.1	Pembuatan media aktivasi untuk <i>starter</i>	39
3.3.8.2	Pembuatan sel imobil.....	40
3.3.8.3	Pembuatan media produksi.....	40
3.3.8.4	Proses fermentasi hidrolisat.....	40
3.3.9	Penentuan konsentrasi etanol.....	41
3.3.10	Penentuan jumlah sel dengan metode kamar hitung (<i>counting chamber</i>).....	42
3.3.11	Bagan kerja.....	43

BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	45
4.1 Persiapan sampel dan delignifikasi.....	45
4.2 Penggunaan kapang <i>Trichoderma viride</i>	46
4.3 Proses hidrolisis oleh <i>Trichoderma viride</i>	47
4.3.1 Pengaruh konsentrasi substrat.....	47
4.3.2 Pengaruh delignifikasi substrat.....	49
4.3.3 Pengaruh sumber nitrogen.....	50
4.4 Penggunaan khamir <i>Saccharomyces cerevisiae</i> terimobilisasi.....	52
4.5 Proses fermentasi oleh <i>Saccharomyces cerevisiae</i> terimobilisasi.....	53
4.5.1 Pengaruh konsentrasi Na alginat.....	53
4.5.2 Pengaruh imobilisasi sel.....	55
4.5.3 Pengaruh penggunaan berulang sel imobil.....	56
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN.....	59
DAFTAR PUSTAKA.....	61
LAMPIRAN.....	65

DAFTAR GAMBAR

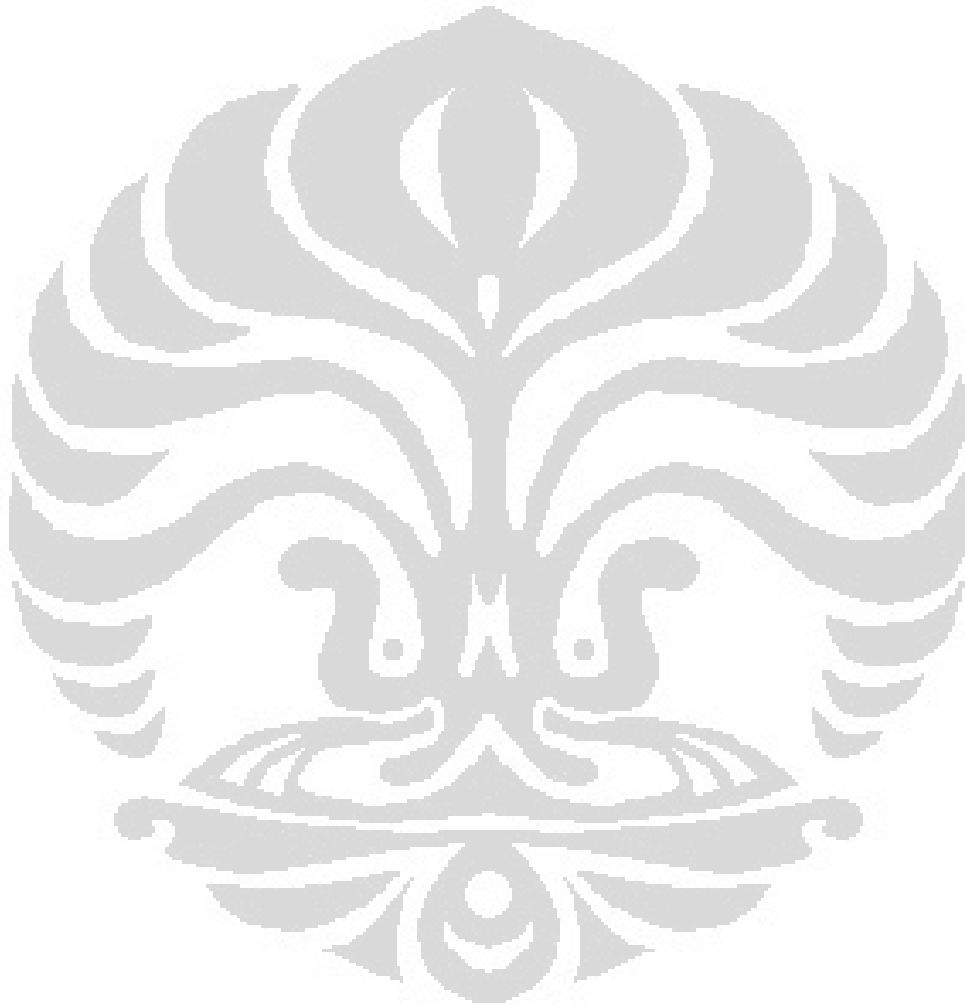
Gambar 2.1	Tanaman padi.....	11
Gambar 2.2	Tanaman tebu.....	13
Gambar 2.3	Lignoselulosa dalam dinding sel tanaman.....	15
Gambar 2.4	Skema ikatan hidrogen pada rantai selulosa.....	16
Gambar 2.5	Serat selulosa.....	16
Gambar 2.6	Bagian amorf pada selulosa.....	17
Gambar 2.7	Struktur Selulosa.....	17
Gambar 2.8	Struktur Hemiselulosa.....	18
Gambar 2.9	Struktur Lignin.....	20
Gambar 2.10	<i>Trichoderma viride</i>	22
Gambar 2.11	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24
Gambar 2.12	Skema presentatif delignifikasi.....	25
Gambar 2.13	Metabolisme fermentasi glukosa.....	28
Gambar 4.1	Grafik pengaruh konsentrasi substrat terhadap produksi gula pereduksi.....	48
Gambar 4.2	Grafik pengaruh delignifikasi terhadap produksi gula pereduksi	49
Gambar 4.3.	Grafik pengaruh sumber N terhadap produksi gula pereduksi	51

Gambar 4.4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> terimobilisasi dalam gel alginat....	53
Gambar 4.5	Grafik pengaruh konsentrasi Na alginat terhadap produksi etanol.....	54
Gambar 4.6	Grafik pengaruh imobilisasi sel terhadap produksi etanol.....	55
Gambar 4.7	Perbandingan hasil fermentasi oleh sel imobil dan sel non imobil.....	56
Gambar 4.8	Grafik pengaruh penggunaan berulang sel imobil terhadap produksi etanol.....	57



DAFTAR TABEL

Tabel 1 . Kandungan kimiawi jerami padi.....	11
Tabel 2. Kandungan kimiawi bagas tebu	14



DAFTAR LAMPIRAN

1. Standar gula pereduksi.....	63
2. Pengaruh konsentrasi substrat terhadap produksi gula pereduksi.....	67
3. Pengaruh delignifikasi terhadap produksi gula produksi.....	71
4. Pengaruh sumber nitrogen terhadap produksi gula pereduksi.....	67
5. Standar etanol.....	68
6. Pengaruh konsentrasi Na alginat terhadap produksi etanol.....	69
7. Pengaruh imobilisasi terhadap produksi etanol.....	70
8. Pengaruh penggunaan berulang sel imobil terhadap produksi etanol.....	71
9. Data luas peak GC standar etanol.....	73
10. Data luas peak GC pengaruh konsentrasi Na alginat terhadap Produksi etanol.....	74
11. Data luas peak GC pengaruh imobilisasi terhadap produksi etanol.....	75
12. Data luas peak GC pengaruh penggunaan berulang sel imobil terhadap produksi etanol.....	77

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang masalah

Cadangan bahan bakar minyak (BBM) yang semakin menipis sangat kontradiktif dengan populasi manusia yang semakin bertambah dan kebutuhan energi bagi kelangsungan hidup manusia beserta aktivitas ekonomi dan sosialnya yang semakin meningkat. Sejak lima tahun terakhir, Indonesia mengalami penurunan produksi minyak nasional akibat cadangan minyak yang menurun secara alamiah pada sumur-sumur produksi.¹ Pertambahan jumlah penduduk menyebabkan peningkatan kebutuhan akan sarana transportasi dan aktivitas industri. Hal tersebut secara langsung akan meningkatkan kebutuhan dan konsumsi bahan bakar minyak.

Untuk mengatasi permasalahan tersebut, saat ini mulai dikembangkan suatu inovasi baru sebagai alternatif pengganti bahan bakar minyak, yaitu etanol. Penggunaan etanol sebagai bahan bakar bernilai oktan tinggi atau sebagai zat aditif peningkat bilangan oktan pada bahan bakar, sebenarnya sudah dilakukan sejak abad 19. Mula-mula etanol digunakan untuk bahan bakar lampu pada masa sebelum perang saudara di Amerika Serikat. Kemudian pada tahun 1860 Nikolaus Otto menggunakan bahan bakar etanol dalam mengembangkan mesin kendaraan dengan siklus Otto. Bahkan, mobil model T karya Henry Ford yang diluncurkan pada tahun 1908 dirancang

dengan menggunakan bahan bakar etanol atau gasolin. Akan tetapi karena harganya yang sangat tinggi, etanol kalah bersaing dengan bahan bakar dari minyak bumi.²

Produksi etanol di Indonesia cukup banyak, namun belum digunakan sebagai sumber utama bahan bakar, melainkan sebagai pelarut, antiseptik dalam bidang kedokteran, campuran untuk minuman keras seperti *wine* atau *sake*, bahan baku farmasi dan kosmetika, dan sebagai campuran bahan bakar kendaraan seperti bensin alkohol (gasohol).

Etanol yang dijadikan pilihan baru sebagai bahan bakar adalah etanol yang diproduksi dari biomassa melalui proses biokimia dengan memanfaatkan mikroorganisme sehingga disebut bioetanol. Bioetanol yang diproduksi saat ini umumnya adalah bioetanol generasi pertama, yaitu terbuat dari bahan-bahan pangan atau pakan, seperti gula (tebu, molase) atau pati-patian (jagung, singkong). Hal tersebut dikhawatirkan akan menimbulkan masalah baru yang merupakan dampak dari penggunaan bahan makanan sebagai substrat untuk produksi bioetanol. Oleh karena itu, arah pengembangan bioetanol mulai berubah ke arah pengembangan bioetanol generasi kedua, yaitu bioetanol dari biomassa lignoselulosa.

Indonesia memiliki keunggulan dalam hal biomassa lignoselulosa. Biomassa lignoselulosa di Indonesia tersedia dengan sangat melimpah dan murah, namun banyak disia-siakan. Sumber biomassa lignoselulosa antara lain adalah sebagai berikut³ :

1. Limbah pertanian / industri pertanian:jerami, tongkol jagung, sisa

- pangkasan jagung, onggok dan lain-lain.
2. Limbah perkebunan: bagas tebu, sisa pangkasan tebu, kulit buah kakao, kulit buah kopi dan lain-lain.
 3. Limbah kayu dan kehutanan: sisa gergajian dan limbah *sludge* pabrik kertas.
 4. Sampah organik: sampah rumah tangga dan sampah pasar.

1.2 Perumusan Masalah

Pada penelitian ini, bahan baku pembuatan bioetanol berasal dari ampas tebu (bagas) yang merupakan biomassa lignoselulosa. Bahan ini tersusun dari lignin yang merupakan polimer alam yang sulit terdegradasi sehingga menghambat proses hidrolisis selulosa. Oleh karena itu, dilakukan suatu proses delignifikasi sebagai *pretreatment* yang diharapkan mampu meningkatkan efektifitas proses hidrolisis.

Selama ini proses hidrolisis selulosa pada pembuatan bioetanol dilakukan secara kimiawi dan enzimatik. Hidrolisis kimiawi biasanya menggunakan asam sulfat atau asam kuat lain. Metode ini mulai banyak ditinggalkan, karena selain tidak ramah lingkungan, dibutuhkan biaya dan waktu untuk menetralkan pH hidrolisat yang terlalu asam. Sebaliknya, hidrolisis enzimatik merupakan metode yang paling sering digunakan karena lebih efektif, namun harga enzim yang mahal menjadi salah satu faktor penghambat metode ini. Pada penelitian ini, hidrolisis dilakukan secara langsung dengan menambahkan inokulum mikroorganisme ke dalam bahan

baku atau substrat. Mikroorganisme tersebut menghasilkan enzim yang mampu memutus ikatan pada selulosa menjadi gula monomernya.

Fermentasi gula umumnya dilakukan secara konvensional oleh khamir *Saccharomyces cerevisiae* yaitu dengan menambahkan inokulum khamir langsung ke dalam larutan gula. Alasan pemilihan spesies khamir ini adalah karena sifatnya yang cepat berkembang biak, mampu memproduksi etanol dalam jumlah besar, mempunyai toleransi terhadap etanol yang tinggi, dan cepat beradaptasi terhadap media yang difermentasi.

Pada penelitian ini, gula hasil hidrolisis difermentasi oleh *Saccharomyces cerevisiae* yang terimobilisasi. Pemilihan metode imobilisasi dilakukan dengan tujuan untuk meningkatkan produksi etanol hasil fermentasi. Imobilisasi sel bertujuan untuk membuat sel-sel mikroorganisme menjadi tidak bergerak atau berkurang ruang gerakannya agar menghambat pertumbuhan sel sehingga substrat (makanan) yang dikonsumsi mikroorganisme tersebut hanya digunakan untuk menghasilkan produk atau metabolit.⁴

Fermentasi dengan teknik imobilisasi sel dilakukan dengan menggunakan suatu material pendukung yang berupa sistem matriks, membran atau permukaan suatu zat padat yang digunakan sebagai pembawa (*carrier*). Pada penelitian ini, digunakan Ca alginat sebagai sistem matriks. Sel-sel khamir *Saccharomyces cerevisiae* diimobilisasi dengan cara penjebakan dalam gel Ca alginat.

1.3 Tujuan penelitian

Penelitian ini bertujuan memanfaatkan ampas tebu (bagas) sebagai substrat untuk produksi bioetanol melalui proses hidrolisis oleh kapang *Trichoderma viride* dan dilanjutkan dengan fermentasi menggunakan khamir *Saccharomyces cerevisiae* dengan teknik imobilisasi sel. Melalui penelitian ini akan dilakukan optimasi kondisi proses hidrolisis maupun proses fermentasi. Optimasi ini dilakukan sebagai dasar untuk penerapan proses produksi bioetanol pada skala yang lebih besar dengan sistem kontinu.

1.4 Hipotesis

Ampas tebu (bagas) merupakan limbah pertanian, tersusun atas lignoselulosa yang terdiri dari lignin, selulosa, dan hemiselulosa. Selulosa bagas dapat digunakan sebagai bahan dasar pembuatan bioetanol melalui proses hidrolisis oleh kapang *Trichoderma viride* yang selanjutnya difermentasi oleh khamir *Saccharomyces cerevisiae* terimobilisasi dalam gel Ca alginat. Fermentasi dengan metode imobilisasi sel menggunakan gel Ca alginat mampu meningkatkan produksi bioetanol.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bioetanol

Bioetanol merupakan cairan hasil proses fermentasi gula dari sumber karbohidrat (pati) menggunakan bantuan mikroorganisme. Pada dasarnya bioetanol dan etanol adalah zat yang sama. Struktur, sifat kimia, sifat fisika, dan kereaktifan keduanya sama. Etanol atau etil alkohol merupakan senyawa organik dengan rumus kimia C_2H_5OH . Dalam kondisi kamar, etanol berwujud cairan yang tidak berwarna, mudah menguap, mudah terbakar, mudah larut dalam air, dan tembus cahaya. Etanol adalah senyawa organik golongan alkohol primer dengan satu gugus hidroksil yang mempengaruhi sifat fisik dan kimianya. Reaksi yang dapat terjadi pada etanol antara lain dehidrasi, dehidrogenasi dan esterifikasi. Sifat fisik etanol adalah sebagai berikut:

Massa molekul relatif	: 46,07 g/mol
Titik beku	: $-114,1^{\circ}C$
Titik didih normal	: $78,32^{\circ}C$
Densitas pada $20^{\circ}C$: 0,7893 g/ml
Kelarutan dalam air pada $20^{\circ}C$: sangat larut
Viskositas pada $20^{\circ}C$: 1,17 cP
Kalor spesifik pada $20^{\circ}C$: 0,579 kal/g $^{\circ}C$

Kalor pembakaran pada 25°C : 7092,1 kal/g

Kalor penguapan pada 78,32°C : 200,6 kal/g

Tekanan uap pada 38°C : 0,2 bar

Berdasarkan kadarnya, alkohol dibagi menjadi 3 yaitu :

1. Kadar 90 – 96,5 % adalah alkohol yang digunakan pada industri.
2. Kadar 96 – 99,5 % adalah alkohol yang digunakan sebagai campuran miras dan bahan dasar industri farmasi.
3. Kadar 99,5 – 100 % adalah alkohol yang digunakan sebagai campuran bahan bakar untuk kendaraan, oleh sebab itu harus benar-benar kering dan *anhydrous* agar tidak korosif.

Keunggulan-keunggulan etanol sebagai bahan bakar dibandingkan bahan bakar minyak adalah sebagai berikut:

1. Gas emisi etanol lebih ramah lingkungan karena ada gugus OH dalam susunan molekul etanol. Oksigen pada molekul etanol membantu penyempurnaan pembakaran antara udara dan bahan bakar di dalam silinder pada kendaraan sehingga menurunkan tingkat emisi asap, emisi CO dan CO₂ serta partikulat yang membahayakan kesehatan.
2. Rentang keterbakaran (*flammability*) etanol yang lebar, yakni 4,3 - 19 vol% (dibandingkan dengan gasolin yang memiliki rentang keterbakaran 1,4 – 7,6 vol%) membuat pembakaran campuran udara-bahan bakar etanol menjadi lebih baik.
3. Tidak mengandung senyawa timbal.
4. Bioetanol diproduksi dari sumber yang dapat diperbaharui, seperti

tebu, jagung, singkong dan tanaman-tanaman sejenis lainnya, sehingga tidak perlu khawatir akan kehabisan etanol.

5. Kandungan energi pada etanol lebih tinggi. Etanol memiliki panas penguapan (*heat of vaporization*) yang tinggi, yakni 842 kJ / kg.
6. Penggunaan etanol sebagai bahan bakar tidak rumit. Etanol dapat dicampur dengan bensin dan digunakan tanpa memerlukan modifikasi mesin.
7. Meningkatkan kesejahteraan petani sebab bahan baku produksi etanol merupakan tanaman hasil dan limbah pertanian.

2.2 Padi

Padi merupakan makanan pokok dari 40% penduduk dunia serta makanan pokok seluruh penduduk Asia Tenggara. Indonesia merupakan negara produsen padi terkemuka di dunia (9% dari total produksi dunia) setelah Cina (31%) dan India (20%).⁵ Padi merupakan tanaman rumput musiman yang tumbuh pada tanah kering atau tanah yang tergenang air dengan kandungan bahan organik 1-50%, pH 3-10, suhu 20-38°C, dan kandungan garam hampir 0-1%.

2.2.1 Morfologi Padi⁶

Batang : tegak tersusun dari deretan buku-buku dan ruas, jumlah batang tergantung pada kultivar dan musim pertumbuhan padi.

Masing-masing buku memiliki daun tunggal, kadang-kadang memiliki akar, memiliki ruas yang pendek pada pangkal tanaman, pelepah saling menutupi satu sama lain membentuk batang semu.

Daun : berbentuk lanset (sempit memanjang) dan memiliki pelepah daun.

Bunga : tersusun sebagai bunga majemuk dengan satuan bunga berupa floret.

Akar : berbentuk serabut

Biji : merupakan biji tunggal

2.2.2 Taksonomi padi⁷

Kingdom : *Plantae* (tumbuhan)

Subkingdom : *Tracheobionta* (tumbuhan berpembuluh)

Super Divisi : *Spermatophyta* (menghasilkan biji)

Divisi : *Magnoliophyta* (tumbuhan berbunga)

Kelas : *Liliopsida* (berkeping satu / monokotil)

Sub Kelas : *Commelinidae*

Ordo : *Poales*

Famili : *Poaceae* (suku rumput-rumputan)

Genus : *Oryza*

Spesies : *Oryza sativa*



Gambar 2.1 Tanaman padi⁸

2.2.3 Jerami padi

Jerami padi adalah limbah batang dan daun padi yang telah diambil buahnya yang masak. Oleh sebagian petani, jerami biasa dimanfaatkan sebagai atap rumah, kandang, penutup tanah (mulsa), bahan bakar industri, pupuk organik (pupuk kompos), dan pakan ternak. Di lain pihak, jerami sebagai limbah pertanian sering dibakar atau dibuang begitu saja sehingga mengganggu keseimbangan lingkungan. Produksi padi nasional mencapai 54,75 juta ton pertahun pada tahun 2006, meningkat sebesar 1,11% dibandingkan produksi padi tahun 2005. Peningkatan produksi padi juga diiringi peningkatan limbah jerami padi.⁹

Tabel 2.1 Kandungan kimiawi jerami padi¹⁰

Selulosa	37,71 %
Hemiselulosa	21,99 %
Lignin	16,62 %

2.3 Tebu

Tebu merupakan tanaman perkebunan jenis rumput-rumputan.

Tanaman ini merupakan komoditi penting sebagai bahan baku pembuatan gula putih. Tanaman tebu cocok ditanam pada daerah yang mempunyai ketinggian tanah antara 1 sampai 1300 m di atas permukaan laut. Tanah yang ideal bagi tanaman tebu adalah tanah berhumus dengan pH antara 5,7-7.

Tebu hanya dapat ditanam di daerah iklim tropis. Di Indonesia, perkebunan tebu menempati luas areal \pm 232 ribu hektar. Pada tahun 2002 produksi tebu Indonesia mencapai \pm 2 juta ton. Dalam proses produksi di pabrik gula, ampas tebu dihasilkan sebesar 90% dari setiap tebu yang diproses dan gula yang dimanfaatkan hanya 5%, sisanya berupa tetes tebu (*molase*) dan air.¹¹

2.3.1 Morfologi Tebu¹²

Batang : terdiri dari banyak ruas yang setiap ruas dibatasi oleh buku-buku sebagai tempat tumbuh daun. Tinggi tanaman tebu berkisar 2-4 meter. Batang tebu mengandung serat dan kulit batang (12,5%), nira yang terdiri dari gula, mineral dan bahan-bahan non gula lain (87,5%).

Daun : berbentuk helaian dengan pelepah. Panjang daun dapat

mencapai panjang 1-2 meter dan lebar 4-8 cm dengan permukaan kasar dan berbulu.

Bunga : berupa bunga majemuk di puncak sebuah poros gelagah.

Akar : berbentuk serabut

Biji : merupakan biji tunggal

2.3.2 Taksonomi Tebu⁷

Kingdom : *Plantae* (tumbuhan)

Subkingdom : *Tracheobionta* (tumbuhan berpembuluh)

Super Divisi : *Spermatophyta* (menghasilkan biji)

Divisi : *Magnoliophyta* (tumbuhan berbunga)

Kelas : *Liliopsida* (berkeping satu / monokotil)

Sub Kelas : *Commelinidae*

Ordo : *Poales*

Famili : *Poaceae* (suku rumput-rumputan)

Genus : *Saccharum*

Spesies : *Saccharum officinarum*



Gambar 2.2 Tanaman tebu⁷

2.3.3 Ampas tebu

Ampas tebu atau bagas ialah hasil samping proses ekstraksi (pemerahan) cairan tebu. Pada musim giling 2006 lalu, data yang diperoleh dari Ikatan Ahli Gula Indonesia (IKAGI) menunjukkan bahwa jumlah tebu yang digiling oleh 57 pabrik gula di Indonesia mencapai sekitar 30 juta ton, sehingga ampas tebu yang dihasilkan diperkirakan mencapai 9.640.000 ton. Sebanyak 60% dari ampas tebu tersebut dimanfaatkan oleh pabrik gula sebagai bahan bakar *boiler* (mesin pemanas), bahan baku untuk kertas, *particleboard*, *fibreboard*, bahan baku industri kanvas rem, industri jamur dan lain-lain. Diperkirakan sebanyak 45 % dari ampas tebu belum dimanfaatkan.¹³

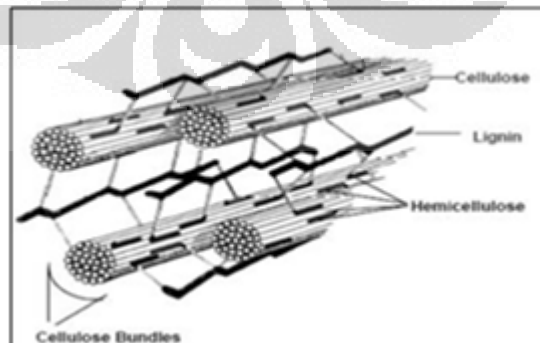
Tabel 2.2 Kandungan kimiawi bagas tebu¹⁴

Selulosa	52,70 %
Hemiselulosa	17,50 %
Lignin	24,20 %

Ampas tebu atau bagas memiliki berbagai kandungan yang potensial untuk industri. Sebagian besar dari ampas tebu mengandung lignoselulosa. Panjang serat bagas antara 1,7 sampai 2 mm dengan diameter sekitar 20 mikro. Bagas mengandung air 48 - 52%, gula rata-rata 3,3%, dan serat rata-rata 47,7%. Serat bagas tidak dapat larut dalam air dan sebagian besar terdiri dari selulosa, pentosan, dan lignin.¹¹

2.4 Lignoselulosa

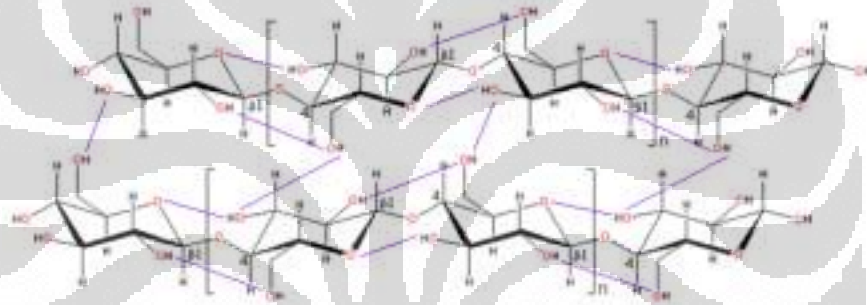
Lignoselulosa merupakan materi yang terdapat di dalam tanaman dan tersusun atas tiga bagian utama, yaitu selulosa, hemiselulosa, dan lignin. Lignin merupakan komponen paling keras pada dinding sel tanaman, berupa polimer dari unit-unit fenilpropana yang berikatan silang satu sama lain. Lignin terdapat dalam lamela tengah dan dinding sel, yang berfungsi sebagai perekat antar sel dan merupakan senyawa aromatik berbentuk amorf yang berperan sebagai penguat dan pembentuk dinding sel yang kokoh. Kandungan lignin bervariasi tergantung pada jenis dan umur tanaman.



Gambar 2.3 Lignoselulosa dalam dinding sel tanaman¹⁵

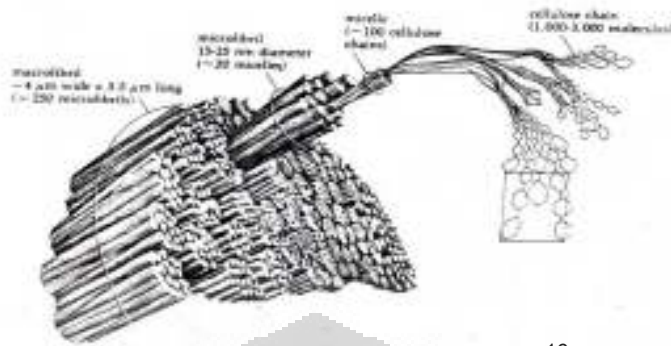
2.5 Selulosa

Selulosa adalah komponen utama semua dinding sel tumbuhan dan merupakan polimer tak bercabang dari unit-unit β -D-glukopiranososa yang berikatan melalui ikatan 1,4- β -glikosidik membentuk homopolisakarida yang tersusun linier dan memiliki kecenderungan membentuk ikatan hidrogen intra dan intermolekular.¹⁵



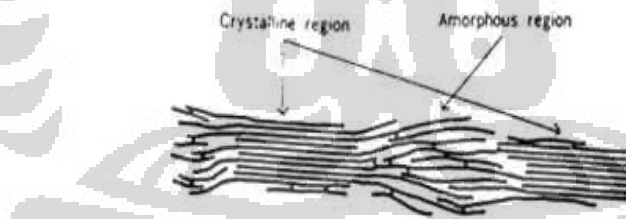
Gambar 2.4 Skema ikatan hidrogen pada rantai selulosa.¹⁵

Rantai selulosa yang lurus dan panjang saling berhubungan melalui ikatan hidrogen intermolekular (Gambar 2.4) membentuk suatu lembaran-lembaran. Lembaran-lembaran tersebut tersusun menjadi suatu lapisan yang akhirnya membentuk mikrofibril yang kristalin. Mikrofibril berinteraksi membentuk serat-serat selulosa (Gambar 2.5) yang mengandung sekitar 500 ribu rantai selulosa.¹⁶



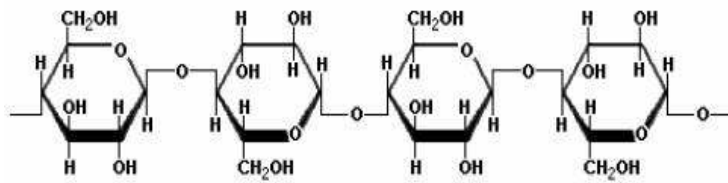
Gambar 2.5 Serat selulosa.¹⁶

Dalam mikrofibril terdapat bagian kristal dan amorf. Rantai selulosa berorientasi sejajar dengan sumbu serat, membentuk daerah kristal yang sangat teratur diselingi dengan daerah amorf yang tidak teratur. Pada bagian amorf (Gambar 2.6) inilah selulosa lebih mudah dihidrolisis dengan enzim atau asam untuk menghasilkan glukosa.¹⁷



Gambar 2.6 Bagian Kristal dan amorf pada selulosa.¹⁷

Panjang molekul selulosa ditentukan oleh jumlah glukosa di dalam polimer, disebut derajat polimerisasi. Derajat polimerisasi selulosa tergantung pada jenis tanaman dan lebih besar dari hemiselulosa, yaitu antara 7000-15000 molekul glukosa per polimer.¹⁸



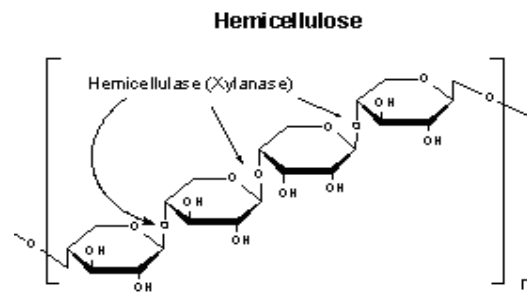
Gambar 2.7 Struktur Selulosa¹⁹

2.6 Hemiselulosa

Hemiselulosa merupakan komponen kedua terbesar setelah selulosa yang berfungsi sebagai bahan pendukung dinding sel tanaman.

Hemiselulosa mirip dengan selulosa yang merupakan polimer monosakarida. Namun, tidak seperti selulosa yang hanya terdiri dari satu jenis monosakarida (glukosa), hemiselulosa tersusun dari bermacam-macam jenis monosakarida. Monomer gula penyusun hemiselulosa terdiri dari monomer monosakarida berkarbon 5 (C-5) dan 6 (C-6), seperti: xilosa, manosa, glukosa, galaktosa, dan arabinosa.

Rantai polimer hemiselulosa memiliki cabang yang pendek dan amorf. Sebagian besar hemiselulosa memiliki derajat polimerisasi hanya sampai 200. Hemiselulosa mengikat fibril-fibril selulosa untuk membentuk mikrofibril, yang dapat meningkatkan stabilitas dinding sel. Hemiselulosa lebih mudah dihidrolisis dibanding selulosa, tetapi gula C-5 lebih sulit difermentasi menjadi etanol daripada gula C-6.

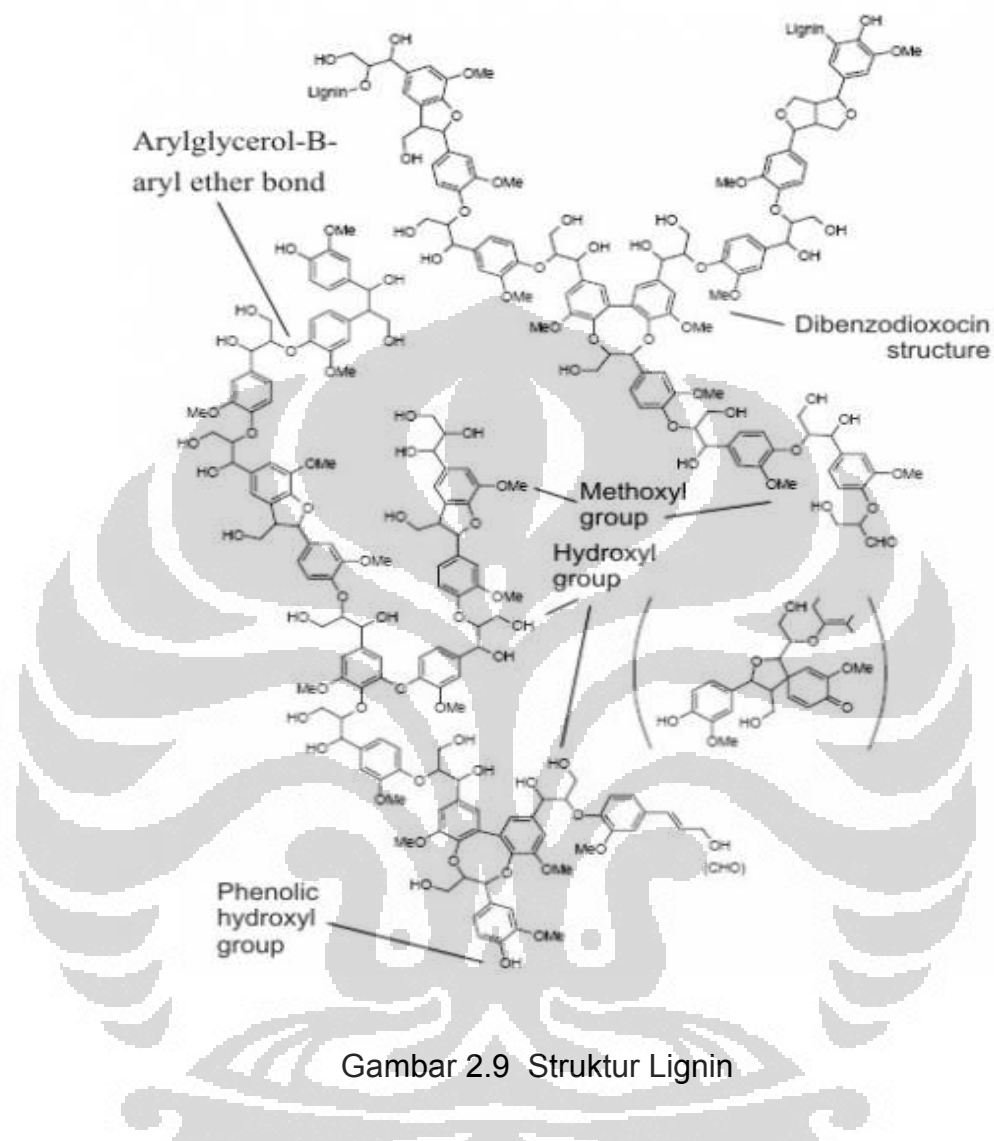


Gambar 2.8 Struktur Hemiselulosa

2.7 Lignin¹⁸

Lignin adalah molekul kompleks dengan berat molekul tinggi yang tersusun dari unit fenilpropan yang terikat di dalam struktur tiga dimensi dan berikatan dengan selulosa dan hemiselulosa pada jaringan tanaman. Lignin merupakan material yang paling kuat di dalam biomassa dan sangat resisten terhadap degradasi, baik secara biologi, enzimatik, maupun kimia. Komposisi lignin di alam sangat bervariasi tergantung pada spesies tanaman. Kadar lignin akan bertambah dengan bertambahnya umur tanaman.

Lignin terdiri dari daerah amorf dengan struktur seperti partikel tabung, umumnya terdapat di daerah lamela tengah dan berfungsi sebagai pengikat antar sel serta menguatkan dinding sel. Lignin bersifat tidak larut dalam kebanyakan pelarut organik dan tahan terhadap hidrolisis oleh karena adanya ikatan alkil dan ikatan eter. Pada suhu tinggi, lignin dapat mengalami perubahan struktur dengan membentuk asam format, metanol, asam asetat, aseton, vanilin dan lain-lain, sedangkan bagian lain mengalami kondensasi.



Gambar 2.9 Struktur Lignin

2.8 *Trichoderma viride*

Trichoderma viride adalah mikroorganisme jenis kapang dengan susunan sel berderet membentuk benang halus yang disebut hifa. Hifa pada kapang ini berbentuk pipih, bersekat, dan bercabang membentuk anyaman yang disebut miselium. Miselium tersebut dapat tumbuh dengan cepat dan memproduksi berjuta-juta spora. Dalam pertumbuhannya, bagian permukaan

akan terlihat putih bersih dan bermiselium kusam, namun setelah dewasa miselium menjadi berwarna hijau.

Trichoderma viride merupakan jenis yang paling banyak dijumpai di antara genus *Trichoderma* dan memiliki kelimpahan yang tinggi pada tanah maupun bahan yang mengalami dekomposisi. Pada spesies saprofit, kapang ini tumbuh pada kisaran suhu optimal 22-30°C.²⁰ Suhu optimal untuk pertumbuhan kapang ini adalah 32-35°C dan pH optimal sekitar 4-5.²¹

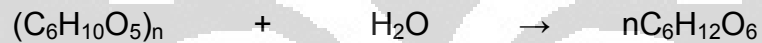
2.8.1 Taksonomi *Trichoderma viride*²²

Kingdom : *Fungi*
Divisi : *Amastigomycota*
Sud Divisi : *Deuteromycotina*
Kelas : *Deuteromycetes*
Sub Kelas : *Hyphomycetidae*
Ordo : *Moniliales*
Famili : *Moniliaceae*
Genus : *Trichoderma*
Species : *Trichoderma viride*



Gambar 2.10 *Trichoderma viride*

Trichoderma viride adalah kapang yang dapat menghasilkan selulase. Selulase adalah enzim yang dapat mendegradasi atau menghidrolisis ikatan kimia dari selulosa (polisakarida) dan turunannya menjadi gula sederhana (monosakarida).



Banyak jenis kapang yang bersifat selulolitik tetapi tidak banyak yang menghasilkan enzim selulase yang cukup banyak untuk dapat dipakai secara langsung.²³ Kapang ini mampu menghancurkan selulosa tingkat tinggi dan memiliki kemampuan mensintesis beberapa faktor esensial untuk melarutkan bagian selulosa yang terikat kuat dengan ikatan hidrogen.²⁴

Trichoderma viride menghasilkan selulase lengkap dengan semua komponen-komponen yang dibutuhkan untuk hidrolisis total selulosa kristal. Selulase yang terdapat pada *Trichoderma viride* terdiri dari 3 jenis, yaitu:

1. Endoglukanase
2. Selobiohidrolase
3. β -glukosidase

Ada dua tahap proses hidrolisis selulosa oleh selulase yaitu tahap awal yang merupakan tahap aktivasi dan kemudian dilanjutkan dengan tahap hidrolisis. Endoglukanase bekerja pada selulosa amorf yang menghidrolisis rantai selulosa di bagian tengah menghasilkan ujung-ujung rantai baru yang merupakan sasaran kerja enzim selobiohidrolase. Selobiohidrolase menghidrolisis ujung selulosa secara berurutan menghasilkan selobiosa sebagai produk utama. Endoglukanase dan selobiohidrolase tidak mampu memecah selobiosa, maka β -glukosidase menghidrolisis selobiosa lebih lanjut menjadi glukosa.

2.9 *Saccharomyces cerevisiae*

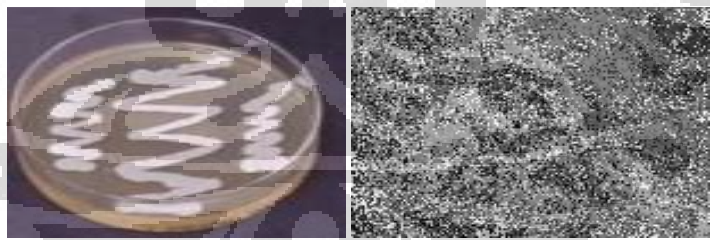
Saccharomyces cerevisiae merupakan khamir sejati golongan eukariot dengan blastospora berbentuk bulat lonjong, silindris, oval, atau bulat telur yang dipengaruhi oleh strainnya. Sel *Sacharomyces cerevisiae* memiliki ukuran yang bervariasi, berwarna putih keruh dengan bagian tengah berwarna kehitaman. Struktur khamir ini terdiri dari sel anak, *budding* dan sel induk.

Khamir ini memiliki diameter 5-10 μm dan tidak mampu bergerak aktif karena tidak memiliki flagella. Secara makroskopik, koloni *Sacharomyces cerevisiae* berbentuk bulat, berwarna putih kekuningan, permukaan berkilau, licin, tekstur lunak, dan memiliki sel bulat dengan askospora 1-8 buah.

Khamir ini bereproduksi dengan cara bertunas. Tempat melekatnya tunas pada induk sel sangat kecil sehingga seolah-olah tidak terbentuk septa, sehingga tidak dapat terlihat dengan mikroskop biasa.

2.9.1 Taksonomi *Saccharomyces cerevisiae*²⁵

- Kingdom : *Fungi*
- Divisi : *Ascomycetes*
- Sud Divisi : *Saccharomycoma*
- Kelas : *Saccharomyces*
- Ordo : *Saccharomycetales*
- Famili : *Saccharomycetaceae*
- Genus : *Saccharomyces*
- Spesies : *Saccharomyces cerevisiae*



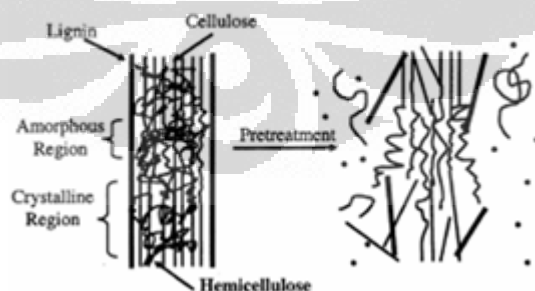
Gambar 2.11 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae dapat berkembang biak dalam gula sederhana seperti glukosa, maupun gula kompleks disakarida yaitu sukrosa. Selain itu, untuk menunjang kebutuhan hidup diperlukan oksigen, karbohidrat, dan nitrogen. Pemakaian khamir dalam proses fermentasi

alkohol biasanya didasarkan pada jenis karbohidrat yang digunakan sebagai medium. Konsentrasi gula yang baik untuk fermentasi adalah antara 10-18%, pH 4-5, selama 30-72 jam. *Saccharomyces cerevisiae* merupakan mikroba yang paling banyak digunakan pada fermentasi alkohol karena dapat memproduksi tinggi, tahan terhadap kadar alkohol yang tinggi, tahan terhadap kadar gula yang tinggi, dan tetap aktif melakukan aktivitasnya pada suhu 4 – 32°C.²⁶

2.10 Delignifikasi (*Pretreatment*)

Selulosa berbentuk serat-serat yang terpilin dan diikat oleh hemiselulosa, kemudian dilindungi oleh lignin yang sangat kuat. Akibat dari perlindungan lignin dan hemiselulosa ini, selulosa menjadi sulit didegradasi menjadi gula (proses hidrolisis). Salah satu langkah penting untuk biokonversi lignoselulosa menjadi etanol adalah memecah perlindungan lignin melalui tahap *pretreatment* (delignifikasi).



Gambar 2.12 Skema presentatif delignifikasi

2.11 Hidrolisis

Hidrolisis adalah reaksi pemecahan molekul besar menjadi bagian-bagian yang lebih kecil yang merupakan komponen monomer dari senyawa itu sendiri, melalui adisi oleh air. Prinsip hidrolisis polisakarida adalah pemutusan rantai polimer pati menjadi unit-unit dekstrosa ($C_6H_{12}O_6$). Pemutusan rantai polimer tersebut dapat dilakukan dengan dua metode, yaitu secara enzimatik dan kimiawi.

Hidrolisis kimiawi biasanya menggunakan asam sulfat (H_2SO_4) atau asam klorida (HCl). Bahan lignoselulosa dipanaskan dalam asam dengan kondisi, suhu, tekanan tinggi dan waktu yang singkat. Hidrolisis juga dapat dilakukan dalam suhu dan tekanan rendah namun dengan waktu yang lebih lama. Pada dasarnya hidrolisis ini dilakukan dalam dua tahap. Pada tahap pertama sebagian besar hemiselulosa dan sedikit selulosa akan terpecah-pecah menjadi gula penyusunnya, sedangkan tahap kedua bertujuan untuk memecah sisa selulosa yang belum terhidrolisis. Dengan dua tahap hidrolisis ini diharapkan akan diperoleh gula dalam jumlah yang banyak.

Hidrolisis enzimatik adalah hidrolisis dengan menggunakan enzim jenis selulase atau jenis yang lain. Enzim selulase memiliki kemampuan untuk memecah selulosa menjadi glukosa. Penggunaan enzim lebih efisien dalam menghidrolisis selulosa. Hidrolisis secara enzimatik memiliki perbedaan mendasar dibandingkan secara kimiawi dalam hal spesifitas pemutusan rantai polimer pati. Pada hidrolisis kimiawi, rantai polimer

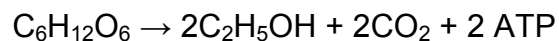
(selulosa) diputus secara acak, sedangkan pada hidrolisis enzimatis rantai selulosa diputus secara spesifik.

2.12 Fermentasi

Awalnya fermentasi hanya menunjukkan suatu peristiwa alami pada pembuatan anggur yang menghasilkan buih (*ferment* berarti buih). Oleh Louis Pasteur, fermentasi didefinisikan sebagai proses penguraian gula pada buah anggur menjadi gelembung-gelembung udara (CO₂) oleh khamir yang terdapat pada cairan ekstrak buah anggur tersebut. Dari definisi ini kemudian arti fermentasi berkembang menjadi suatu kultur mikroorganisme dalam proses optimum untuk menghasilkan produk berupa metabolit-metabolit, enzim, atau produk lain.

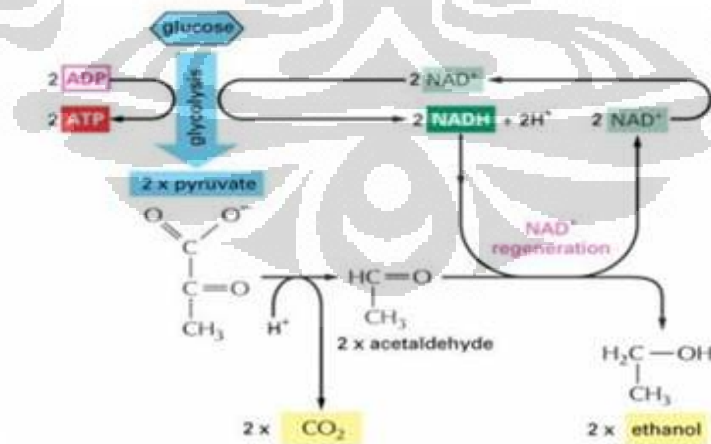
Fermentasi adalah proses produksi energi dalam sel baik dalam keadaan aerob (dengan oksigen) maupun anaerob (tanpa oksigen). Bahan utama dalam fermentasi adalah gula. Reaksi dalam fermentasi berbeda-beda tergantung pada jenis gula yang digunakan dan produk yang dihasilkan. Secara singkat, glukosa (C₆H₁₂O₆) yang merupakan gula paling sederhana, melalui fermentasi akan menghasilkan etanol (C₂H₅OH).

Persamaan reaksi kimia pada fermentasi alkohol:



Pada proses fermentasi glukosa oleh *Saccharomyces cerevisiae*, terjadi suatu tahapan reaksi pada jalur Embden-Meyerhof-Parnas. Glukosa difosforilasi oleh ATP mula-mula menjadi D-glukosa-6 fosfat, kemudian

mengalami isomerasi berubah menjadi D-fruktosa-6 fosfat dan difosforilasi lagi oleh ATP menjadi D-fruktosa-1, 6 difosfat. D-fruktosa-1, 6 difosfat dipecah menjadi satu molekul D-gliseraldehid-3 fosfat dan satu molekul aseton fosfat. Dihidroksi aseton fosfat disederhanakan menjadi L-gliserol-3 fosfat oleh NADH. ATP melepaskan satu molekul fosfat yang diterima oleh gliseraldehid-3 fosfat yang kemudian menjadi D-1, 3 difosfogliserat dan ADP. D-1, 3 difosfogliserat melepaskan energi fosfat yang tinggi ke ADP untuk membentuk D-3 fosfogliserat dan ATP. D-3 fosfogliserat berada dalam keseimbangan dengan D-2 fosfogliserat. D-2 fosfogliserat melepaskan air untuk menghasilkan fosfoenol piruvat. ATP menggeser rantai fosfat yang kaya energi dari fosfoenolpiruvat untuk menghasilkan piruvat dan ATP. Piruvat didekarboksilasi menghasilkan asetaldehid dan CO₂. Akhirnya asetaldehid menerima hidrogen dari NADH menghasilkan etanol.¹⁴



Gambar 2.13 Metabolisme fermentasi glukosa

Alkohol yang diperoleh dari proses fermentasi ini biasanya memiliki kadar hanya 8 sampai 10 persen volume. Apabila melalui proses fermentasi tersebut diperoleh alkohol dengan kadar lebih dari 10%, mikroba akan mengalami lisis karena pengaruh dari alkohol tersebut.

Proses fermentasi dapat digolongkan sebagai berikut:

1. Fermentasi cair / Fermentasi bawah permukaan (*Submerged fermentation*)

Fermentasi ini melibatkan air sebagai fase kontinyu, baik sumber karbon maupun mineral, terlarut atau tersuspensi sebagai partikel-partikel dalam fase cair. Pada fermentasi cair dengan teknik tradisional tidak dilakukan pengadukan. Hal ini berbeda dengan teknik fermentasi cair modern menggunakan fermentor yang dilengkapi dengan pengaduk agar medium tetap homogen, aerasi, pengatur suhu (pendinginan dan pemanasan), dan pengaturan pH.

Fermentasi ini dapat dibagi menjadi 3 macam metode:

- *Batch process* (proses curah), yaitu fermentasi dengan cara memasukkan media dan inokulum secara bersamaan ke dalam bioreaktor dan pengambilan produk dilakukan pada akhir fermentasi.
- *Fed-batch* (gabungan proses curah dengan kontinyu), yaitu fermentasi dengan cara memasukkan sebagian sumber nutrisi ke dalam bioreaktor dengan volume tertentu hingga diperoleh produk yang

mendekati maksimal, akan tetapi konsentrasi sumber nutrisi dibuat konstan.

- *Continuous process* (proses sinambung/ kontinyu), yaitu fermentasi yang dilakukan dengan cara pengaliran substrat dan pengambilan produk dilakukan secara terus-menerus (sinambung) setiap saat setelah diperoleh konsentrasi produk maksimal atau substrat pembatasnya mencapai konsentrasi yang hampir tetap.

Keuntungan dari fermentasi cair adalah sebagai berikut:

- Hampir disemua bagian bioreaktor terjadi fermentasi
- Selalu terjadi kontak antara reaktan dan mikroorganisme

Kelemahan dari fermentasi ini adalah membutuhkan biaya operasi yang relatif mahal.

2. Fermentasi media padat (*Solid state fermentation*)

Fermentasi media padat merupakan proses fermentasi yang berlangsung dalam substrat tidak larut, namun mengandung air yang cukup meskipun tidak mengalir bebas. *Fermentasi ini* mempunyai kandungan nutrisi per volum jauh lebih pekat sehingga hasil per volum dapat lebih besar.

Keuntungan dari fermentasi ini:

- Medium yang digunakan relatif sederhana
- Ruang yang diperlukan untuk peralatan fermentasi relatif kecil, karena air yang digunakan sedikit.
- Inokulum dapat disiapkan secara sederhana

- Kondisi medium tempat pertumbuhan mikroba mendekati kondisi habitat alaminya
- Aerasi dihasilkan dengan mudah karena ada ruang di antara tiap partikel substratnya
- Produk yang dihasilkan dapat dipanen dengan mudah

Faktor-faktor yang mempengaruhi fermentasi ini adalah sebagai berikut:

- Kadar air
Kadar optimum tergantung pada substrat, organisme dan tipe produk akhir. Kisaran kadar air yang optimal adalah 50-75%. Kadar air yang tinggi akan mengakibatkan penurunan porositas, pertukaran gas, difusi oksigen, volume gas, tetapi meningkatkan resiko kontaminasi dengan bakteri.
- Temperatur
Temperatur berpengaruh pada laju reaksi biokimia selama proses fermentasi.
- Pertukaran gas
Pertukaran gas antara fase gas dengan substrat padat mempengaruhi proses fermentasi.

2.13 Imobilisasi sel

Imobilisasi sel adalah suatu metode bioteknologi yang memanfaatkan mikroorganisme dengan membatasi ruang geraknya. Imobilisasi dapat

dilakukan dengan berbagai cara, antara lain melalui adsorpsi permukaan suatu bahan pendukung, ikatan kovalen antara sel dengan suatu senyawa anorganik, pengikatan silang intermolekuler antara sel dengan bahan pendukung, atau dengan cara menjebak sel di dalam gel atau membran polimer.⁵ Beberapa keuntungan penggunaan sel imobil dibandingkan sel non imobil (sel bebas) antara lain meningkatkan hasil fermentasi, mempermudah pemisahan hasil fermentasi dari substrat dan sel mikroorganisme, serta pemakaian ulang sel sehingga menghemat biaya produksi.

Teknik imobilisasi banyak digunakan pada proses fermentasi kontinyu. Keunggulan teknik immobilisasi sel pada fermentasi kontinyu yaitu dapat meningkatkan produktivitas volumetrik, meningkatkan konsentrasi produk dalam aliran keluaran dan mampu menurunkan konsentrasi substrat dalam aliran keluaran. Banyak tipe fermentor yang digunakan dalam proses kontinyu, salah satunya adalah *packed-bed bioreactor* yang populer karena pengoperasian yang murah dan biaya operasi yang rendah. Penggunaan teknik imobilisasi sel pada sistem fermentor adalah untuk mempertahankan mikroorganisme supaya tetap berada dalam fermentor.

BAB III

METODE PENELITIAN

Proses produksi bioetanol dibagi dalam tiga tahap yaitu delignifikasi, hidrolisis, dan fermentasi. Delignifikasi dilakukan untuk mengurangi kadar lignin dalam sampel. Selanjutnya dilakukan proses hidrolisis sehingga diperoleh hidrolisat yang akan difermentasi. Proses hidrolisis dan fermentasi melibatkan mikroorganisme.

3.1 BAHAN – BAHAN

3.1.1 Mikroorganisme

Mikroorganisme yang digunakan pada penelitian ini adalah *Trichoderma viride* dan *Saccharomyces cerevisiae* dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian IPB. Biakan *Trichoderma viride* maupun *Saccharomyces cerevisiae* dipelihara dan diperbanyak pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA). Media tersebut diperbaharui setiap 30 hari.

3.1.2 Substrat dan Bahan Kimia

Substrat yang digunakan pada penelitian ini adalah jerami padi yang berasal dari daerah Madiun, Jawa Tengah. Bagas tebu diperoleh dari pedagang sari tebu di sekitar Depok. Tanaman tebu ini dipasok dari daerah

Tegal, Jawa Tengah. Air limbah tahu dan air cucian kedelai diperoleh dari pabrik tahu di daerah Depok. Sampel jerami dan bagas didelignifikasi menggunakan larutan NaOH 3 %.

Media aktivasi *Trichoderma viride* terdiri dari CMC (*carboxymethyl cellulose*) (10g/L) sebagai substrat, KH_2PO_4 (2 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (3 g/L), urea (0.3 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1.4 g/L), CaCl_2 (4 g/L), dan pepton (1 g/L). Media produksi *Trichoderma viride* terdiri dari bahan dan komposisi yang sama dengan media aktivasi *Trichoderma viride*, namun CMC diganti dengan sampel jerami dan bagas.

Pada fermentasi oleh *Saccharomyces cerevisiae* terimobilisasi, digunakan Na alginat dari Merck dan CaCl_2 1,5 %. Media aktivasi *Saccharomyces cerevisiae* terdiri dari glukosa (4g/L) sebagai sumber karbon, *yeast extract* (1 g/L), KH_2PO_4 (2 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1 g/L), dan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (4 g/L). Media produksi *Saccharomyces cerevisiae* terdiri dari bahan dan komposisi yang sama dengan media aktivasi *Saccharomyces cerevisiae*, namun glukosa diganti dengan hidrolisat hasil hidrolisis oleh *Trichoderma viride*.

Konsentrasi gula pereduksi dalam hidrolisat ditentukan dengan metode Somogyi Nelson menggunakan ZnSO_4 (0,3 M), $\text{Ba}(\text{OH})_2$ (0,3 M), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Na_2CO_3 anhidrat, K-Na tartrat, Na_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (ammonium molibdat), H_2SO_4 pekat, dan $(\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$ Na arsenat.

3.2 Peralatan yang digunakan

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini adalah sebagai berikut: peralatan gelas, blender, timbangan analisis, alat sentrifugasi, desikator, pH meter, oven, autoklaf, jarum ose dan pembakar spiritus, *shaker incubator*, vortex, *hot plate*, Shimadzu UV-VIS Spectrophotometer 2450, Shimadzu Gas Chromatograph GC-9A dengan detektor FID dan kolom PEG.

3.3 Prosedur kerja

3.3.1 Persiapan sampel (substrat)

Sampel bagas dan jerami dicuci kemudian dikeringkan dalam oven selama 24 jam pada suhu 60-70 °C untuk mendapatkan kadar air maksimal 10 %. Sampel dihaluskan sehingga ukuran partikel lebih seragam, kemudian sampel disimpan dalam desikator.

3.3.2 Delignifikasi sampel (substrat)

Sampel jerami dan bagas dicampurkan ke dalam larutan NaOH 3 % dengan perbandingan 1:10 (g/mL). Campuran tersebut dipanaskan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 30 menit, didinginkan, selanjutnya filtrat dipisahkan dari endapan. Endapan yang diperoleh akan digunakan sebagai substrat untuk proses hidrolisis. Substrat dicuci dengan air suling sampai air

cucian netral, dikeringkan dalam oven pada suhu 60-70°C selama 24 jam, kemudian disimpan dalam desikator.

3.3.3 Pembuatan media pemeliharaan *Trichoderma viride* dan *Saccharomyces cerevisiae*

Trichoderma viride dan *Saccharomyces cerevisiae* dipelihara pada media agar miring *potato dextrose agar* (PDA). Media tersebut dibuat dengan melarutkan PDA dalam air suling dengan konsentrasi 39 g/L. Selanjutnya, media dipanaskan hingga larut sempurna, didinginkan, ditempatkan dalam tabung reaksi, dan diletakkan dengan posisi miring.

3.3.4 Pembuatan biakan sediaan dan biakan kerja *Trichoderma viride* dan *Saccharomyces cerevisiae*

Biakan sediaan dan biakan kerja *Trichoderma viride* maupun *Saccharomyces cerevisiae* dibuat dengan menginokulasikan sel biakan asli pada sejumlah agar miring yang disebut dengan kultur. Kultur *Trichoderma viride* diinkubasi pada suhu 28-30°C (suhu kamar) selama 5 hari, sedangkan *Saccharomyces cerevisiae* diinkubasi selama 2 hari pada suhu kamar. Untuk biakan sediaan, kultur disimpan pada suhu 4°C sampai digunakan kembali.

3.3.5 Pembuatan suspensi sel *Trichoderma viride* dan *Saccharomyces cerevisiae*

Sebanyak 10 mL air suling steril dimasukkan ke dalam tabung biakan kerja. Seluruh bagian sel dikeruk dengan menggunakan ose, hingga terbentuk suspensi.

3.3.6 Hidrolisis substrat selulosa oleh *Trichoderma viride*

3.3.6.1 Pembuatan media aktivasi untuk *starter*

Media aktivasi dibuat dengan melarutkan CMC (*carboxymethyl cellulose*) (10 g/L) yang digunakan sebagai substrat, KH_2PO_4 (2 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (3 g/L), urea (0.3 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1.4 g/L), CaCl_2 (4 g/L), dan pepton (1 g/L) ke dalam sejumlah air suling, diatur pada pH 4,5, dan disterilisasi dengan autoklaf. *Starter* dibuat dengan menginokulasikan suspensi sel sebanyak 10 % ke dalam media aktivasi. Selanjutnya, *starter* tersebut diinkubasi dalam *shaker incubator* selama 48 jam pada suhu 30°C dengan kecepatan 130 rpm.

3.3.6.2 Pembuatan media produksi

Media produksi dibuat dengan cara dan komposisi yang sama dengan media aktivasi. Namun, substrat CMC diganti dengan substrat selulosa sampel bagas maupun jerami. Media produksi kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf.

3.3.6.3 Proses hidrolisis substrat

Pada penelitian ini, dilakukan optimasi kondisi hidrolisis dengan membuat variasi konsentrasi substrat selulosa jerami dan bagas, yaitu 2,5 %, 5 %, 7,5 %, dan 10 %, serta variasi sumber nitrogen yang berasal dari urea, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KNO_3 , air limbah tahu, dan air cucian kedelai dengan konsentrasi 3 g/L.

Proses hidrolisis dilakukan dengan mencampurkan *starter* sebanyak 10 % ke dalam media produksi. Campuran tersebut diinkubasi dalam *shaker incubator* selama 48 jam pada suhu 30°C dengan kecepatan 130 rpm. Hidrolisat diambil untuk ditentukan kadar gula pereduksinya.

3.3.7 Penentuan kadar gula pereduksi dengan menggunakan metode Somogyi-Nelson

3.3.7.1 Pembuatan pereaksi tembaga alkali

Pereaksi tembaga alkali dibuat dengan melarutkan 4 gram $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 24 gram Na_2CO_3 anhidrat, 16 gram K-Na tartrat dan 180 gram Na_2SO_4 dalam air suling, selanjutnya diencerkan sampai 1 liter.

3.3.7.2 Pembuatan pereaksi arsenomolibdat

Pembuatan pereaksi arsenomolibdat adalah sebagai berikut:

1. 100 gram ammonium molibdat dilarutkan dalam 1.8 L air suling. 84 mL H_2SO_4 pekat dimasukkan secara perlahan-lahan sambil diaduk.

2. 12 gram Na arsenat dilarutkan dalam 100 mL air suling.

Larutan 1 dicampur dengan larutan 2 kemudian diencerkan sampai 2 L

Campuran diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, selanjutnya disimpan dalam botol plastik coklat.

3.3.7.3 Langkah kerja metode Somogyi-Nelson

Sebanyak 0,5 mL hidrolisat ditambahkan 1,5 mL air, kemudian ditambahkan 0,5 mL Ba(OH)₂ 0,3 M dan 0,5 mL ZnSO₄ 0,3 M. Campuran diaduk dan disentrifugasi. Selanjutnya 1 mL supernatan yang diperoleh, dicampur dengan pereaksi tembaga alkali lalu dipanaskan dalam air mendidih selama 15 menit. Larutan tersebut didinginkan pada suhu ruang, kemudian ditambahkan 1 mL pereaksi arsenomolibdat, dikocok sampai tidak timbul gelembung, diencerkan sampai 10 mL, dan diukur absorbansinya dengan UV pada panjang gelombang 520 nm. Kadar gula pereduksi dihitung menggunakan kurva absorbansi terhadap konsentrasi yang dibuat dari larutan standar glukosa dengan kadar 0,02-0,5 mg/mL.

3.3.8 Fermentasi hidrolisat untuk produksi etanol oleh pembuatan *Saccharomyces cerevisiae* terimobilisasi

3.3.8.1 Pembuatan media aktivasi untuk *starter*

Media aktivasi *Saccharomyces cerevisiae* dibuat dengan melarutkan glukosa (1 g/L), *yeast extract* (1 g/L), KH₂PO₄ (2 g/L), MgSO₄·7H₂O (1 g/L)

dan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (4 g/L) ke dalam sejumlah air suling, diatur pada pH 4, dan disterilisasi dengan autoklaf. *Starter* dibuat dengan menginokulasikan suspensi sel sebanyak 10 % ke dalam media aktivasi. Selanjutnya, *starter* tersebut diinkubasi dalam *shaker incubator* selama 48 jam pada suhu 30°C dengan kecepatan 130 rpm.

3.3.8.2 Pembuatan sel imobil

Sel imobil dibuat dengan menambahkan *starter* ke dalam larutan Na alginat dengan perbandingan 1:1, kemudian meneteskannya ke dalam larutan CaCl_2 1,5 %, didiamkan 15 menit hingga terbentuk butiran-butiran gel Ca alginat yang mengandung sel *Saccharomyces cerevisiae*.

3.3.8.3 Pembuatan media produksi

Media produksi dibuat dengan cara dan komposisi yang sama dengan media aktivasi, namun glukosa diganti dengan hidrolisat hasil hidrolisis oleh *Trichoderma viride*. Media produksi kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf.

3.3.8.4 Proses fermentasi hidrolisat

Pada penelitian ini, dilakukan perbandingan etanol hasil fermentasi oleh *Saccharomyces cerevisiae* yang terimobilisasi dan tanpa imobilisasi. Untuk mengetahui pengaruh kepadatan atau kekerasan sel imobil terhadap produksi etanol, dilakukan variasi konsentrasi Na alginat, yaitu 2%, 4%, 6%,

dan 8%. Semakin besar konsentrasi Na alginat, semakin padat gel-gel Ca alginat (sel imobil) yang terbentuk.

Proses fermentasi menggunakan teknik imobilisasi dilakukan dengan mencampurkan sel imobil *Saccharomyces cerevisiae* sebanyak 10 % ke dalam media produksi. Media produksi tersebut kemudian diinkubasi dalam *shaker incubator* selama 5x24 jam pada suhu 30°C dengan kecepatan 130 rpm. Setiap 24 jam hasil fermentasi diambil untuk penentuan kadar etanol.

Proses fermentasi tanpa imobilisasi dilakukan dengan mencampurkan langsung *starter* sebanyak 10% ke dalam media produksi. Campuran tersebut kemudian diinkubasi dalam *shaker incubator* selama 5x24 jam pada suhu 30°C dengan kecepatan 130 rpm. Setiap 24 jam hasil fermentasi diambil untuk penentuan kadar etanol.

Pada penelitian ini, dilakukan pengujian terhadap ketahanan sel imobil dengan melakukan beberapa kali fermentasi menggunakan sel imobil yang sama pada kondisi fermentasi yang sama. Setelah fermentasi pertama selesai, sel imobil dipisahkan dan langsung dimasukkan ke dalam media fermentasi yang baru untuk fermentasi berikutnya. Perlakuan ini diulangi sebanyak dua kali dan dianalisis kadar etanol yang dihasilkan pada setiap pengulangan fermentasi.

3.3.9 Penentuan konsentrasi etanol

Hasil fermentasi diambil dan disentrifugasi selama 15 menit dalam tabung *centrifuge* tertutup, diambil filtratnya. Konsentrasi etanol pada filtrat

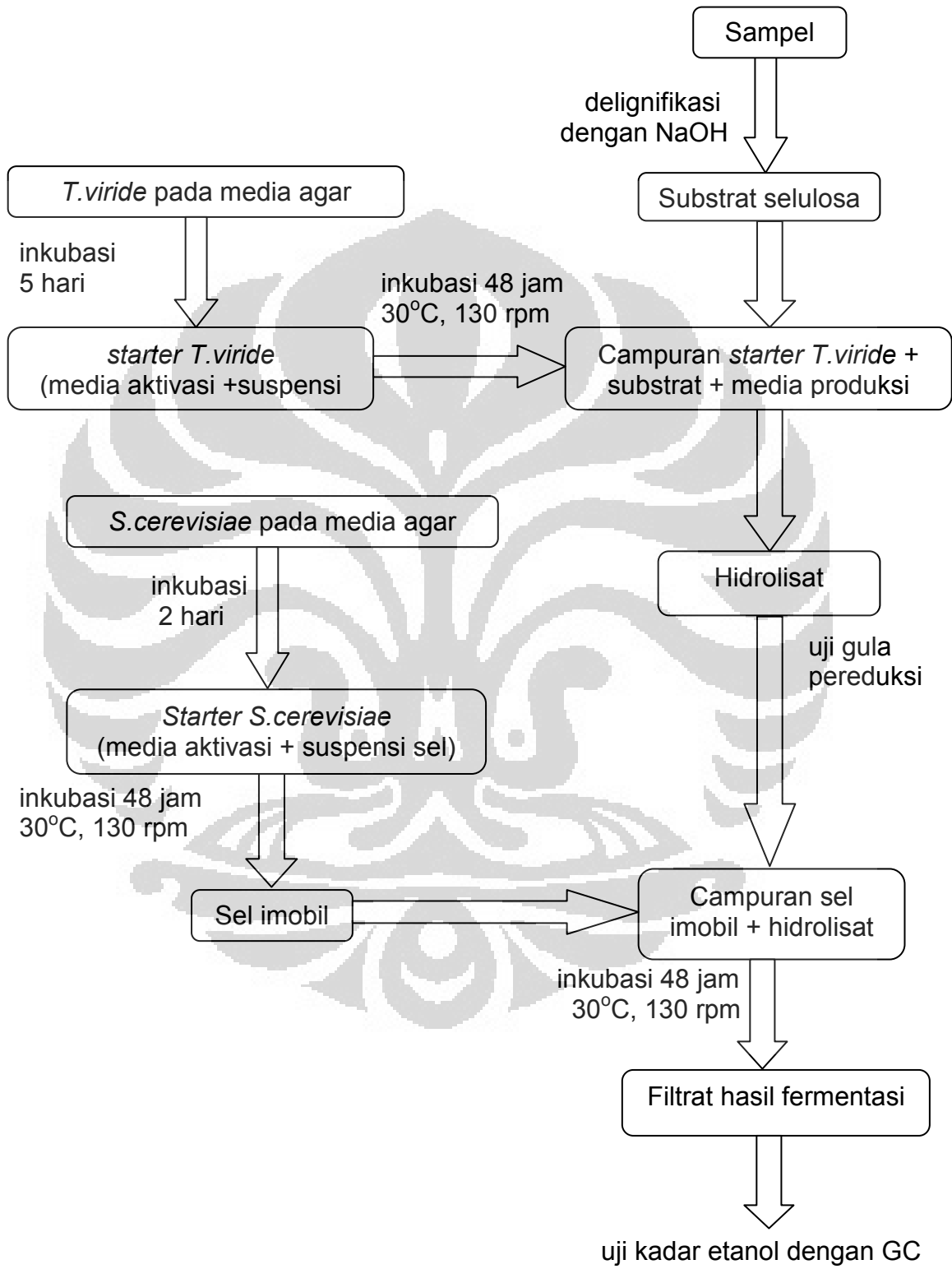
tersebut diukur dengan Kromatografi Gas GC-9A Shimadzu dengan suhu kolom 140°C dan suhu injektor 160°C . Sebelum filtrat hasil fermentasi diinjeksikan ke dalam kolom GC, larutan standar terlebih dahulu diukur sebagai dasar perhitungan konsentrasi etanol.

3.3.10 Penentuan jumlah sel dengan metode kamar hitung

(*counting chamber*)

Penentuan jumlah sel, baik *Trichoderma viride* maupun *Saccharomyces cerevisiae* dilakukan dengan menggunakan metode kamar hitung, sebelum *Trichoderma viride* diinokulasikan ke dalam media produksi hidrolisis dan *Saccharomyces cerevisiae* diinokulasikan ke dalam media produksi fermentasi. Jumlah sel *Trichoderma viride* per mL adalah $4,4 \times 10^7$, sedangkan jumlah sel *Saccharomyces cerevisiae* per mL adalah $8,6 \times 10^7$.

3.3.11 Bagan kerja



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Persiapan sampel dan delignifikasi

Jerami dan bagas, sebelum digunakan sebagai substrat, dihaluskan terlebih dahulu untuk memperluas permukaan partikel substrat sehingga lebih mudah didegradasi. Kadar air pada sampel maksimal 10 % untuk mencegah tumbuhnya jamur pada saat penyimpanan, yang dapat mengurangi nutrisi dari substrat tersebut.

Jerami dan bagas digunakan sebagai substrat pada produksi bioetanol karena kandungan selulosa yang tinggi dalam bahan tersebut (data di sub bab 2.2.3 dan 2.3.3). Akan tetapi, keberadaan lignin merupakan faktor utama penghambat proses degradasi selulosa menjadi glukosa. Oleh karena itu, dilakukan suatu tahap delignifikasi yang diharapkan mampu meningkatkan produksi glukosa hasil hidrolisis substrat selulosa.

Delignifikasi menggunakan larutan NaOH 3 % disertai pemanasan memungkinkan terjadinya saponifikasi pada ikatan ester dari residu lignin serta membuat struktur hemiselulosa menjadi lebih terbuka. Dengan begitu, selulosa lebih mudah kontak dengan enzim, sehingga lebih cepat terhidrolisis menjadi glukosa. Selain itu, delignifikasi juga dapat menurunkan derajat polimerisasi dan kristalinitas dari struktur selulosa.²⁶

Delignifikasi ini memungkinkan hemiselulosa ikut terhidrolisis, karena strukturnya yang amorf dan tidak teratur. Gula-gula hasil hidrolisis

hemiselulosa akan larut dalam air, sehingga diasumsikan glukosa yang diperoleh dari proses hidrolisis hanya berasal dari selulosa.

4.2 Penggunaan kapang *Trichoderma viride*

Pada penelitian ini, proses hidrolisis jerami dan bagas menggunakan kapang *Trichoderma viride* yang memiliki kemampuan menghasilkan enzim selulolitik untuk menghidrolisis selulosa, sehingga harus diperhatikan kondisi optimum agar kapang dapat hidup dan tumbuh. Kapang ini cenderung hidup dalam suasana asam dengan pH sekitar 4 - 6. Kompleks enzim selulase yang terdapat pada *Trichoderma viride* seperti endoglukanase dan eksoglukanase memiliki komponen asam amino yang memiliki sifat asam lebih dominan. Asam amino seperti asam aspartat dan asam glutamat terkandung masing-masing sekitar 19,6% dan 20,9% pada endoglukanase dan eksoglukanase. Oleh karena itu, jamur ini lebih stabil bekerja pada rentang pH asam.²⁷ Penelitian lainnya membuktikan pH optimum pertumbuhan kapang *Trichoderma viride* adalah pH 4,5.²⁸ Oleh karena itu, pada penelitian ini, baik media aktivasi maupun media produksi untuk pertumbuhan kapang diatur pada pH 4,5.

Selanjutnya, untuk mempercepat proses hidrolisis, sel-sel kapang diaktivasi terlebih dahulu pada suatu media aktivasi dengan CMC (*carboxymethyl cellulose*) sebagai sumber karbonnya. CMC adalah eter polimer selulosa linear yang larut dalam air. Sel-sel kapang mengalami fase lag atau adaptasi pada media aktivasi dan setelah mencapai fase log, sel

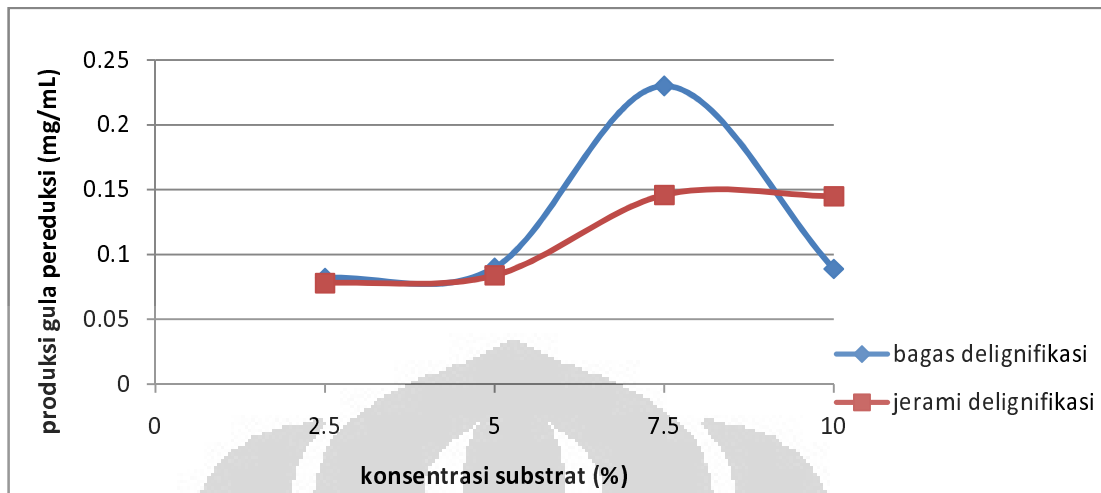
kapang siap dimasukkan ke dalam media produksi dengan substrat selulosa jerami ataupun bagas sebagai sumber karbonnya. Selain sebagai sumber karbon, CMC merupakan induser yang dapat menginduksi pembentukan enzim selulase, karena enzim selulase bersifat induktif dan ekstraselular.

Media yang digunakan pada proses hidrolisis terdiri dari sumber karbon yang berasal dari substrat selulosa jerami maupun bagas, sumber nitrogen berasal dari urea dan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, dan mineral berasal dari KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Penambahan pepton pada media bertujuan untuk mempersingkat fasa lag (adaptasi), sehingga enzim selulase yang bersifat ekstraselular lebih cepat diproduksi dan proses hidrolisis selulosa menjadi lebih cepat.²⁹ Untuk menghitung jumlah sel pada fasa log, dilakukan metode kamar hitung (*counting chamber*) agar pada setiap proses hidrolisis jumlah sel dapat dibuat konstan. Jumlah sel *Trichoderma viride* per mL adalah $4,4 \times 10^7$ sel.

4.3 Proses hidrolisis oleh *Trichoderma viride*

4.3.1 Pengaruh konsentrasi substrat

Besarnya konsentrasi substrat berpengaruh terhadap produksi enzim selulase. Konsentrasi optimum untuk pertumbuhan jamur *Trichoderma viride* adalah pada konsentrasi 7,5 %, menghasilkan gula pereduksi 0,230 mg/mL dari selulosa bagas dan 0,146 mg/mL dari selulosa jerami.

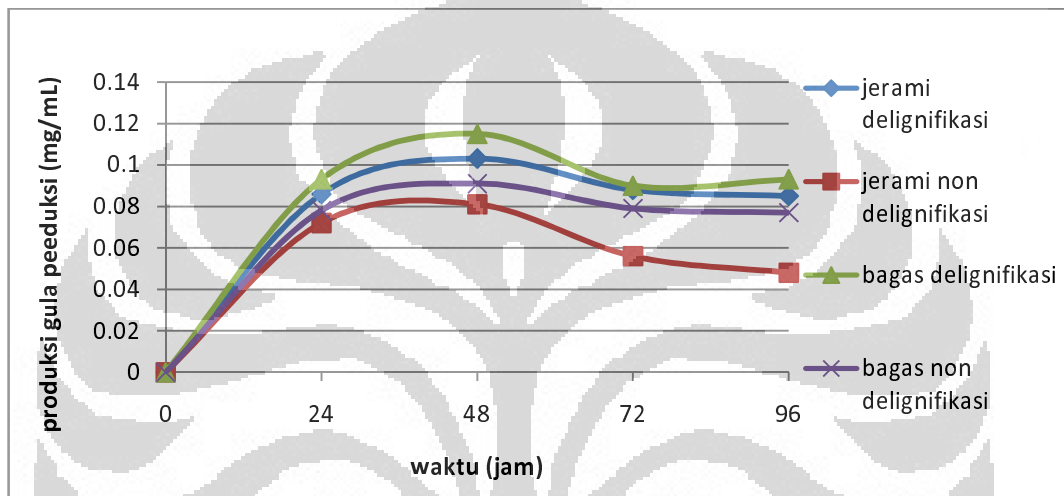


Gambar 4.1 Pengaruh konsentrasi substrat terhadap produksi gula pereduksi

Pada Gambar 4.1 dapat dilihat kadar gula pereduksi pada berbagai konsentrasi substrat jerami dan bagas. Penurunan kadar gula pereduksi terjadi pada konsentrasi lebih dari 7,5 %. Hal ini kemungkinan disebabkan karena *Trichoderma viride* yang bersifat aerob tumbuh kurang baik pada media yang terlalu pekat, sehingga menyebabkan oksigen terlarut rendah. Hal tersebut terlihat secara jelas pada saat konsentrasi substrat 10 %. Gula pereduksi yang diproduksi jerami lebih besar dibandingkan bagas, sebab partikel-partikel bagas menempati volume yang lebih besar dibanding jerami. Akibatnya, kepekatan substrat bagas dalam media, lebih besar dibandingkan jerami, sehingga oksigen terlarutnya pun lebih rendah.

4.3.2 Pengaruh delignifikasi substrat

Pada Gambar 4.2 dapat dilihat konsentrasi gula pereduksi dalam hidrolisat substrat yang didelignifikasi dan tanpa delignifikasi dalam selang waktu 24 jam selama 4 hari.



Gambar 4.2 Pengaruh delignifikasi terhadap produksi gula pereduksi

Pada percobaan ini, konsentrasi substrat yang digunakan baik substrat jerami maupun bagas, yang didelignifikasi maupun tanpa delignifikasi adalah 7,5 %. Konsentrasi tersebut adalah konsentrasi optimum untuk mendapatkan kadar gula pereduksi tertinggi.

Dari hasil pengamatan selama 4 x 24 jam, baik jerami maupun bagas, kadar gula pereduksi tertinggi diperoleh dari substrat yang didelignifikasi pada waktu inkubasi 48 jam. Pada kondisi optimum tersebut, jerami padi menghasilkan gula pereduksi dengan konsentrasi 0,103 mg/mL, sedangkan bagas menghasilkan gula pereduksi yang lebih banyak yaitu 0,115 mg/mL.

Nilai ini lebih besar dibandingkan substrat tanpa delignifikasi. Jerami non-delignifikasi menghasilkan gula pereduksi dengan konsentrasi 0,081 mg/mL, sedangkan bagas non-delignifikasi 0,091 mg/mL. Hal ini berarti delignifikasi meningkatkan kadar gula pereduksi pada bagas sebanyak 26,37%, dan pada jerami 27,16 %.

Bila proses hidrolisis telah melampaui waktu optimumnya dan produksi gula pereduksi semakin meningkat, produk gula tersebut akan menghambat kerja enzim selulase. Saat produk gula pereduksi dihasilkan dalam jumlah yang banyak, sel akan menghentikan metabolisme dan mengurangi produksi enzim karena ketersediaan gula pereduksi meningkat.³⁰ Selain itu, produksi gula pereduksi yang berlebih, dapat dimanfaatkan atau dikonsumsi kembali oleh *Trichoderma viride*.

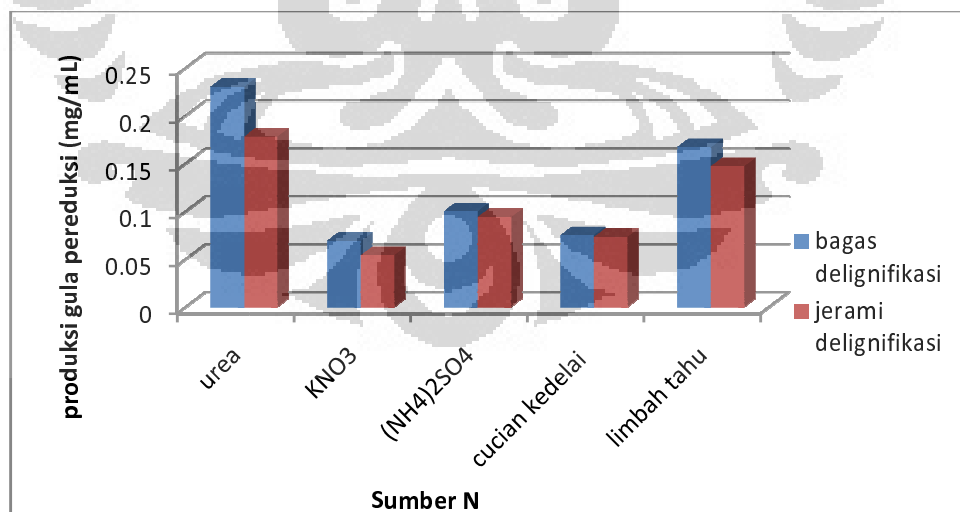
4.3.3 Pengaruh sumber nitrogen

Salah satu komponen yang mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme adalah unsur nitrogen. Umumnya, penelitian-penelitian yang melibatkan mikroorganisme, menggunakan urea atau $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sebagai sumber N dalam media. Bahan-bahan tersebut bila digunakan dalam skala besar akan membutuhkan biaya yang tidak sedikit. Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan variasi sumber N.

Sumber N divariasikan berasal dari urea, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KNO_3 , air limbah tahu dan air cucian kedelai. Air limbah tahu dan air cucian kedelai

merupakan limbah dari pabrik tahu yang mengandung unsur N, mudah didapatkan, dan murah. Air limbah tahu adalah air bekas pemasakan kacang kedelai. Pada proses pemasakan tersebut, kemungkinan besar banyak asam amino yang terdapat pada kacang kedelai terdenaturasi karena panas yang tinggi, sehingga terbawa dalam air limbah tersebut. Air cucian kedelai adalah air yang digunakan untuk mencuci kacang kedelai sebelum diolah lebih lanjut. Oleh karena itu, dapat diperkirakan kadar N dalam air limbah tahu lebih banyak dibanding air cucian kedelai.

Konsentrasi sumber N yang digunakan dalam media produksi *Trichoderma viride* yaitu 0,3 g/L. Oleh karena itu, sebelum digunakan, air limbah tahu dan air cucian kedelai dipanaskan terlebih dahulu dalam oven untuk menguapkan air sehingga hanya tersisa residu yang mengandung unsur N.



Gambar 4.3 Pengaruh sumber N terhadap produksi gula pereduksi

Pada Gambar 4.3 dapat dilihat kadar gula pereduksi yang dihasilkan dari hidrolisis substrat dengan berbagai variasi sumber N. Dari data tersebut, konsentrasi gula pereduksi tertinggi dihasilkan dari urea, yaitu 0,230 mg/mL dari substrat bagas dan 0,178 mg/mL dari substrat jerami.

Dari data tersebut, konsentrasi gula pereduksi yang dihasilkan pada hidrolisis menggunakan air limbah tahu, cukup tinggi yaitu 0,167 mg/mL dari substrat bagas dan 0,147 mg/mL dari substrat jerami. Oleh karena itu, air limbah tahu berpotensi sebagai sumber N untuk pertumbuhan *Trichoderma viride*.

4.4 Penggunaan khamir *Saccharomyces cerevisiae* terimobilisasi

Pada penelitian ini, teknik imobilisasi sel menggunakan Ca alginat sebagai sistem matriks yang mampu menjebak sel *Saccharomyces cerevisiae*. Ca alginat menjadi pilihan karena sifatnya yang ramah lingkungan, memiliki pori-pori yang mampu menjebak sel hidup tanpa membunuh sel tersebut karena tidak mempengaruhi metabolisme sel khamir.

Sebelum sel-sel *Saccharomyces cerevisiae* diimobilisasi, sel harus diperbanyak dan diaktivasi terlebih dahulu pada media cair yang mengandung sumber C, N dan mineral-mineral lain. Sumber karbon yang digunakan pada tahap aktivasi adalah glukosa, sumber nitrogen berasal dari $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, dan mineral berasal dari KH_2PO_4 dan $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Sama seperti sel-sel kapang *Trichoderma viride*, sel-sel khamir *Saccharomyces cerevisiae* mengalami fase lag atau adaptasi pada media

aktivasi dan setelah mencapai fase log, sel khamir siap dimasukkan ke dalam media produksi dengan hidrolisat yang mengandung gula perduksi sebagai sumber karbonnya. Pada fasa log, jumlah sel *Saccharomyces cerevisiae* per mL adalah $8,6 \times 10^7$.

4.5 Proses fermentasi oleh *Saccharomyces cerevisiae* terimobilisasi

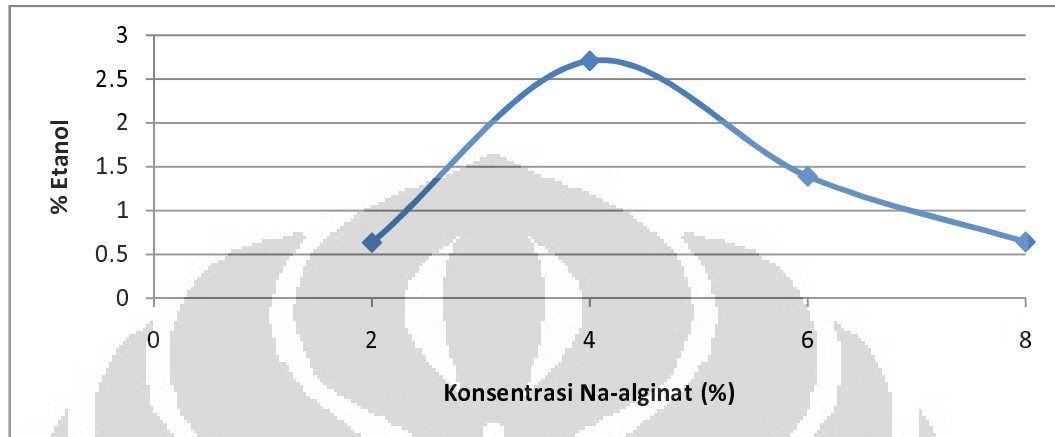
4.5.1 Pengaruh konsentrasi Na alginat

Sel imobil adalah sel *Saccharomyces cerevisiae* yang terperangkap dalam gel-gel Ca alginat. Gel Ca alginat dibuat dengan mencampurkan Na alginat dan sel *Saccharomyces cerevisiae* yang telah diaktivasi, dan meneteskan campuran tersebut ke dalam larutan CaCl_2 1,5 %. Kepadatan gel-gel Ca alginat yang terbentuk, dipengaruhi oleh konsentrasi Na alginat yang digunakan. Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan optimasi terhadap konsentrasi Na alginat, yaitu 2%, 4%, 6% dan 8 %. Semakin besar konsentrasi Na alginat maka gel-gel Ca alginat yang terbentuk semakin keras dan padat. Pada Gambar 4.4 dapat dilihat sel *Saccharomyces cerevisiae* yang terperangkap dalam gel Ca alginat.



Gambar 4.4 *Saccharomyces cerevisiae* terimobilisasi dalam gel alginat

Pengaruh konsentrasi Na alginat terhadap produksi etanol hasil fermentasi hidrolisat dapat dilihat pada Gambar 4.5.

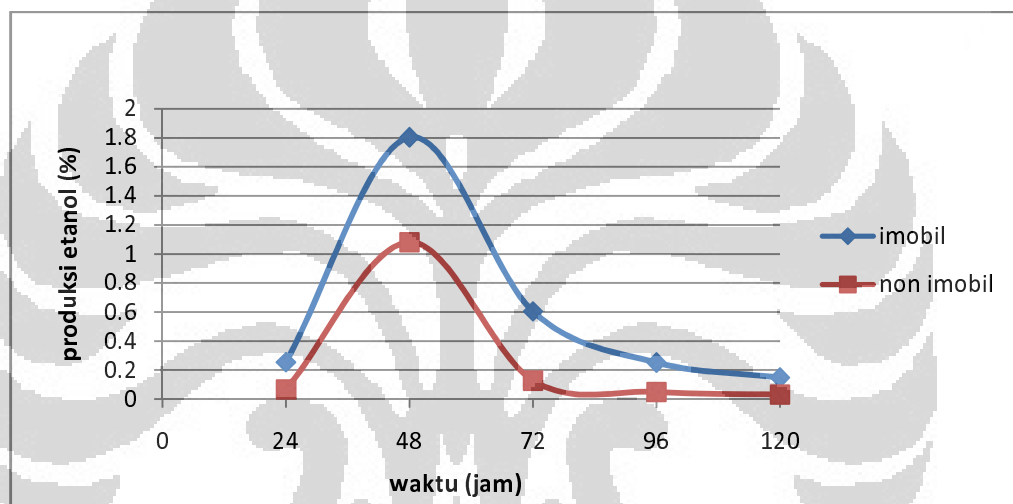


Gambar 4.5 Pengaruh konsentrasi Na alginat terhadap produksi etanol

Fermentasi menggunakan sel khamir yang terimobilisasi pada Ca alginat dengan konsentrasi Na alginat 4 % menghasilkan etanol tertinggi, yaitu sebesar 2,705 %. Dengan demikian konsentrasi Na alginat 4 % merupakan konsentrasi optimal yang menyebabkan pori-pori dan kerapatan dalam gel Ca alginat paling tepat bagi masuknya substrat dan keluarnya produk, serta memberikan ruang yang sesuai bagi aktivitas sel dalam melakukan proses fermentasi. Ruang yang terlalu luas untuk sel dapat menyebabkan pertumbuhan sel yang berlebihan sehingga menjadi *overload* dan tujuan imobilisasi tidak tercapai.⁴ Selain itu, pori-pori yang terlalu rapat akan memperkecil efisiensi difusi substrat dari gel sehingga menurunkan produksi etanol.⁴

4.5.2 Pengaruh imobilisasi sel

Pada percobaan ini, digunakan Na alginat dengan konsentrasi 4 % untuk membuat sel imobil. Konsentrasi etanol hasil fermentasi, baik dengan imobilisasi maupun tanpa imobilisasi, yang diamati dalam selang waktu 24 jam selama 5 hari dapat dilihat pada Gambar 4.6

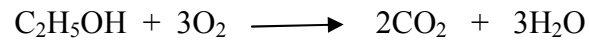


Gambar 4.6 Pengaruh imobilisasi terhadap produksi etanol

Dari grafik diatas, kadar etanol tertinggi mencapai 1,802 % pada waktu fermentasi 48 jam oleh sel imobil *Saccharomyces cerevisiae*. Pada 48 jam pertama, khamir mulai menggunakan glukosa hasil hidrolisis sebagai sumber karbon melalui jalur glikolisis menghasilkan piruvat yang kemudian terdekarboksilasi menjadi asetaldehid dan tereduksi menjadi etanol.

Dari grafik diatas, setelah melewati 48 jam terjadi penurunan konsentrasi etanol yang signifikan. Hal tersebut mungkin disebabkan karena

persediaan glukosa yang telah habis, sehingga *Saccharomyces cerevisiae* mengoksidasi etanol menjadi CO₂ dan H₂O melalui jalur respiratif untuk menghasilkan energi.



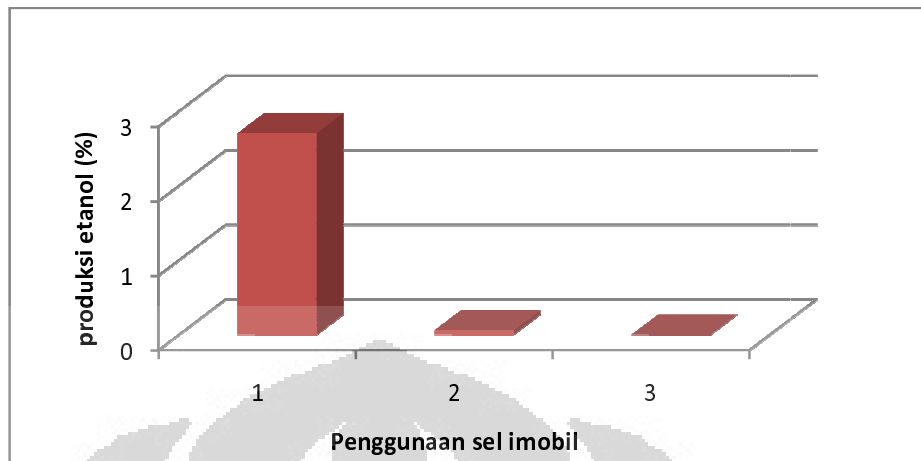
Konsentrasi etanol yang dihasilkan oleh sel imobil lebih besar dibandingkan oleh sel non-imobil. Imobilisasi sel membuat sel menjadi tidak bergerak atau berkurang ruang geraknya sehingga sel menjadi terhambat pertumbuhannya dan substrat yang diberikan hanya digunakan untuk menghasilkan produk.⁴



Gambar 4.7 hasil fermentasi oleh sel non imobil (kiri) dan sel imobil (kanan)

4.5.3 Pengaruh penggunaan berulang sel imobil

Pada penelitian ini, dilakukan fermentasi beberapa kali menggunakan sel imobil yang sama dengan kondisi yang sama. Pada Gambar 4.8 dapat dilihat pengaruh penggunaan berulang sel imobil dalam fermentasi terhadap etanol yang dihasilkan.



Gambar 4.8 Pengaruh penggunaan berulang sel imobil terhadap produksi etanol

Pada pemakaian sel imobil yang pertama kali, etanol yang dihasilkan mencapai konsentrasi 2,705%. Pada pemakaian kedua kali, konsentrasi etanol menurun hingga 0,060 % dan pada fermentasi ketiga kali, tidak terdeteksi lagi adanya etanol. Setelah 2 kali fermentasi terjadi penurunan produksi etanol sampai 97,78%. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh karena banyaknya sel-sel *Saccharomyces cerevisiae* yang telah mati sehingga tidak dapat lagi digunakan pada fermentasi selanjutnya.

Dari data-data yang ada, didapatkan bahwa pada kondisi optimum, baik pada hidrolisis maupun fermentasi, diperoleh etanol sebanyak 0,027 mL etanol dari 0,230 mg gula pereduksi hasil hidrolisis 0,075 g bagas. Artinya, tiap gram bagas dapat menghasilkan 3,067 mg gula pereduksi dari proses hidrolisis, dan menghasilkan 0,360 mL etanol dari proses fermentasi.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Bagas tebu dapat dimanfaatkan sebagai substrat selulosa untuk produksi bioetanol melalui proses hidrolisis oleh *Trichoderma viride*. Kondisi optimum untuk proses hidrolisis selulosa bagas diperoleh pada konsentrasi substrat 7,5% (b/v), dengan urea sebagai sumber nitrogen, dan waktu inkubasi 48 jam.

Konsentrasi etanol tertinggi diperoleh dari hidrolisat yang difermentasi oleh *Saccharomyces cerevisiae* terimobilisasi dalam gel Ca alginat dengan konsentrasi Na alginat 4% dan waktu inkubasi 48 jam.

5.2 Saran

1. Mencari metode delignifikasi lain yang lebih efektif dan lebih ramah lingkungan.
2. Melakukan aktivasi yang tepat terhadap *Trichoderma viride* sebelum digunakan pada media produksi.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mendapatkan produk etanol dengan konsentrasi yang lebih tinggi melalui metode fermentasi kontinyu.

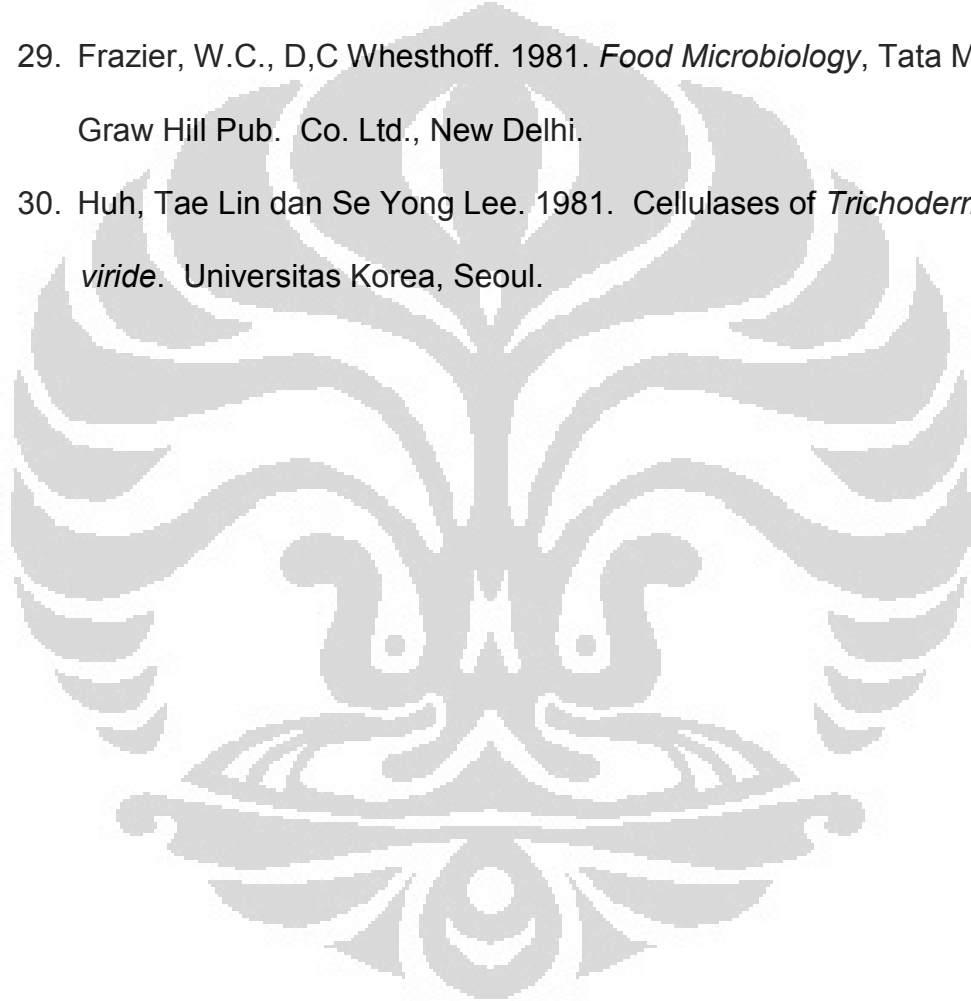
DAFTAR PUSTAKA

1. Wahyuningsih, N., Adiprasetya, R. 2008. *Pemanfaatan Energi Biomassa Sebagai Biofuel: Konsep Sinergi dengan Ketahanan Pangan*. Universitas Muhammadiyah. Yogyakarta.
2. “Biogasoline” (02 Maret 2009, pukul 11: 27)
(<http://www.pertamina.com>)
- 3 “Bio Ethanol Alternatif BBM. “ (Rabu, 11 Juni 2008, pukul 12: 23)
(<http://energibio.blogspot.com>)
- 4 Elevri, P.A., Putra, S. R. 2006. *Produksi Etanol Menggunakan Saccharomyces cerevisiae yang Diamobilisasi dengan Agar Batang*. FMIPA Institut Teknologi Surabaya, Surabaya.
- 5 Prakasham, R. S., Ramakrishna, S. V. 1998. *Microbial Fermentations with Immobilized Cells*, Lecture Handouts, Biochemical and Environmental Engineering, Indian Institute of Chemical Technology, India.
- 6 “Padi.” (09 Januari 2009, pukul 15: 43)
<http://id.wikipedia.org/wiki/Padi>
- 7 “Plant.” (28 Maret 2006, pukul 12: 27)
<http://www.plantanamor.com/index.php?plant>
8. “Padi dan manfaatnya” (19 April 2009)
<http://hifzhanberau.wordpress.com/2009/04/19/padi-dan-manfaatnya/>

9. Berita Resmi Statistik. 2006. "Produksi Jagung, Padi dan Kedelai",
Berita Resmi Statistik Volume 35/IX
10. Dewi, Kurnia Harlina. 2002. Hidrolisis Limbah Hasil Pertanian
Secara Enzimatik. Bandung.
11. "Produksi Furfural Dan Turunannya : Alternatif Peningkatan Nilai
Tambah Ampas Tebu Indonesia." (03 Maret 2005)
http://www.chem-istry.org/artikel_kimia/teknologi_tepat_guna
12. Ariantiningssi, Fransisca. Mutiara di Pantai Barat Aceh Program
Kampanye Bangga : Suaka Margasatwa Rawa Singkil. Hal 14
13. "Ampas Tebu." (14 April 2008)
<http://bioindustri.blogspot.com/2008/04/ampas-tebu.html>
14. Samsuri, M., M. Gozan., R. Mardias., M. Baiquni., H. Hermansyah.,
A. Wijanarko., B. Prasetya dan M. Nasikin. 2007. Pemanfaatan
Selulosa Bagas untuk Produksi Etanol melalui Fermentasi Serentak
dengan Enzim Xylanase, Depok.
15. Nelson, D. L. , Michael, M. C. 2005. *Principles of Biochemistry.*
Lehninger. Halaman 247-252. 5th Edition. WH Freeman and Company,
New York.
16. Der Reyden, D. Van. 1992. *Recent Scientific Research in Paper
Consevation.* J.Am. Inst. Conservation.31 (1) :117-138.
17. Nur Bayti, S. 2002. *Produksi dan Karakterisasi Selulase Penicillium
nalgiovense Laxa dari Sarang Rayap.* Karya Utama Magister Kimia.
FMIPA. Universitas Indonesia, Depok.

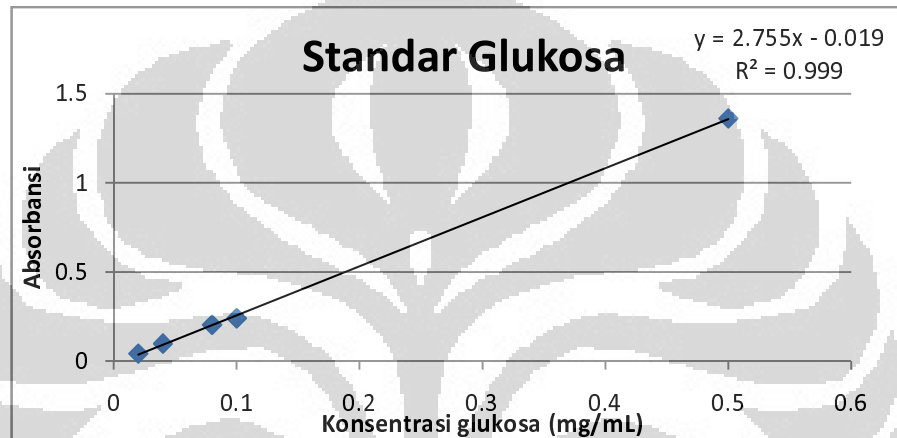
18. "Bioetanol dari lignoselulosa." (02 Maret 2002, pukul 11:23)
www.isroi.wordpress.com
19. "Cellulose." (23 Februari 2005, pukul 14:23)
<http://www.scientificpsychic.com/fitness/carbohydrates>
20. Pelczar, M. J., and R. D. Reid. 1974. *Microbiology*. McGraw Hill Book Company. New York.
21. Enari, T. M. 1983. *Microbial Enzymatic and Biotechnology*. W. M. Fogarty (ed). Applied Science Published London.
22. Alexopoulos, C.J. and C. W. Mims. 1979. *Introductory Mycology*. Third edition John Wiley and Sons. New York.
23. Judoamidjojo, M., A. Darwis, E. Gumbira. 1990. *Teknologi Fermentasi*. Pusat Antar Universitas Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
24. Wood, T. M. 1985. *Aspects of the Biochemistry of Cellulose Degradation*. p. 173-187. In. J. F. Kennedy, G. O. Phillips, D. J. Wedlock, and P. A. Williams (eds). *Cellulose and its Derivatives; Chemistry, Biochemistry and Applications*. Elsevier Horwood Limited, John Wiley and Sons. New York.
25. Sanger. 2004. Peptidase of *Saccharomyces cerevisiae* .
(20 Desember 2004)
<http://merops.sanger.ac.uk/speccards/peptidase/sp000895.htm> .
26. Kartika, B., A.D. Guritno, D. Purwadi, D. Ismoyowati. 1992. *Petunjuk Evaluasi Produk Industri Hasil Pertanian*. PAU Pangan dan Gizi UGM. Yogyakarta.

27. Kamara, Dian Siti. 2007. Degradasi Enzimatik Selulosa dari Batang Pohon Pisang untuk Produksi Glukosa dengan Bantuan Aktivitas Selulolitik *Trichoderma viride*. FMIPA, UNPAD, Bandung.
28. Amanda, Leona. 2006. Isolasi Selulase dari *Trichoderma viride* Menggunakan Substrat Kulit Gandum (*Bran*). FMIPA, UI, Depok.
29. Frazier, W.C., D,C Whesthoff. 1981. *Food Microbiology*, Tata Mc. Graw Hill Pub. Co. Ltd., New Delhi.
30. Huh, Tae Lin dan Se Yong Lee. 1981. Cellulases of *Trichoderma viride*. Universitas Korea, Seoul.



Lampiran 1. Standar glukosa :

Konsentrasi (mg/mL)	Absorbansi
0,02	0,042
0,04	0,098
0,08	0,203
0,10	0,240
0,50	1,361



Lampiran 2. Pengaruh konsentrasi substrat terhadap produksi gula pereduksi:

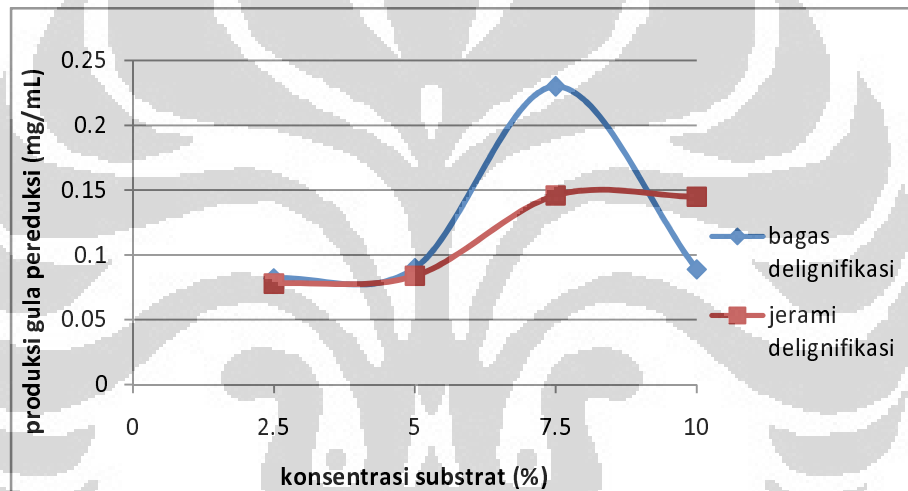
Konsentrasi Substrat dalam Media (%)	Absorbansi	
	Jerami Padi	Bagas Tebu
2,5	0,195	0,208
5,0	0,212	0,228
7,5	0,382	0,616
10,0	0,380	0,227

Nilai absorbansi dimasukkan ke dalam persamaan linier

$$y = 2,755 x - 0,019$$

Dengan y adalah absorbansi, maka dapat diketahui nilai x yang merupakan konsentrasi gula pereduksi (mg/mL)

Konsentrasi Sampel dalam Media (%)	Gula pereduksi (mg/mL)	
	Jerami Padi	Bagas Tebu
2,5	0,082	0,078
5,0	0,084	0,090
7,5	0,146	0,230
10,0	0,145	0,089



Lampiran 3. Pengaruh delignifikasi terhadap produksi gula pereduksi

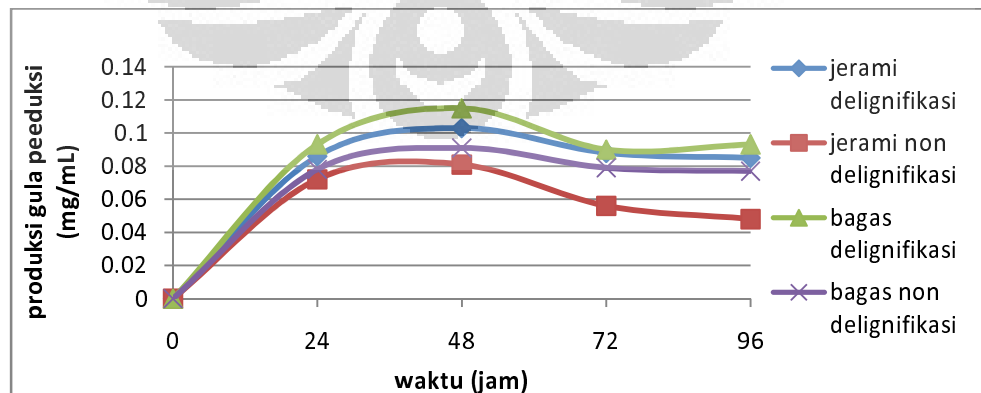
Waktu (jam)	Absorbansi Jerami		Absorbansi Bagas	
	Delignifikasi	Non-delignifikasi	Delignifikasi	Non-delignifikasi
0	0	0	0	0
24	0,219	0,179	0,237	0,196
48	0,264	0,205	0,297	0,233
72	0,223	0,136	0,228	0,199
96	0,236	0,114	0,214	0,193

Nilai absorbansi dimasukkan ke dalam persamaan linier

$$y = 2,755 x - 0,019$$

Dengan y adalah absorbansi, maka dapat diketahui nilai x yang merupakan konsentrasi gula pereduksi (mg/mL)

Waktu (jam)	Gula pereduksi (Jerami) (mg/mL)		Gula pereduksi (Bagas) (mg/mL)	
	Delignifikasi	Non-delignifikasi	Delignifikasi	Non-delignifikasi
0	0	0	0	0
24	0,081	0,072	0,093	0,078
48	0,103	0,081	0,115	0,091
72	0,088	0,056	0,090	0,079
96	0,093	0,048	0,085	0,077



Lampiran 4. Pengaruh sumber N terhadap produksi gula pereduksi

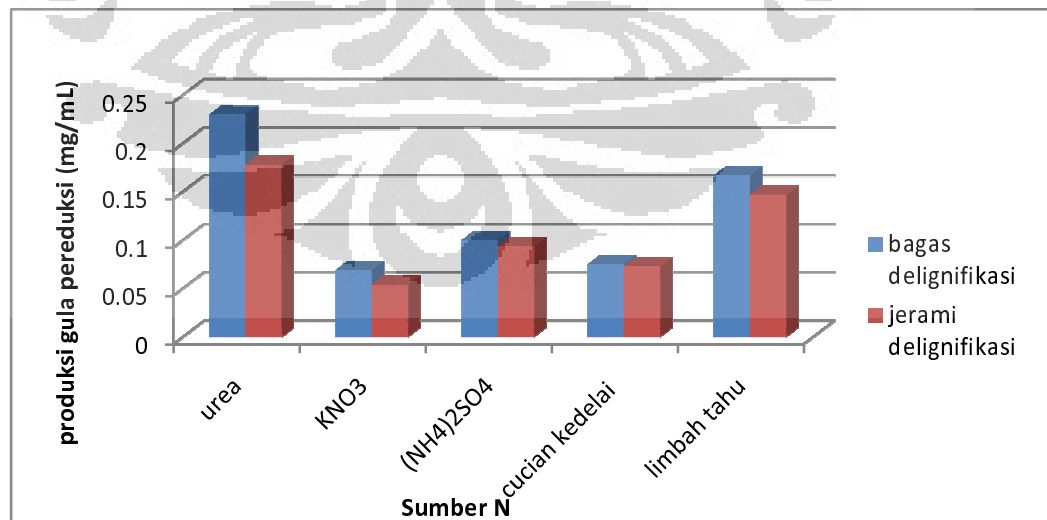
Sumber N	Absorbansi	
	Jerami Padi	Bagas Tebu
Urea	0,471	0,615
KNO ₃	0,131	0,172
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,241	0,258
Air cucian kedelai	0,183	0,187
Air limbah tahu	0,442	0,387

Nilai absorbansi dimasukkan ke dalam persamaan linier

$$y = 2,755 x - 0,019$$

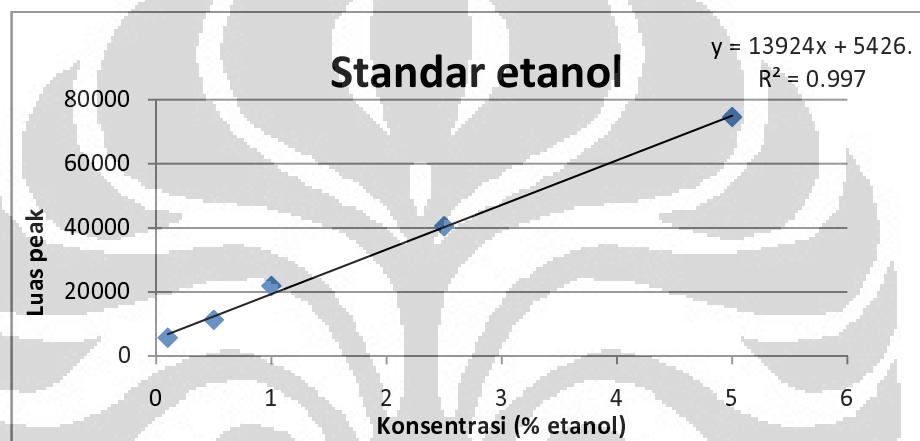
Dengan y adalah absorbansi, maka dapat diketahui nilai x yang merupakan konsentrasi gula pereduksi (mg/mL)

Sumber N	Gula pereduksi (mg/mL)	
	Jerami Padi	Bagas Tebu
Urea	0.178	0,230
KNO ₃	0,054	0,069
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,094	0,100
Air cucian kedelai	0.073	0,075
Air limbah tahu	0,147	0,167



Lampiran 5. Standar etanol

Konsentrasi (%)	Luas Peak
0,1	5684
0,5	11257
1,0	21852
2,5	40494
5,0	74554



Lampiran 6. Pengaruh konsentrasi Na alginat terhadap produksi etanol

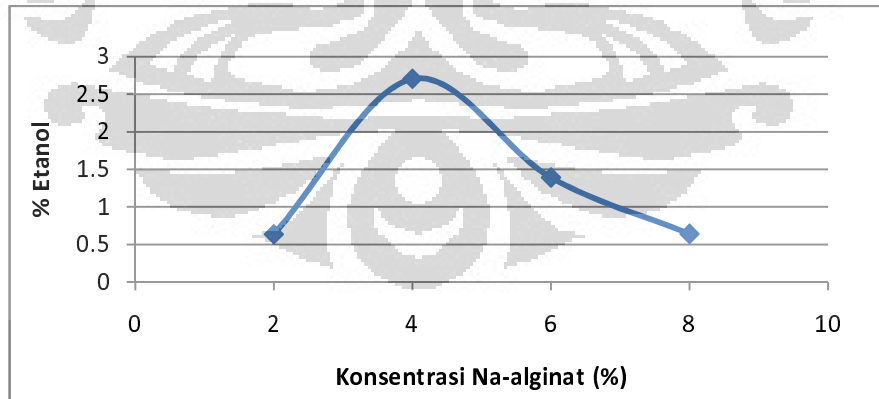
Konsentrasi Na-alginat(%)	Luas Peak
2	14282
4	43091
6	24791
8	14350

Nilai luas peak dimasukkan ke dalam persamaan linier

$$y = 13924 x + 5426$$

Dengan y adalah luas peak, maka dapat diketahui nilai x yang merupakan konsentrasi etanol (%)

Konsentrasi Na-alginat(%)	% etanol
2	0,636
4	2,705
6	1,391
8	0,641



Lampiran 7. Pengaruh imobilisasi terhadap produksi etanol

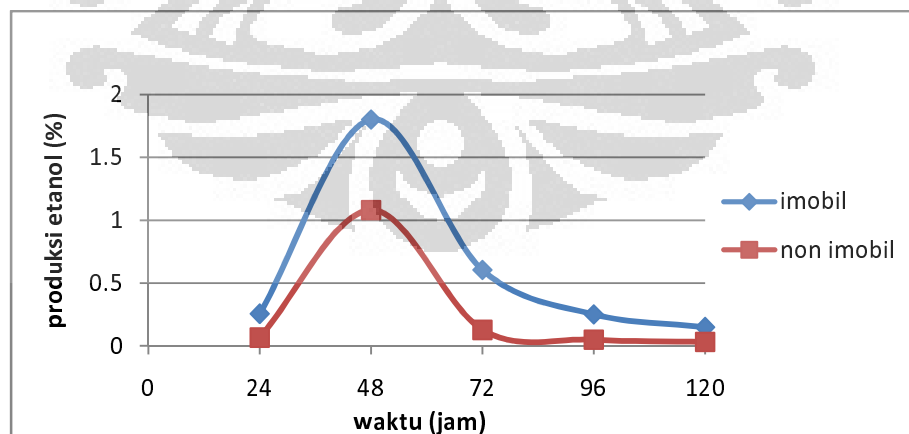
Waktu (jam)	Luas Peak	
	Imobilisasi	Non-imobilisasi
24	8967	6339
48	30519	20460
72	13848	7197
96	8919	6103
120	7478	5869

Nilai luas peak dimasukkan ke dalam persamaan linier

$$y = 13924 x + 5426$$

Dengan y adalah luas peak, maka dapat diketahui nilai x yang merupakan konsentrasi etanol (%)

Waktu (jam)	% Etanol	
	Imobilisasi	Non-imobilisasi
24	0.254	0.066
48	1.802	1.080
72	0.605	0.127
96	0.251	0.049
120	0.147	0.032



Lampiran 8. Pengaruh penggunaan berulang sel imobil terhadap produksi etanol

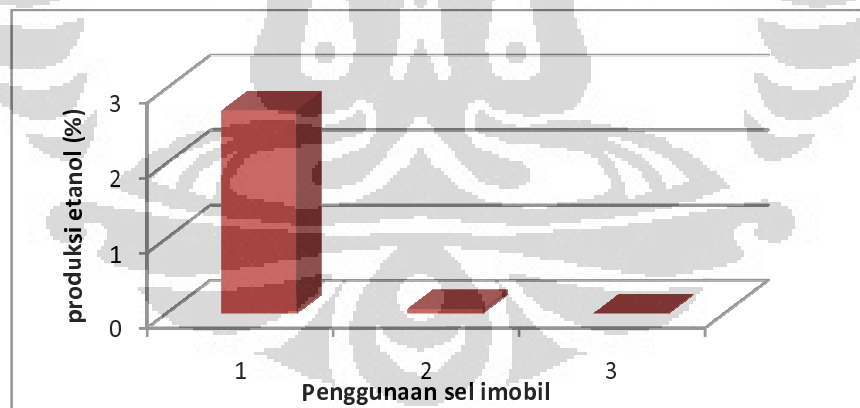
Fermentasi ke	Luas Peak
1	43091
2	6268
3	Tidak ada peak

Nilai luas peak dimasukkan ke dalam persamaan linier

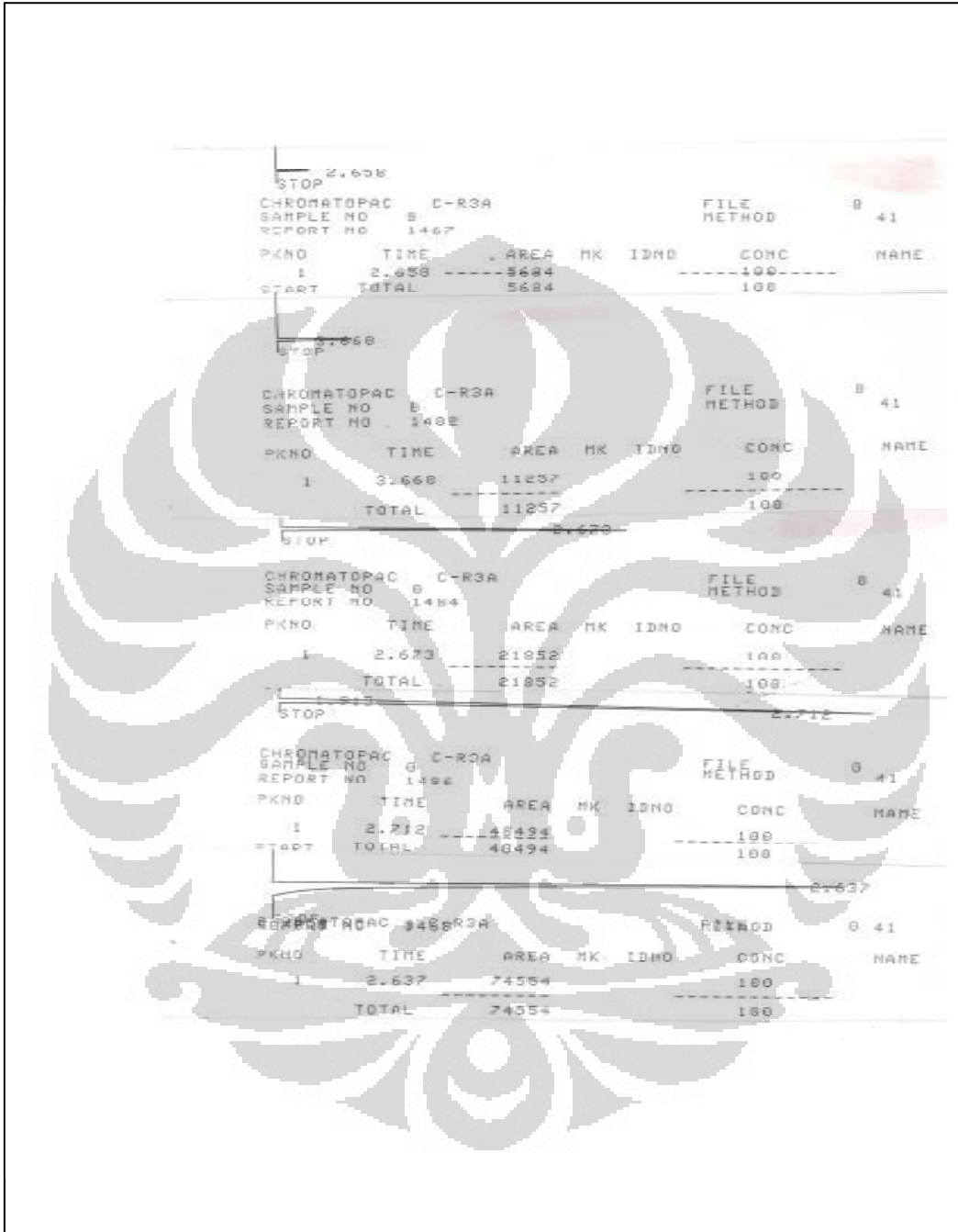
$$y = 13924 x + 5426$$

Dengan y adalah luas peak, maka dapat diketahui nilai x yang merupakan konsentrasi etanol (%)

Fermentasi ke	% Etanol
1	2,705
2	0,060
3	-



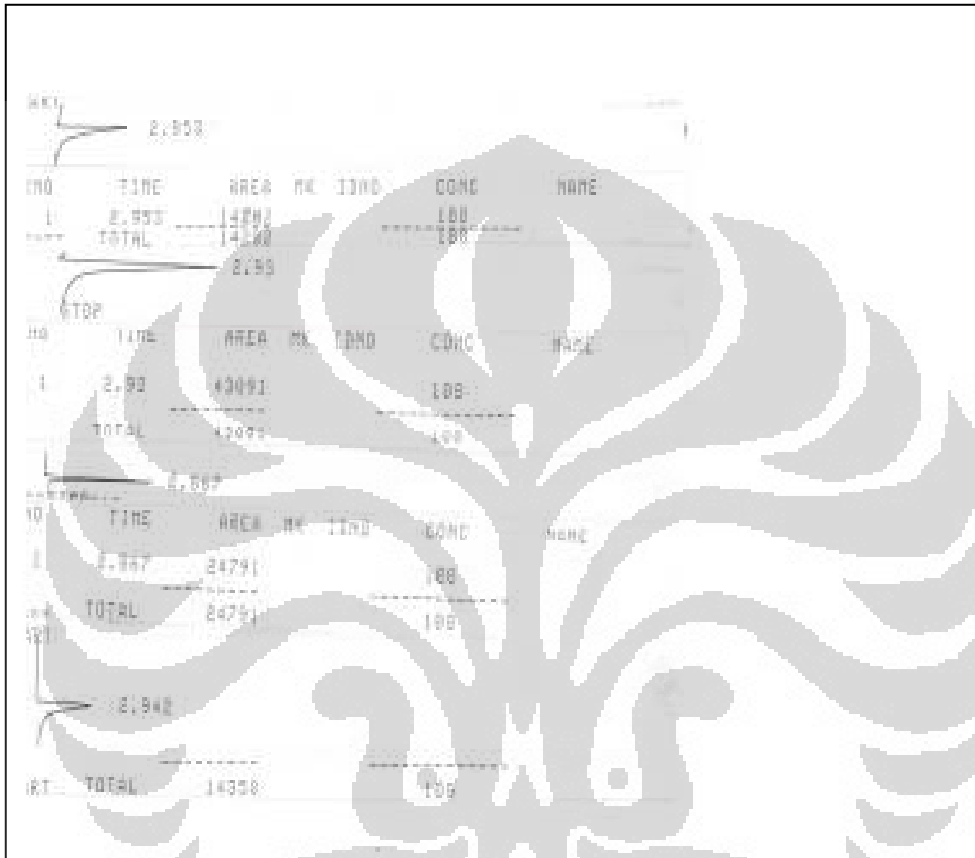
Lampiran 9. Data luas peak GC standar etanol



Standar etanol berturut-turut dari atas ke bawah

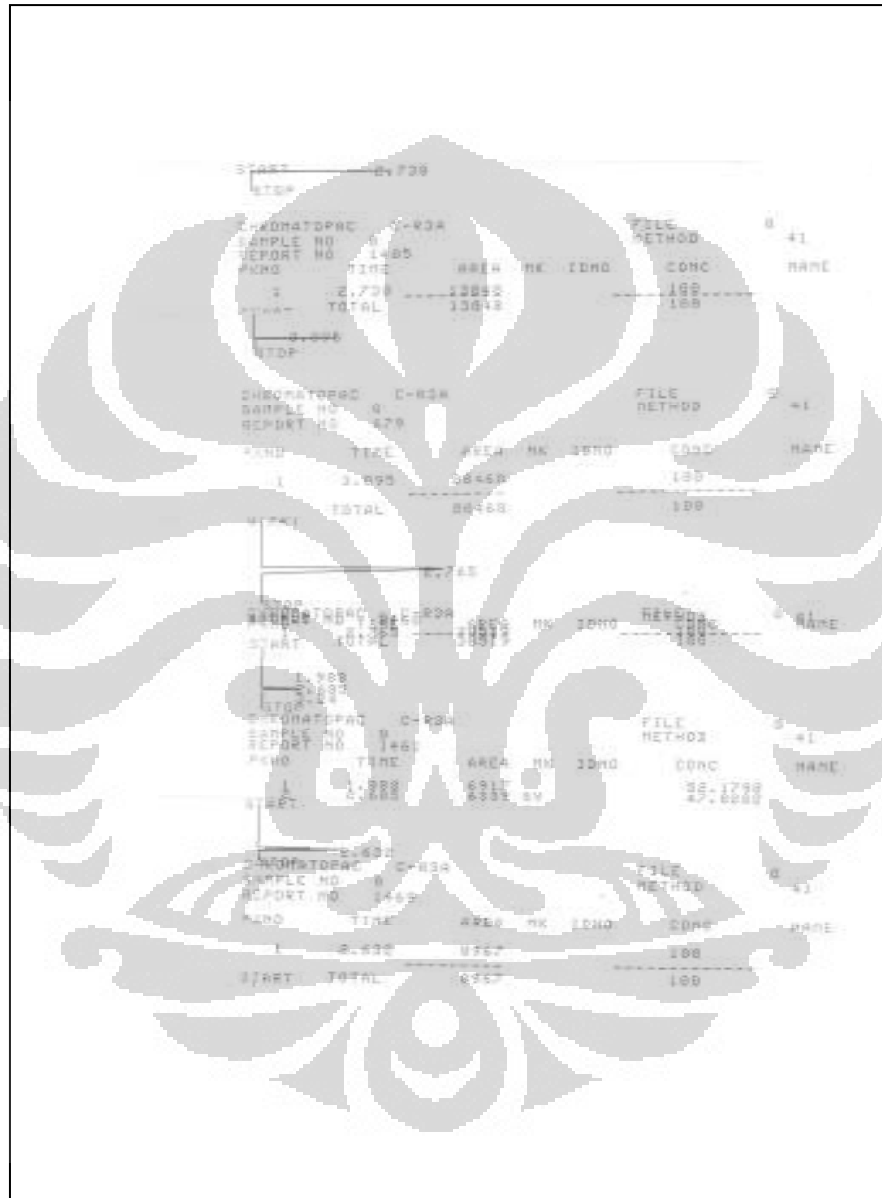
(0,1%, 0,5%, 1%, 2,5%, 5%)

Lampiran 10. Data luas peak GC pengaruh konsentrasi Na alginat terhadap produksi etanol



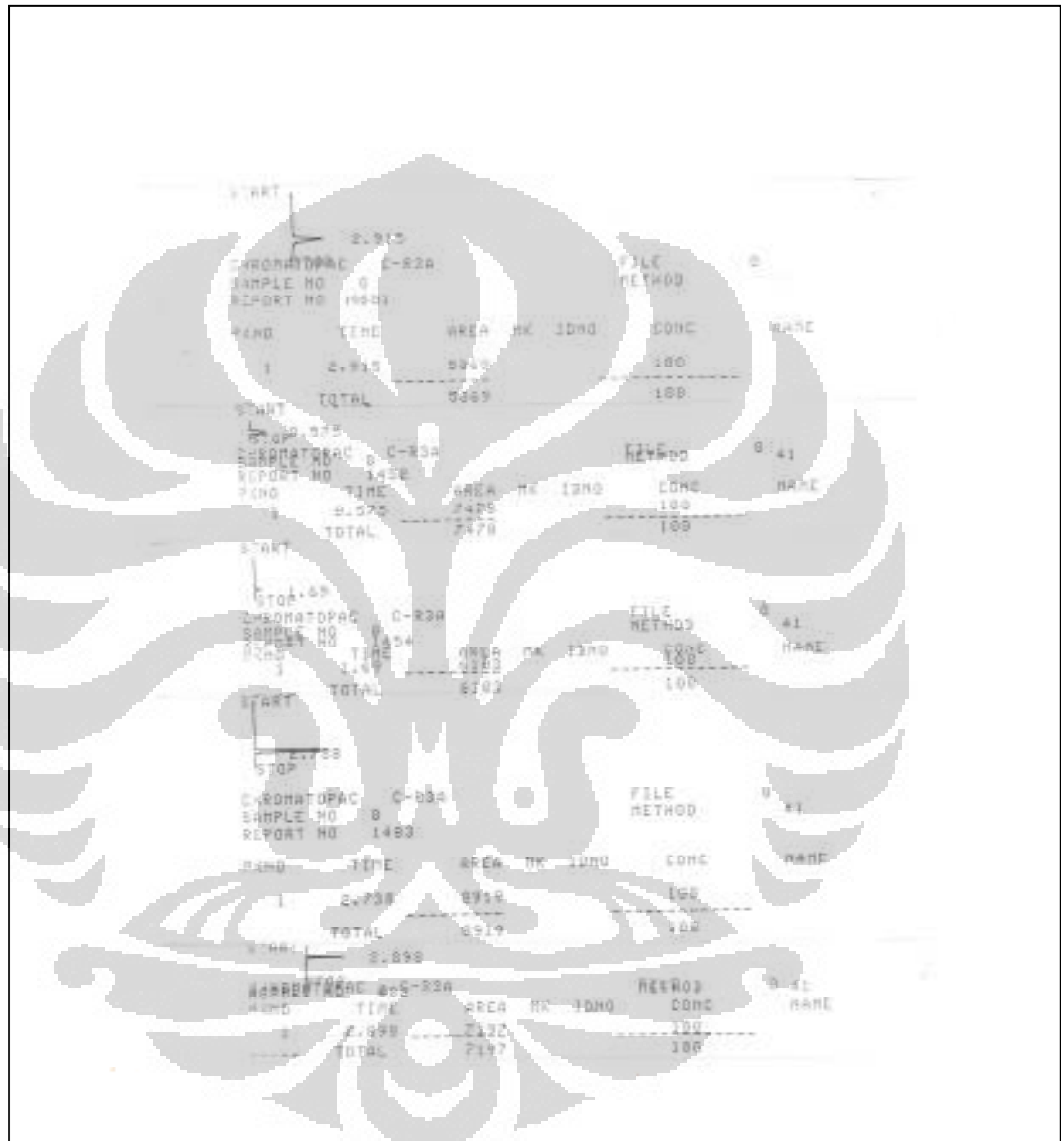
Konsentrasi Na alginat berturut-turut dari atas ke bawah
(2%, 4%, 6%, dan 8 %)

Lampiran 11.Data luas peak GC pengaruh imobilisasi terhadap produksi etanol



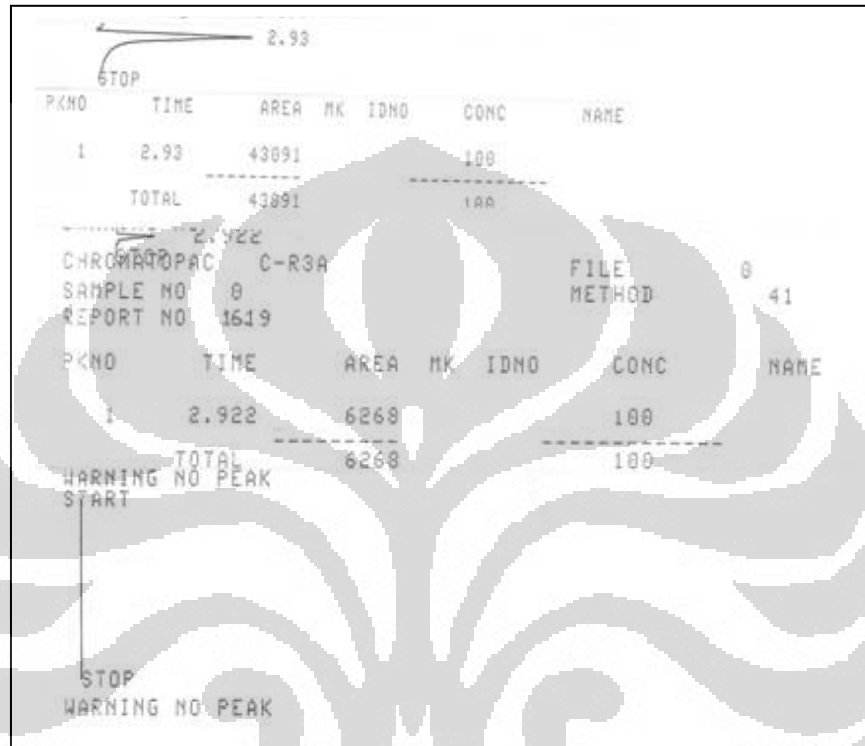
Dari bawah ke atas berturut-turut (24 jam sel imobil, 24 jam sel non imobil, 48 jam sel imobil, 48 jam sel non imobil, dan 72 jam sel imobil)

Lanjutan lampiran 11. Data luas peak GC pengaruh imobilisasi terhadap produksi etanol



Dari bawah ke atas berturut turut (72 jam sel non imobil, 96 jam sel imobil, 96 jam sel non imobil, 120 jam sel imobil, dan 120 jam sel non imobil)

Lampiran 12. Data luas peak GC pengaruh penggunaan berulang sel imobil terhadap produksi etanol



Dari atas ke bawah berturut-turut penggunaan sel imobil yang sama pada fermentasi pertama, kedua, dan ketiga.