



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**ENKAPSULASI *Rhizopus oryzae* DALAM KALSIUM-ALGINAT  
UNTUK PRODUKSI BIOETANOL DARI TANDAN KOSONG  
KELAPA SAWIT DENGAN SAKARIFIKASI DAN  
FERMENTASI SERENTAK**

**TESIS**

**MURYANTO**

**1006787754**

**FAKULTAS TEKNIK  
PROGRAM STUDI MAGISTER TEKNIK KIMIA  
DEPOK  
JUNI 2012**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**ENKAPSULASI *Rhizopus oryzae* DALAM KALSIUM ALGINAT  
UNTUK PRODUKSI BIOETANOL DARI TANDAN KOSONG  
KELAPA SAWIT DENGAN SAKARIFIKASI DAN  
FERMENTASI SERENTAK**

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister Teknik  
pada Program Pasca Sarjana di Departemen Teknik Kimia Fakultas Teknik  
Universitas Indonesia

**TESIS**

**MURYANTO**

**1006787754**

**FAKULTAS TEKNIK  
PROGRAM STUDI MAGISTER TEKNIK KIMIA  
DEPOK  
JUNI 2012**

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri,  
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk  
telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Muryanto

NPM : 1006787754

Tanda Tangan: 

Tanggal : Juni 2012

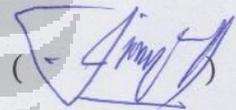
## LEMBAR PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :  
Nama : Muryanto  
NPM : 1006787754  
Program Studi : Teknik Kimia  
Judul Tesis : Enkapsulasi *Rhizopus oryzae* dalam Kalsium-alginat untuk Produksi Bioetanol dari Tandan Kosong Kelapa Sawit dengan Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak

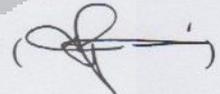
Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Teknik pada Program Studi Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Indonesia.

### DEWAN PENGUJI

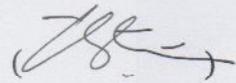
Pembimbing I : Dr. Eng. Muhamad Sahlan, S.Si., M.Eng



Pembimbing II : Dr. Ing. Ir. Misri Gozan, M.Tech



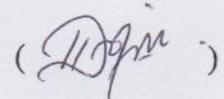
Penguji : Dr. Tania Surya Utami, ST., MT



Penguji : Dr. Ir. Nelson Saksono, MT



Penguji : Dianursati, ST., MT



Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 29 Juni 2012

## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT, karena atas berkat dan rahmat-Nya, penulis dapat menyelesaikan tesis dengan judul “Enkapsulasi *Rhizopus oryzae* dalam Kalsium-alginat untuk Produksi Bioetanol dari Tandan Kosong Kelapa Sawit dengan Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak”. Penulisan tesis ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Magister Teknik Jurusan Teknik Kimia pada Fakultas Teknik Universitas Indonesia.

Penulis mendapatkan banyak sekali bantuan serta dukungan dari berbagai pihak dalam penyusunan tesis ini. Oleh karena itu, dalam kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Dr. Eng. Muhamad Sahlan, S.Si, M.Eng., selaku dosen pembimbing I yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan penulis dalam penyusunan tesis ini;
2. Dr.Ing.Ir. Misri Gozan, M,Tech, selaku dosen pembimbing II yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan penulis dalam penyusunan tesis ini;
3. Prof. Sutrasno Kartohardjono, selaku dosen pembimbing akademik selama masa perkuliahan;
4. Orang tua, istri, anak, dan keluarga penulis yang telah memberikan bantuan dukungan material dan moral;
5. Sahabat - sahabat penulis di S2 Teknik Kimia UI angkatan 2010 yang telah banyak membantu dalam menyelesaikan tesis ini;
6. Tim PN8 Lab bioetanol PPKimia-LIPI Serpong, atas segala bantuannya;
7. Semua pihak yang telah membantu penyusunan tesis ini secara langsung maupun tidak langsung.

Penulis menyadari bahwa dalam tesis ini masih terdapat banyak kekurangan. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun sehingga dapat menyempurnakan tesis ini dan melaksanakan perbaikan di masa yang akan datang. Semoga tulisan ini dapat bermanfaat bagi para pembaca dan bagi dunia pendidikan dan ilmu pengetahuan.

Depok, 29 Juni 2012

Penulis

## HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

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

Nama : Muryanto

NPM : 1006787754

Program Studi : Teknik Kimia

Deperatemen : Teknik Kimia

Fakultas : Teknik

Jenis Karya : Tesis

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

Enkapsulasi *Rhizopus oryzae* dalam Kalsium-alginat untuk Produksi Bioetanol dari Tandan Kosong Kelapa Sawit dengan Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak.

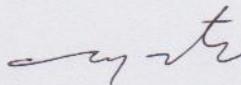
berserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalih media/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta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

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok, UI

Pada Tanggal : 29 Juni 2012

Yang menyatakan



Muryanto

## ABSTRAK

Nama : Muryanto  
Program Studi : Teknik Kimia  
Judul Tesis : Enkapsulasi *Rhizopus oryzae* dalam Kalsium-alginat untuk  
Produksi Bioetanol dari Tandan Kosong Kelapa Sawit dengan  
Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak

Proses sakarifikasi dan fermentasi serentak/SSF memberikan keunggulan dalam pembuatan bioetanol. Namun proses SSF masih menemui kendala berupa perbedaan suhu optimum proses sakarifikasi dan fermentasi. Pada penelitian ini dilakukan enkapsulasi *Rhizopus oryzae* dengan memberikan perlindungan menggunakan polimer kalsium-alginat sehingga sel dapat lebih tahan terhadap lingkungan dan suhu, kemudian digunakan pada proses SSF tandan kosong kelapa sawit. Enkapsulasi sel *R. oryzae* berhasil meningkatkan produksi bioetanol sampai 17% dibandingkan dengan penggunaan sel bebas *R. oryzae* pada proses SSF tandan kosong kelapa sawit yang telah dilakukan perlakuan awal (pret-TKKS) dengan variasi pH. Produksi etanol yang dihasilkan pada pH 4,5; 5,0; dan 5,5 berturut-turut adalah 33,99 g/l, 38,92 g/l, dan 37,66 g/l. Enkapsulasi sel *R. oryzae* dapat meningkatkan ketahanan terhadap suhu proses dengan perbedaan produksi etanol yang dihasilkan antara enkapsulasi dengan sel bebas sebesar 31,95 % pada suhu 40°C, dan sebesar 89,16 % pada suhu 45°C, dibandingkan dengan sel bebas *R. oryzae*. Yield etanol tertinggi yang dihasilkan adalah 0,43 g/g selulosa, dengan konversi sebesar 75,89 % dibandingkan konsentrasi etanol secara teoritis.

**Kata kunci:** bioetanol, enkapsulasi, *Rhizopus oryzae*, dan SSF

## ABSTRACT

Name : Muryanto  
Study Program : Chemical Engineering  
Title : Encapsulation of *Rhizopus Oryzae* with Calcium-alginate for Production of Bioethanol from Oil Palm Empty Fruit Bunch in Simultaneous Saccharification and Fermentation

*Simultaneous saccharification and fermentation process (SSF) was the promising technique for converting cellulose to bioethanol. However, the main problems in SSF process are difference the optimum temperature in saccharification and fermentation. The aim of this research is to encapsulation cell in natural polymer in order to increasing the cell tolerant from environment and high temperature. This research was conduct to encapsulation of *Rhizopus oryzae* with calcium alginate polymer then used for SSF process from pretreated oil palm empty fruit bunch (EFB). The adaptation ability of these capsules on high temperature and different pH of medium in SSF process oil palm EFB was examined. Encapsulated *R. oryzae* was increasing the bioethanol production from pretreated EFB in SSF process up to 17 % compared the use of free cell of *R. oryzae*. The bioethanol production by encapsulated *R. oryzae* on pH 4.5, 5.0 and 5.5 were 33,99 g/l, 38,92 g/l, and 37,66 g/l. Encapsulated *R. oryzae* was more resistant from increasing temperature with disparities ethanol production between encapsulated and free cell *R.oryzae* up to 31.95 % at a temperature of 40°C and up to 89.16% at 45°C. The highest ethanol yield was 0.43 g/g cellulose with maximal theoritical ethanol yield was 75.89 % from pretreated EFB.*

**Key words:** *bioethanol, encapsulation, *Rhizopus oryzae*, and SSF*

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS .....</b>	<b>i</b>
<b>LEMBAR PENGESAHAN.....</b>	<b>ii</b>
<b>KATA PENGANTAR.....</b>	<b>iii</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI.....</b>	<b>iv</b>
<b>TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS .....</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRAK.....</b>	<b>v</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>vii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>ix</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>x</b>
<b>DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN .....</b>	<b>xi</b>
<b>BAB 1 PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan .....	5
1.4 Batasan Masalah.....	5
1.5 Sistematika Penulisan .....	5
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>7</b>
2.1 Etanol .....	7
2.2 Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS).....	8
2.2.1 Selulosa .....	9
2.2.2 Hemiselulosa .....	11
2.2.3 Lignin .....	11
2.3 Sakarifikasi dengan Enzim.....	12
2.4 Fermentasi.....	14
2.5 Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak/SSF .....	15
2.6 Imobilisasi Sel .....	16
2.7 <i>Rhizopus oryzae</i> .....	21
2.8 <i>State of The Art</i> .....	25
<b>BAB 3 METODE PENELITIAN .....</b>	<b>28</b>
3.1 Alat dan Bahan yang Digunakan.....	29
3.2 Tahap Pelaksanaan Penelitian .....	30
3.2.1 Variable penelitian .....	31
3.2.2 Pemiakan kultur <i>R. oryzae</i> .....	31

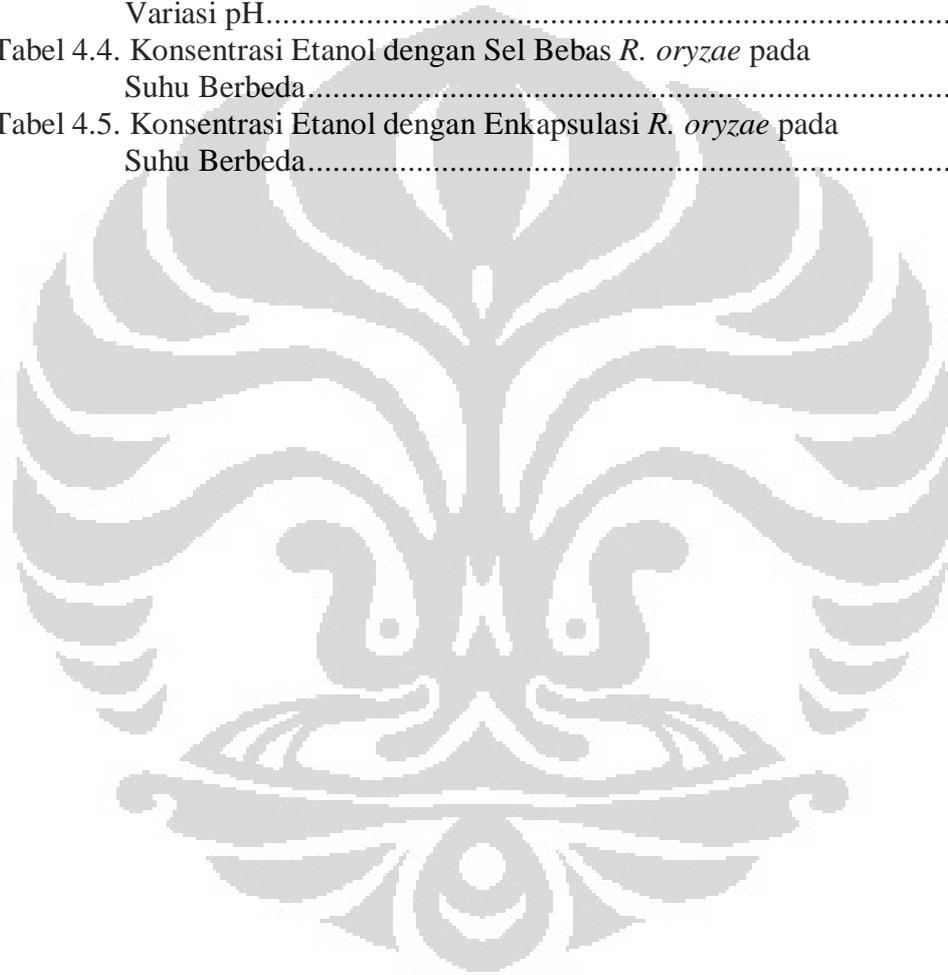
3.2.3	Enkapsulasi <i>R. oryzae</i> .....	32
3.2.4	Proses fermentasi dengan enkapsulasi <i>R. oryzae</i> .....	33
3.2.5	Proses sakarifikasi dan fermentasi serentak (SSF).....	34
3.3	Analisis .....	35
3.3.1	Penentuan konsentrasi etanol dengan HPLC.....	35
3.3.2	Penentuan konsentrasi glukosa dengan HPLC .....	36
3.4	Pengolahan Data dan Gambaran Hasil Penelitian.....	36
3.4.1	Pengaruh pH dan suhu proses SSF terhadap konsentrasi glukosa dan etanol yang dihasilkan .....	37
3.4.2	Pengaruh pH dan suhu terhadap yield etanol yang dihasilkan.....	37
3.4.3	Perbandingan hasil SSF dengan enkapsulasi dan sel bebas <i>R. oryzae</i> .....	38
<b>BAB 4</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>40</b>
4.1	Pembahasan Umum .....	40
4.2	Data Hasil Penelitian .....	41
4.2.1	Enkapsulasi <i>Rhizopus oryzae</i> .....	41
4.2.2	Proses Fermentasi menggunakan medium glukosa .....	42
4.2.3	Proses SSF Pre-TKKS .....	47
4.2.4	Pengaruh variasi pH pada proses SSF Pret-TKKS dengan sel bebas <i>R. oryzae</i> .....	48
4.2.5	Pengaruh variasi pH pada proses SSF Pret-TKKS dengan enkapsulasi <i>R. oryzae</i> .....	53
4.2.6	Pengaruh peningkatan suhu pada proses SSF Pret-TKKS dengan sel bebas <i>R. oryzae</i> .....	55
4.2.7	Pengaruh peningkatan suhu pada proses SSF Pret-TKKS dengan enkapsulasi <i>R. oryzae</i> .....	57
4.3	Pembahasan Perbandingan Hasil SSF dengan Enkapsulasi dan Sel Bebas <i>R. oryzae</i> .....	59
4.3.1	Pengaruh enkapsulasi <i>R. oryzae</i> pada variasi pH .....	59
4.3.2	Pengaruh enkapsulasi pada peningkatan suhu.....	63
<b>BAB 5</b>	<b>KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>67</b>
5.1	Kesimpulan .....	67
5.2	Saran .....	68
	<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>69</b>
	<b>DAFTAR LAMPIRAN ...</b> .....	<b>71</b>

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Struktur Molekul Selulosa .....	11
Gambar 2.2. Struktur Hemiselulosa .....	11
Gambar 2.3. Struktur Molekul Lignin .....	12
Gambar 2.4. Jenis-jenis Imobilisasi Sel .....	17
Gambar 2.5. Skema Pembuatan Enkapsulasi Sel .....	21
Gambar 2.6. <i>Rhizopus oryzae</i> .....	23
Gambar 2.7. Skema Glikolisis <i>Rhizopus oryzae</i> .....	24
Gambar 2.8. Proses Metabolisme Jalur Piruvat <i>Rhizopus oryzae</i> .....	25
Gambar 3.1. Diagram Alir Penelitian .....	28
Gambar 3.2. Diagram Alir Tahapan Penelitian .....	30
Gambar 3.3. Diagram Alir Enkapsulasi <i>R. oryzae</i> .....	32
Gambar 3.4. Skema Peralatan Enkapsulasi dan Pertumbuhan Kapsul <i>R. oryzae</i> ..	33
Gambar 3.5. Diagram Alir Proses SSF .....	34
Gambar 3.6. Skema Peralatan Proses SSF .....	35
Gambar 4.1. Foto TKKS Sebelum dan Setelah Perlakuan Awal .....	47
Gambar 4.2. Foto <i>R. oryzae</i> (A) dan Kapsul Kalsium Alginat yang Mengandung <i>R. oryzae</i> di dalamnya (B) .....	42
Gambar 4.3. Perbandingan Produksi Etanol Terhadap Kerapatan Inokulum <i>R. oryzae</i> .....	44
Gambar 4.4. Proses Fermentasi dengan Glukosa pada Kondisi Aerob dan Anaerob.....	45
Gambar 4.5. Produksi Glukosa dan Etanol dengan Sel Bebas <i>R. oryzae</i> pada Variasi pH. ....	49
Gambar 4.6. Konsentrasi Etanol dan Glukosa dengan Enkapsulasi <i>R. oryzae</i> pada Variasi pH. ....	53
Gambar 4.7. Konsentrasi Glukosa dan Etanol dengan Variasi Suhu.....	56
Gambar 4.8. Konsentrasi Etanol dan Glukosa dengan Enkapsulasi <i>R. oryzae</i> pada beberapa variasi suhu.....	58
Gambar 4.9. Perbandingan Konsentrasi Etanol yang Dihasilkan Sel Bebas <i>R. oryzae</i> dengan Enkapsulasi <i>R. oryzae</i> pada Variasi pH .....	60
Gambar 4.10. Penurunan dan Disparitas Konsentrasi dan Etanol pada Variasi pH.....	61
Gambar 4.11. Perbandingan Konsentrasi Etanol yang Dihasilkan Sel Bebas <i>R. oryzae</i> dengan Enkapsulasi <i>R. oryzae</i> pada Variasi Suhu.....	63
Gambar 4.12. Penurunan dan Disparitas Konsentrasi Etanol Akibat Kenaikan Suhu.....	64

## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. Sifat Fisik Etanol.....	7
Tabel 2.2. Data Komposisi Kimia TKKS .....	8
Tabel 2.3. Proses Perlakuan Awal.....	10
Tabel 2.4. Tabel <i>State of the Art</i> Penelitian Bioetanol.....	27
Tabel 4.1. Komposisi Kimia TKKS.....	47
Tabel 4.2. Konsentrasi Etanol dengan Sel Bebas <i>R. oryzae</i> pada Variasi pH.....	52
Tabel 4.3. Konsentrasi Etanol dengan Enkapsulasi <i>R. oryzae</i> pada Variasi pH.....	55
Tabel 4.4. Konsentrasi Etanol dengan Sel Bebas <i>R. oryzae</i> pada Suhu Berbeda.....	57
Tabel 4.5. Konsentrasi Etanol dengan Enkapsulasi <i>R. oryzae</i> pada Suhu Berbeda.....	58



## DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN

Aerob	: proses membutuhkan oksigen
Anaerob	: proses tidak membutuhkan oksigen
Fermentasi	: Proses mengubah glukosa menjadi etanol
Pret-TKKS	: TKKS yang telah dilakukan perlakuan awal
Sakarifikasi	: Proses mengubah selulosa menjadi glukosa, dapat juga disebut proses hidrolisis
Pret-TKKS	: TKKS yang telah dilakukan perlakuan awal
ADH	: <i>Alcohol Dehydrogenase</i>
LDH	: <i>Lactate Dehydrogenase</i>
FPU	: <i>Filter Paper Unit</i>
PDC	: <i>Pyruvate Decarboxylase</i>
PDH	: <i>Pyruvate Dehydrogenase</i>
SSF	: <i>Simultaneous Saccharification and Fermentation</i>
SHF	: <i>Separated Hydrolysis and Fermentation</i>
TCA	: <i>Tricarboxylic Acid</i>

# BAB 1

## PENDAHULUAN

Pada bab ini akan dijelaskan latar belakang penelitian sakarifikasi dan fermentasi serentak tandan kosong kelapa sawit dengan *Rhizopus oryzae* yang telah dienkapsulasi. Selain itu, akan dijelaskan mengenai rumusan masalah, tujuan penelitian, batasan masalah dan sistematika penulisan tesis ini.

### 1.1 Latar Belakang

Akhir-akhir ini penduduk dunia menghadapi dua masalah besar yang berkaitan dengan energi. Pertama, meningkatnya kebutuhan energi, sementara sumber energi yang berasal dari fosil semakin berkurang dan diramalkan akan habis pada beberapa dekade kedepan. Menurut *International Energy Outlook 2010*, konsumsi bahan bakar cair (BBC) dunia bertambah sebanyak 2 juta barel/hari pada tahun 2010 menjadi 84 juta barel/hari, sedangkan *supply* BBC pada tahun 2010 sebesar 86,35 juta barel/hari dengan kenaikan hanya 1,4 juta barel/hari. Dengan konsumsi dan produksi seperti ini diperkirakan cadangan BBC akan habis dalam 40-50 tahun yang akan datang (IEO, 2010). Kedua, penggunaan energi fosil memberikan kontribusi terhadap gangguan lingkungan terutama bertambahnya polusi udara yang pada akhirnya meningkatkan pemanasan global (*global warming*). Menurut laporan US EPA tahun 2000, lebih dari 90% gas rumah kaca dihasilkan dari pembakaran bahan bakar fosil (US EPA, 2000).

Di Indonesia sumber utama energi masih bertumpu pada jenis bahan bakar minyak yang berasal dari fosil padahal masih banyak sumber energi alternatif lain yang potensial seperti sumber energi yang berasal dari biomassa yang merupakan sumber energi baru dan terbarukan. Biomassa dari limbah pertanian dan kehutanan belum banyak dimanfaatkan menjadi produk yang lain, padahal biomassa ini umumnya berupa bahan yang mengandung lignoselulosa yang dapat diproses menjadi etanol (Hermiati and Sukara, 2005). Etanol dapat berfungsi sebagai bahan bakar alternatif pengganti bahan bakar yang berasal dari minyak bumi.

Penggunaan alkohol sebagai bahan bakar mulai diteliti dan diimplementasikan di Brazil dan USA sejak terjadinya krisis bahan bakar fosil di kedua negara tersebut pada awal tahun 1970-an. Saat ini, implementasi penggunaan bahan bakar alkohol untuk kendaraan bermotor di Brazil dan USA mencapai 40% dan 85%. Penggunaan etanol sebagai bahan bakar mempunyai beberapa keunggulan dibandingkan dengan Bahan Bakar Minyak (BBM), yaitu :

- kandungan oksigen yang tinggi (35%) sehingga apabila dibakar dihasilkan buangan yang bersih,
- lebih ramah lingkungan karena emisi gas karbon monooksida yang dihasilkan lebih rendah 19-25% dibanding BBM sehingga tidak memberikan kontribusi pada akumulasi karbon monoksida di atmosfer, dan
- bersifat terbarukan.

Saat ini, di Indonesia terdapat 10 industri etanol dengan menggunakan bahan baku singkong, jagung, dan molase (tetes). Molase merupakan bahan baku yang banyak digunakan oleh pabrik etanol. Kapasitas pabrik etanol yang ada saat ini membutuhkan 650.000 – 700.000 ton molase, sedangkan pabrik MSG dan Lisin membutuhkan molase 550.000 – 600.000 ton. Dari data tersebut terlihat bahwa pengembangan produksi etanol dari molase sudah tidak prospektif lagi karena harus bersaing dengan kebutuhan pabrik MSG dan pabrik etanol yang sudah ada. Sedangkan kendala penggunaan singkong dan jagung adalah selain merupakan bahan pangan, kedua bahan tersebut harganya cukup tinggi, dan jumlahnya terbatas. Oleh karena itu, pengembangan industri etanol dari bahan baku selain molase, jagung, dan singkong perlu dikembangkan.

Penelitian ini memanfaatkan limbah lignoselulosa sebagai bahan baku pembuatan bioetanol. Komponen utama dalam limbah lignoselulosa terdiri dari selulosa, hemiselulosa, dan lignin yang jumlahnya bervariasi tergantung dari sumber bahannya. Menurut Sun and Cheng (2002) batang kayu mengandung lignin 18-25 %, selulosa 40-55 % dan hemiselulosa 24-40 %; Tongkol jagung mengandung lignin 15 %, selulosa 45 % dan hemiselulosa 35 %; Jerami gandum mengandung lignin 15 %, selulosa 30 % dan hemiselulosa 50 %. Limbah lignoselulosa yang lain diantaranya bagas mengandung lignin 25 %, selulosa 50 % dan hemiselulosa 25 % (Samsuri *et al.*, 2008), dan tandan kosong kelapa sawit

mengandung lignin 27,6-32,5 %, selulosa 41,3-46,5 % dan hemiselulosa 25,3-33,8 % (Syafwina *et al.*, 2002).

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah limbah tandan kosong kelapa sawit (TKKS). Indonesia memiliki potensi besar untuk memanfaatkan produk samping sawit sebagai sumber energi terbarukan. Kelapa sawit Indonesia merupakan salah satu komoditi yang mengalami pertumbuhan sangat pesat. Pada periode tahun 1980 hingga pertengahan tahun 1990 luas areal kebun meningkat dengan laju 11% per tahun. Sejalan dengan luas area produksi *Crude Palm Oil* (CPO) juga meningkat dengan laju 9.4% per tahun. Data tahun 2004 menunjukkan bahwa potensi kelapa sawit berdasarkan luas perkebunannya mencapai 3.574.726 ha dengan total produksi minyak mencapai 6.237.425 ton. Secara umum, industri kelapa sawit menghasilkan 1.1 ton tandan kosong untuk setiap ton CPO yang dihasilkan. Menurut Badger (2002), 1 ton bahan yang mengandung 45% selulosa mampu menghasilkan 151 liter etanol, sehingga dapat diperkirakan potensi produksi etanol di Indonesia dengan bahan baku tandan kosong kelapa sawit mencapai 800 juta liter per tahun.

Berdasarkan latar belakang diatas, pada penelitian ini dilakukan pengembangan proses konversi limbah lignoselulosa TKKS menjadi bioetanol. Proses konversi bahan berlignoselulosa menjadi etanol pada prinsipnya terdiri dari dua tahap, yaitu sakarifikasi selulosa yang terdapat dalam bahan-bahan berlignoselulosa menjadi gula-gula sederhana dan fermentasi gula-gula sederhana menjadi etanol menggunakan khamir, jamur atau bakteri. Pada penelitian ini dilakukan proses satu tahap dengan metoda *Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF)*. Keunggulan *SSF* dibandingkan dengan proses sakarifikasi dan fermentasi bertahap/*Separated Hidrolysis and Fermentation (SHF)* diantaranya adalah meningkatkan rendemen produk karena glukosa yang dihasilkan dari proses sakarifikasi segera difermentasi menjadi etanol sehingga tidak akan menghambat kerja enzim, waktu proses lebih pendek, dan kebutuhan reaktor lebih sedikit karena hanya digunakan satu reaktor saja (Sun and Cheng, 2002; Sudyani, 2009). Adapun kendala yang perlu diatasi pada proses *SSF* adalah suhu sakarifikasi dan fermentasi yang tidak sama, dan adanya hambatan toleransi

mikroba terhadap konsentrasi etanol yang tinggi. Umumnya proses sakarifikasi optimum pada suhu 40-45°C dan fermentasi optimum pada suhu 30°C (Sun and Cheng, 2002).

Beberapa upaya telah dilakukan untuk mengatasi kendala metode SSF, salah satunya adalah dengan teknik enkapsulasi sel. Sel yang dienkapsulasi terbukti dapat meningkatkan produksi etanol dari limbah kayu yang dihidrolisis dengan asam encer (Talebnia and Taherjadeh, 2006). Selain itu, sel yang dikapsulasi lebih toleran terhadap suhu yang lebih tinggi karena proses enkapsulasi memberikan dinding buatan yang membuat sel lebih tahan terhadap suhu yang lebih tinggi (Ylitervo *et al.*, 2011). Suhu optimum proses sakarifikasi mencapai 40-45°C, sedangkan pada suhu tinggi tersebut jamur kurang aktif untuk melakukan proses fermentasi. Oleh karena itu, dengan adanya enkapsulasi diharapkan jamur tetap dapat melakukan proses fermentasi pada suhu tinggi mendekati suhu proses sakarifikasi. Proses sakarifikasi pada suhu optimum akan menghasilkan glukosa yang optimum untuk difermentasi oleh jamur menjadi etanol. Penelitian Hamamci *et al.*, (1994) menunjukkan enkapsulasi *Rhizopus oryzae* terbukti meningkatkan produksi asam laktat dibandingkan sel bebas, selain itu enkapsulasi *R. oryzae* dapat digunakan berulang-ulang. Proses SSF umumnya menggunakan *Saccharomyces cerevisiae*, karena dapat menghasilkan etanol yang cukup tinggi, namun *S. cerevisiae* hanya dapat menghasilkan etanol dari gula heksosa saja (Abedinifar *et al.*, 2009). *R. oryzae* dapat menghasilkan etanol baik dari gula heksosa maupun dari gula pentosa, sehingga lebih menguntungkan untuk bahan baku lignoselulosa yang tidak hanya terdapat gula heksosa tapi juga gula pentosa seperti xilosa (Millati *et al.*, 2002). Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan proses SSF TKKS dengan menggunakan *R. oryzae* yang dikapsulasi, sehingga diperoleh etanol dari TKKS yang lebih tinggi.

## 1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana enkapsulasi *R. oryzae* dapat meningkatkan daya toleran sel pada saat produksi bioetanol?
2. Bagaimana kondisi operasi optimum pada proses SSF TKKS dengan *R. oryzae* yang dienkapsulasi?

### 1.3 Tujuan

1. Mengetahui pengaruh enkapsulasi terhadap produksi bioetanol pada *Rhizopus oryzae*.
2. Mengetahui kondisi suhu dan pH optimum proses SSF TKKS menjadi bioetanol dengan enkapsulasi *R. oryzae*.
3. Mengetahui pengaruh enkapsulasi *R. oryzae* terhadap konsentrasi bioetanol yang dihasilkan.

### 1.4 Batasan Masalah

1. TKKS yang digunakan berasal dari PT. Perkebunan Nusantara VIII, Kebun Kertajaya, Malimping, Pandeglang, Banten.
2. TKKS yang digunakan telah diproses perlakuan awal fisik dan kimia dengan NaOH 10% selanjutnya disebut pret-TKKS.
3. Proses SSF dilakukan serentak dengan menggunakan enzim selulase dan  $\beta$ -glukosidase dan *R. oryzae* yang telah dienkapsulasi.
4. Analisis penelitian ini hanya meliputi uji glukosa dan uji etanol.
5. Jamur yang digunakan adalah *R. oryzae* yang dienkapsulasi dengan membran kalsium-alginat
6. Penelitian dilakukan di laboratorium Pusat Penelitian Kimia-LIPI, Serpong.

### 1.5 Sistematika Penulisan

Adapun sistematika yang digunakan dalam penulisan tesis ini adalah sebagai berikut:

#### BAB 1 PENDAHULUAN

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

#### BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

Bab ini berisi tinjauan pustaka mengenai etanol, tandan kosong kelapa sawit, proses fermentasi etanol, SSF, dan imobilisasi sel, dan *R. oryzae*.

### BAB 3 METODE PENELITIAN

Bab ini berisi pembahasan tentang diagram alir penelitian, alat dan bahan penelitian, variabel penelitian, prosedur penelitian, dan metode pengolahan data hasil penelitian.

### BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

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

### BAB 5 KESIMPULAN

Bab ini berisi tentang kesimpulan dan saran dari seluruh isi tesis ini.

### DAFTAR PUSTAKA



## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

Bab ini berisi tinjauan pustaka mengenai etanol, tandan kosong kelapa sawit, proses fermentasi etanol, sakarifikasi dan fermentasi serentak/SSF, imobilisasi sel, dan *Rhizopus oryzae*.

### 2.1 Etanol

Etanol merupakan kependekan dari etil alkohol ( $C_2H_5OH$ ), bentuknya berupa cairan yang tak berwarna dan mempunyai bau khas yang menusuk hidung, mudah menguap dan larut dalam air dan eter. Penggunaan etanol yang terbanyak adalah sebagai pelarut sebesar 40%, untuk membuat asetaldehid sebesar 35%, dan untuk penggunaan lain sebesar 25% (Judoamidjojo, 1992).

Etanol yang diperoleh dari peragian, pada prosesnya berkataliskan enzim. Enzim mengubah karbohidrat menjadi glukosa kemudian menjadi etanol. Peragian buah-buahan, sayuran, biji-bijian umumnya berhenti bila kadar etanol mencapai 14-16%. Untuk menghasilkan kadar etanol yang tinggi maka proses distilasi harus dilakukan. Sifat fisik etanol ditunjukkan pada Tabel 2.1.

**Tabel 2.1. Sifat Fisik Etanol**

Propertis	Nilai
Massa molekul relatif	46,07 g/mol
Titik beku	-114,1°C
Titik didih normal	78,32°C
Dentitas pada 20°C	0,7893 g/ml
Kelarutan dalam air	sangat larut
Viskositas pada 20°C	1,17 cP
Kalor spesifik, 20°C	0,579 kal/g°C
Kalor pembakaran, 25°C	7092,1 kal/g
Kalor penguapan 78,32°C	200,6 kal/g

(Sari, 2009)

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

1. Etanol ramah lingkungan karena dapat terurai (biodegradable),
2. Etanol sangat fleksibel karena dapat dicampur dengan bahan bakar jenis lain dan tidak perlu modifikasi mesin bila digunakan pada komposisi sampai 5% etanol,
3. Pembakaran etanol lebih sempurna karena kandungan oksigen yang tinggi (35%) sehingga emisi CO yang dihasilkan 19-25 % lebih rendah dibandingkan BBM.

## 2.2 Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS)

Sampai saat ini bahan baku fermentasi etanol adalah bahan-bahan yang mengandung glukosa dan atau pati. Bahan berpati yang sering digunakan adalah singkong, ubi jalar, kentang dan biji-bijian seperti padi, jagung, sorgum, dan gandum (Dermibas, 2005).

Penggunaan bahan pangan akan menimbulkan masalah baru yaitu kompetisi antara kebutuhan pangan dengan kebutuhan energi. Salah satu alternatif lain bahan baku pembuatan bioetanol adalah biomassa. Biomassa merupakan sumber daya alam yang berlimpah dan murah yang memiliki potensi mendukung produksi komersial industri bahan bakar seperti etanol dan butanol (Hermiati and Sukara, 2005). Biomassa lignoselulosa dapat diperoleh dari limbah pertanian, limbah perkebunan, limbah kehutanan yang tersebar luas di Indonesia. Salah satu limbah pertanian di Indonesia yang belum banyak dimanfaatkan adalah limbah TKKS. Data komposisi kimia TKKS ditunjukkan pada Tabel 2.2.

Tabel 2.2. Data Komposisi Kimia TKKS

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

(Sudiyani, 2009)

Adanya lignin pada TKKS menyebabkan bahan berlignoselulosa sulit dihidrolisis. Oleh sebab itu, diperlukan proses perlakuan awal baik secara fisik, kimia dan atau hayati untuk melepaskan ikatan lignin dan selulosa tersebut. Umumnya perlakuan fisik dilakukan dengan memperkecil ukuran yang akan meningkatkan luas bidang kontak. Perlakuan secara fisik dapat dilakukan dengan bantuan air pada suhu tinggi. Perlakuan awal secara kimia dimaksudkan untuk mendapatkan selulosa dan hemiselulosa yang tinggi. Perlakuan awal kimia dengan asam sulfat 4% dan NaOH 6% pada penelitian Hermawan and Sudiyani (2009) telah menghasilkan selulosa yang bebas dari lignin lalu dihidrolisis dengan menggunakan enzim selulase menjadi gula-gula sederhana yang dimanfaatkan oleh *Saccharomyces cerevisiae* untuk produksi etanol dalam satu tahapan. Beberapa proses perlakuan awal ditunjukkan pada Tabel 2.3 seperti yang telah dijabarkan oleh Harmsen *et al.* (2010). Perlakuan awal secara hayati dapat dilakukan dengan menggunakan jamur pelapuk putih untuk mendegradasi lignin. Perlakuan awal dengan menggunakan jamur pelapuk putih juga dapat meningkatkan produksi etanol dari TKKS (Samsuri *et al.*, 2008).

### 2.2.1 Selulosa

Selulosa adalah homopolimer linear dari D-anhidroglukosa (glukosa anhidrida) dengan ikatan  $\beta$ -1,4-glukosida dan memiliki rumus empiris  $(C_6H_{12}O_5)_n$ , dimana  $n$  adalah jumlah satuan glukosa yang berikatan atau derajat polimerasi selulosa yang berkisar antara 15-1400 (Fessenden and Fessenden, 1982).

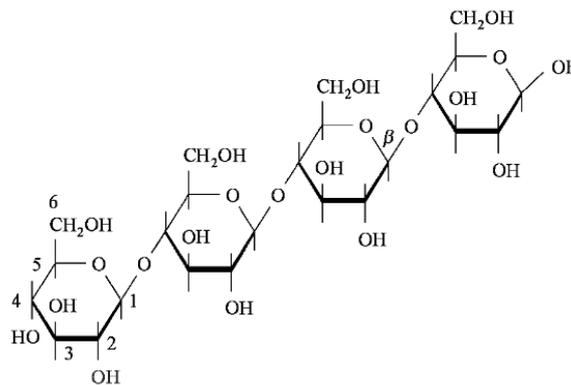
Selulosa merupakan salah satu bentuk karbohidrat yang termasuk polisakarida arsitektural, yang memberikan kekuatan pada kayu bagi tumbuhan. Polisakarida adalah senyawa yang terdiri dari banyak monosakarida yang dipersatukan oleh ikatan glukosida. Sakarifikasi lengkap akan mengubah suatu polisakarida menjadi monosakarida. Selulosa merupakan senyawa organik yang paling melimpah di alam. Selulosa terdapat pada semua tanaman baik pohon tingkat tinggi hingga organisme primitif seperti rumput laut. Daun kering diperkirakan mengandung selulosa 10-20% selulosa, kayu 50% dan kapas 90% (Fessenden dan Fessenden, 1982). Rumus struktur selulosa ditunjukkan pada Gambar 2.1.

Tabel 2.3. Proses Perlakuan Awal

Perlakuan awal	Mekanisme proses	Potensial glukosa	Pembentukan inhibitor	Pembentukan residu	Recycle bahan kimia	Semua biomassa	Terbukti secara pilot plant	Keterangan
Mekanik	Pengecilan ukuran	--	++	++	++	+	+	
<i>Liquid Hot Water</i>	Menghilangkan hemiselulosa	++	-	++	++		++	
Asam lemah	Menghilangkan hemiselulosa (utama)	++	-	-	-	+	++	Untuk lignin rendah
Asam kuat	Alterasi struktur lignin	++	-	-	-	++	++	Beracun, korosif
Basa	Hidrolisis selulosa dan hemiselulosa	++	++	-	-	+/-	+/-	
<i>Organosolv</i>	Menghilangkan lignin (utama) dan hemiselulosa tergantung pelarut	++	++	+	-	+	++	Menghambat pertumbuhan sel
<i>Wet oxidation</i>	Menghilangkan lignin	+/-	++	+	++		-	
	Melarutkan hemiselulosa, dekristalisasi selulosa							
<i>Steam explosion</i>	Menghilangkan hemiselulosa (utama), alterasi struktur lignin	+	-	+	++	+/-	++	
<i>AFEX</i>	Menghilangkan lignin (utama) dan hemiselulosa	++	++					
	dekristalisasi selulosa							
<i>CO<sub>2</sub> explosion</i>	Menghilangkan hemiselulosa dan dekristalisasi selulosa	+	+	++	++		-	Biaya tinggi

+ : mempunyai nilai positif, contohnya menghasilkan glukosa yang tinggi  
 - : mempunyai nilai negatif, contohnya terjadi pembentukan senyawa inhibitor

(Harmsen *et al.*, 2010)

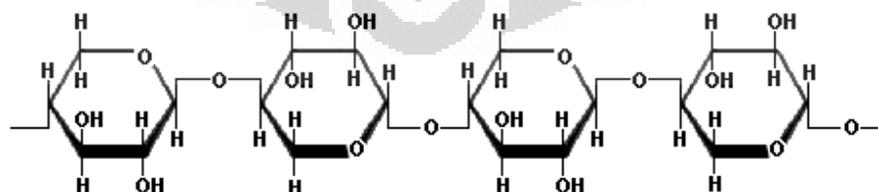


Gambar 2.1. Struktur Molekul Selulosa (Kirk-Othmer, 1993a)

### 2.2.2 Hemiselulosa

Hemiselulosa termasuk dalam kelompok polisakarida heterogen berbeda dengan selulosa yang merupakan homopolisakarida. Hemiselulosa relatif mudah dihidrolisis dengan asam menjadi komponen-komponen monomernya yang terdiri dari D-glukosa, D-manosa, D-galaktosa, D-xilosa, L-arabinosa, dan sejumlah kecil L-ramnosa disamping menjadi asam D-glukuronat, asam 4-O-metilglukuronat dan asam D-galakturonat. Hemiselulosa berbentuk *amorf*, mudah larut dalam alkali tetapi sukar larut dalam asam, dan mempunyai derajat polimerasi lebih rendah yaitu mencapai 200 (Sastrohamidjojo dan Prawirohatmojo, 1995).

Molekul hemiselulosa lebih mudah menyerap air, bersifat plastis, dan mempunyai permukaan kontak antar molekul lebih luas dibandingkan dengan selulosa (Judoamidjojo, *et al.*, 1989; Winarno, 1997). Struktur hemiselulosa ditunjukkan pada Gambar 2.2.



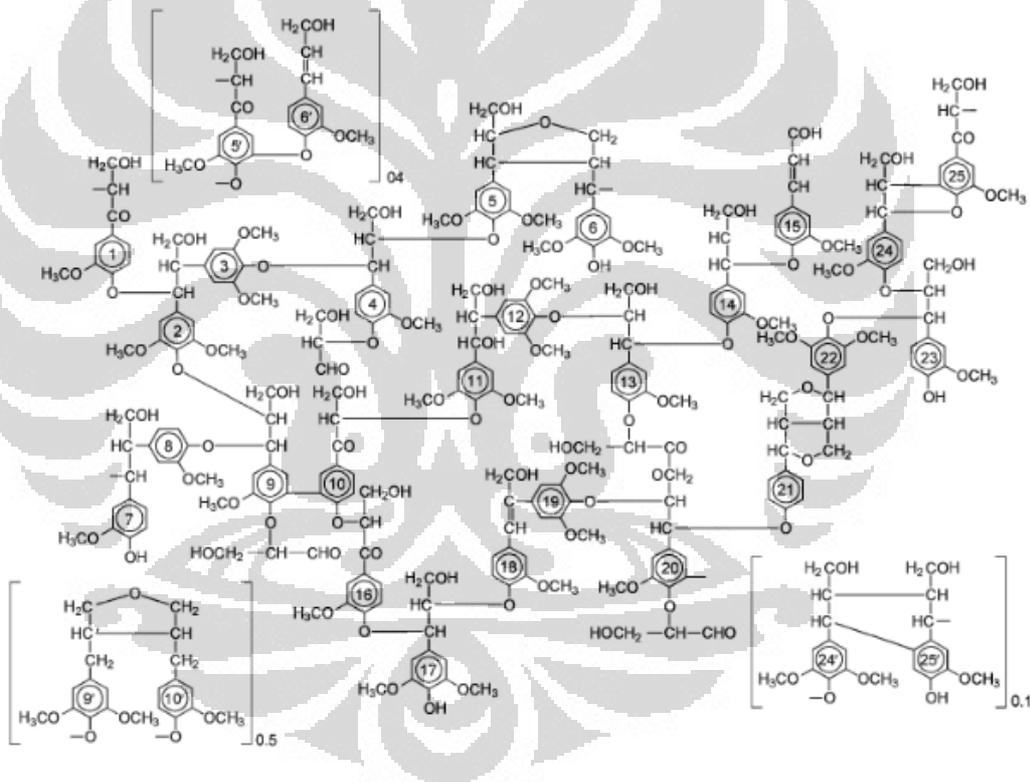
Gambar 2. 2 Struktur Hemiselulosa (Kirk-Othmer, 1993b)

### 2.2.3 Lignin

Lignin adalah polimer aromatik kompleks yang terbentuk melalui polimerasi tiga dimensi dari sinamil alkohol dengan bobot molekul 11.000

(Krisnawati, 2008). Lignin terbentuk dari fenil propana, unit-unit fenil propana terikat satu dengan lainnya dengan ikatan eter (C-O-C) maupun ikatan karbon-karbon (Sjostrom, 1981).

Lignin bersifat hidrofobik dan melindungi selulosa sehingga strukturnya bersifat kaku (*rigid*). Adanya ikatan aril alkil dan ikatan eter di dalamnya menyebabkan lignin menjadi tahan terhadap proses hidrolisis dari asam-asam universal. Lignin dapat dioksidasi oleh larutan alkali dan oksidator lain. Pada suhu tinggi, lignin dapat mengalami perubahan menjadi asam format, metanol, asam asetat, aseton dan vanilin (Judoamidjojo, *et al.*, 1989). Rumus struktur molekul lignin ditunjukkan pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3. Struktur Molekul Lignin (Kirk-Othmer, 1993c)

### 2.3 Sakarifikasi dengan Enzim

Enzim memiliki kemampuan mengaktifkan senyawa lain secara spesifik dan dapat meningkatkan kecepatan reaksi kimia. Enzim memiliki ukuran yang sangat besar apabila dibandingkan dengan substrat gugus fungsional targetnya.

Beberapa enzim hanya terdiri dari polipeptida dan tidak mengandung gugus kimiawi selain residu asam amino (Samsuri *et al.*, 2008).

Sakarifikasi enzimatik memiliki beberapa keuntungan dibandingkan dengan hidrolisis asam, diantaranya dapat menurunkan resiko korosi pada alat proses serta mengurangi kehilangan energi pada bahan bakar produksi. Kekurangan dari sakarifikasi enzimatik ini adalah lajunya akan menurun seiring meningkatnya konsentrasi glukosa di dalam reaktor. Inhibisi oleh glukosa ini pada akhirnya akan menghentikan proses sakarifikasi kecuali ada mekanisme khusus untuk mengambil glukosa yang terbentuk (Sun and Cheng, 2002).

Enzim yang digunakan untuk menghidrolisis selulosa menjadi glukosa adalah enzim selulase. Karena strukturnya yang rigid, selulosa kristalin resisten terhadap aksi individual selulase. Konversi efektif dari selulosa menjadi monosakarida hanya dimungkinkan oleh kerja sinergis dari ketiga subgroup selulase berikut :

1. Endo- $\beta$ -1,4-Dglukanase yang memecah ikatan internal glukosidik yang berada diantara rantai glukuan yang utuh.
2. Exo- $\beta$ -1,4-Dglukanase/exo- $\beta$ -1,4-selobiohidrolase yang memecah dimer selobiosa dari rantai glukuan dan melepaskannya ke dalam larutan,
3.  $\beta$ -glucosidase yang menyempurnakan hidrolisis selulosa menjadi glukosa dengan memecah selobiosa menjadi monomer glukosa

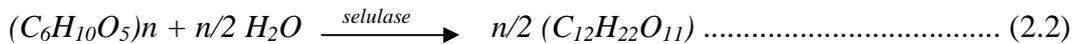
Selulase dapat dihasilkan dari mikroorganisme diantaranya yaitu *Trichoderma resei*, *Trichoderma longbractium*, *Trichoderma harzianum*, dan *T. Aureoviride*. Mikroorganisme lainnya yang juga bisa memproduksi selulase adalah *Aspergillus terreus* (Samsuri *et al.*, 2008).

Dua enzim lainnya yang dapat digunakan dalam proses sakarifikasi untuk menghasilkan glukosa adalah enzim selobiase atau disebut juga enzim  $\beta$ -glucosidase. Enzim ini diperlukan karena keberadaan selobiase dalam selulase hanya sedikit didominasi oleh enzim endoselulase dan enzim eksoselulase, sehingga sangat diperlukan penambahan enzim selobiase dari luar untuk menghasilkan konversi glukosa yang tinggi. Enzim lain yang dapat juga ditambahkan pada proses sakarifikasi yaitu enzim xilanase. Enzim ini berperan menghidrolisis hemiselulosa menjadi xilosa.

Secara teoritis reaksi sakarifikasi selulosa menjadi glukosa adalah sebagai berikut:



Sedangkan reaksi parsial selulosa menjadi selobiosa sebagai berikut :



Sedangkan reaksi sakarifikasi selobiosa menjadi glukosa sebagai berikut :



Secara teoritis reaksi sakarifikasi hemiselulosa menjadi xilosa dapat ditulis sebagai berikut :



## 2.4 Fermentasi

Istilah “fermentasi“ berasal dari kata latin *ferfere* yang artinya mendidihkan. Ini dianggap sebagai suatu peninggalan pada waktu ilmu kimia masih sangat muda sehingga terbentuknya gas dari suatu cairan hanya dapat dibandingkan dengan keadaan seperti air mendidih atau mulai mendidih (Judoamidjojo, 1992).

Fermentasi klasik yaitu upaya penguraian senyawa-senyawa organik kompleks dengan bantuan mikroorganisme pada kondisi anaerob untuk menghasilkan produk. Sedangkan fermentasi modern adalah upaya perubahan substrat dengan bantuan mikroorganisme dalam kondisi terkontrol sehingga menghasilkan bahan yang lebih berguna (Pujaningsih, 2005).

Pada dasarnya substrat yang digunakan pada fermentasi skala industri adalah sumber karbon. Sumber karbon yang biasa digunakan adalah karbohidrat yang dapat diperoleh dari berbagai jenis pati seperti sereal, jagung, kentang, singkong dan sagu. Salah satu proses fermentasi yang paling penting dan terkenal ialah produksi etanol dari karbohidrat. Proses fermentasi ini dimanfaatkan oleh para pembuat bir, roti, anggur, bahan kimia, para ibu rumah tangga, dan lain-lain (Pelczar dan Chan, 2005). Fermentasi etanol terjadi pada kondisi anaerob dengan khamir tertentu yang dapat mengkonversi glukosa jadi etanol melalui Embden-Meyerhoff-Parras (EMP) *pathway* (Pelczar dan Chan, 2005).

Fermentasi akan merubah satu molekul glukosa menjadi dua molekul etanol dan dua molekul CO<sub>2</sub> sehingga berdasarkan bobotnya secara teoritis satu

gram glukosa menghasilkan 0,51 gram etanol (Judoamidjojo, 1992). Proses perubahan gula yang dilakukan *yeast* sebagai berikut :



Hasil fermentasi biasanya hanya terbentuk larutan etanol encer, karena sel-sel *yeast* akan mati pada kadar etanol yang lebih pekat. Untuk mendapatkan konsentrasi etanol yang lebih tinggi, larutan tersebut harus disuling secara bertingkat (Fessenden and Fessenden, 1982).

Bahan-bahan yang mengandung monosakarida langsung dapat difermentasikan, akan tetapi disakarida, pati maupun karbohidrat kompleks harus dihidrolisis terlebih dahulu menjadi komponen yang lebih sederhana yaitu monosakarida. Oleh karena itu agar proses fermentasi berjalan optimal maka bahan-bahan tersebut harus mengalami perlakuan pendahuluan sebelum masuk ke dalam proses fermentasi (Samsuri *et al.*, 2008).

## 2.5 Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak/SSF

Pada metode terdahulu proses sakarifikasi dan fermentasi dilakukan secara terpisah atau *Separated Hydrolysis and Fermentation (SHF)*, sedangkan metode yang terbaru adalah proses *Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF)*. Satu diantara beberapa keuntungan dari proses SSF adalah sakarifikasi dan fermentasi dilakukan dalam satu reaktor sehingga dapat berlangsung secara efisien. Sakarifikasi bertujuan untuk memecah polisakarida menjadi monosakarida sehingga dapat langsung difermentasi oleh *yeast* atau jamur.

SSF pertama kali diperkenalkan oleh Takagi pada tahun 1997, yaitu kombinasi antara sakarifikasi menggunakan enzim dengan fermentasi gula menjadi etanol secara simultan. Keuntungan dari proses ini adalah kerja enzim selulase tidak terhambat oleh produk sakarifikasi seperti selobiosa dan glukosa, karena glukosa yang dihasilkan langsung difermentasi menjadi etanol. Selain itu dengan proses SSF reaksi dilakukan dalam satu reaktor sehingga akan mengurangi biaya produksi (Sun and Cheng, 2002; Sudiyani, 2009).

## 2.6 Imobilisasi Sel

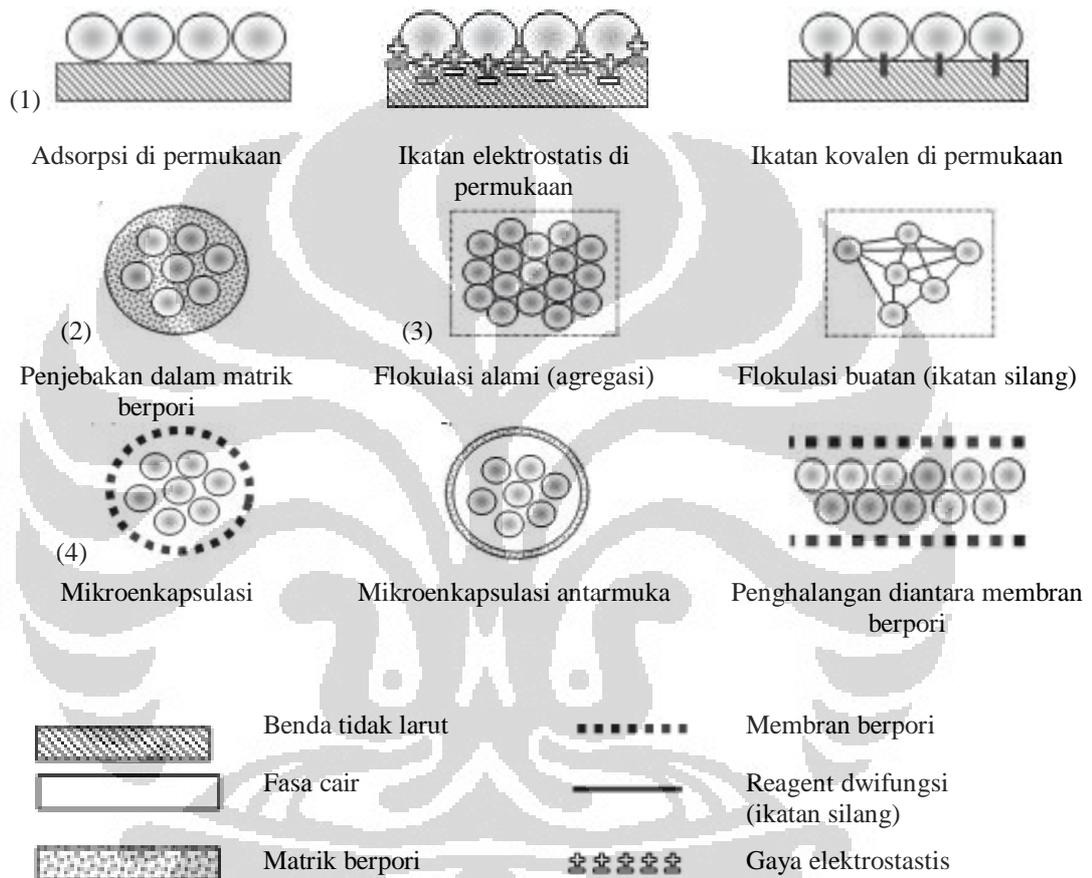
Ide awal penggunaan mikrokapsul dilakukan untuk melindungi transplantasi sel. Sel dikelilingi oleh matrik yang mempunyai kekuatan mekanik yang cukup tetapi dapat dilewati oleh molekul-molekul kecil nutrisi dan oksigen yang diperlukan oleh pertumbuhan sel dan juga dapat mengeluarkan zat-zat beracun hasil samping metabolisme dan hormon-hormon yang diproduksi sebagai hasil dari proses metabolisme. Material pelapis biasanya juga disebut sebagai kapsul, membran atau cangkang umumnya terbuat dari polimer alam maupun sintetis seperti polisakarida, protein, lemak, poliamid, nilon dan lain lain (Talebnia and Taherjaded, 2006). Alasan utama penggunaan polimer untuk enkapsulasi adalah kemampuannya untuk berada pada fasa yang berbeda seperti cair, gel maupun padat yang memungkinkan untuk mempunyai kekuatan mekanik dan fisik yang cukup (Kampf, 2002).

Immobilisasi sel dengan densitas yang tinggi tidak hanya meningkatkan produktivitas bioreaktor, tetapi juga memberikan beberapa keuntungan dibandingkan sel bebas. Sel mikroba yang diimmobilisasi dalam matrik hidrogel dapat meningkat ketahanannya dari pengaruh kondisi lingkungan seperti pH, suhu, pelarut organik dan zat beracun. Immobilisasi sel dapat meningkatkan yield produk fermentasi. *Saccharomyces cerevisiae* yang diimmobilisasi dengan menggunakan alginat dapat meningkatkan etanol yang dihasilkan hingga 3,5 kali dibandingkan dengan sel bebas (Talebnia et al., 2006).

Immobilisasi sel juga dapat digunakan dalam proses kontinyu tanpa mengalami kehilangan biomasa sel walaupun pada tingkat pengenceran yang tinggi sehingga dapat meningkatkan produktivitas bioreaktor. Proses kontinyu mulai disukai untuk proses menghasilkan etanol, karena proses kontinyu lebih menguntungkan dibandingkan proses *batch* diantaranya karena memberikan hasil yang lebih seragam, tidak memerlukan banyak pengawasan dalam proses dan menghasilkan produktivitas volume produk yang tinggi (Pilkington *et al.*, 1998). Metode enkapsulasi mulai digunakan sejak tahun 1993 sebagai teknologi alternatif dalam teknik penjematan sel dalam matrik dan telah banyak diaplikasikan dalam

berbagai proses bioproses seperti imobilisasi enzim, sel buatan dan biosorben (Park and Chang, 2000).

Imobilisasi sel dalam sebuah matrik dapat dilakukan dengan beberapa metode diantaranya dijelaskan oleh Kourkoutas *et al.*(2004) seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.4 :



Gambar 2.4. Jenis-jenis Metode Imobilisasi Sel (Kourkoutas *et al.*, 2004)

#### 1. Imobilisasi dalam permukaan padat

Imobilisasi sel dalam permukaan padat dapat terjadi akibat adsorpsi fisik antara gaya elektrostatis atau oleh ikatan kovalen antara membran sel dan permukaan padat. Ketebalan dari dinding sel buatan berkisar antara satu lapis sel sampai 1 mm bahkan lebih. Mekanisme ini disukai karena mudah dalam diaplikasikan. Namun karena tidak ada pelindung antara sel yang diimobilisasi

dengan lingkungan luar, maka kemungkinan sel lepas atau berpindah tinggi. Zat padat yang umum digunakan dalam proses ini adalah material berselulosa (kayu, serut kayu), dan senyawa anorganik seperti kaca.

## 2. Imobilisasi dalam matrik berpori

Pada jenis imobilisasi ini, sel dapat masuk ke dalam matrik berpori sampai pergerakannya terbatas oleh keberadaan sel lainnya atau matrik berpori terbentuk secara *in situ* oleh keberadaan sel. Metode ini pada dasarnya adalah memasukan sel ke dalam suatu jaringan yang kaku untuk mencegah sel berdifusi ke luar, namun perpindahan massa difusi masuk dan keluar nutrisi, substrat dan metabolit melalui dinding buatan masih dapat terjadi. Metode yang terkenal adalah *bead entrapment*. Gel matrik berpori biasanya tersusun atas agar, agarosa, *kappa-carragenan*, kolagen, kitosan dan selulosa. Beberapa komponen tersebut cukup mahal namun memiliki kekuatan mekanik yang kecil. Umumnya *bead entrapment* dilakukan dengan menggunakan kalsium alginat.

Pertumbuhan sel di dalam matrik berpori tergantung pada porositas bahan yang menentukan batas difusi melalui pori dan oleh pengaruh akumulasi pertumbuhan sel didalam pori. Salah satu kelemahan metode ini adalah tumbuhnya sel di bagian permukaan matrik yang kemudian dapat lepas dan menjadi sel bebas yang tumbuh di media. Untuk mengatasi permasalahan ini diantaranya dengan membuat dua lapis dinding dimana bagian inti adalah matrik yang berisi sel dan dinding bagian luar yang berfungsi sebagai pelindung matrik.

## 3. Flokulasi sel (penggumpalan)

Flokulasi sel didefinisikan sebagai penggumpalan sel menjadi lebih besar atau sel didalam larutan untuk menjadi sebuah gumpalan atau sedimen secara cepat. Flokulasi sel merupakan teknik imobilisasi sel yang menjanjikan untuk digunakan pada reaktor seperti reaktor berunggun atau reaktor kontinyu. Kemungkinan menjadi penggumpalan dapat terjadi pada jamur dan sel tanaman. Flokulasi buatan dengan ikatan silang dapat digunakan untuk meningkatkan flokulasi pada sel yang tidak dapat terflokulasi secara alami.

#### 4. Mekanisme penghalangan dalam suatu dinding penghalang (enkapsulasi)

Penahanan sel didalam sebuah dinding penghalang dapat dilakukan dengan menggunakan filter membran mikropori atau dengan penjebakan sel didalam mikrokapsul. Metode imobilisasi ini cocok digunakan untuk sel dengan transfer senyawa yang minimal. Pada metode ini terbentuk imobilisasi sel dengan terbentuknya dinding sel buatan dengan bagian dalam kapsul berupa cairan dengan kerapatan sel yang tinggi. Metode ini dapat mengatasi kelemahan lepasnya sel dan tumbuh di media pertumbuhan yang terjadi pada *bead entrapment*. Salah satu kekurangan dalam metode ini adalah terbatasnya transfer massa dan terjadinya *biofouling* pada membran karena pertumbuhan sel.

Beberapa metode enkapsulasi seperti yang telah dijabarkan oleh Park and Chang (2000) adalah sebagai berikut :

##### a. Koaservasi (*coacervation*)

Koaservasi adalah metode pembentukan inti cair didalam kapsul polimer. Ketika semua parameter seperti suhu, pH dan komposisi kimia telah ditentukan, fasa cair dari komponen pembentuk membran terpisahkan dari larutan polimer dan membungkus inti cair dalam bentuk lapisan yang merata. Lapisan pembentuk membran akan mengeras akibat pengaruh panas, ikatan silang atau hilangnya pelarut. Senyawa hidrofilik seperti gelatin dapat digunakan untuk menenkapsulasi jenis minyak, sedangkan senyawa hidrofobik dapat digunakan untuk melapisi inti cair yang bersifat mudah larut dalam air. Koaservasi merupakan proses enkapsulasi yang efisien namun mahal.

##### b. Emulsi/Polimerisasi antar muka

Polimerisasi antar-muka terjadi antara monomer-monomer yang dilarutkan dalam fasa larutnya masing-masing. Larutan yang mengandung monomer yang larut dalam air ditetaskan dan tersebar dalam fasa organik oleh pengadukan. Membran kapsul terbentuk dengan penambahan monomer yang larut dalam pelarut organik ke dalam fasa organik.

c. *Pregel dissolving* (metode dua langkah)

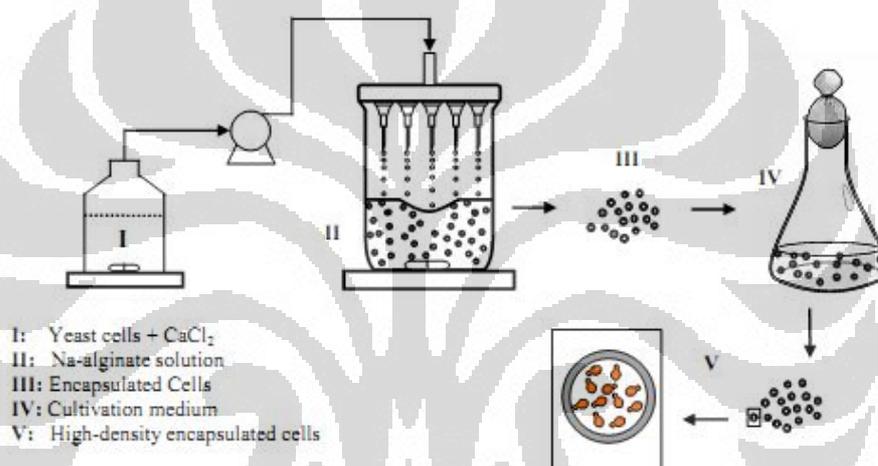
Teknik enkapsulasi mulai berkembang sejak ditemukannya metode *pregel dissolving* pada tahun 1980. Metode ini hampir sama dengan metode *bead entrapment* menggunakan kalsium alginat, namun setelah terbentuk *bead* kalsium alginat, larutan ditambahkan senyawa polimer yang mengandung gugus amina yang reaktif seperti *poly-L-lysine* atau polietilenamin sehingga terbentuk membran yang kompleks diatas permukaan *bead* kalsium alginat. Metode pengikatan antara *poly-L-lysine* ini dengan kalsium alginat adalah ikatan silang, inti cair akan terbentuk ketika kalsium alginat dimasukkan ke dalam larutan sodium sitrat.

d. *Liquid droplet forming* (metode satu langkah)

Metode ini dilakukan dengan melarutkan sel dalam larutan  $\text{CaCl}_2$  kemudian ditetaskan ke dalam larutan sodium alginat sambil diaduk. Membran kalsium alginat terbentuk secara cepat di permukaan tetesan larutan (*droplet*)  $\text{CaCl}_2$  oleh ikatan ionik membentuk kapsul kalsium alginat. Ketebalan dinding sel, ukuran pori, kekuatan membran ditentukan dengan variasi konsentrasi natrium alginat dan  $\text{CaCl}_2$  yang digunakan. Metode ini telah digunakan untuk mengenkapsulasi yeast, bakteri dan jamur sejak tahun 1993.

Biopolimer yang umum digunakan untuk proses enkapsulasi adalah natrium alginat. Natrium alginat merupakan suatu polisakarida yang diekstraksi dari ganggang coklat marga *Sargassum* dan *Turbinaria* menggunakan larutan basa encer (Surini, *et al.*, 2003). Natrium alginat mempunyai gugus karboksilat yang dapat terion menjadi muatan negatif. Natrium alginat larut dalam air dan membentuk koloid kental dan tidak larut dalam medium dengan pH kurang dari 3, etanol dan pelarut organik lainnya. Larutan natrium alginat stabil pada pH 4 sampai 10 (Kibbe, 2000). Kalsium alginat sangat ringan dan umum digunakan dalam pengebakan sel hewan, sel tumbuhan, sel mikroba, kloroplas, dan sel darah merah.

Polimer hidrogel alami seperti natrium alginat dapat digunakan sebagai enkapsulasi karena dapat melindungi sel yang terdapat didalamnya dari lingkungan yang buruk yang dapat meracuni sel. Mencegah kontak dengan suhu yang tinggi dan pelarut organik, serta menjamin bahwa tidak terjadi hilangnya aktivitas sel yang terdapat di dalamnya. Keuntungan enkapsulasi dibandingkan dengan sel bebas adalah menghasilkan kerapatan sel yang tinggi, meningkatkan produk, dan melindungi sel dari stress akibat agitasi dan aerasi (Pandey and Khulle, 2005). Skema pembuatan enkapsulasi sel ditunjukkan pada Gambar 2.5.



Gambar 2.5. Skema Pembuatan Enkapsulasi Sel

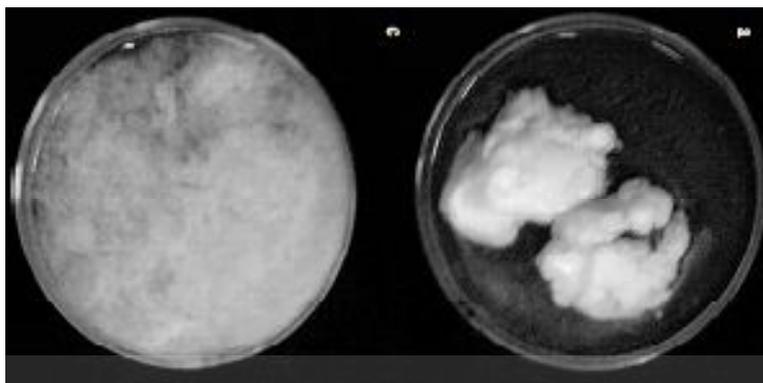
## 2.7 *Rhizopus oryzae*

Sifat-sifat jamur *R. oryzae* yaitu koloni berwarna putih berangsur-angsur menjadi abu-abu, stolon halus atau sedikit kasar dan tidak berwarna hingga kuning kecoklatan, sporangiofora tumbuh dari stolon dan mengarah ke udara, baik tunggal atau dalam kelompok (hingga 5 sporangiofora), rhizoid tumbuh berlawanan dan terletak pada posisi yang sama dengan sporangiofora, spora bulat, oval atau berbentuk elips. Suhu optimal untuk pertumbuhan *R. oryzae* adalah  $35^{\circ}\text{C}$ , suhu minimal pertumbuhan adalah  $5-7^{\circ}\text{C}$  sedangkan suhu maksimal *R. oryzae* dapat tumbuh adalah  $44^{\circ}\text{C}$  (Soetrisno and Sapuan, 1996). Taksonomi *R. oryzae* sebagai berikut:

Kingdom : *Fungi*  
Divisi : *Zygomycota*  
Kelas : *Zygomycetes*  
Ordo : *Mucorales*  
Famili : *Mucoraceae*  
Genus : *Rhizopus*  
Spesies : *Rhizopus oryzae*

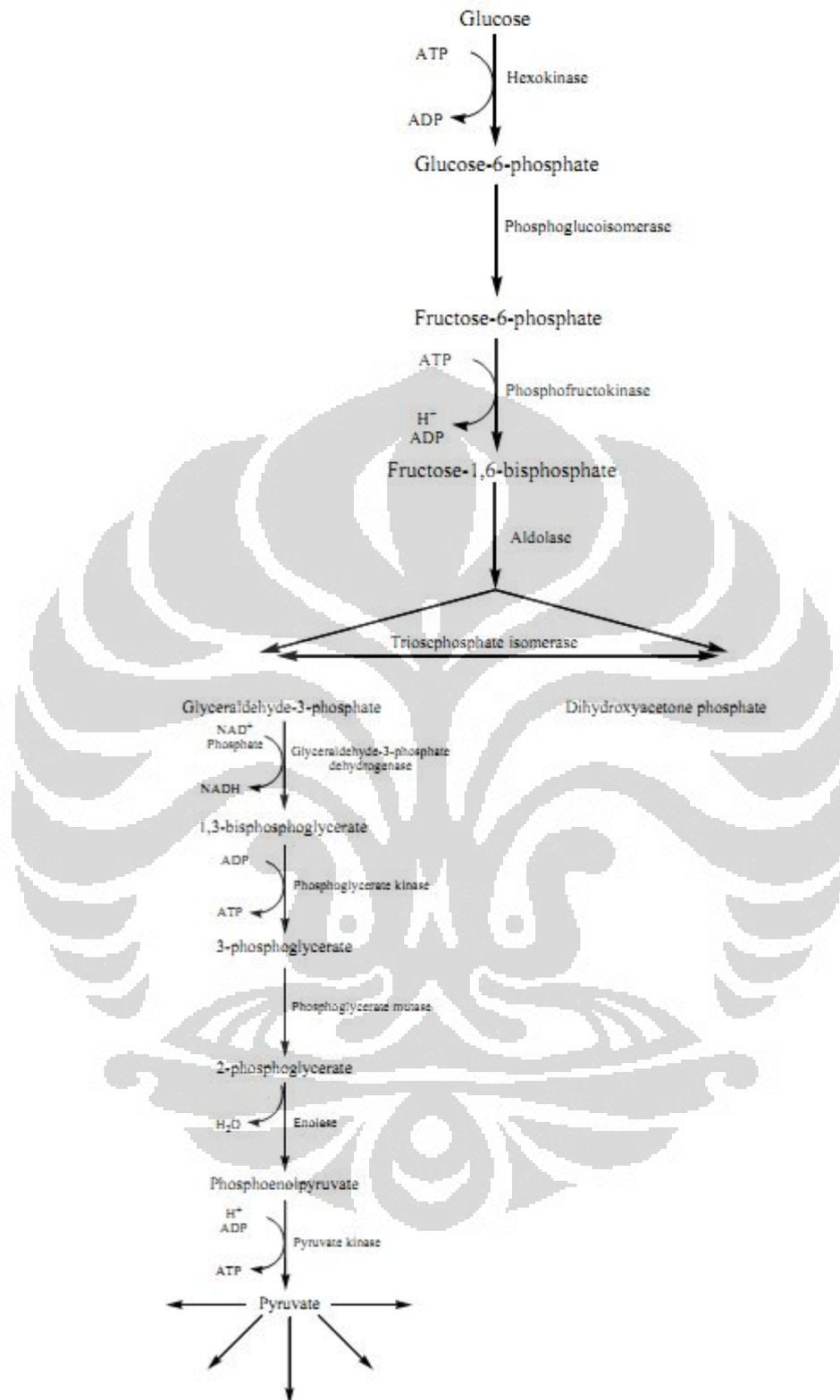
Jamur *R. oryzae* merupakan jamur yang sering digunakan dalam pembuatan tempe (Soetrisno and Sapuan, 1996). Jamur *R. oryzae* aman dikonsumsi karena tidak menghasilkan toksin dan mampu menghasilkan asam laktat. Jamur *R. oryzae* mempunyai kemampuan mengurai lemak kompleks menjadi trigliserida dan asam amino. Selain itu jamur *R. oryzae* mampu menghasilkan protease (Ghosh and Ray, 2011).

*R. oryzae* umumnya digunakan untuk menghasilkan asam laktat, namun dapat juga menghasilkan etanol. Perbedaan proses yang dilakukan adalah dengan mengubah kondisi proses menjadi anaerob dan memperkaya media dengan nutrisi, gula heksosa atau pentosa dan inokulum (Taherjاده *et al.*, 2003). *R. oryzae* dapat menghasilkan etanol baik dari heksosa maupun dari pentosa, sehingga lebih menguntungkan untuk bahan baku lignoselulosa yang tidak hanya terdapat heksosa tapi juga pentosa (Millati *et al.*, 2002). Keuntungan menggunakan *R. oryzae* untuk memproduksi etanol adalah *R. oryzae* dapat tumbuh pada suhu yang lebih tinggi dibandingkan *S. cerevisiae*, dan juga menghasilkan biomassa lain yang berharga seperti kitosan. Keuntungan lain adalah dapat digunakan baik dari bahan baku maupun limbah, tidak memerlukan nutrisi yang spesifik, dan karena bentuknya yang berfilamen sehingga mudah dipisahkan dari campuran hasil (Soccol *et al.*, 1994). Gambar *R. oryzae* ditunjukkan pada Gambar 2.6.

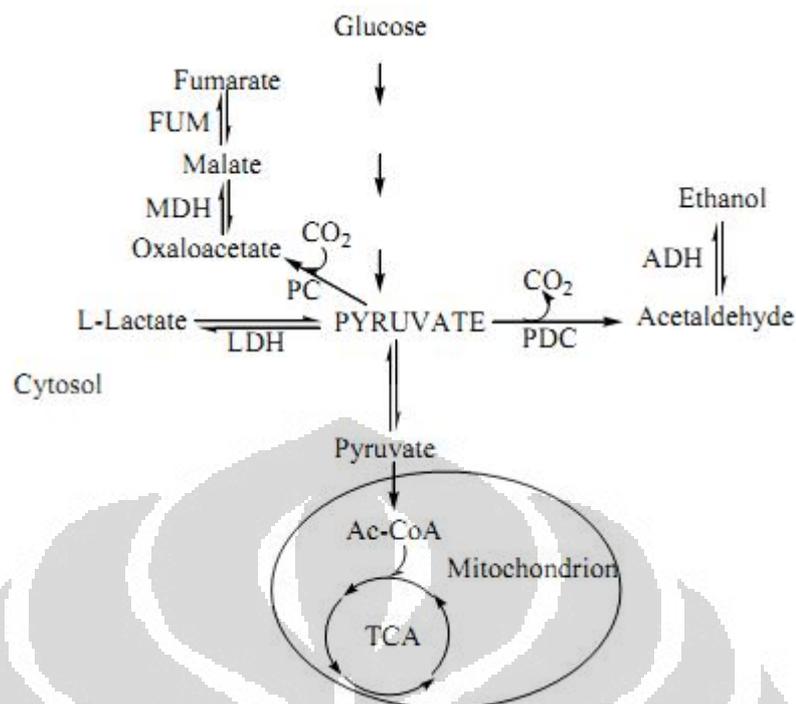


Gambar 2.6. *Rhizopus oryzae* (Buyukkileci et al, (2006))

Proses metabolisme jamur adalah dengan proses glikolisis seperti mikroorganisme lainnya. Jamur menghidrolisis oligosakarida, mengalirkan glukosa ke dalam sel dan mengoksidasinya menjadi asam piruvat dan mengkatabolisme asam piruvat. Skema proses glikolisis ditunjukkan Gambar 2.7. Gula pospat diubah menjadi triosa pospat lalu dioksidasi menjadi asam piruvat melalui mekanisme Embden-Meyerhoff-Parras (EMP) *pathway*. Proses glikolisis mengubah satu mol glukosa menjadi dua mol asam piruvat melalui 10 tahapan enzimatik. Setelah proses glikolisis, maka selanjutnya asam piruvat yang dihasilkan akan digunakan tergantung dari jenis mikroorganisme dan enzim yang berperan seperti yang terlihat pada Gambar 2.8. Dalam mikroorganisme aerob, asam piruvat akan dioksidasi menjadi *asetil CoA* oleh enzim *pyruvate dehydrogenase* (PDH) dan dioksidasi lebih lanjut menjadi karbondioksida dan air di dalam mitokondria melalui siklus *Tricarboxylic acid* (TCA). Asam piruvat yang dihasilkan akan dilakukan proses metabolisme oleh *Rhizopus oryzae* menjadi asam laktat atau etanol. Proses fermentasi menjadi asam laktat dilakukan dengan mengubah asam piruvat menjadi asam laktat dengan menggunakan enzim *lactate dehydrogenase* (LDH). Sedangkan untuk menghasilkan etanol, asam piruvat akan diubah oleh enzim *pyruvate decarboxylase* (PDC) menjadi asetaldehid dan karbondioksida untuk selanjutnya asetaldehid diubah menjadi etanol oleh *alcohol dehydrogenase* (ADH). Aktivitas PDC akan meningkat dengan cara mengubah kondisi proses dari kondisi aerob menjadi anaerob.



**Gambar 2.7** Skema Glikolisis *Rhizopus oryzae* (Buyukkileci *et al.*, (2006))



**Gambar 2. 8** Proses Metabolisme Jalur Piruvat *Rhizopus oryzae* (Buyukkileci *et al.*, (2006))

## 2.8 State of The Art

Penelitian tentang bioetanol telah lama dilakukan para peneliti untuk mencari kondisi yang optimal. Bioetanol merupakan energi alternatif untuk mengatasi krisis energi akibat cadangan energi fosil yang terus menipis. Penelitian bioetanol dari bahan baku limbah lignoselulosa diantaranya dilakukan oleh Samsuri *et al.* (2008) dengan menggunakan *S. cerevisiae* dalam limbah bagas menghasilkan 8,2 g/l etanol dari bagas sebanyak 0,25 g (50 g/l glukosa). Selain itu juga Sudiyani (2009) melakukan proses SSF dari TKKS dengan menggunakan *S. cerevisiae* menghasilkan 10,5 g/l etanol dengan yield sebesar 32,54%, sedangkan Karimi *et al.* (2006) melakukan proses fermentasi dari limbah hidrolisis kayu dengan asam encer menggunakan *S. cerevisiae*, *Mucor indicus*, dan *R. oryzae*. Hasil penelitian tersebut menunjukkan *S. cerevisiae* hanya dapat memfermentasi gula-gula heksosa saja, sedangkan hidrolisis bahan lignoselulosa selain mengandung gula heksosa, juga mengandung gula-gula pentosa. Namun beberapa penelitian menunjukkan rekombinan *S. cerevisiae* dapat menghasilkan etanol dari gula pentosa.

Beberapa penelitian dilakukan dengan jamur berfilamen untuk memfermentasi glukosa menjadi etanol. Hasil penelitian menunjukkan *Rhizopus oryzae* dapat melakukan fermentasi glukosa menjadi etanol seperti yang telah dilakukan oleh Millati *et al.* (2002) menghasilkan 20 g/l etanol dan 4 g/l asam laktat dari 50g/l glukosa, Karimi *et al.* (2006) 21,51 g/l etanol pada kondisi anaerob dan 19,25 g/l pada kondisi aerob dari 50 g/l kertas saring *Avicel*, sedangkan dengan menggunakan batang padi dihasilkan etanol sebanyak 12,35 g/l pada kondisi anaerob dan 9,20 g/l pada kondisi aerob. Abedinifar *et al.* (2009) juga melakukan penelitian dengan menggunakan bahan batang padi yang dihidrolisis dengan asam encer. Walaupun umumnya *R. oryzae* digunakan untuk menghasilkan asam laktat seperti yang dilakukan oleh Jin *et al.* (2005), Huang *et al.* (2005) and Buyukkileci *et al.* (2006).

Proses fermentasi yang menguntungkan untuk menghasilkan bioetanol adalah menggunakan proses SSF yaitu menggabungkan proses sakarifikasi dengan fermentasi. Namun, pada proses SSF terdapat kendala yaitu perbedaan suhu optimum proses sakarifikasi dan fermentasi, sehingga beberapa penelitian dilakukan untuk mengatasi hal tersebut. Salah satu metode yang dilakukan adalah dengan teknik enkapsulasi sel. Penelitian yang dilakukan oleh Talebnia and Taherjadeh (2006) menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* yang dienkapsulasi terbukti dapat meningkatkan etanol yang dihasilkan. Ylivero *et al.* (2011) melakukan fermentasi dengan menggunakan *S. cerevisiae* pada beberapa suhu proses menunjukkan *S. cerevisiae* yang dienkapsulasi dapat menghasilkan etanol pada suhu yang lebih tinggi dibandingkan *S. cerevisiae* yang tidak dienkapsulasi. Enkapsulasi juga dapat dilakukan pada *R. oryzae* seperti yang dilakukan oleh Hamamci *et al.* (1994) yang menghasilkan 73 g/l asam laktat dari 150 g/l glukosa, dan Lin *et al.* (2007) menghasilkan 20 g/l asam laktat. Hasil penelitian Hamamci *et al.* (1994) juga menunjukkan bahwa *R. oryzae* yang dienkapsulasi menghasilkan asam laktat yang lebih tinggi dibanding *R. oryzae* yang tidak dienkapsulasi, selain itu *R. oryzae* yang dienkapsulasi dapat digunakan untuk proses yang berulang-ulang.

Dari hasil penelitian sebelumnya seperti yang ditunjukkan pada Tabel 2.3, akhirnya muncul kesimpulan bahwa *R. oryzae* yang dienkapsulasi juga dapat

memiliki ketahanan terhadap inhibisi dari suhu dan produk yang dihasilkan melalui proses SSF untuk menghasilkan bioetanol yang lebih tinggi dari bahan TKKS.

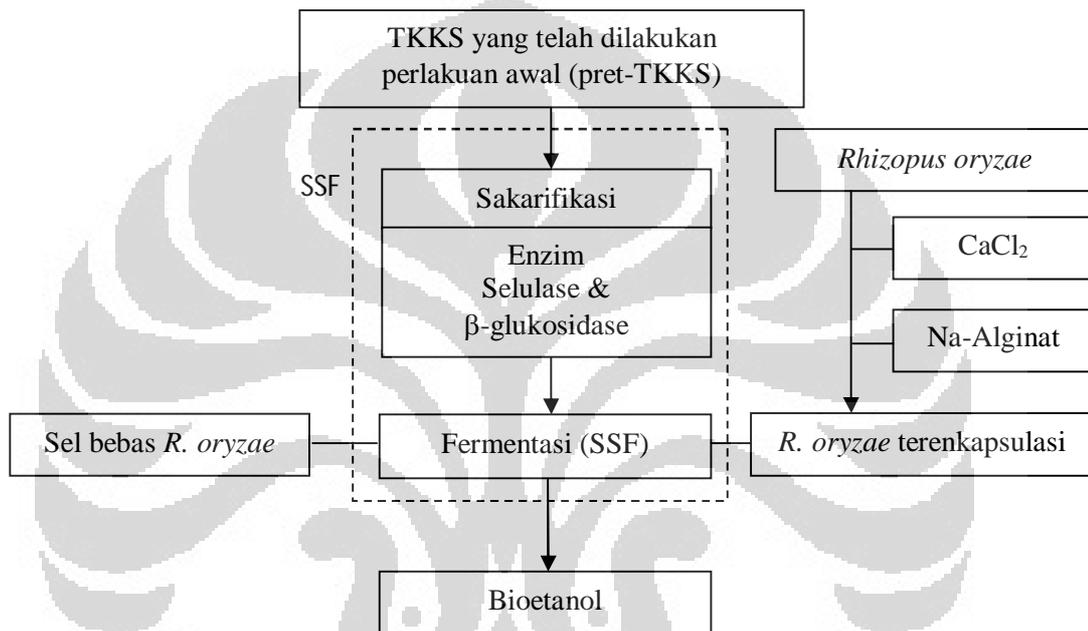
**Tabel 2.4. Tabel *State of the Art* Penelitian Bioetanol**

	Etanol		Asam laktat
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>R. oryzae</i>	<i>R. oryzae</i>
<b>Sel bebas</b>	Sudiyani, 2009 Samsuri <i>et al.</i> , 2008 Karimi <i>et al.</i> , 2006	Abedinifar <i>et al.</i> , 2009 Karimi <i>et al.</i> , 2006 Buyukkileci <i>et al.</i> , 2006 Millati <i>et al.</i> , 2002	Buyukkileci <i>et al.</i> , 2006 Huang <i>et al.</i> , 2005 Jin <i>et al.</i> , 2005
<b>Enkapsulasi/ Imobilisasi</b>	Talebnia and Taherjاده, 2006 Ylitervo <i>et al.</i> , 2011	Penelitian yang dilakukan	Hamamci <i>et al.</i> , 1994 Lin <i>et al.</i> , 2007

### BAB 3

## METODE PENELITIAN

Secara umum, rangkaian penelitian yang dilakukan untuk menghasilkan etanol dari TKKS dengan proses Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak (SSF) menggunakan enkapsulasi *Rhizopus oryzae* dapat digambarkan dengan diagram alir seperti ditunjukkan pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1. Diagram Alir Penelitian

Secara singkat dalam penelitian ini akan dilakukan proses SSF dengan menggunakan enzim selulase dan β-glukosidase serta *R. oryzae* yang telah dienkapsulasi dalam kalsium-alginat. Rangkaian proses SSF diawali dengan membuat enkapsulasi *R. oryzae* untuk proses SSF, kemudian dilakukan optimasi pH dan suhu proses SSF. Setelah semua proses SSF dilakukan, maka setiap sampel dianalisis dengan *High Performance Liquid Chromatografi* (HPLC) untuk menentukan jumlah konsentrasi glukosa dan etanol yang dihasilkan.

### 3.1 Alat dan Bahan yang Digunakan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini terbagi menjadi peralatan yang digunakan dalam proses SSF dan peralatan/instrument pengambilan data. Peralatan untuk proses SSF terdiri dari :

1. Erlenmeyer 250 ml yang berfungsi sebagai reaktor *batch*,
2. Peralatan *Glassware* yang terdiri dari Erlenmeyer, pipet ukur, pipet tetes, gelas ukur, botol sample, dan *beaker glass*,
3. Oven, sebagai tempat sterilisasi dan pengeringan peralatan,
4. *Rotary shaker incubator*,
5. *Autoclave* untuk mensterilkan alat dan bahan,

Peralatan/instrument untuk mengambil data terdiri atas :

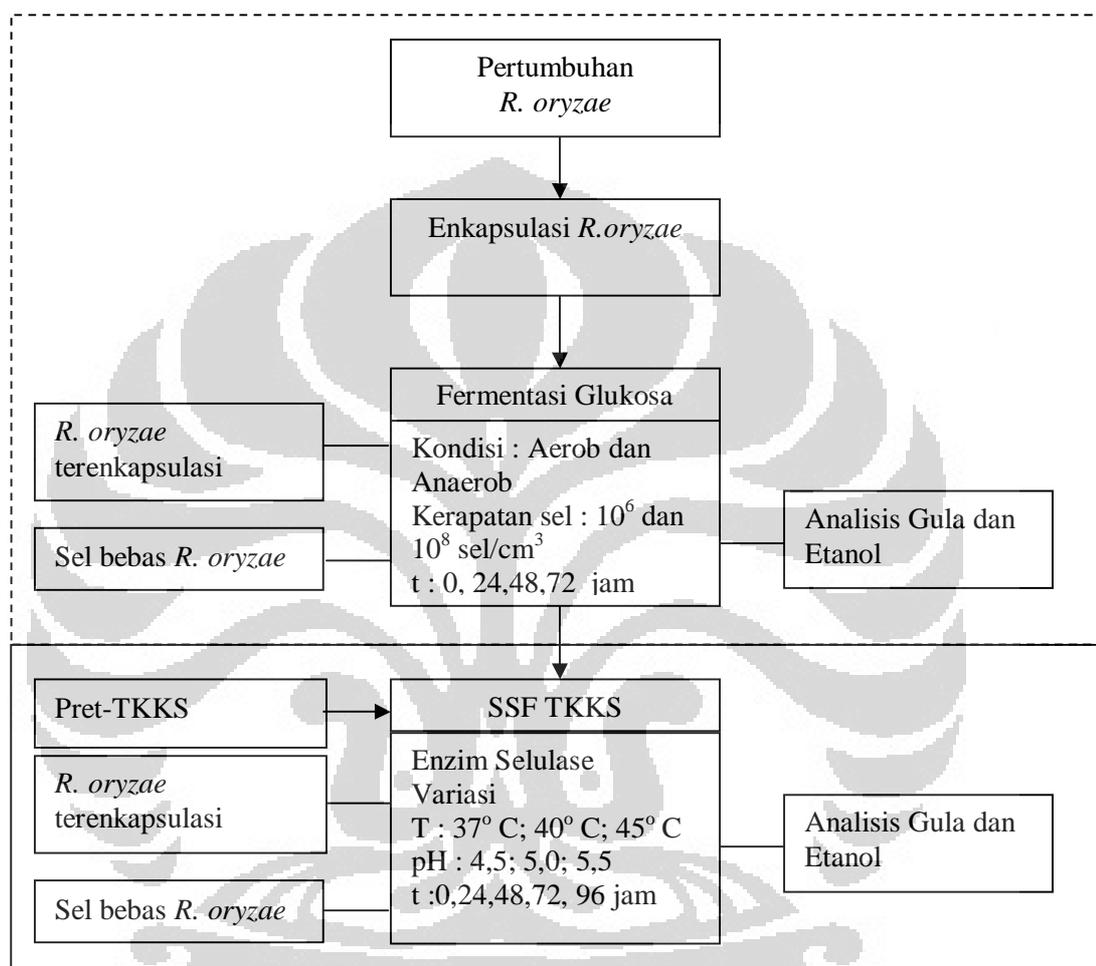
1. pH Meter (Mettler Toledo) untuk mengukur pH medium,
2. Mikroskop dan *Haemocytometer*, untuk mengukur kerapatan sel
3. Termometer untuk mengukur suhu proses,
4. *HPLC* (Waters 2695, Milford, MA) untuk mengukur konsentrasi etanol, Kolom Aminex HPX-87H (Bio-Rad, Richmond, CA, USA), RI Detektor (Waters, 2414), suhu kolom 65°C, suhu detektor 40°C, asam sulfat 5mM sebagai *eluent* dengan laju alir 0.6 ml/min.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

1. TKKS dari PTPN VIII Kebun Kertajaya, Malimping, Pandeglang Banten.
2. Enzim selulase dan  $\beta$ -glukosidase (NOVOzymes, Bagsverd, Denmark),
3. Jamur *Rhizopus oryzae* (kultur lab Mikrobiologi SITH, ITB)
4. Bahan-bahan kimia untuk membuat medium : *Potato Dextrose Agar (PDA)*, glukosa, *yeast extract*,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , bufer sitrat, NaOH, asam asetat. Bahan kimia untuk enkapsulasi sel : Na-Alginat,  $\text{CaCl}_2$ .
5. Bahan-bahan kimia untuk analisis : glukosa monohidrat, etanol pro analis, kalsium karbonat, aquades.

### 3.2 Tahap Pelaksanaan Penelitian

Pada Gambar 3.2 ditunjukkan diagram alir tahapan pelaksanaan penelitian ini, variabel-variabel penelitian dan penjelasan mengenai prosedur yang akan dilakukan.



Gambar 3.2. Diagram Alir Tahapan Penelitian

Penelitian dimulai dengan melakukan pertumbuhan dan perbanyakan inokulum *R. oryzae*, kemudian dilakukan enkapsulasi menggunakan kalsium-alginat. *R. oryzae* yang telah dienkapsulasi kemudian diuji kinerjanya dengan fermentasi menggunakan glukosa pada variasi jumlah inokulum dan kondisi aerob dan anaerob. Hasil terbaik yang didapat difermentasi glukosa ini digunakan untuk kondisi pada tahap selanjutnya yaitu proses SSF menggunakan tandan kosong kelapa sawit yang telah dilakukan perlakuan awal.

### 3.2.1 Variabel penelitian

Variabel yang ditentukan dalam penelitian ini adalah :

1. Variabel bebas, yaitu variasi pH dan variasi suhu proses SSF.
2. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah etanol yang dihasilkan dan kadar glukosa selama proses SSF.

### 3.2.2 Pemiakan kultur *Rhizopus oryzae*

#### 3.2.2.1. Stock kultur *R. oryzae*

*R. oryzae* ditumbuhkan sementara pada *Potato Dextrose Agar* (PDA). Agar sebanyak 3,90 gr dilarutkan ke dalam 100 ml aquades dan diaduk sambil dipanaskan sampai semua bahan larut. Medium dimasukkan kedalam tabung reaksi lalu disterilisasi dengan *autoclave* pada suhu 121° C selama  $\pm 15$  menit. Medium yang telah steril didinginkan dengan cara tabung reaksi dimiringkan. Lampu UV dan blower *laminar transfer box* dinyalakan selama  $\pm 20$  menit. Sebanyak 1 ose *R. oryzae* diinokulasikan dengan kawat ose secara aseptis pada media agar miring PDA. Agar miring tersebut kemudian diinkubasikan selama  $\pm 48$  jam di dalam inkubator pada suhu 32° C. *R. oryzae* dalam PDA ini disimpan di kulkas pada suhu 4° C sebagai *stock* kultur *R. oryzae*.

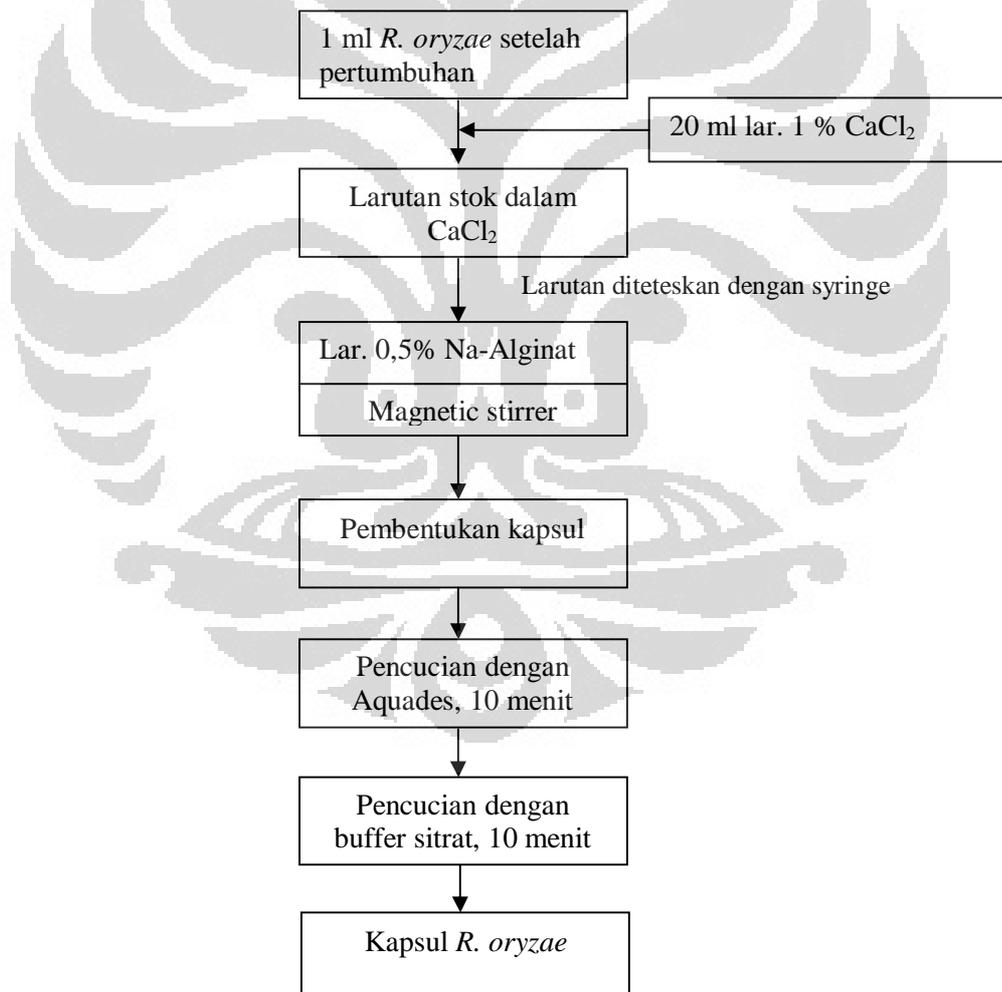
#### 3.2.2.2. Pertumbuhan *R. oryzae*

*R. oryzae* dari *stock* dikultivasi pada 100 ml medium yang telah disterilisasi dengan *autoclave* pada suhu 121° C selama 15 menit. Medium terdiri dari 10 g/l glukosa; 1,0 g/l *yeast extract*; 0,1 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,1g/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  dan 0,1 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , dimasukkan dalam erlenmeyer 250 ml, kemudian diinkubasi pada suhu 32° C selama 7 hari menggunakan *orbital shaker* dengan kecepatan 150 rpm. Spora *R. oryzae* dihitung menggunakan *haemocytometer* untuk mendapat kerapatan sel yang diinginkan.

### 3.2.3 Enkapsulasi *R. oryzae*

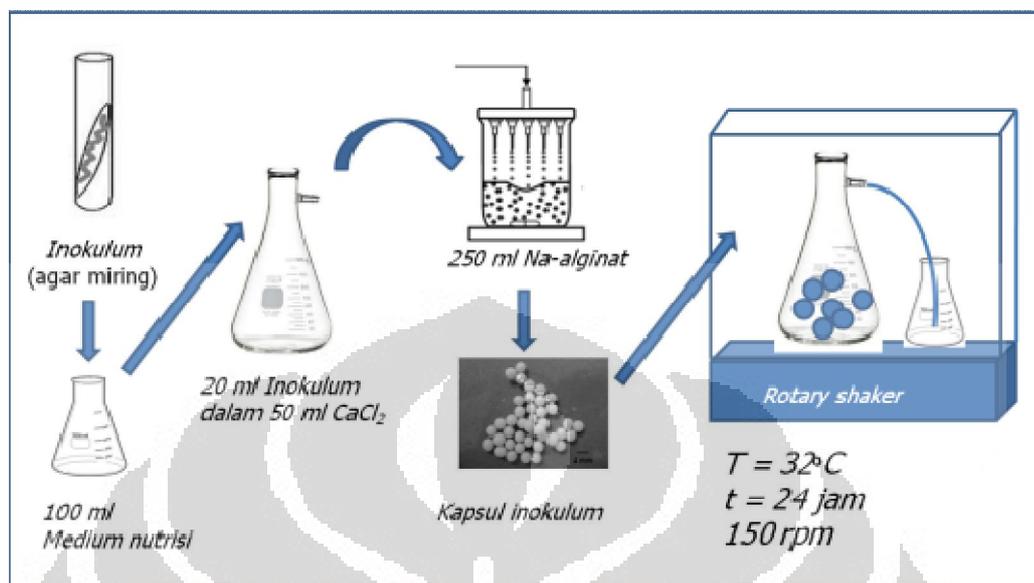
*R. oryzae* yang telah tumbuh dalam media pertumbuhan selama 48 jam diambil sebanyak 1 ml dengan kerapatan sel yang diinginkan yaitu  $1 \times 10^6$  sel/cm<sup>3</sup> dan  $1 \times 10^8$  sel/cm<sup>3</sup>, lalu disuspensikan ke dalam larutan 1% CaCl<sub>2</sub> sebanyak 20 ml. Suspensi kultur diteteskan menggunakan *syringe* kedalam larutan 0.5 % Na-alginat yang diputar dengan batang magnetik.

Skema diagram enkapsulasi ditunjukkan pada Gambar 3.3. Kapsul yang terbentuk lalu dicuci dengan aquades selama 10 menit dan didiamkan dalam buffer sitrat selama 10 menit. Sel yang telah dienkapsulasi dibiakkan pada medium tumbuh pada suhu 37° C.



Gambar 3.3. Diagram Alir Enkapsulasi *R. oryzae*

Skema peralatan untuk proses enkapsulasi *Rhizopus oryzae* ditunjukkan pada Gambar 3.4.



Gambar 3. 4. Skema Peralatan enkapsulasi dan pertumbuhan kapsul *R. oryzae*

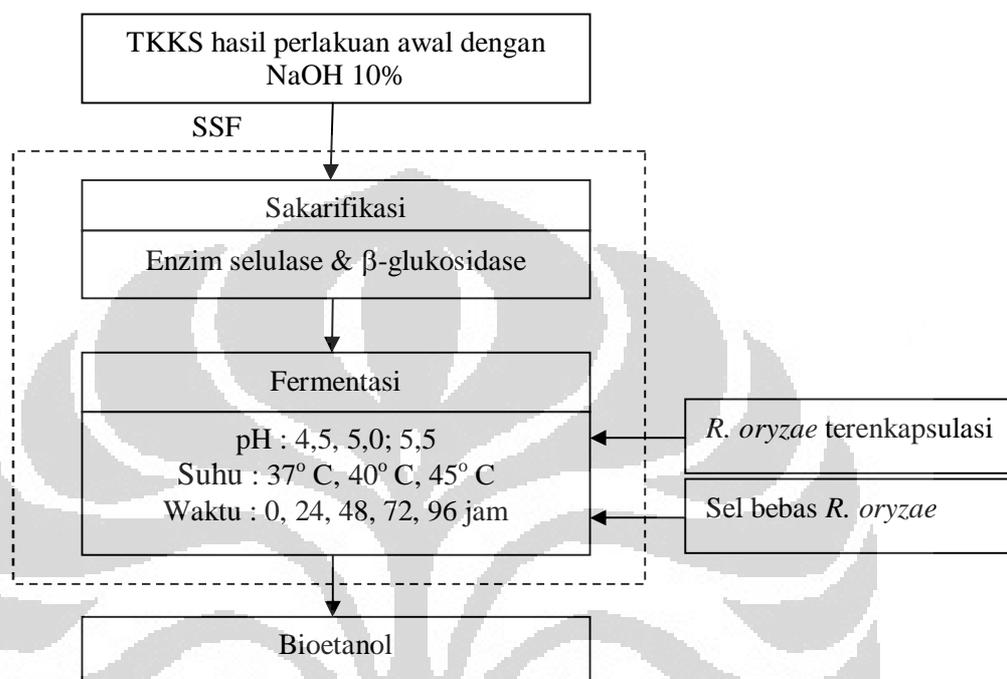
### 3.2.4 Proses fermentasi dengan enkapsulasi *Rhizopus oryzae*

Sebelum dilakukan proses SSF dengan menggunakan TKKS maka dilakukan penelitian pendahuluan untuk mengetahui kinerja kapsul *R. oryzae* dengan melakukan proses fermentasi pada media glukosa.

Medium sebanyak 100 ml yang mengandung glukosa 5% digunakan untuk fermentasi glukosa dengan menggunakan kapsul *R. oryzae*. Medium ditambahkan nutrisi 1,0 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,25 g/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 2,5 g/l peptone; dan 2,5 g/L yeast extract. Fermentasi dilakukan dengan menggunakan orbital shaker pada kecepatan 150 rpm. Pada penelitian ini dilakukan variasi kondisi aerob dan anaerob dan jumlah inokulum awal, *sampling* dilakukan pada jam ke-0, 24, 48, dan 72 untuk diukur kadar glukosa dan etanol yang dihasilkan. Sebagai perbandingan akan dilakukan proses fermentasi dengan menggunakan *R. oryzae* yang tidak dienkapsulasi (sel bebas).

### 3.2.5 Proses sakarifikasi dan fermentasi serentak (SSF)

Proses menghasilkan etanol dari TKKS yang telah dilakukan perlakuan awal (pret-TKKS) dengan SSF merupakan proses utama pada penelitian ini. Diagram alir proses SSF ditunjukkan pada Gambar 3.5.



Gambar 3.5. Diagram Alir Proses SSF

#### 3.2.5.1 Perlakuan awal

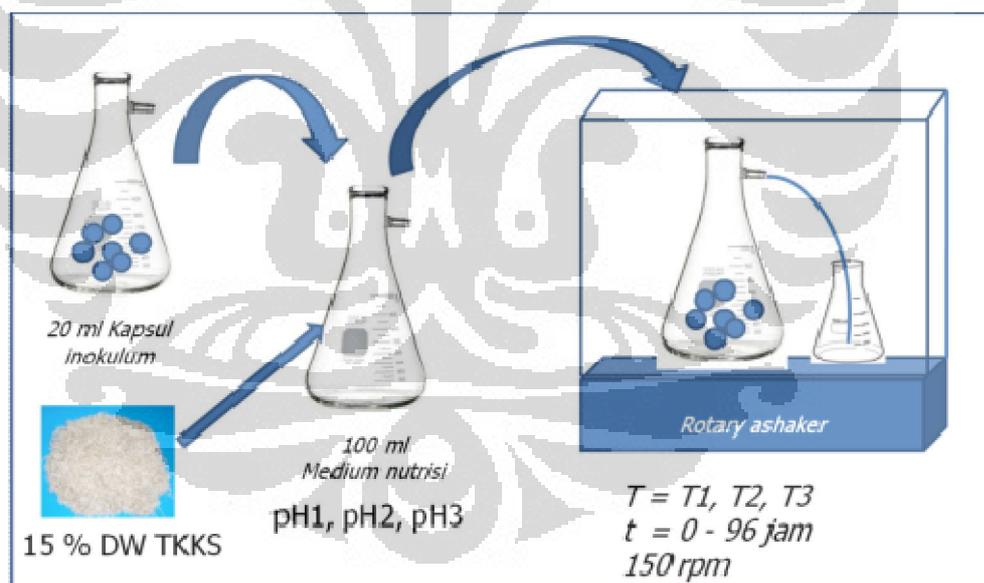
TKKS dilakukan perlakuan awal dengan cara dipotong-potong hingga 1-3 mm, lalu direndam dengan NaOH 10% dan dimasukkan ke dalam reaktor bertekanan 4 bar pada suhu 150° C selama 30 menit lalu dicuci dan dibilas sampai pH larutan netral. Kemudian padatan dikeringkan dalam oven pada suhu 50 °C selama ± 1 hari. Perlakuan awal bertujuan untuk menghilangkan lignin, mengurangi kristalinitas selulosa, dan meningkatkan porositas bahan sehingga akan meningkatkan luas bidang kontak pada proses sakarifikasi.

#### 3.2.5.2 Enzim

Enzim selulase dan β-glukosidase (NOVOzymes, Bagsverd, Denmark) digunakan pada proses sakarifikasi selulosa menjadi glukosa dalam proses SSF. Sebelum digunakan enzim selalu disimpan dalam pendingin dibawah suhu 10°C.

### 3.2.5.3 Proses sakarifikasi dan fermentasi serentak/SSF

Medium untuk SSF sebanyak 100 ml dan sample TKKS 15% berat kering, ditambahkan 0.05 M bufer sitrat, dan NaOH 2N untuk mendapat variasi pH 4,5; 5,0; dan 5,5. Sampel, medium nutrisi dan buffer disterilisasi selama 15 menit pada suhu 121°C dengan *autoclave*, namun larutan enzim dan *Rhizopus oryzae* ditambahkan setelah proses sterilisasi. Kultivasi diambil dan dimasukkan ke dalam *erlenmeyer* 250 ml dengan volume total 100 ml kemudian di fermentasi menggunakan *orbital shaker* pada kecepatan 150 rpm selama 96 jam pada variasi suhu 37° C, 40° C dan 45° C dalam kondisi anaerob dengan cara reaktor di-*purging* dengan nitrogen sebelum proses dan selama *sampling*. Cairan sampel diambil dengan *sampling* pada jam ke-0, 24, 48, 72 dan 96 dan diuji konsentrasi glukosa dan etanol yang dihasilkan. Sebagai perbandingan akan dilakukan proses SSF menggunakan sel bebas *R. oryzae*. Skema peralatan proses SSF TKKS ditunjukkan pada Gambar 3.6.



Gambar 3. 6. Skema Peralatan Proses SSF

## 3.3 Analisis

### 3.3.1 Penentuan konsentrasi etanol dengan HPLC

Pembuatan kurva standar dibuat dengan cara sebanyak 0 g; 0,01 g; 0,03 g, 0,07 g, 0,09 g, 0,14 dan 0,22 g etanol pro analis dengan kemurnian 99,9% dimasukkan ke dalam labu ukur dan diencerkan dengan aquades sampai volum

tepat  $\pm 100$  ml sehingga konsentrasinya menjadi 0 g/l; 0,1 g/l; 0,3 g/l; 0,7 g/l; 0,9 g/l; 1,4 g/l dan 2,2 g/l. HPLC dinyalakan dan diatur kondisi suhu kolom pada 65 °C menggunakan eluen 5 mM asam sulfat serta kecepatan alir optimum eluen pada 0.6 ml/menit. Sebanyak 10  $\mu$ l standar etanol kemudian diinjeksikan ke dalam injektor dan dicatat tinggi puncak masing-masing standar dari hasil rekorder. Tinggi puncak standar etanol dicatat dan dibuat kurva regresi hubungan antara tinggi puncak dengan konsentrasi etanol.

Sampel media fermentasi dan SSF disampling sebanyak 1 ml dan disimpan dalam *vial* 2 ml. Lalu disentrifuge dengan kecepatan 8000 rpm selama 5 menit kemudian cairan bening disaring dan disimpan dalam *vial* HPLC. Setelah itu 10  $\mu$ l sampel disuntikkan pada injektor dengan kondisi yang sama seperti pada pembuatan standar. Tinggi puncak pada sampel dicatat dan diplotkan dengan regresi linear yang dihasilkan pada standar sehingga akan diketahui kadar etanol pada masing-masing sampel.

### 3.3.2 Penentuan konsentrasi glukosa dengan HPLC

Untuk pengukuran glukosa, sama seperti dalam melakukan analisis konsentrasi etanol, hanya standar yang dimasukkan adalah standar glukosa. Pembuatan kurva standar dibuat dengan cara sebanyak 0 g; 0,01 g; 0,02 g; 0,04 g; 0,05 g; 0,07 g dan 0,12 g etanol pro analis dengan kemurnian 99,9% dimasukan kedalam labu ukur dan diencerkan dengan aquades sampai volum tepat  $\pm 100$  ml sehingga konsentrasinya menjadi 0 g/l; 0,1 g/l; 0,2 g/l; 0,4 g/l; 0,5 g/l; 0,7 g/l dan 1,2 g/l. Lalu dicatat tinggi puncak dan diplotkan dengan regresi linier standar glukosa sehingga didapat konsentrasi glukosa pada sampel.

### 3.4 Pengolahan Data Hasil Penelitian

Pengamatan yang dilakukan dalam penelitian ini pada dasarnya ada dua macam, yaitu pengamatan konsentrasi glukosa dan konsentrasi etanol yang dihasilkan dari proses SSF menggunakan Tandan Kosong Kelapa Sawit yang telah dilakukan perlakuan awal.

Penelitian yang dilakukan adalah memvariasikan pH medium dan suhu proses SSF dan membandingkan antara proses SSF dengan *Rhizopus oryzae* yang telah dienkapsulasi dengan sel bebas *R. oryzae*.

### 3.4.1 Pengaruh pH dan suhu proses SSF terhadap konsentrasi glukosa dan etanol yang dihasilkan

Pada penelitian ini digunakan proses dengan substrat TKKS yang telah dilakukan perlakuan awal sebanyak 15% berat kering. Pada proses ditambahkan enzim selulase dan  $\beta$ -glukosidase sebanyak 20 FPU. Proses digunakan pada kondisi anaerob dengan volume 100 ml pada erlenmeyer 250 ml pada *rotary shaker* 150 rpm. Penelitian dilakukan dengan menggunakan sel bebas *Rhizopus oryzae* dan enkapsulasi *R. oryzae* dengan jumlah kerapatan sel awal  $1 \times 10^8$  sel/cm<sup>3</sup>. Variasi pH dilakukan pada pH medium dan suhu proses SSF. *Sampling* dilakukan tiap interval 24 jam selama proses berlangsung selama 96 jam lalu dianalisa menggunakan HPLC dan akan didapatkan data tinggi peak dari kromatogram. Konsentrasi glukosa dan etanol didapatkan dengan memplot data tinggi peak terhadap kurva standar glukosa dan etanol. Sehingga akan didapatkan profil konsentrasi glukosa dan etanol yang dihasilkan.

### 3.4.2 Pengaruh pH dan suhu terhadap yield etanol yang dihasilkan.

Etanol hasil penelitian dilakukan *sampling* tiap interval 24 jam hingga proses dihentikan selama 96 jam. Setelah 96 jam diperoleh data konsentrasi etanol maksimal. Perhitungan yield etanol dilakukan dengan persamaan yang diperoleh dari penelitian Karimi *et al.* (2005).

#### a. Yield etanol berbasis kandungan selulosa dalam TKKS

Perhitungan yield etanol berbasis kandungan selulosa merupakan perbandingan etanol yang dihasilkan terhadap fraksi selulosa yang terdapat di dalam TKKS yang telah dilakukan perlakuan awal dihitung berdasarkan persamaan :

$$\text{Yield etanol berbasis selulosa (g/g)} = \frac{M_E}{F_s \times W_{TKKS}} \dots\dots\dots$$

(3.1)

$M_E$  = massa etanol akhir yang dihasilkan (g)

$F_s$  = fraksi selulosa dalam TKKS yang telah dilakukan perlakuan awal

$W_{TKKS}$  = berat kering TKKS yang digunakan (g)

b. Yield etanol berbasis pret-TKKS

Perhitungan yield etanol berbasis TKKS yang telah dilakukan perlakuan awal dihitung berdasarkan persamaan :

$$\text{Yield etanol berbasis pret TKKS (g/g)} = \frac{M_E}{W_{TKKS}} \dots\dots\dots (3.2)$$

$M_E$  = massa etanol akhir yang dihasilkan (g)

$W_{TKKS}$  = berat kering pret-TKKS yang digunakan (g)

c. Yield etanol teoritis

Perhitungan yield etanol teoritis merupakan perbandingan antara etanol yang dihasilkan dalam penelitian ini dengan etanol yang dihasilkan menurut hasil perhitungan teoritis persamaan reaksi 2.5 (halaman 15), dihitung dengan persamaan :

$$\text{Yield etanol teoritis (\%)} = \frac{M_E}{0,51 \times 1,111 \times W_{TKKS} \times F_S} \dots\dots\dots (3.3)$$

$M_E$  = konsentrasi etanol akhir yang dihasilkan (g)

0,51 = konstanta konversi dari glukosa menjadi etanol

1,111 = konstanta konversi selulosa menjadi glukosa

$W_{TKKS}$  = berat kering TKKS yang telah dilakukan perlakuan awal (g)

$F_S$  = fraksi selulosa di dalam TKKS yang telah dilakukan perlakuan awal.

**3.4.3 Perbandingan Hasil SSF dengan enkapsulasi dan sel bebas *R. oryzae*.**

Konsentrasi etanol yang dihasilkan dari proses SSF akan dibandingkan antara proses menggunakan enkapsulasi *R. oryzae* dengan proses menggunakan sel bebas *R. oryzae*. Perbedaan konsentrasi etanol tersebut dinyatakan dalam disparitas konsentrasi etanol yang dihitung menggunakan persamaan :

$$\text{Disparitas [etanol] (\%)} = \frac{ME_e - ME_b}{ME_b} \times 100\% \dots\dots\dots (3.4)$$

$ME_e$  = konsentrasi etanol oleh enkapsulasi *R. oryzae* (g/l)

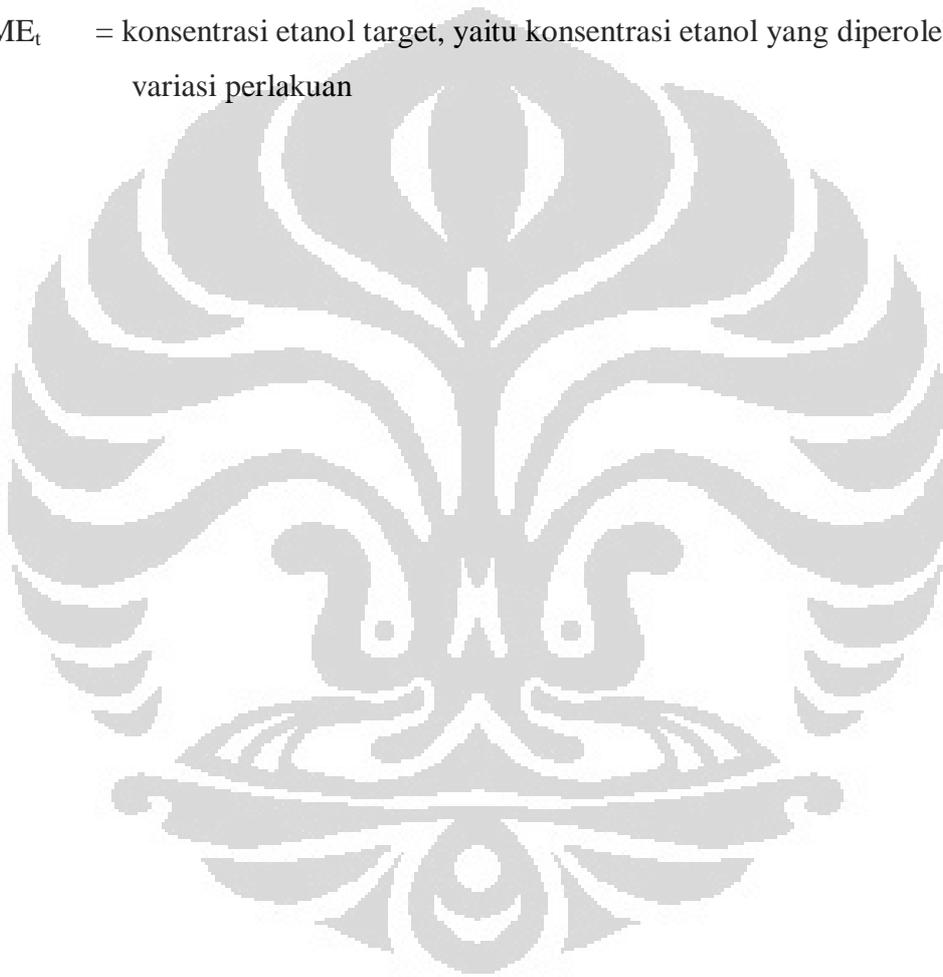
$ME_b$  = konsentrasi etanol oleh sel bebas *R. oryzae* (g/l)

Selain disparitas konsentrasi, juga dibandingkan penurunan konsentrasi etanol pada tiap variasi perlakuan, dihitung dengan persamaan:

$$\text{Penurunan[etanol]}(\%) = \frac{ME_r - ME_t}{ME_r} \times 100\% \dots \dots \dots (3.5)$$

$ME_r$  = konsentrasi etanol yang dijadikan referensi, yaitu konsentrasi etanol tertinggi yang diperoleh dari variasi perlakuan.

$ME_t$  = konsentrasi etanol target, yaitu konsentrasi etanol yang diperoleh dari variasi perlakuan



## BAB 4

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada bab ini akan dijelaskan tentang pelaksanaan penelitian, pengukuran dan pengolahan data serta analisis dari hasil-hasil penelitian. Untuk lebih jelasnya berikut akan dibahas mengenai pelaksanaan penelitian dan analisis hasil penelitian ini.

#### 4.1 Pembahasan Umum

Pembahasan mengenai hasil penelitian ini akan ditekankan pada pengaruh enkapsulasi *Rhizopus oryzae* terhadap produksi etanol dari tandan kosong kelapa sawit yang telah dilakukan proses perlakuan awal (pret-TKKS), sebagai pembandingnya adalah *R. oryzae* yang tidak dienkapsulasi atau sel bebas *R. oryzae*. Selain itu dilihat juga pengaruh pH medium dan kenaikan suhu proses SSF terhadap produksi etanol yang dihasilkan.

Penelitian ini terdiri dari beberapa tahapan yaitu tahap persiapan, pelaksanaan penelitian dan pengolahan data. Tahapan persiapan dalam penelitian ini dimulai dengan melakukan sterilisasi peralatan yang akan digunakan, agar tidak terjadi kontaminasi. Selain itu, dilakukan kalibrasi setiap peralatan yang akan digunakan hal ini bertujuan agar dapat diketahui secara tepat skala dari masing-masing peralatan tersebut.

Tahapan pelaksanaan penelitian memiliki beberapa tahapan sebelum sampai ke tahapan utama. Tahapan pelaksanaan diawali dengan melakukan pembiakan kultur awal *R. oryzae*, pembuatan medium pertumbuhan dan enkapsulasi *R. oryzae*. Media pertumbuhan terdiri dari ekstrak yeast, pepton,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $KH_2PO_4$  dan glukosa yang disterilisasi dengan menggunakan *autoclave* pada suhu  $121^\circ C$ . Langkah berikutnya adalah pembuatan inokulum awal dari *R. oryzae* dengan kepadatan  $1 \times 10^6$  sel/cm<sup>3</sup> yang merupakan jumlah inokulum yang menghasilkan etanol yang lebih tinggi pada penelitian Buyukkileci, *et al.* (2006). Pembuatan starter ini diperoleh dari hasil inokulasi

*Rhizopus oryzae* dari media agar miring PDA (*Potato Dextrose Agar*) disampling dan dikultivasi dalam medium pertumbuhan cair selama 7 hari lalu diukur menggunakan *haemocytometer*. Jika kerapatan sel terlalu pekat maka diencerkan dengan menggunakan aquades steril sampai memiliki nilai kerapatan  $1 \times 10^6$  sel/cm<sup>3</sup>. Stater ini kemudian disimpan dalam kulkas pada suhu 4° C sampai pada saat digunakan. Stater ini digunakan dalam proses fermentasi menggunakan sel bebas maupun sel yang telah dienkapsulasi. Selanjutnya adalah proses enkapsulasi. Proses enkapsulasi dilakukan dengan menjebak sel *R. oryzae* dalam membran kalsium alginat. Sel-sel terenkapsulasi ini yang akan digunakan dalam proses fermentasi dengan menggunakan medium glukosa.

Tahapan selanjutnya adalah proses perlakuan awal TKKS yang akan digunakan dalam penelitian, dilanjutkan dengan proses sakarifikasi dan fermentasi serentak/SSF dengan substrat pret-TKKS. Tahapan terakhir adalah pengolahan data hasil penelitian.

Penelitian ini membandingkan produksi etanol yang dihasilkan oleh *R. oryzae* yang telah dienkapsulasi dengan sel bebas *R. oryzae*. Data-data yang diambil selama penelitian ini adalah nilai tinggi puncak hasil HPLC yang akan dikonversi menjadi produksi etanol (g/l) dan konsentrasi glukosa (g/l), lalu dilakukan pengolahan data untuk melihat pengaruh variasi variabel bebas terhadap produksi etanol dan menghitung nilai yield etanol dan maksimal yield teoritis etanol.

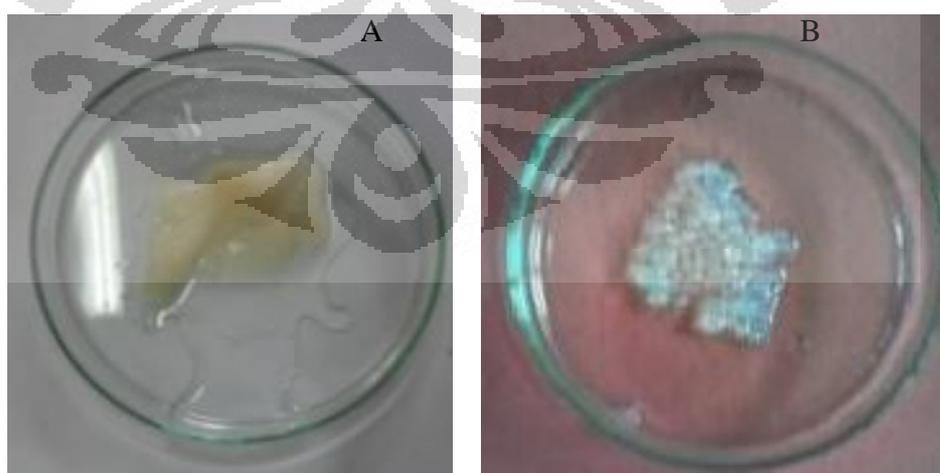
## **4.2 Data Hasil Penelitian**

Data hasil penelitian diperoleh dari hasil analisis sampel pada tiap interval *sampling* 24 jam. Sampel diambil dari tiap erlenmeyer sebanyak 1 ml, untuk dilakukan analisis menggunakan HPLC.

### **4.2.1 Enkapsulasi *R. oryzae***

Penelitian ini dilakukan proses enkapsulasi *R. oryzae* dalam polimer kalsium-alginat. *R. oryzae* yang digunakan terlebih dahulu ditumbuhkan dalam medium PDA selama 2 hari, lalu dikultivasi dalam medium nutrisi selama 7 hari untuk menghasilkan spora. Spora *R. oryzae* dihitung menggunakan

*haemocytometer* untuk dilakukan proses enkapsulasi sel *Rhizopus oryzae*. Enkapsulasi dilakukan dengan mencampurkan sel *R. oryzae* dengan larutan  $\text{CaCl}_2$  1 % kemudian diteteskan ke dalam larutan natrium alginat 0.5% sehingga terbentuk kapsul-kapsul dengan dinding sel kalsium-alginat. Monomer utama alginat adalah asam manuronat (M) dan asam guluronat (G). Alginat tersusun dari rantai panjang asam manuronat, rantai panjang asam guluronat, atau perpaduan asam manuronat dan asam guluronat. *Inter-chain linkage* antara gugus asam guluronat yang disumbang oleh keberadaan kation bervalensi dua seperti  $\text{Ca}^{+2}$  dan  $\text{Ba}^{+2}$  akan membentuk jaringan gel tiga dimensi (Talebnia, 2008). Kapsul kalsium alginat yang terbentuk berukuran 2-3 mm. Ukuran pori membran kalsium alginat umumnya sekitar 0,14 - 0,36  $\mu\text{m}$  (Mofidi *et al.*, 2000; Egana *et al.*, 2011) sehingga memungkinkan untuk terjadinya difusi glukosa yang berukuran 0,8 nm (Deval *et al.*, 2012) ke dalam membran. Selain glukosa, etanol yang mempunyai diameter kinetik sebesar 0,43 nm (Shao and Huang, 2007) pun dapat berdifusi melalui membran kalsium alginat ini. Senyawa glukosa membutuhkan waktu 20-40 menit untuk mencapai 90% kesetimbangan konsentrasi di dalam kapsul kalsium alginat (Talebnia, 2008). Sel *R. oryzae* yang telah dienkapsulasi ini digunakan dalam proses fermentasi dengan medium glukosa untuk melihat kinerja enkapsulasi sel. Gambar 4.1. menunjukkan sel *R. oryzae* yang tumbuh bebas dan setelah dilakukan proses enkapsulasi.

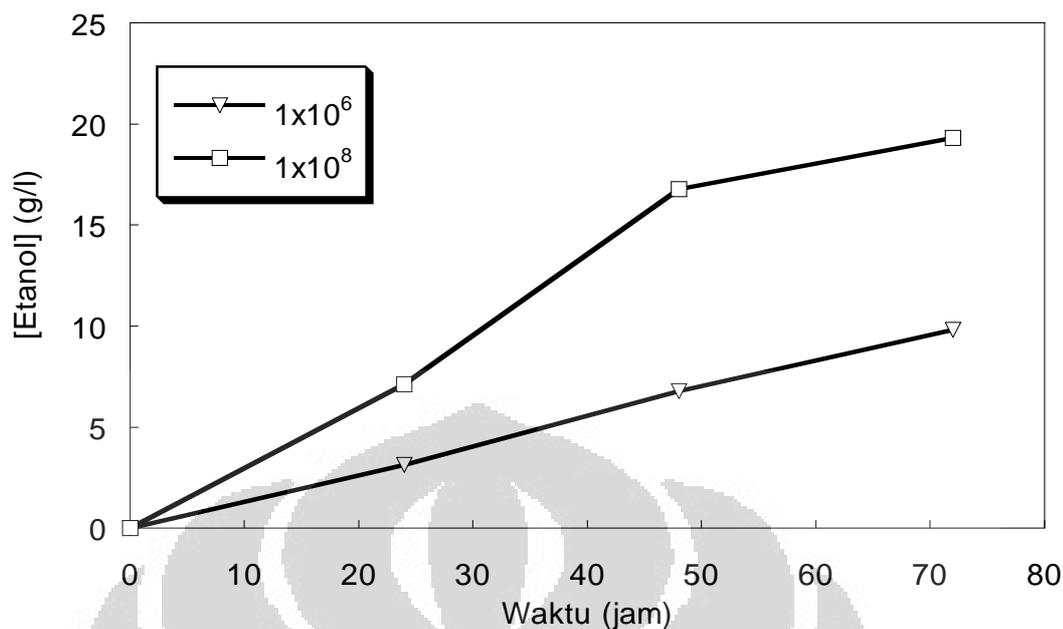


**Gambar 4.1. Foto *R. oryzae* (A) dan Kapsul kalsium a-alginat yang Mengandung *R. oryzae* di dalamnya (B)**

#### 4.2.2 Proses Fermentasi Menggunakan Medium Glukosa

Pada penelitian ini dilakukan proses fermentasi menggunakan medium glukosa 5% yang diperkaya dengan medium nutrisi ekstrak yeast (2,5 g/l), pepton (2,5 g/l),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,25 g/l) dan  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1 g/l). Komponen kimia ini bertujuan untuk memberikan nutrisi pertumbuhan bagi *Rhizopus oryzae*. Penelitian dilakukan secara *batch* dengan volume 100 ml dalam erlenmeyer 250 ml pada *shaker incubator* bersuhu  $37^\circ\text{C}$  dan kecepatan *shaking* 150 rpm selama 72 jam dengan interval waktu *sampling* 24 jam.

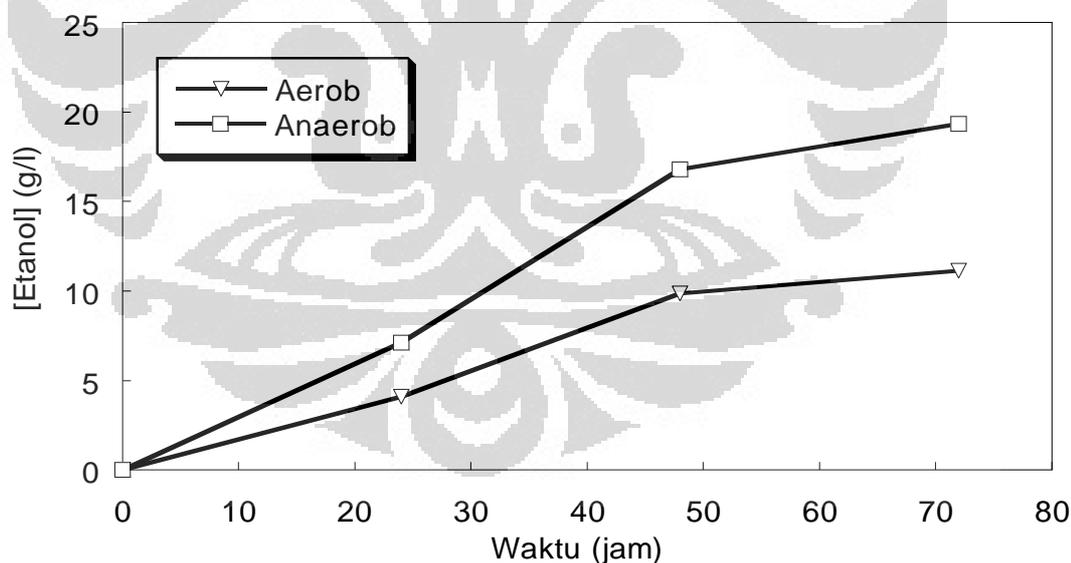
Variasi jumlah kerapatan sel inokulum awal *R. oryzae* yang dienkapsulasi dalam kalsium alginat bertujuan untuk melihat produksi etanol yang dihasilkan. Jumlah kerapatan sel spora yang digunakan adalah  $1 \times 10^6$  sel/cm<sup>3</sup> yang merupakan jumlah inokulum yang menghasilkan etanol yang lebih tinggi pada penelitian Buyukkileci *et al.* (2006), serta kerapatan sel  $1 \times 10^8$  sel/cm<sup>3</sup> yang diharapkan semakin banyak sel yang digunakan dalam proses fermentasi maka *R. oryzae* akan cenderung menghasilkan etanol dibanding asam laktat, sehingga dapat dihasilkan produksi etanol yang lebih tinggi. Penelitian Buyukkileci *et al.* (2006) memvariasikan jumlah inokulum  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  dan  $1 \times 10^6$  sel/cm<sup>3</sup> menghasilkan jumlah inokulum awal yang sedikit yaitu  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$  dan  $1 \times 10^5$  sel/cm<sup>3</sup> cenderung menghasilkan asam laktat (78,4 g/l asam laktat berbanding 7,7 g/l etanol) sedangkan untuk inokulum  $1 \times 10^6$  sel/cm<sup>3</sup> lebih cenderung menghasilkan etanol (15,3 g/l asam laktat berbanding 37,2 g/l etanol). Oleh karena itu pada penelitian ini akan digunakan inokulum yang sama dengan Buyukkileci *et al.* (2006) yaitu  $1 \times 10^6$  sel/cm<sup>3</sup> dan peningkatan inokulum  $1 \times 10^8$  sel/cm<sup>3</sup>. Hasil penelitian menggunakan variasi jumlah kerapatan sel *R. oryzae* ditunjukkan pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2. Perbandingan Produksi Etanol terhadap Kerapatan Inokulum *R. oryzae*.

Gambar 4.2 menunjukkan bahwa *Rhizopus oryzae* selain diketahui sebagai penghasil asam laktat, juga dapat menghasilkan etanol dari proses metabolismenya. Proses yang terjadi adalah proses glikolisis yaitu mengubah glukosa menjadi energi dan piruvat melalui skema Embden-Meyerhoff-Parras (EMP) pathway. Pada *R. oryzae* piruvat akan diubah menjadi tiga senyawa metabolit yaitu asam laktat menggunakan enzim *Lactate dehidrogenase* (LDH), etanol melalui jalur asetal-dehid oleh enzim *Pyruvate decarboxylase* (PDC) dan *Alcohol dehidrogenasi* (ADH), serta fumarat oleh enzim *Fumarase* (Buyyukkileci *et al.*, 2006). Jumlah inokulum awal lebih tinggi akan menghasilkan aktivitas ADH yang lebih tinggi. Produksi etanol yang dihasilkan pada stater awal *Rhizopus oryzae* dengan kerapatan sel  $1 \times 10^8$  sel/cm<sup>3</sup> mencapai 19,32 g/l dengan yield etanol teoritis sebesar 75,76%, hasil ini lebih tinggi dibandingkan dengan kerapatan sel  $1 \times 10^6$  sel/cm<sup>3</sup> yang hanya menghasilkan 9,83 g/l etanol dengan yield etanol teoritis sebesar 38,54 %. Hal ini menunjukkan semakin tinggi kerapatan sel awal yang digunakan akan cenderung menghasilkan etanol yang lebih tinggi. Hasil ini sesuai dengan penelitian Buyyukkileci *et al.* (2006) yang menggunakan *R. oryzae*, dan Yusuf (2008) serta Wentao *et al.* (2005) yang menggunakan *Saccharomyces cerevisiae*.

Selain dengan memvariasikan jumlah kerapatan sel awal dari inokulum *R. oryzae* yang dienkapsulasi, dilakukan juga proses fermentasi dalam dua kondisi yaitu fermentasi secara aerob dan anaerob. Proses aerob dilakukan dengan menggunakan erlenmeyer 250 ml yang ditutup dengan kapas sehingga oksigen tetap dapat masuk ke dalam erlenmeyer karena jika dibiarkan terbuka akan mempermudah terjadinya kontaminasi. Sedangkan proses anaerob dilakukan dalam erlenmeyer 250 ml yang ditutup dengan tutup elastis. Tutup elastis ini digunakan untuk mencegah masuknya oksigen ke dalam erlenmeyer namun mencegah erlenmeyer pecah akibat gas yang dihasilkan, karena tutup elastis akan mengembang ketika dalam proses terbentuk gas yang cukup banyak. Gas nitrogen dialirkan ke dalam erlenmeyer sebelum proses dan pada saat *sampling* untuk menghilangkan kandungan oksigen dalam erlenmeyer. Proses fermentasi dilakukan dengan medium glukosa 5 %, dalam *shaker inkubator* dengan *shaking* 150 rpm pada suhu 37° C dengan pH 5,0. Hasil proses fermentasi glukosa oleh *Rhizopus oryzae* yang telah dienkapsulasi dengan jumlah kerapatan sel awal  $1 \times 10^8$  sel/cm<sup>3</sup> pada kondisi aerob dan anaerob ditunjukkan pada Gambar 4.3.



**Gambar 4.3. Proses Fermentasi dengan Glukosa pada Kondisi Aerob dan Anaerob**

Pada Gambar 4.4 terlihat bahwa produksi etanol tertinggi diperoleh pada kondisi anaerob yaitu mencapai 19,32 g/l atau 0,38 g/g glukosa. Etanol terbentuk cukup tinggi pada pada 48 jam pertama yang merupakan fase logaritmik yaitu fase pertumbuhan yang cukup tinggi lalu setelah itu memasuki jam ke-72 penambahan

produksi etanol tidak terlalu tinggi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kondisi anaerob menghasilkan produksi etanol yang lebih tinggi dibandingkan kondisi aerob yang hanya sekitar 11,12 g/l medium atau 0,22 g/g glukosa. Hal ini sesuai dengan yang dilakukan oleh Karimi *et al.*, (2005) pada proses fermentasi jerami padi dengan *Rhizopus oryzae* yang menyatakan bahwa produksi etanol yang dihasilkan lebih tinggi pada kondisi anaerob yaitu sekitar 12,35 g/l bandingkan dengan kondisi aerob 9,20 g/l. Penelitian lain yang dilakukan Sues *et al.* (2005) juga menunjukkan etanol yang dihasilkan pada kondisi anaerob lebih tinggi dibandingkan dengan kondisi aerob pada fermentasi glukosa menggunakan *Mucor indicus*, salah satu spesies dari jamur berfilamen (*Zygomycetes*) dengan produksi etanol sebesar 0,46 g/g glukosa. Pada kondisi aerob *R. oryzae* akan cenderung menghasilkan asam laktat dibandingkan etanol (Milati *et al.*, 2004; Abedinifar *et al.*, 2009; Scory *et al.*, 1997).

Pada kondisi anaerob, produksi etanol lebih tinggi dibandingkan pada kondisi aerob disebabkan oleh aktivitas enzim *alcohol dehidrogenase* semakin meningkat dengan berkurangnya kandungan oksigen dalam media. Hal ini telah dibuktikan oleh Milati *et al.* (2004) aktivitas *alcohol dehidrogenase* yang diekstrak dari *Mucor indicus* (strain *zygomycetes*) lebih tinggi pada kondisi anaerob dibandingkan pada kondisi aerob. Sebagai mana diketahui, dalam proses glikolisis glukosa oleh *Rhizopus oryzae*, dipengaruhi oleh beberapa enzim, diantaranya adalah *Pyruvate decarboxylase* (PDC) dan *Alcohol dehidrogenasi* (ADH) untuk menghasilkan etanol. Pada kondisi anaerob, aktivitas enzim PDC yang berfungsi untuk merubah piruvat menjadi asetaldehid semakin meningkat, begitu pula dengan enzim ADH yang berfungsi merubah asetaldehid menjadi etanol. Semakin tinggi aktivitas enzim PDC dan ADH, maka akan semakin tinggi etanol yang dihasilkan.

#### **4.2.3. Proses Sakarifikasi dan Fementasi Serentak pret-TKKS**

TKKS merupakan salah satu bahan lignoselulosa yang cukup melimpah di Indonesia. Kandungan selulosanya yang cukup tinggi berpotensi untuk dijadikan sebagai bahan baku pembuatan etanol. TKKS yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari perkebunan kelapa sawit PTPN VIII Malimping, Banten. Selain

kandungan selulosa yang tinggi, kandungan lignin dari TKKS juga cukup tinggi. Oleh karena itu, sebelum dilakukan proses sakarifikasi dan fermentasi, TKKS yang digunakan terlebih dahulu dilakukan proses perlakuan awal baik secara fisik maupun secara kimia. Proses perlakuan awal secara fisik dilakukan dengan cara memperkecil TKKS menjadi serat-serat berukuran sekitar 1-3 mm yang bertujuan untuk memperbesar luas permukaan. Perlakuan awal secara kimia dilakukan menggunakan larutan NaOH 10 % dalam reaktor bertekanan 4 bar pada suhu 150°C selama 30 menit, lalu dilakukan penyaringan dan pencucian untuk menetralkan pH TKKS yang telah dilakukan perlakuan awal. Gambar TKKS sebelum dan sesudah perlakuan awal secara kimia ditunjukkan pada Gambar 4.4.



Sebelum Perlakuan awal

Perlakuan awal fisik

Perlakuan awal kimia

**Gambar 4.4 Foto TKKS Sebelum dan Setelah Perlakuan Awal**

Komposisi kimia TKKS sebelum dan sesudah proses perlakuan awal ditunjukkan pada Tabel 4.1.

**Tabel 4.1 Komposisi Kimia TKKS**

Komponen	Sebelum perlakuan awal (%)	Setelah perlakuan awal (%)
Lignin	37,84	20,00
Selulosa	33,64	60,34
Hemiselulosa	15,22	11,52

Hasil analisis pada Tabel 4.1 menunjukkan bahwa proses perlakuan awal dapat mengurangi kadar lignin (delignifikasi) dari TKKS. Pada umumnya proses sakarifikasi dalam mengkonversi polisakarida khususnya selulosa pada material berbasis lignoselulosa menjadi monosakarida tidak berjalan dengan mulus. Faktor utama yang menyebabkan terhambatnya proses tersebut adalah oligosakarida yang terkandung dalam biomassa terlindungi oleh lignin yang

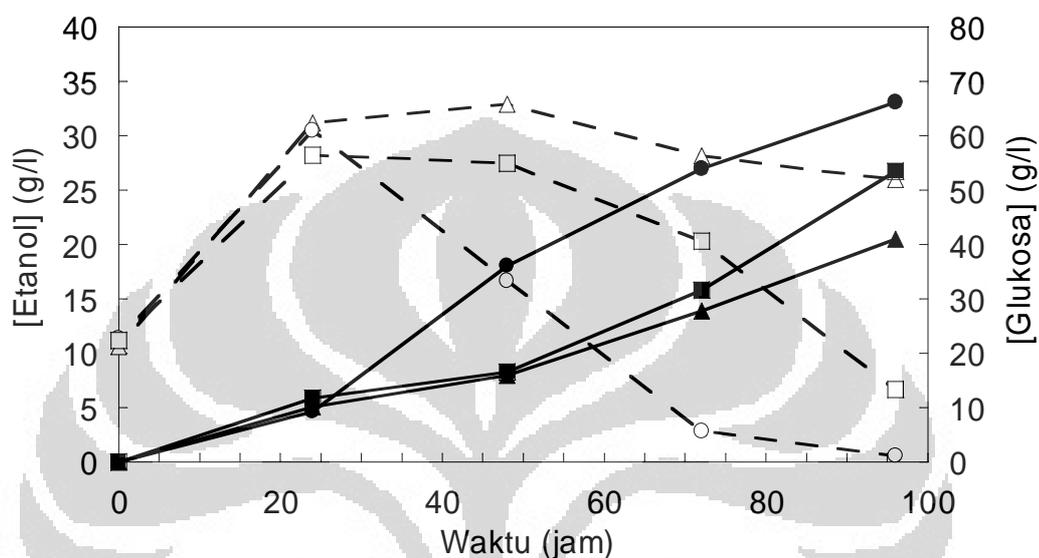
memiliki struktur dan ikatan yang sangat kuat. Selain itu proses sakarifikasi terkadang berjalan kurang lancar akibat adanya inhibitor-inhibitor yang disebabkan oleh ikatan lignin tersebut. Ini artinya keberadaan lignin sangat menghambat proses sakarifikasi sehingga perlu dilakukan perlakuan sebelum SSF untuk menghancurkan ikatan lignin. Kandungan lignin pada TKKS setelah perlakuan awal secara kimia berkurang dari 37,84 % menjadi 20 %, hal ini disebabkan dengan perlakuan awal maka lignin akan terlepas dari TKKS dan sebagian larut dalam NaOH serta terbuang setelah proses penyaringan dan pencucian. Proses perlakuan awal ini menghasilkan delignifikasi sebesar 73,57%. Peningkatan kandungan selulosa terlihat cukup tinggi hampir dua kali lipat dibandingkan TKKS yang belum dilakukan perlakuan awal mencapai 60%. Namun pada proses perlakuan awal ini terjadi penyusutan berat kering TKKS sekitar 50% yang disebabkan oleh banyaknya TKKS hasil perlakuan awal yang lolos saat penyaringan dan pencucian. Selulosa yang terdapat pada TKKS ini dapat dihidrolisis menjadi monomer-monomer gula untuk selanjutnya dilakukan proses fermentasi menjadi etanol (Sudiyani, 2009).

TKKS yang telah dilakukan proses perlakuan awal (pret-TKKS) ini kemudian digunakan sebagai substrat proses SSF untuk menghasilkan etanol. Proses SSF dilakukan dengan menggunakan *Rhizopus oryzae* yang telah dienkapsulasi.

#### **4.2.4 Pengaruh Variasi pH pada Proses SSF Pret-TKKS dengan Sel Bebas *R. oryzae***

Pada proses SSF Pret-TKKS menggunakan enkapsulasi *Rhizopus oryzae*, ditambahkan enzim selulase dan enzim  $\beta$ -glukosidase. Penambahan enzim ini bertujuan untuk melakukan proses sakarifikasi dari selulosa menjadi glukosa. Pada penelitian ini jumlah enzim selulase yang ditambahkan sebanyak 20 FPU (*Filter Paper Unit*) dan perbandingan enzim selulase dengan enzim  $\beta$ -glukosidase yang ditambahkan adalah 5 : 1. 1 FPU sebanding dengan 1  $\mu$ mol glukosa yang terbentuk dari selulosa per 1 ml enzim. Pada penelitian ini akan dilakukan variasi pH medium SSF, yang bertujuan untuk mencari kondisi pH optimum proses SSF dengan menggunakan *R. oryzae*. pH awal dari medium adalah 4,8 lalu untuk

membuat pH yang diinginkan dilakukan dengan penambahan NaOH 2 N hingga pH 5,0 dan 5,5 sedangkan untuk pH 4.5 ditambahkan asam asetat 1 N. Proses SSF dilakukan dengan substrat 15 % berat kering TKKS yang telah di perlakuan awal, dengan menggunakan sel bebas *R. oryzae* dengan kerapatan sel  $1 \times 10^8$  sel/cm<sup>3</sup>. Produksi glukosa dan etanol selama proses SSF ditunjukkan pada Gambar 4.5.



**Gambar 4.5. Produksi Glukosa dan Etanol dengan Sel Bebas *R. oryzae* pada Variasi pH. Simbol menandakan konsentrasi glukosa (simbol kosong), etanol (simbol terisi), pH 4,5 (▲/△), pH 5,0 (●/○) dan pH 5,5 (■/□)**

Gambar 4.5 menunjukkan bahwa pada awal proses terdapat glukosa sebesar 20 g/l, yang berasal dari enzim selulase dan  $\beta$ -glukosidase yang ditambahkan ke dalam proses SSF. Konsentrasi glukosa terlihat naik pada 24 jam pertama kemudian mengalami penurunan konsentrasi hingga akhir waktu proses SSF selama 96 jam. Hal ini menunjukkan pada proses ini terjadi proses sakarifikasi atau hidrolisis yaitu pemecahan rantai panjang selulosa yang terdapat pada pret-TKKS menjadi monomer-monomer glukosa oleh enzim selulase dan  $\beta$ -glukosidase (Hermawan and sudiyani, 2009). Sakarifikasi dengan enzim selulase bekerja secara spesifik untuk memecah rantai panjang selulosa menjadi monomer glukosa, sehingga produksi glukosa yang dihasilkan akan lebih optimal. Selain itu dengan sakarifikasi enzim tidak dihasilkan produk-produk sampingan yang dapat meracuni *Rhizopus oryzae* dalam melakukan proses fermentasi selama proses SSF.

Enzim selulase terdiri dari tiga jenis enzim yaitu enzim Endo- $\beta$ -1,4-Dglukanase yang memecah ikatan internal glukosidik yang berada diantara rantai glukukan yang utuh. Exo- $\beta$ -1,4-Dglukanase/exo- $\beta$ -1,4-selobiohidrolase yang memecah menjadi dimer selobiosa dari rantai glukukan dan melepaskannya ke dalam larutan.  $\beta$ -glukosidase yang menyempurnakan hidrolisis selulosa menjadi glukosa dengan memecah selobiosa menjadi monomer glukosa. Pada proses ini selain selulase juga ditambahkan enzim  $\beta$ -glukosidase untuk meningkatkan proses pemecahan selobiosa menjadi glukosa dan secara simultan difermentasi menjadi etanol oleh *R. oryzae*.

Produksi glukosa yang terlihat semakin menurun menunjukkan bahwa terjadi proses konsumsi glukosa oleh *Rhizopus oryzae* selama proses SSF. Hal ini dapat dibuktikan dengan semakin meningkatnya kadar etanol yang dihasilkan. Setelah jam ke 24 ini terlihat produksi glukosa semakin menurun, hingga mendekati 5% di jam ke-96. Pada Gambar 4.5 terlihat bahwa produksi etanol akan semakin meningkat seiring bertambahnya waktu proses SSF sedangkan produksi glukosa semakin menurun. Pada 24 jam pertama, etanol yang dihasilkan masih cukup kecil hal ini dikarenakan *R. oryzae* masih dalam tahap adaptasi dengan media TKKS, berbeda dengan media glukosa, etanol yang dihasilkan sudah cukup tinggi pada 24 jam pertama.

Variasi pH dilakukan untuk mencari kondisi optimum dari proses SSF dengan menggunakan pret-TKKS. Dari Gambar 4.5 terlihat bahwa pH 5,0 menunjukkan peningkatan etanol yang lebih tinggi dibandingkan dengan pH 4,5 dan 5,5. Produksi etanol maksimal yang dihasilkan pada pH 5,0 mencapai 33,08 g/l sedangkan produksi etanol masing-masing pada pH 4,5 dan 5, 5 adalah 20,51 g/l dan 26,78 g/l, sehingga dapat dikatakan bahwa pH 5.0 merupakan pH optimum untuk penelitian SSF menggunakan *R. oryzae*. Hasil yang sama juga dicapai oleh Milati *et al.* (2004) melaporkan bahwa pH 5,0 merupakan pH optimal proses fermentasi dengan *R. oryzae*.

*R. oryzae* merupakan jamur berfilamen, yang membentuk benang-benang hifa dalam pertumbuhannya. Walaupun *R. oryzae* lebih dikenal sebagai jamur tempe namun metabolisme *R. oryzae* melalui jalur glikolisis yaitu memecah

glukosa menjadi energi selain menghasilkan asam laktat juga menghasilkan etanol (Buyukkileci et al, 2006). *R. oryzae* memecah glukosa menjadi asam piruvat melalui 10 enzim yang terdapat dalam selnya, kemudian asam piruvat akan diubah menjadi etanol oleh enzim PDC dan ADH (Buyukkilecci, 2006), Kecenderungan menurunnya produksi glukosa dan meningkatnya produksi etanol menunjukkan proses glikolisis yang dilakukan *R. oryzae*. Nilai pH awal media fermentasi sangat mempengaruhi kadar etanol yang dihasilkan, hal ini disebabkan karena proton-proton mempengaruhi kinerja enzim-enzim dalam jalur EMP, diantaranya enzim *fosfofruktokinase* yang berperan dalam proses glikolisis.

Terjadinya glikolisis glukosa menunjukkan terpenuhinya nutrisi-nutrisi yang dibutuhkan oleh pertumbuhan *Rhizopus oryzae* yaitu kadar karbon, mikronutrien dan kondisi pH yang cocok pada medium tersebut. Tingginya produksi etanol pada pH 5,0 menunjukkan pH 5,0 merupakan pH optimum untuk proses yang ditandai dengan banyaknya konsumsi glukosa oleh *R. oryzae* untuk kemudian diubah menjadi etanol. pH mempunyai pengaruh yang cukup penting dalam proses SSF. Penentuan pH optimum sangat penting karena dalam prinsip reaksi bioproses pH larutan akan mempengaruhi kualitas etanol yang dihasilkan (Samsuri et al., 2008). Selain itu, Adrados et al. (2005) dan Abedinifar et al. (2009) melaporkan bahwa pH 5,0 merupakan pH optimum untuk kerja enzim selulase, karena pada pH ini membuat enzim selulase dalam kondisi lebih stabil dan lebih aktif. Semakin tinggi glukosa yang dihasilkan, maka semakin banyak glukosa yang dapat difermentasi oleh *R. oryzae*. Yield etanol yang dihasilkan oleh sel bebas *R. oryzae* ditunjukkan pada Tabel 4.2 (halaman 52).

Tabel 4.2 menunjukkan konsentrasi maksimal etanol yang dihasilkan, yield etanol terhadap kandungan selulosa yang terdapat pada pret-TKKS dan yield etanol terhadap pret-TKKS. Pada Tabel 4.2 juga ditunjukkan perbandingan antara etanol yang dihasilkan oleh penelitian dengan etanol teoritis yang dihasilkan secara perhitungan. Jika melihat hasil hasil konversi terhadap substrat yang ada terlihat bahwa konversi masih cukup kecil dibandingkan secara teori hanya mencapai 65 % pada pH 5,0 dan 40 % dan 52 % pada pH 4,5 dan 5,5. Hasil penelitian ini mendekati penelitian yang dilakukan Karimi et al. (2006) yang mendapatkan hasil *max theoretical yield* sekitar 60% dengan substrat jerami padi.

Penelitian lain yang dilakukan Samsuri *et al.* (2009) menggunakan bagas dengan *Saccharomyces cerevisiae* menghasilkan 6,94 g/l etanol. Jika dilihat dari maksimal glukosa yang dihasilkan oleh enzim selulase secara teori adalah 90 g/l maka kadar etanol maksimal yang dapat diperoleh secara teoritis adalah 45 g/l, hasil penelitian diperoleh mencapai 33 g/l, masih dibawah nilai teoritis namun sudah cukup baik jika untuk fermentasi menggunakan *Rhizopus oryzae*.

**Tabel 4.2. Produksi Etanol dengan Sel Bebas *R. oryzae* pada Variasi pH**

Proses	Konsentrasi etanol maks. (g/l)	yield etanol berdasar selulosa (g/g selulosa) <sup>a</sup>	yield etanol berdasar pret-TKKS (g/g pret-TKKS) <sup>b</sup>	yield etanol teoritis maksimal (%) <sup>c</sup>
pH 4,5	20,51	0,23	0,14	39,98
pH 5,0	33,08	0,37	0,22	64,51
pH 5,5	26,78	0,30	0,18	52,21

<sup>a</sup> yield etanol berdasarkan selulosa = konsentrasi etanol/kandungan selulosa dalam pret-TKKS (0,6034x150g)

<sup>b</sup> yield etanol berdasarkan pret-TKKS = konsentrasi etanol/berat kering pret-TKKS (150 g/l)

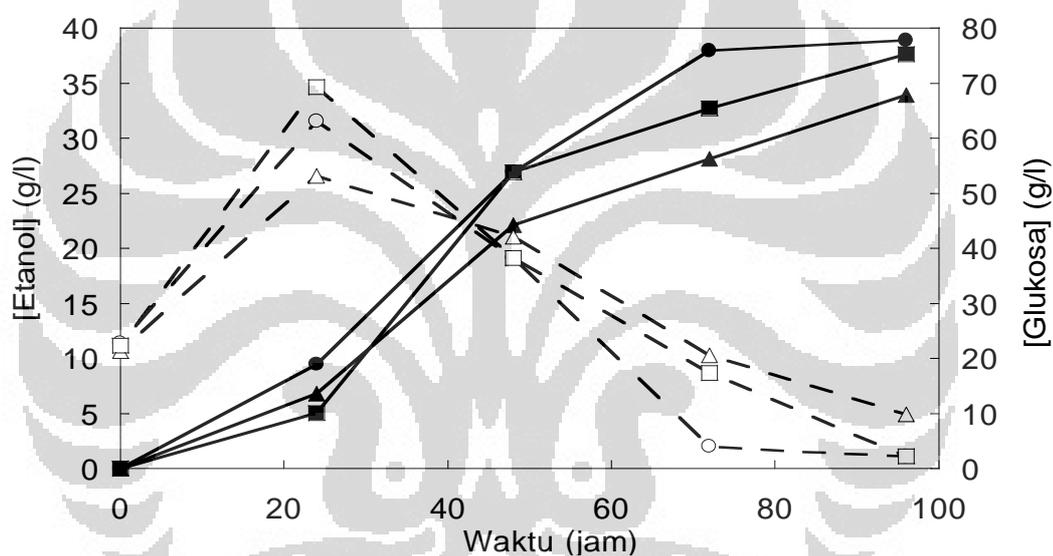
<sup>c</sup> yield etanol teoritis = konsentrasi etanol/((0,51 x 1,111 x berat kering pret-TKKS x F) x 100, F = kandungan selulosa dalam pret-TKKS (0,6034)

Proses dihentikan pada menit ke-96 karena terlihat konsentrasi glukosa yang sudah mencapai 5-10 % bertujuan untuk mencegah sel mencapai fase stasioner. Selain itu, dikhawatirkan jika proses terus dilanjutkan akan meningkatkan kadar asam laktat, karena *R. oryzae* cenderung akan menghasilkan asam laktat ketika sumber glukosa telah berkurang (Thongcul *et al.*, 2010).

Pada penelitian dengan menggunakan sel bebas *R. oryzae* menunjukkan tidak semua glukosa dikonsumsi secara optimal, oleh karena itu perlu dilakukan peningkatan agar diperoleh produksi etanol yang lebih tinggi, salah satu caranya adalah dengan melakukan immobilisasi dengan enkapsulasi sel.

#### 4.2.5 Pengaruh Variasi pH pada Proses SSF Pret-TKKS dengan Enkapsulasi *R. oryzae*.

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa *R. oryzae* dapat menghasilkan etanol dari substrat TKKS. Namun etanol yang dihasilkan masih kurang optimal. Oleh karena itu akan dilakukan optimasi produksi etanol dengan cara melakukan enkapsulasi sel *R. oryzae* dalam kalsium-alginat. Beberapa penelitian menunjukan bahwa enkapsulasi sel dapat meningkatkan produksi produk pada proses fermentasi (Ylivero *et al.*, 2011; Talebnia and Taherzadeh, 2006). Secara lengkap hasil proses SSF Pret-TKKS dengan enkapsulasi *R. oryzae* pada beberapa kondisi pH ditunjukkan pada Gambar 4.6.



Gambar 4.6. Konsentrasi Etanol dan Glukosa dengan Enkapsulasi *R. oryzae* pada Variasi pH. Simbol menandakan konsentrasi glukosa (simbol kosong), etanol (simbol terisi), pH 4,5 (▲/△), pH 5,0 (●/○) dan pH 5,5 (■/□)

Gambar 4.6 menunjukkan produksi glukosa dan etanol pada proses SSF menggunakan TKKS dengan *R. oryzae* yang telah di enkapsulasi. Produksi glukosa pada awal 24 jam pertama cenderung naik, karena pertumbuhan spora *R. oryzae* belum optimal, sedangkan proses sakarifikasi selulosa tetap berlangsung. Setelah 24 jam terjadi penurunan konsentrasi gula yang menunjukkan bahwa terkonsumsinya glukosa oleh *Rhizopus oryzae* dalam proses metabolismenya untuk menghasilkan etanol.

Hasil penelitian menunjukkan enkapsulasi *R. oryzae* dalam kapsul kalsium-alginat dapat tetap menghasilkan etanol tanpa menghambat pertumbuhan *R. oryzae*. Enkapsulasi memberikan perlindungan sel dari pengaruh luar dengan memberikan dinding sel buatan. Enkapsulasi umumnya menggunakan polimer dan biopolimer seperti natrium alginat. Alasan utama penggunaan polimer untuk enkapsulasi adalah kemampuannya untuk berada pada fasa yang berbeda seperti cair, gel maupun padat yang memungkinkan untuk mempunyai kekuatan mekanik dan fisik yang cukup (Kampf, 2002). Enkapsulasi menggunakan kalsium-alginat melibatkan ikatan silang ionik yang menyebabkan kalsium-alginat menjadi gel di dalam larutan.

Pada enkapsulasi glukosa tetap dapat dimetabolisme oleh *R. oryzae* yang terdapat didalam kapsul kalsium-alginat. Glukosa berdifusi masuk ke dalam kapsul melewati dinding kalsium-alginat dan etanol yang dihasilkan dari proses fermentasi berdifusi ke luar kapsul melewati dinding kalsium-alginat. Konsentrasi alginat yang tepat dapat mengoptimalkan difusi masuk dan keluarnya glukosa dan etanol melewati dinding kalsium-alginat (Widjaja, 2008). Enkapsulasi melindungi sel dari pekatnya etanol yang dapat meracuni *Rhizopus oryzae*. Enkapsulasi juga melindungi sel yang didalamnya dari metabolit dan zat-zat beracun hasil samping proses sakarifikasi dan fermentasi.

Produksi etanol yang dihasilkan oleh enkapsulasi *R. oryzae* cukup tinggi yaitu mencapai 38 g/l medium. Variasi pH yang dilakukan untuk mengetahui kondisi optimum SSF dengan *R. oryzae* yang telah dienkapsulasi. Data menunjukkan bahwa pH 5,0 tetap menjadi pH yang optimum untuk proses SSF dengan *R. oryzae* yang telah dienkapsulasi. Konsumsi glukosa yang tinggi pun terjadi pada pH 5,0. Produksi etanol maksimal yang dihasilkan pada pH 5,0 mencapai 38,92 g/l sedangkan produksi etanol masing-masing pada pH 4,5 dan 5,5 adalah 33,92 g/l dan 37,66 g/l. Yield etanol yang dihasilkan oleh *R. oryzae* yang telah dienkapsulasi ditunjukkan pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3. Konsentrasi Etanol dengan Enkapsulasi *R. oryzae* pada Variasi pH

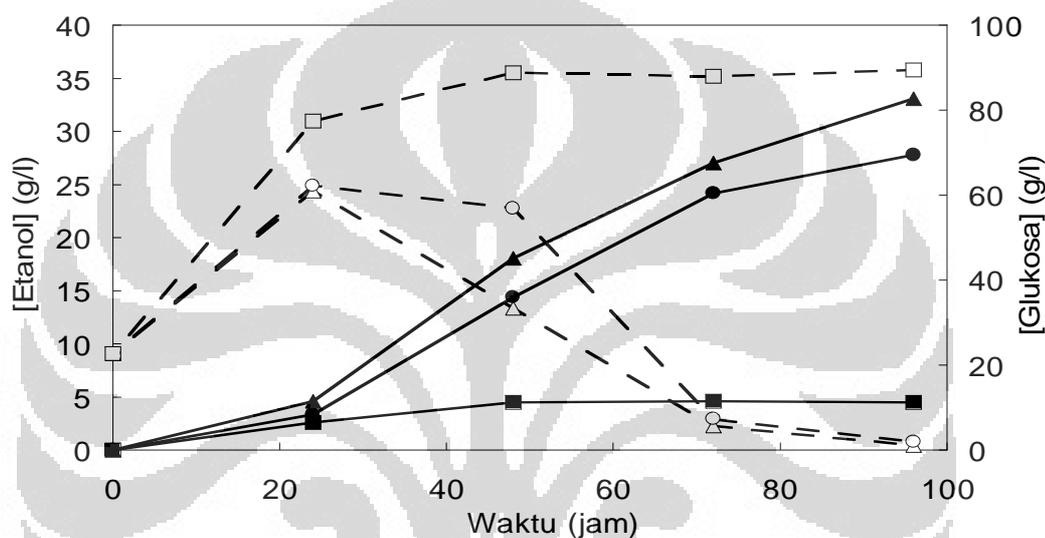
Proses	Konsentrasi etanol maks. (g/l)	yield etanol berdasar selulosa (g/g selulosa)	yield etanol berdasar pret-TKKS (g/g pret-TKKS)	yield etanol teoritis maksimal (%)
pH 4,5	33,92	0,37	0,23	66,14
pH 5,0	38,92	0,43	0,26	75,89
pH 5,5	37,66	0,42	0,25	73,43

Tabel 4.3 menunjukkan konsentrasi maksimal etanol dengan enkapsulasi sel *R. oryzae* dalam kalsium-alginat. Yield etanol tertinggi yang dihasilkan oleh enkapsulasi sel *R. oryzae* terjadi pada pH 5,0, hal ini menunjukkan bahwa pH 5,0 merupakan pH optimum untuk proses SSF baik dengan sel bebas maupun dengan enkapsulasi sel. Yield etanol berdasarkan kandungan selulosa yang dihasilkan oleh enkapsulasi *R. oryzae* lebih tinggi dibandingkan dengan sel bebas, hal ini menunjukkan enkapsulasi sel dapat meningkatkan produksi etanol sebesar 17 % dibandingkan sel bebas. Perbandingan etanol yang dihasilkan dengan etanol sesecara teoritis mencapai 75,89 % pada pH 5,0, hasil ini lebih tinggi dibandingkan dengan sel bebas maupun dengan penelitian Karimi *et al.* (2006). Namun hasil enkapsulasi sel ini masih sedikit lebih kecil dibandingkan dengan hasil enkapsulasi sel *Saccharomyces cerevisiae* yang dilakukan oleh Ylivero *et al.* (2011). Ylivero melakukan fermentasi dengan enkapsulasi sel *Saccharomyces cerevisiae* dalam media glukosa 30 g/l dan menghasilkan etanol sebesar 13,5 g/l dengan yield etanol 0,44 g/g glukosa.

#### 4.2.6 Pengaruh Peningkatan Suhu pada Proses SSF Pret-TKKS dengan sel bebas *R. oryzae*

Suhu merupakan salah satu faktor penting dalam pertumbuhan mikroorganisme termasuk jamur *Rhizopus oryzae*. Setiap mikroorganisme mempunyai rentang suhu pertumbuhan tertentu dan spesifik, namun setiap mikroorganisme tidak memberikan laju pertumbuhan yang sama di setiap rentang suhu pertumbuhannya. Suhu optimal untuk pertumbuhan *R. oryzae* adalah 35°C, suhu minimal pertumbuhan adalah 5-7° C sedangkan suhu maksimal *R. oryzae*

dapat tumbuh adalah 44°C (Soetrisno and Sapuan, 1996). Pada penelitian ini dilakukan proses SSF pada ketinggian suhu yang berbeda yaitu pada suhu yang umum digunakan pada proses SSF yaitu 37°C dan mendekati suhu proses optimal sakarifikasi yaitu pada suhu 40-50°C. Proses sakarifikasi selulosa menjadi glukosa pada suhu optimal akan menghasilkan konsentrasi glukosa yang optimal juga sehingga akan semakin banyak glukosa yang dapat dikonversi menjadi etanol. Efek suhu proses terhadap jumlah glukosa yang dikonsumsi dan etanol yang diproduksi diperlihatkan pada Gambar 4.7.



Gambar 4.7. Konsentrasi glukosa dan etanol dengan variasi suhu. Simbol menandakan konsentrasi glukosa (simbol kosong), etanol (simbol terisi), pH 4,5 (▲/△), pH 5,0 (●/○) dan pH 5,5 (■/□)

Pada Gambar 4.7 ditunjukkan produksi etanol yang dihasilkan pada variasi suhu 37° C, 40° C dan 45° C. Suhu 37° C merupakan suhu optimal proses SSF, yang merupakan perpaduan antara suhu proses sakarifikasi yang umumnya berada pada rentang 40-50°C dan suhu fermentasi yang optimum pada suhu 32°C. Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan perubahan suhu operasi mendekati suhu proses sakarifikasi. Peningkatan suhu proses menyebabkan semakin meningkatnya konsentrasi glukosa yang dihasilkan, hal ini dapat dilihat pada 24 jam pertama, produksi glukosa pada suhu 45 °C lebih tinggi dibandingkan pada suhu 40 °C dan 37 °C. Namun profil produksi etanol berbanding terbalik dengan produksi glukosa. Pada Gambar 4.7, produksi etanol tertinggi ditunjukkan terjadi pada suhu 37°C yaitu sebesar 33,08 g/l media SSF. Produksi etanol menurun

ketika suhu proses dinaikkan dari 37°C menjadi 40°C, namun perbedaannya tidak cukup signifikan. Penurunan produksi etanol yang cukup signifikan terlihat ketika suhu operasi dinaikkan menjadi 45°C. Pada suhu ini *Rhizopus oryzae* kurang optimal dalam mengkonsumsi glukosa menjadi etanol sehingga glukosa yang terbentuk dari proses sakarifikasi selulosa tidak semua dikonversi menjadi etanol.

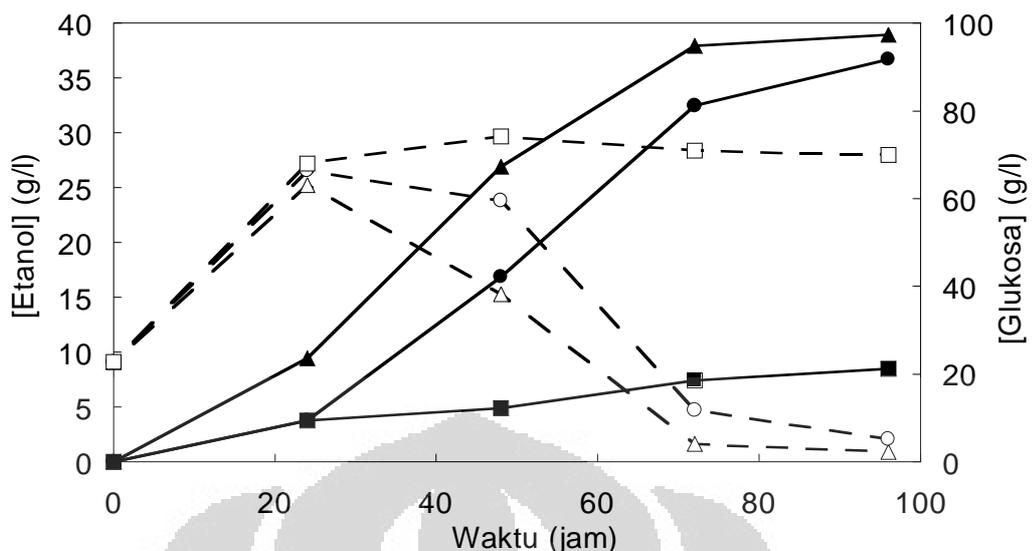
**Tabel 4.4. Konsentrasi Etanol dengan Sel Bebas *R. oryzae* pada Suhu Berbeda**

Proses	Konsentrasi etanol maks. (g/l)	yield etanol berdasar selulosa (g/g selulosa)	yield etanol berdasar pret-TKKS (g/g pret-TKKS)	yield etanol teoritis maksimal (%)
T = 37°C	33,08	0,37	0,22	64,51
T = 40°C	27,80	0,31	0,19	54,22
T = 45°C	4,49	0,05	0,03	8,75

Yield etanol yang dihasilkan dengan peningkatan suhu proses ditunjukkan pada Tabel 4.4. Produksi etanol tertinggi dihasilkan pada suhu proses 37 °C dengan yield etanol berbanding selulosa sebesar 0,37 g/g selulosa. Produksi etanol yang dihasilkan dibandingkan dengan etanol teoritis hasil perhitungan sebesar 64,51 %. Semakin tinggi suhu proses semakin kecil produksi etanol yang dihasilkan, yaitu pada suhu 40°C etanol yang dihasilkan sebesar 27,80 g/l media atau 0,31 g/g selulosa sedangkan pada suhu 45 °C hanya mencapai 4,49 g/l media atau 0,05 g/g selulosa.

#### **4.2.7 Pengaruh Peningkatan Suhu pada Proses SSF Pret-TKKS dengan enkapsulasi *Rhizopus oryzae***

Pada penelitian sebelumnya telah dibahas pengaruh kenaikan suhu proses terhadap produksi etanol yang dihasilkan oleh sel bebas *R. oryzae*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa semakin tinggi suhu proses maka produksi etanol yang dihasilkan semakin kecil. Pada penelitian ini dilakukan juga perlakuan kenaikan suhu pada proses SSF dengan enkapsulasi *R. oryzae* untuk melihat pengaruh enkapsulasi terhadap daya tahan sel pada suhu tinggi. Profil produksi glukosa dan etanol yang dihasilkan ditunjukkan pada Gambar 4.8.



Gambar 4.8. Konsentrasi etanol dan glukosa dengan enkapsulasi *R. oryzae* pada beberapa variasi Suhu, Simbol menandakan konsentrasi glukosa (simbol kosong), etanol (simbol terisi), pH 4,5 ( $\blacktriangle/\triangle$ ), pH 5,0 ( $\bullet/\circ$ ) dan pH 5,5 ( $\blacksquare/\square$ )

Gambar 4.8 menunjukkan bahwa kenaikan suhu juga akan menurunkan produksi etanol yang dihasilkan, seperti yang terjadi pada sel bebas *R. oryzae*. Namun produksi etanol yang dihasilkan lebih tinggi dibandingkan pada sel bebas *R. oryzae*. Hal ini menunjukkan bahwa proses enkapsulasi selain memberikan ketahanan terhadap kondisi kimiawi media, juga memberikan ketahanan terhadap suhu proses. Dinding sel buatan pada sel yang terenkapsulasi melindungi sel yang terdapat didalamnya dari suhu yang tinggi. Produksi etanol tertinggi yang dihasilkan terjadi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  yaitu mencapai 38,92 g/l media, Sedangkan kenaikan suhu menjadi  $40^{\circ}\text{C}$  menurunkan produksi etanol menjadi 36,69 g/l media, sedangkan pada suhu  $45^{\circ}\text{C}$ , etanol yang dihasilkan turun secara drastis menjadi 8,49 g/l.

Tabel 4.5. Konsentrasi Etanol dengan Enkapsulasi *R. oryzae* pada Suhu Berbeda

Proses	Konsentrasi etanol maks, (g/l)	yield etanol berdasar selulosa (g/g selulosa)	yield etanol berdasar pret-TKKS (g/g pret-TKKS)	yield etanol teoritis maksimal (%)
T = 37 C	38,92	0,43	0,26	75,89
T = 40 C	36,69	0,41	0,24	71,54
T = 45 C	8,49	0,09	0,06	16,55

Tabel 4.5 menunjukkan produksi etanol dan yield etanol yang dihasilkan dari proses SSF dengan pret-TKKS pada suhu yang berbeda. Sama seperti halnya sel bebas, produksi etanol tertinggi dihasilkan pada suhu proses 37° C dengan yield etanol berbanding selulosa sebesar 0,43 g/g selulosa lebih tinggi dibandingkan sel bebas *Rhizopus oryzae* yang hanya menghasilkan 0,37 g/g selulosa. Produksi etanol yang dihasilkan dibandingkan dengan etanol teoritis hasil perhitungan sebesar 75,89 %. Pada peningkatan suhu menjadi 40° C, etanol yang dihasilkan turun namun tidak terlalu signifikan dibandingkan sel bebas *R. oryzae*. Hal ini menunjukkan enkapsulasi sel meningkatkan ketahanan sel terhadap kenaikan suhu. Pada suhu 40° C etanol yang dihasilkan sebesar 36,69 g/l media atau 0,41 g/g selulosa. Sedangkan pada suhu 45°C hanya mencapai 8,49 g/l media atau 0,09 g/g selulosa.

### **4.3 Pembahasan Perbandingan Hasil SSF dengan Enkapsulasi dan Sel Bebas *Rhizopus oryzae***

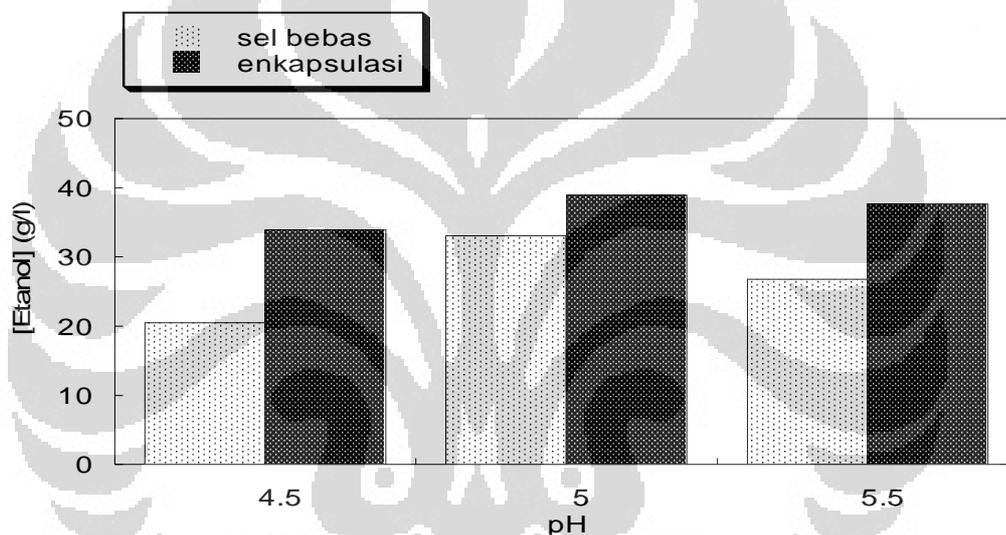
Proses SSF TKKS yang telah dilakukan perlakuan awal menggunakan *R. oryzae* terbukti dapat menghasilkan etanol yang cukup tinggi. Selain dengan menggunakan sel bebas *R. oryzae*, pada penelitian ini juga digunakan *R. oryzae* yang telah dienkapsulasi dalam kalsium-alginat. Perbandingan hasil dari kedua proses tersebut akan dijelaskan dalam pembahasan pengaruh enkapsulasi *R. oryzae* terhadap produksi etanol yang dihasilkan pada proses SSF.

#### **4.3.1 Pengaruh Enkapsulasi *R. oryzae* pada Variasi pH**

Pada penelitian ini akan dilihat pengaruh perlakuan enkapsulasi *Rhizopus oryzae* terhadap produksi etanol yang dihasilkan. Perbandingan produksi etanol yang dihasilkan antara *R. oryzae* yang telah dienkapsulasi dengan sel bebas *R. oryzae* pada proses SSF pret TKKS ditunjukkan pada Gambar 4.9 (halaman60).

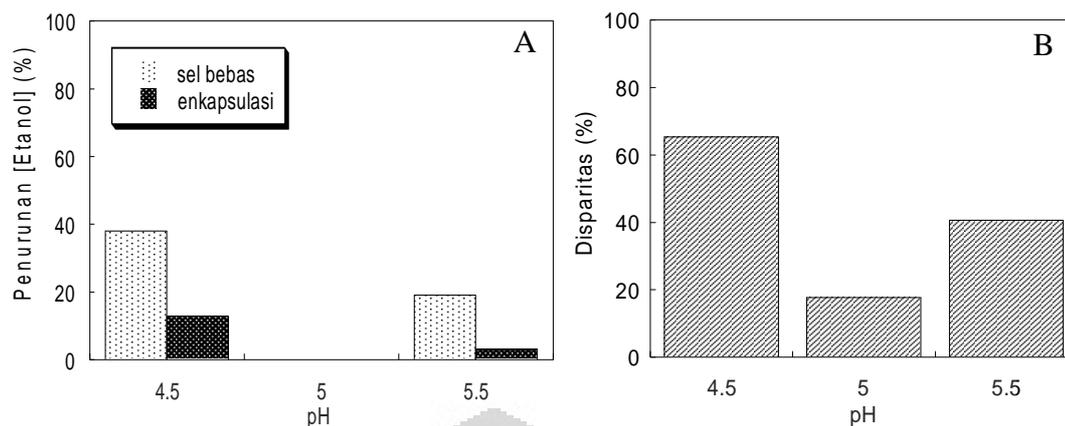
Pada Gambar 4.9 terlihat bahwa produksi etanol yang dihasilkan dari proses SSF pret-TKKS dengan menggunakan enkapsulasi sel *R. oryzae* lebih tinggi dibandingkan dengan sel bebas *R. oryzae*. Produksi etanol yang dihasilkan oleh enkapsulasi *R. oryzae* pada pH 4,5; 5,0; dan 5,5 berturut-turut yaitu 33,92 g/l, 38,92 g/l, dan 37,66 g/l media. Hasil ini lebih tinggi sekitar 17,64 % - 65,43 %

jika dibandingkan dengan produksi etanol dengan menggunakan sel bebas *R. oryzae*. Pada variasi pH terlihat bahwa produksi etanol yang dihasilkan memiliki kecenderungan yang sama antara sel bebas dengan enkapsulasi sel, yaitu memiliki produksi etanol tertinggi pada pH 5,0 dan produksi etanol lebih rendah diperoleh pada pH 5,5 dan 4,5. Sehingga dapat disimpulkan bahwa pH 5,0 merupakan pH optimum untuk proses sakarifikasi dan fermentasi serentak dari TKKS yang telah dilakukan perlakuan awal baik dengan menggunakan sel bebas maupun *R. oryzae* yang telah dienkapsulasi. Pada pH yang optimum *R. oryzae* akan lebih cepat melakukan proses metabolisme untuk mengkonsumsi glukosa, semakin banyak glukosa yang dikonsumsi maka akan semakin banyak etanol yang dihasilkan.



**Gambar 4.9. Perbandingan konsentrasi etanol yang dihasilkan sel bebas *R. oryzae* dengan enkapsulasi *R. oryzae* pada variasi pH**

Pengaruh enkapsulasi terhadap produksi etanol dibandingkan dengan sel bebas *Rhizopus oryzae* ditunjukkan pada Gambar 4.10. Pengaruh enkapsulasi juga terlihat pada perubahan pH kondisi proses. Sebagai referensi adalah data produksi etanol pada pH 5,0 sebesar 38,92 g/l media. Pada Gambar 4.10 (A), perubahan pH membuat produksi etanol yang dihasilkan juga berubah, terlihat pada proses SSF dengan menggunakan sel bebas perubahan pH 5,0 menjadi pH 4,5 menurunkan produksi etanol sebesar 38 %. Sedangkan pada proses SSF dengan menggunakan enkapsulasi *R. oryzae*, perubahan pH hanya menurunkan produksi etanol sebesar 12,8 %.



Gambar 4.10. Penurunan dan Disparitas Konsentrasi dan Etanol pada Variasi pH

Pengaruh enkapsulasi juga terlihat pada perubahan pH kondisi proses. Sebagai referensi adalah data produksi etanol pada pH 5,0 sebesar 38,92 g/l media. Pada Gambar 4.10 (A), perubahan pH membuat produksi etanol yang dihasilkan juga berubah, terlihat pada proses SSF dengan menggunakan sel bebas perubahan pH 5,0 menjadi pH 4,5 menurunkan produksi etanol sebesar 38 %. Sedangkan pada proses SSF dengan menggunakan enkapsulasi *R. oryzae*, perubahan pH hanya menurunkan produksi etanol sebesar 12,8 %.

Enkapsulasi sel *R. oryzae* terbukti memberikan pengaruh terhadap kekonsentrasi etanol yang dihasilkan pada proses SSF pret-TKKS. Enkapsulasi sel meningkatkan ketahanan sel terhadap perubahan kondisi sekitar, dalam hal ini pH larutan proses SSF. Proses enkapsulasi sel memberikan perlindungan sel dengan dinding sel buatan dan memberikan ketahanan terhadap sel dari kondisi asam pada larutan. pH yang terlalu tinggi dapat menyebabkan stress pada mikroorganisme yang akan mempengaruhi metabolismenya. Sedangkan pH yang terlalu asam akan membuat proses metabolisme berjalan lebih lambat (Idris and Suzana, 2006). Proses yang menggunakan sel bebas *R. oryzae* sangat rentan terhadap perubahan pH, dengan perubahan pH sedikit saja sudah menurunkan produksi etanol yang dihasilkan. Sedangkan proses yang dilakukan dengan menggunakan enkapsulasi sel lebih tahan terhadap perubahan pH. Perubahan pH menjadi 5,5 menurunkan sedikit produksi etanol yang dihasilkan enkapsulasi *Rhizopus oryzae*.

Selain itu, kenaikan produksi etanol pada sel yang dienkapsulasi juga disebabkan karena sel yang dienkapsulasi lebih bersifat anaerob dibandingkan

dengan sel bebas *R. oryzae*. Sel yang terenkapsulasi lebih sulit kontak dengan oksigen yang mungkin masih sedikit terdapat didalam reaktor, sehingga proses anaerobis berlangsung lebih baik. Beberapa penelitian menunjukkan produksi etanol yang dihasilkan pada kondisi anaerob lebih tinggi dibandingkan dengan kondisi aerob (Karimi *et al.*, 2005; Milati *et al.*, 2004; Abedinifar *et al.*, 2009).

Pada Gambar 4.10 (B), ditunjukkan disparitas (perbedaan) data produksi etanol antara *R. oryzae* yang telah dienkapsulasi dengan sel bebas *R. oryzae*, terlihat bahwa dengan perubahan pH terjadi perubahan produksi etanol yang dihasilkan. Pada pH 5,0 disparitas produksi etanol antara enkapsulasi dengan sel bebas hanya sebesar 17,64 % artinya produksi etanol yang dihasilkan pada SSF dengan enkapsulasi *R. oryzae* lebih tinggi 17,64 % dibandingkan SSF dengan sel bebas *R. oryzae*. Sedangkan pada pH 4,5 dan 5,5 enkapsulasi dapat meningkatkan produksi etanol sebanyak 65,42 % dan 40,63 %. Semakin besarnya disparitas konsentrasi etanol menunjukkan proses SSF dengan menggunakan sel bebas *R. oryzae* lebih rentan terhadap perubahan pH dibandingkan dengan proses menggunakan enkapsulasi *R. oryzae*.

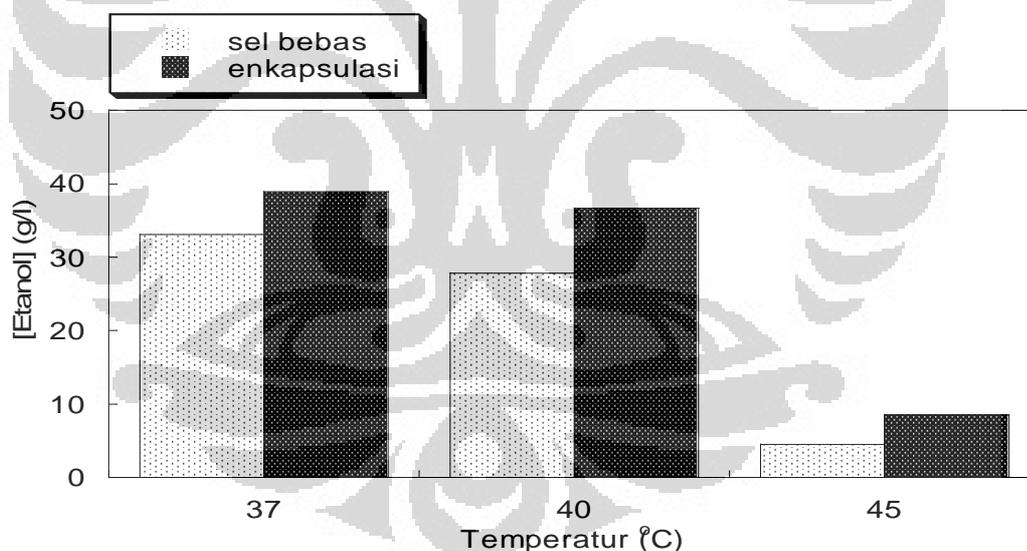
Proses ini dilakukan secara SSF yaitu proses sakarifikasi dan fermentasi dilakukan secara serentak pada satu reaktor dengan salah satu tujuannya adalah mencegah terjadinya penghambatan proses sakarifikasi akibat tingginya kadar glukosa, karena glukosa yang dihasilkan dari proses sakarifikasi langsung diubah menjadi etanol. Semakin tinggi glukosa yang dihasilkan pada proses sakarifikasi akan meningkatkan potensi produksi etanol yang dihasilkan. Proses SSF terbukti menghasilkan etanol yang lebih tinggi dibandingkan dengan proses sakarifikasi dan fermentasi terpisah/*Separated Hydrolysis and Fermentation* (SHF). Pada penelitian ini, etanol yang dihasilkan oleh proses SSF dengan sel bebas *R. oryzae* pada pH 5,0 yaitu sebesar 0,37 g/g selulosa lebih tinggi dibandingkan proses SHF dari jerami padi yang dilakukan oleh Abedinifar *et al.* (2009) pada kondisi yang sama yaitu sebesar 0,33 g/g selulosa. Etanol yang dihasilkan dengan enkapsulasi *R. oryzae* bahkan lebih tinggi yaitu 0,43 g/g selulosa. Sehingga pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa enkapsulasi *R. oryzae* dalam membran kalsium alginat

dengan proses SSF dapat meningkatkan ketahanan sel terhadap perubahan lingkungan sekitarnya sehingga dapat meningkatkan produksi etanol.

### 4.3.2 Pengaruh Enkapsulasi pada Peningkatan Suhu

Selain pengaruh pH, pada penelitian ini juga akan dibandingkan hasil proses SSF pret-TKKS menggunakan enkapsulasi sel *R. oryzae* dengan sel bebas *R. oryzae* terhadap kenaikan suhu proses. Perbandingan produksi etanol yang dihasilkan dengan kenaikan suhu proses ditunjukkan pada Gambar 4.11.

Pada gambar 4.11 terlihat produksi etanol tertinggi diperoleh pada suhu proses 37 °C. Ketika proses SSF dilakukan pada suhu 40 °C, produksi etanol yang dihasilkan baik pada enkapsulasi sel *R. oryzae* maupun dengan sel bebas *R. oryzae* mengalami penurunan. Begitu pula ketika suhu proses dinaikkan menjadi 45 °C, terjadi penurunan produksi etanol yang cukup signifikan. Namun dapat dilihat bahwa enkapsulasi sel *Rhizopus oryzae* menghasilkan produksi etanol yang lebih tinggi dibandingkan dengan proses SSF menggunakan sel bebas *R. oryzae*.

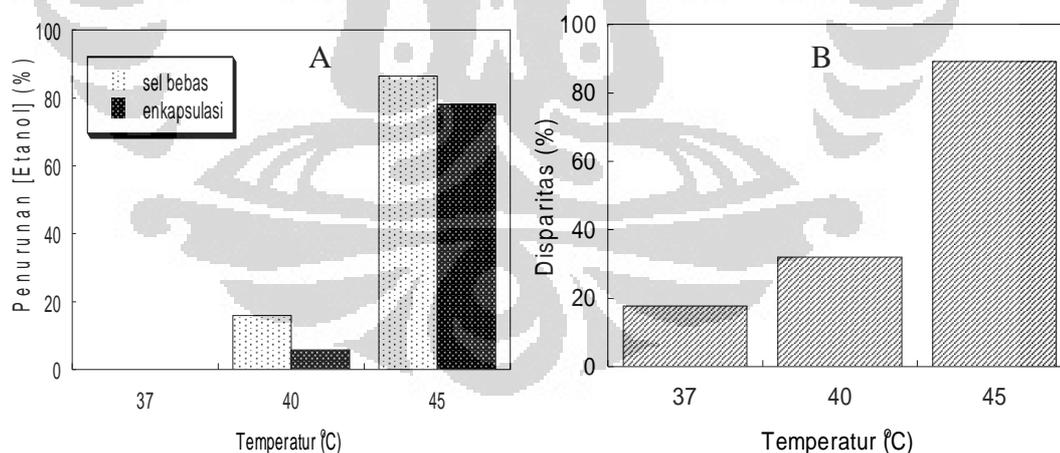


**Gambar 4.11.** Perbandingan konsentrasi etanol yang dihasilkan sel bebas *R. oryzae* dengan enkapsulasi *R. oryzae* pada variasi suhu

Suhu proses sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan mikroorganisme, dalam hal ini *R. oryzae*. Suhu yang tinggi akan merusak sel dengan berbagai macam efek, diantaranya kerusakan membran atau dinding sel, denaturasi protein dan terjadinya agregasi sel (Singer and Lindquist, 1998). Umumnya untuk menghasilkan glukosa dari lignoselulosa diperlukan proses sakarifikasi yang yang

bersuhu tinggi pada suhu optimum selulase yaitu sekitar 45-50° C. Oleh karena itu diperlukan mikroorganismenya yang dapat tahan pada suhu proses yang tinggi. Selain dengan mencari mikroorganismenya yang dapat menghasilkan etanol di suhu tinggi, salah satu metode lain yang dapat meningkatkan ketahanan sel pada suhu tinggi adalah proses enkapsulasi. Enkapsulasi sel telah terbukti memberikan ketahanan terhadap lingkungan sel, seperti pH yang terlalu asam atau terlalu basa. Enkapsulasi memberikan perlindungan terhadap zat-zat metabolit yang beracun bagi sel tersebut. Enkapsulasi juga dapat meningkatkan toleransi stres sel terhadap gangguan luar (Ylivero *et al.*, 2011).

Enkapsulasi juga terbukti memberikan daya tahan terhadap kenaikan suhu. Penurunan produksi akibat perubahan suhu proses ditunjukkan pada Gambar 4.12. Pada Gambar 4.12 A, dengan perubahan suhu proses SSF dari suhu 37 °C menjadi 40 °C dan 45 °C, terlihat bahwa produksi etanol yang dihasilkan sel bebas turun lebih besar dibandingkan dengan produksi etanol yang dihasilkan enkapsulasi sel. Dengan menggunakan produksi etanol pada suhu 37 °C yaitu sebesar 38,92 g/l sebagai data referensi, kenaikan suhu dari 37 °C menjadi 40 °C menurunkan produksi etanol sebesar 16 % pada sel bebas sedangkan pada enkapsulasi hanya sebesar 5,7 %.



**Gambar 4.12. Penurunan dan Disparitas Konsentrasi Etanol Akibat Kenaikan Suhu**

Pada Gambar 4.12 B, memperlihatkan disparitas produksi etanol antara proses SSF menggunakan sel bebas dengan enkapsulasi *Rhizopus oryzae*. Pada tiap suhu proses terjadi disparitas data produksi etanol. Proses SSF dengan menggunakan enkapsulasi *R. oryzae* lebih tinggi dibandingkan dengan sel bebas

*R. oryzae* sebesar 17,64 %. Kenaikan suhu proses menyebabkan penurunan produksi etanol yang dihasilkan. Disparitas produksi etanol semakin naik pada suhu 40 °C, enkapsulasi *R. oryzae* menghasilkan etanol 31,95 % lebih tinggi dibandingkan sel bebas, dan pada suhu 45 °C dihasilkan etanol 89,16 % lebih tinggi. Disparitas data yang semakin besar, menunjukkan sel bebas *R. oryzae* lebih rentan terhadap perubahan suhu, sedangkan enkapsulasi *R. oryzae* lebih tahan terhadap perubahan suhu proses.

Hasil penelitian menunjukkan pada suhu yang tinggi enkapsulasi *R. oryzae* masih dapat menghasilkan etanol yang lebih tinggi dibandingkan dengan sel bebas. Hal ini menunjukkan bahwa *R. oryzae* yang telah dienkapsulasi mempunyai ketahanan terhadap panas dibandingkan dengan sel bebas. Hasil penelitian yang sama juga dilakukan Ylivero *et al.*, (2011), dimana pada proses fermentasi dengan suhu 45°C enkapsulasi *Saccharomyces cerevisiae* masih dapat menghasilkan etanol dibandingkan sel bebas yang sudah tidak dapat menghasilkan etanol pada suhu tersebut. Enkapsulasi memberikan dinding sel buatan pada sel yang terperangkap di dalamnya, sehingga memberikan perlindungan dari panas lingkungan sekitar sel. Analisis dari komposisi membran buatan pada enkapsulasi sel mengindikasikan bahwa kandungan asam lemak, pospolipid dan sterols meningkat, dan meningkatkan perlindungan dari lingkungan sekitar (Bai *et al.*, 2008)

Sel yang terkena suhu tinggi sangat cepat mengalami respon perubahan molekul terutama pada ekspresi gen. Akibat suhu tinggi, sel akan merespon dengan mensintesis beberapa protein khusus, selain itu juga akan memproduksi senyawa pelindung lainnya seperti trehalosa dan beberapa enzim (Uyar *et al.*, 2010). Trehalosa akan terproduksi ketika sel berada pada kondisi stress. Trehalosa berfungsi sebagai pelindung suhu panas dengan menstabilkan dinding sel dan protein sel lainnya. Trehalosa banyak terdapat pada fase pertumbuhan stasioner, sedangkan pada fase logaritmik tidak ditemukan trehalosa. Daya tahan yang terdapat pada sel *Rhizopus oryzae* yang dienkapsulasi dapat dijelaskan dengan kemungkinan terbentuk dan menumpuknya trehalose pada *R. oryzae* di dalam kapsul. Penelitian yang dilakukan oleh Uyar *et al.* (2010) menyatakan *R. oryzae* menghasilkan trehalose 5 kali lebih banyak ketika mengalami stress akibat suhu

yang tinggi. Penelitian Talebnia *et al.* (2007) menyatakan bahwa dalam sel yang terenkapsulasi ditemukan banyak trehalose dan trehalose ini akan meningkatkan daya tahan terhadap suhu tinggi. Sehingga dapat disimpulkan enkapsulasi dapat meningkatkan ketahanan *R. oryzae* terhadap suhu terbukti dengan tetap menghasilkan etanol lebih banyak pada suhu tinggi dibandingkan sel bebas *R. oryzae*. Namun pada penelitian ini produksi etanol tertinggi yang dihasilkan terjadi pada suhu 37°C, sedangkan untuk lebih meningkatkan glukosa yang dihasilkan sebagai sumber etanol harus dilakukan pada suhu optimum proses sakarifikasi, yaitu 45-50°C. Produksi etanol yang dihasilkan pada suhu 45°C masih belum optimal karena masih jauh lebih kecil dibandingkan dengan etanol pada suhu 37°C dan 40°C. Oleh karena itu masih perlu dilakukan peningkatan kinerja membran kalsium alginat untuk melindungi *R. oryzae* pada suhu tinggi, agar dapat melakukan fermentasi di suhu optimal sakarifikasi untuk menghasilkan etanol yang lebih tinggi sekaligus mengatasi kelemahan yang terjadi pada proses SSF.

## BAB 5

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1 Kesimpulan

Penelitian enkapsulasi *Rhizopus oryzae* untuk proses sakarifikasi dan fermentasi serentak tandan kosong kelapa sawit menjadi etanol pada reaktor *batch*, penambahan enzim selulase 20 FPU, pada *rotary shaker incubator*, dapat disimpulkan :

1. Kondisi optimum proses SSF pret-TKKS dengan enkapsulasi *R. oryzae* pada pH 5,0 dan suhu 37°C.
2. Enkapsulasi dapat meningkatkan aktivitas produksi bioetanol pada *R. oryzae* dalam proses SSF pret-TKKS yang telah dilakukan perlakuan awal dengan produksi etanol yang dihasilkan dihasilkan pada pH 4,5; 5,0; dan 5,5 berturut-turut adalah 33,99 g/l, 38,92 g/l, dan 37,66 g/l media sedangkan menggunakan sel bebas dihasilkan 20,50 g/l, 33,08 g/l dan 26,77 g/l. Subtrat pret-TKKS sebanyak 15 % berat kering, dan proses SSF dilakukan pada pH 5,0, suhu 37° C, dan *shaking* 150 rpm.
3. Enkapsulasi *R. oryzae* meningkatkan produksi etanol yang dihasilkan sebesar 17,64 % pada pH 5,0; 65,42 % pada pH 4,5; dan 40,63 % pada pH 5,5 dibandingkan dengan sel bebas *R.oryzae*.
4. Enkapsulasi sel *R. oryzae* dapat meningkatkan ketahanan terhadap suhu proses dengan perbedaan produksi etanol antara enkapsulasi dengan sel bebas sebesar 31,95 % ketika dinaikkan pada suhu 40°C, dan sebesar 89,16 % pada suhu 45°C, dibandingkan dengan sel bebas *R. oryzae*.
5. Yield etanol tertinggi yang dihasilkan adalah 0,43 g/g selulosa yang terdapat di pret-TKKS, dengan konversi sebesar 75,89 % dibandingkan produksi etanol secara teoritis.

## 5.2 Saran

Beberapa saran yang dapat dijadikan acuan untuk lebih menyempurnakan tulisan ini adalah :

1. Penelitian ini hanya menggunakan enkapsulasi dengan kalsium alginat, perlu dilakukan peningkatan dinding enkapsulasi dengan menggunakan penambahan lapisan polimer lain.
2. Untuk meningkatkan produksi etanol, dapat dilakukan kombinasi penggunaan *Rhizopus oryzae* dengan *Saccharomyces cerevisiase* secara bersamaan.



## DAFTAR PUSTAKA

- Abedinifar, S., Keikhosro K., and Khanahmadi, M. 2009. Ethanol production by *Mucor indicus* and *Rhizopus oryzae* from rice straw by separate hydrolysis and fermentation, *Biomass and Bioenergy*. 828-833.
- Adrados, B.P., Choteborska P., Galbe M., and Zacchi G. 2005. Ethanol production from non-starch carbohydrates of wheat bran. *Biosource Technology*. 96.843-850.
- Badger, P.C. 2002. *Ethanol from cellulose: A general review*, In: J, Janick and A, Whipkey (eds.), Trends in new crops and new uses, Alexandria VA: ASHS Press. 17–21.
- Bai, F.W., Anderson, W. A., Moo-Young, M., 2008. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances*. **26**. 89-105.
- Buyukkileci, A.O., Hamamci, H., and Yucel, M. 2006. Lactate and ethanol productions by *Rhizopus oryzae* ATCC 9396 and activities of related pyruvate branch points enzymes. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **102**, 464-466.
- Demirbas, A. 2005. Bioethanol from cellulosic materials: A renewable motor fuel from biomass. *Energy Sources*. **21**. 327–337,
- Deval, R.B., Assary, R.S., Nikolla, E., Moliner, M., Leshkov, Y.R., Hwang, S. 2012. Metalloenzyme-like catalyzed isomerizations of sugar by Lewis acid zeolites. [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1206708109](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1206708109).
- Egana, A.L., Braumann, U.D., Cuenca, A.D., Nowicki, M., Bader, A. 2011. Determination of pore size distribution at the cell-hydrogel interface. *Journal of Nanobiotechnology*. **9**. 24.
- Fessenden, R.J and Fessenden, J.S. 1982. *Kimia Organik* (3<sup>rd</sup> ed.) Jakarta: Erlangga.
- Ghosh, Barnita and Ray, Rina Rani. 2011. Current commercial perspective of *Rhizopus oryzae* : A Review. *Journal Applied Science*. 2470-2486.
- Hamamci, H., and Ryu, D.D.Y. 1994. Production of L(+)-lactic acid using immobilized *Rhizopus oryzae* : reaktor performance based on kinetic model and simulation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **44**. 125-133.
- Hermawan, Y and Yanni S. 2009. Sakarifikasi fermentasi secara serentak tandan kosong kelapa sawit untuk produksi etanol. *Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia 2009* ISBN 978-979-98465-5-6 : 99-100.
- Hermiati, E. and Sukara, E. 2005. Konversi bahan berlignoselulosa menjadi bioenergi etanol. *Prosiding Seminar Nasional Biomassa Lignoselulosa*. 14-21.
- Huang, L.P., Jin, B., Lant, P., and Zhou, J. 2005. Simultaneous saccharification and fermentation of potato starch wastewater to lactic acid by *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus arrhizus*. *Biochemical Engineering Journal*. **23**. 265-276.

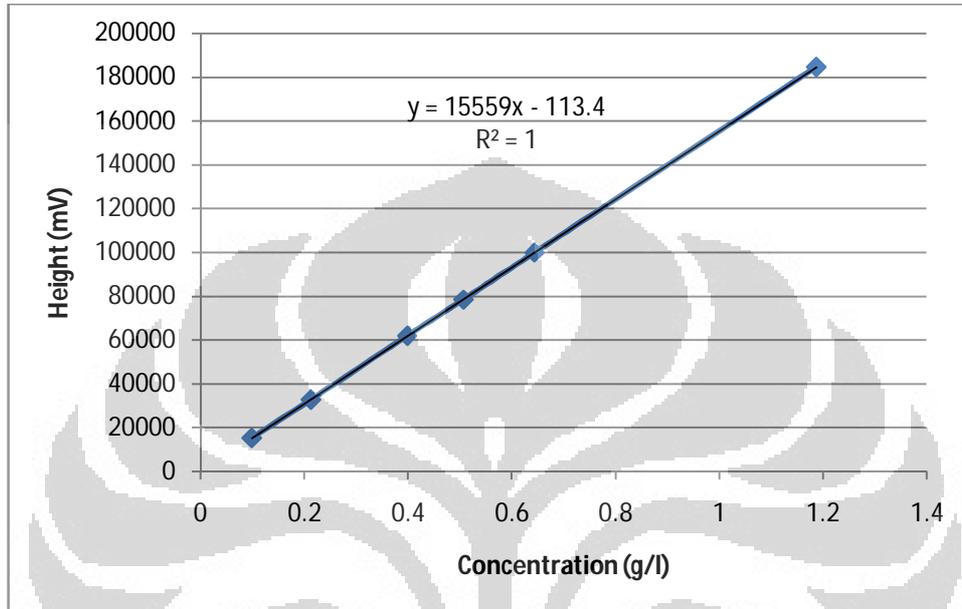
- IEO. 2010. U.S. Energy Information Administration / International Energy Outlook 2010.
- Jin, Bo., Yin P., Ma, Y., and Zhao L. 2005. Production of lactic acid and fungal biomass by *Rhizopus* fungi from food processing waste streams. *Microbiologi Biotechnology*. **32**. 678-686.
- Judomidjojo, M. 1992. *Teknologi Fermentasi*. Jakarta: Rajawali Pers.
- Judoamidjojo, M., R.E. Gumbira S., and Hartoto, L.B. 1989. *Biokonversi*. Bogor : Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi. Pusat Antar Universitas Bioteknologi Institut Pertanian Bogor.
- Kampf, N. 2002. The use of polymers for coating of cells, *Polymers for Advanced Technologies*. **13**. 895-904.
- Karimi, K., Emtiazi, G., and Taherzadeh, Mohammad J. 2006. Ethanol production from dilute acid pretreated rice straw by SSF with *Mucor indicus*, *Rhizopus oryzae*, and *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*. **40**. 138-144,
- Kibbe, A. 2000. *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (3<sup>rd</sup> ed.). London: Pharmaceutical press. 465-466.
- Kirk-Othmer. 1999a. *Encyclopedia of Chemical Technology*. Vol. 5 4<sup>th</sup> edition. A Wiley Interscience Publication. John Willey & Sons. Newyork.
- Kirk-Othmer. 1999b. *Encyclopedia of Chemical Technology*. Vol. 13 4<sup>th</sup> edition. A Wiley Interscience Publication. John Willey & Sons. Newyork.
- Kirk-Othmer. 1999c. *Encyclopedia of Chemical Technology*. Vol. 15 4<sup>th</sup> edition. A Wiley Interscience Publication. John Willey & Sons. Newyork.
- Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., banat, I.M., Marchant, R., Koutinas, A.A. 2004. Immobilization technologies and support material suitable in alcohol beverages production : a review. *Food Microbiology*. **21**. 377-397.
- Lin, J., Zhou, M., Zhao, X., Luo, S., and Lu Y. 2007. Extractive fermentation of L-lactic acid with immobilized *Rhizopus oryzae* in a three fluidized bed. *Chemical engineering and Processing*. **46**. 369-374.
- Mofidi, N., Aghai-Moghadam, M., Sarbolouki, M.N. 2000. Mass preparation and characterization of alginate microspheres. *Process Biochemsitry*. **35**. 885-888
- Millati, R., Niklasson, C., and Taherzadeh, Mohammad J. 2002. Effect of pH, time and temperature of overliming on detoxification of dilute-acid hydrolyzates for fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry*. 515-522.
- Park, J.K., and Chang, H.N. 2000. Microencapsulation of microbial cells: Review. *Biotechnology Advances*. **18**. 303-319.
- Pelczar, Michael J., and E.C.S. Chan. 2005. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Jilid 1. Jakarta : Universitas Indonesia Press.
- Pilkington, P.H., Margaritis, A., Mensour, N.A., Russell, I. 1998. Fundamentals of immobilised yeast cells for ontinuous beer fermentation : a review. *Jornal on the Institute of Brewing*. **104**. 19-31.

- Pujaningsih, R.I. 2005. *Teknologi Fermentasi dan Peningkatan Kualitas Pangan*. Semarang: Universitas Diponegoro.
- Rosenberg, M., Kristofikova, L., 1995. Physiological restriction of the (L)-lactic acid production by *Rhizopus arrhizus*. *Acta Biotechnology*. **15**. 367–374.
- Samsuri, M., Gozan, M., Prasetya, B., and Nasikin, M. 2008. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic bagasse for bioethanol production. *The 4<sup>th</sup> Indonesian Biotechnology Conference*. Bogor. Indonesia.
- Samsuri, M., Gozan, M., Prasetya, B., Nasikin, M. 2009. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic bagasse for bioethanol production. *Journal of Biotechnology Research in Tropical Region*. **2**.
- Sari, N, K. 2009. Purifikasi bioetanol dari rumput gajah dengan destilasi batch. *SNTKI 2009* ISBN 978-979-98300-1-2 Bandung. Oktober 2008 :1-9.
- Sastrohamidjojo, H., and Prawirohatmodjo, S. 1995. *KAYU : Kimia, Ultrastruktur, Reaksi-reaksi*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Scory, C.D., Freer, S.N., Bothast, R.J., 1997. Screening for ethanol producing filamentous fungi. *Biotechnology*. Letter **19**. 203-206.
- Shao, P., Huang, R.Y.M. 2007. Polymeric membran pervaporation. *Journal of Membran Science*. **287**. 162-179.
- Singer, M. A., Lindquist, S., 1998. Thermotolerance in *Sachharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. *Trends in Biotechnology*. **16**. 460-468.
- Sjostrom, E. 1981. *Wood Chemistry*, California: Fundamentals and Application. Academic Press Inc. p 233.
- Socol, C.R., Stonoga, V.I., Raimbault, M. 1994. Production of (L)-lactic acid by *Rhizopus* species, *World Journal Microbiology Biotechnology* . 10
- Soetrisno, N., and Sapuan. 1996. *Bunga Rampai Tempe Indonesia*, Jakarta: Yayasan Tempe Indonesia.
- Sudiyani, Y. 2009. Utilization of biomass waste empty fruit bunch fiber of palm oil for bioethanol production, Jakarta, 4-5 Februari 2009 : *Research Workshop on Sustainable Biofuel* : 1-15.
- Sues, A., Millati, R., Edebo, L., & Taherzadeh, M. J. 2005. Ethanol production from hexoses, pentoses, and dilute-acid hydrolyzate by *Mucor indicus*. *FEMS Yeast Research*, **5**, 669-676.
- Sun, Y, and Cheng, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*. **83**. 1 – 11.
- Surini, S., Akiyama H., Morianhita M., Takayama K., and Nagai, T. 2003. polyion complex of chitosan and Sodium Hyaluronate as an Implant device for insulin delivery *S,T,P, Pharmasciences*, **13**, 1-4,
- Syafwina, Y, Honda, T, Watanabe and M, Kuwahara, 2002. Pretreatment of oil palm empty fruit bunch by white-rot fungi for enzymatic saccharification. *Wood Research*. **89**. 19 – 20.
- Taherzadeh, Mohammad J., Fox, M., Hjorth, H., Edebo, L. 2003. Production of mycelium biomass and ethanol from paper pulp sulfite liquor by *Rhizopus oryzae*. *Bioresource Technology*. **88**. 167-177.

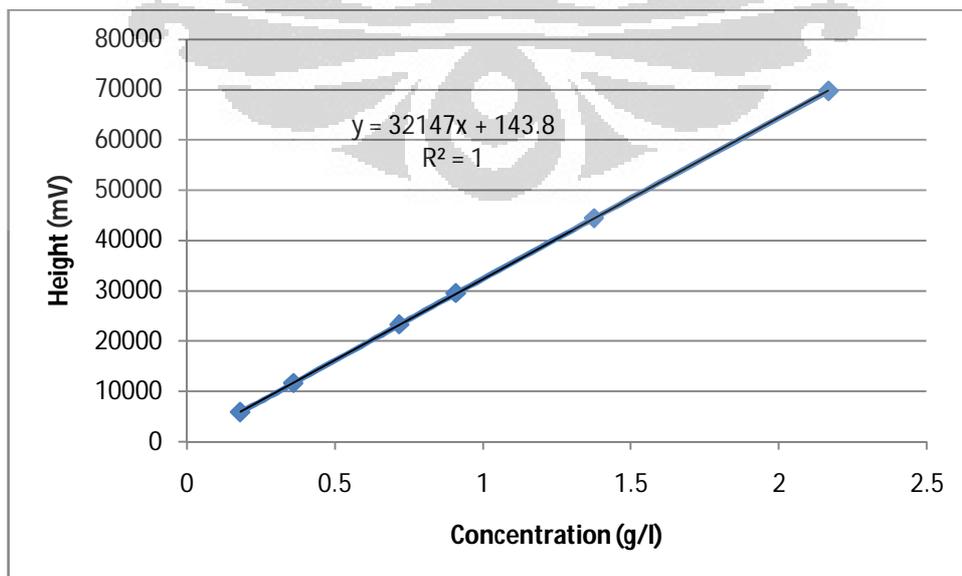
- Talebnia, F., Taherzadeh, Mohammad J. 2006. In situ detoxification and continuous cultivation of dilute-acid hydrolyzate to ethanol by encapsulated *S. cerevisiae*. *Journal of Biotechnology*. 377-384.
- Talebnia F. 2008. Ethanol production from cellulosic biomass by encapsulated *Saccharomyces cerevisiae*. Thesis for the Degree of PhD. Department of Chemical and Biological Engineering. Chalmers University of Technology.
- Thongcul, N., Navankasattusas, S., Yang, S. 2010. Production of lactic acid and ethanol by *Rhizopus oryzae* with cassava pulp hydrolysis. *Bioprocess Biosystem Engineering*. **33**. 407-416.
- US EPA. 2000. Inventory of U.S. Greenhouse Gas Emissions and Sinks: 1990-1998. Rep. EPA 236-R-00-01. US EPA. Washington. DC.
- Uyar EO, Hamamci H, Türkel S. 2010. Effect of different stresses on trehalose levels in *Rhizopus oryzae*. *Journal of Basic Microbiology*. 50(4):368-72.
- Winarno, F.G. 1997. *Kimia Pangan dan Gizi*. Jakarta: PT Garmedia Pustaka Utama.
- Wentao, Q., Wueting, Y., Yubing, X., Xiaojun, M. 2005. Optimization of *Saccharomyces cerevisiae* culture in alginate-chitosan-alginate microcapsul. *Biochemical Engineering Journal*. **25**. 151-157.
- Ylitervo, P., Johan, C., Taherzadeh, Mohammad J. 2011. Ethanol production at elevated temperatures using encapsulation of yeast. *Journal of Biotechnology*. 22-29.
- Yusuf, R. 2008. Studi pendahuluan konversi alkohol dari senyawa pati tepung tapioka menggunakan Jamur *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus oligosporus*, dan *Rhizopus stolonifer*. Skripsi. Program Studi Sarjana Mikrobiologi SITH, ITB.

## DAFTAR LAMPIRAN

### Lampiran 1 : Kurva standar Glukosa



### Lampiran 2 : Kurva standar etanol



**Lampiran 3: Konsentrasi Glukosa dan etanol dengan sel bebas *R. oryzae* pada variasi pH**

Konsentrasi Glukosa pada T 37° C, 150 rpm, anaerob.

pH	Jam ke-	Tinggi rata-rata	Konsentrasi (g/l)	Pengenceran	Konsentrasi (g/l)	Konsentrasi (%)
4.5	0	33958	0.2180	9.77	2.1303	21.3026
	24	99166	0.6367	9.80	6.2402	62.4019
	48	104327	0.6698	9.82	6.5810	65.8099
	72	89676	0.5758	9.79	5.6373	56.3731
	96	81508	0.5233	9.94	5.2000	52.0003
5.0	0	37003	0.2376	9.59	2.2777	22.7772
	24	96609	0.6203	9.83	6.0982	60.9817
	48	55800	0.3583	9.32	3.3400	33.3999
	72	8886	0.0571	9.92	0.5662	5.6617
	96	1681	0.0108	10.04	0.1084	1.0836
5.5	0	36219	0.2325	9.62	2.2363	22.3634
	24	90183	0.5790	9.74	5.6414	56.4142
	48	89434	0.5742	9.57	5.4958	54.9581
	72	65225	0.4188	9.69	4.0597	40.5975
	96	21180	0.1360	9.83	1.3374	13.3740

Konsentrasi Etanol pada T 37° C, 150 rpm, anaerob.

pH	Jam ke-	Tinggi rata-rata	Konsentrasi (g/l)	Pengenceran	Konsentrasi (g/l)	Konsentrasi (%)
4.5	0	0	0.0000	0.00	0.0000	0.0000
	24	1704	0.0520	9.80	0.5094	5.0937
	48	2658	0.0811	9.82	0.7965	7.9649
	72	4657	0.1420	9.79	1.3906	13.9058
	96	6766	0.2064	9.94	2.0505	20.5054
5.0	0	0	0.0000	0.00	0.0000	0.0000
	24	1542	0.0470	9.83	0.4624	4.6238
	48	6346	0.1935	9.32	1.8044	18.0443
	72	8927	0.2723	9.92	2.7020	27.0196
	96	10803	0.3295	10.04	3.3082	33.0822
5.5	0	0	0.0000	0.00	0.0000	0.0000
	24	1973	0.0602	9.74	0.5863	5.8630
	48	2831	0.0863	9.57	0.8264	8.2642
	72	5341	0.1629	9.69	1.5792	15.7920
	96	8927	0.2723	9.83	2.6778	26.7776

**Lampiran 4 : Konsentrasi Glukosa dan etanol dengan enkapsulasi *R. oryzae* pada variasi pH**

Konsentrasi Glukosa pada T 37° C, 150 rpm, anaerob.

pH	Jam ke-	Tinggi rata-rata	Konsentrasi (g/l)	Pengenceran	Konsentrasi (g/l)	Konsentrasi (%)
4.5	0	33958	0.2180	9.77	2.1303	21.3026
	24	85076	0.5462	9.73	5.3169	53.1695
	48	65224	0.4188	10.05	4.2093	42.0933
	72	32577	0.2092	9.85	2.0605	20.6049
	96	15392	0.0988	9.93	0.9815	9.8153
5.0	0	37003	0.2376	9.59	2.2777	22.7772
	24	103291	0.6632	9.51	6.3073	63.0727
	48	61394	0.3942	9.71	3.8269	38.2685
	72	6295	0.0404	10.02	0.4050	4.0498
	96	3706	0.0238	9.56	0.2275	2.2750
5.5	0	36219	0.2325	9.62	2.2363	22.3634
	24	111512	0.7160	9.69	6.9351	69.3513
	48	91777	0.5892	9.73	5.7336	57.3356
	72	28263	0.1815	9.59	1.7405	17.4045
	96	3489	0.0224	9.69	0.2171	2.1707

Konsentrasi Etanol pada T 37° C, 150 rpm, anaerob.

pH	Jam ke-	Tinggi rata-rata	Konsentrasi (g/l)	Pengenceran	Konsentrasi (g/l)	Konsentrasi (%)
4.5	0	0	0.0000	0.00	0.0000	0.0000
	24	2285	0.0697	9.73	0.6784	6.7838
	48	7213	0.2200	10.05	2.2113	22.1132
	72	9365	0.2856	9.85	2.8138	28.1383
	96	11198	0.3415	9.93	3.3922	33.9217
5.0	0	0	0.0000	0.00	0.0000	0.0000
	24	3261	0.0995	9.51	0.9459	9.4593
	48	9088	0.2772	9.71	2.6910	26.9100
	72	12412	0.3786	10.02	3.7932	37.9323
	96	13346	0.4070	9.56	3.8919	38.9190
5.5	0	0	0.0000	0.00	0.0000	0.0000
	24	1706	0.0520	9.69	0.5040	5.0401
	48	6676	0.2036	9.73	1.9812	19.8124
	72	11192	0.3414	9.59	3.2740	32.7402
	96	12742	0.3886	9.69	3.7659	37.6588

**Lampiran 5 : Konsentrasi Glukosa dan etanol dengan sel bebas *R. oryzae* pada variasi Suhu**

Konsentrasi Glukosa pada pH 5,0, 150 rpm, anaerob.

T (°C)	Jam ke-	Tinggi rata-rata	Konsentrasi (g/l)	Pengenceran	Konsentrasi (g/l)	Konsentrasi (%)
37	0	37003	0.2376	9.59	2.2777	22.7772
	24	96609	0.6203	9.83	6.0982	60.9817
	48	55800	0.3583	9.32	3.3400	33.3999
	72	8886	0.0571	9.92	0.5662	5.6617
	96	1681	0.0108	10.04	0.1084	1.0836
40	0	37003	0.2376	9.59	2.2777	22.7772
	24	102089	0.6555	9.48	6.2148	62.1476
	48	89874	0.5770	9.86	5.6873	56.8734
	72	11643	0.0748	9.80	0.7329	7.3289
	96	2944	0.0189	10.01	0.1891	1.8912
45	0	37003	0.2376	9.59	2.2777	22.7772
	24	126290	0.8108	9.55	7.7473	77.4725
	48	144236	0.9261	9.59	8.8810	88.8097
	72	143994	0.9245	9.51	8.7926	87.9257
	96	148281	0.9520	9.40	8.9477	89.4773

Konsentrasi Etanol pada pH 5.0, 150 rpm, anaerob.

T (°C)	Jam ke-	Tinggi rata-rata	Konsentrasi (g/l)	Pengenceran	Konsentrasi (g/l)	Konsentrasi (%)
37	0	0	0.0000	0.00	0.0000	0.0000
	24	1542	0.0470	9.83	0.4624	4.6238
	48	6346	0.1935	9.32	1.8044	18.0443
	72	8927	0.2723	9.92	2.7020	27.0196
	96	10803	0.3295	10.04	3.3082	33.0822
40	0	0	0.0000	0.00	0.0000	0.0000
	24	1156	0.0353	9.48	0.3343	3.3430
	48	4785	0.1459	9.86	1.4384	14.3842
	72	8088	0.2467	9.80	2.4185	24.1850
	96	9111	0.2779	10.01	2.7804	27.8039
45	0	0	0.0000	0.00	0.0000	0.0000
	24	886	0.0270	9.55	0.2582	2.5819
	48	1540	0.0470	9.59	0.4504	4.5044
	72	1598	0.0487	9.51	0.4635	4.6353
	96	1565	0.0477	9.40	0.4486	4.4861

**Lampiran 6 : Konsentrasi Glukosa dan etanol dengan enkapsulasi *R. oryzae* pada variasi Suhu**

Konsentrasi Glukosa pada pH 5,0, 150 rpm, anaerob.

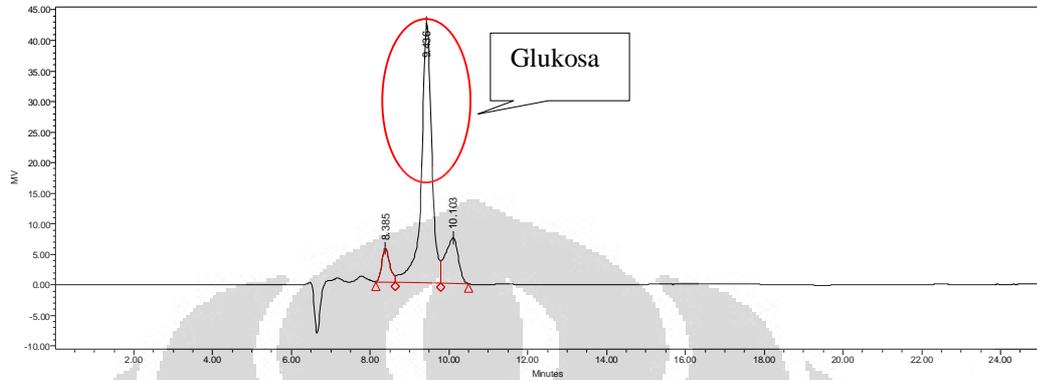
T (°C)	Jam ke-	Tinggi rata-rata	Konsentrasi (g/l)	Pengenceran	Konsentrasi (g/l)	Konsentrasi (%)
37	0	37003	0.2376	9.59	2.2777	22.7772
	24	103291	0.6632	9.51	6.3073	63.0727
	48	61394	0.3942	9.71	3.8269	38.2685
	72	6295	0.0404	10.02	0.4050	4.0498
	96	3706	0.0238	9.56	0.2275	2.2750
40	0	37003	0.2376	9.59	2.2777	22.7772
	24	108609	0.6973	9.50	6.6245	66.2449
	48	100396	0.6446	9.25	5.9652	59.6520
	72	18714	0.1202	9.86	1.1843	11.8432
	96	8162	0.0524	9.93	0.5205	5.2049
45	0	37003	0.2376	9.59	2.2777	22.7772
	24	108593	0.6972	9.76	6.8049	68.0488
	48	121358	0.7792	9.51	7.4111	74.1107
	72	112387	0.7216	9.84	7.0995	70.9955
	96	116324	0.7468	9.36	6.9919	69.9188

Konsentrasi Etanol pada pH 5,0, 150 rpm, anaerob.

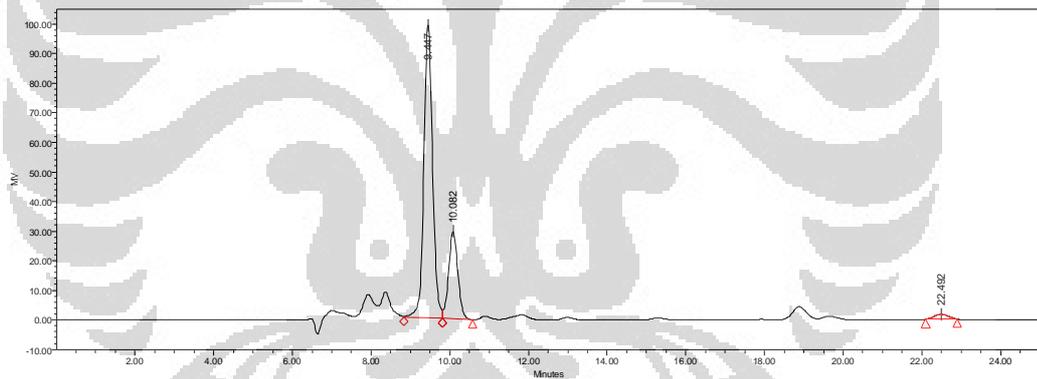
T (°C)	Jam ke-	Tinggi rata-rata	Konsentrasi (g/l)	Pengenceran	Konsentrasi (g/l)	Konsentrasi (%)
37	0	0	0.0000	0.00	0.0000	0.0000
	24	3261	0.0995	9.51	0.9459	9.4593
	48	9088	0.2772	9.71	2.6910	26.9100
	72	12412	0.3786	10.02	3.7932	37.9323
	96	13346	0.4070	9.56	3.8919	38.9190
40	0	0	0.0000	0.00	0.0000	0.0000
	24	1302	0.0397	9.50	0.3772	3.7725
	48	5965	0.1819	9.25	1.6836	16.8364
	72	10807	0.3296	9.86	3.2489	32.4892
	96	12111	0.3694	9.93	3.6688	36.6881
45	0	0	0.0000	0.00	0.0000	0.0000
	24	1265	0.0386	9.76	0.3766	3.7656
	48	1695	0.0517	9.51	0.4917	4.9171
	72	2477	0.0755	9.84	0.7433	7.4331
	96	2972	0.0906	9.36	0.8486	8.4860

## Lampiran 7 : Gambar Kromatogram HPLC

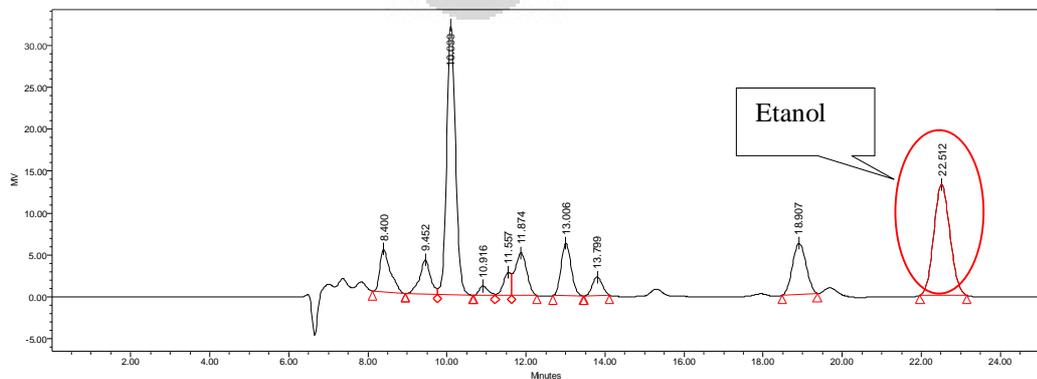
Kromatogram HPLC T 37° C, pH 5,0 enkapsulasi sel, t = 0 jam



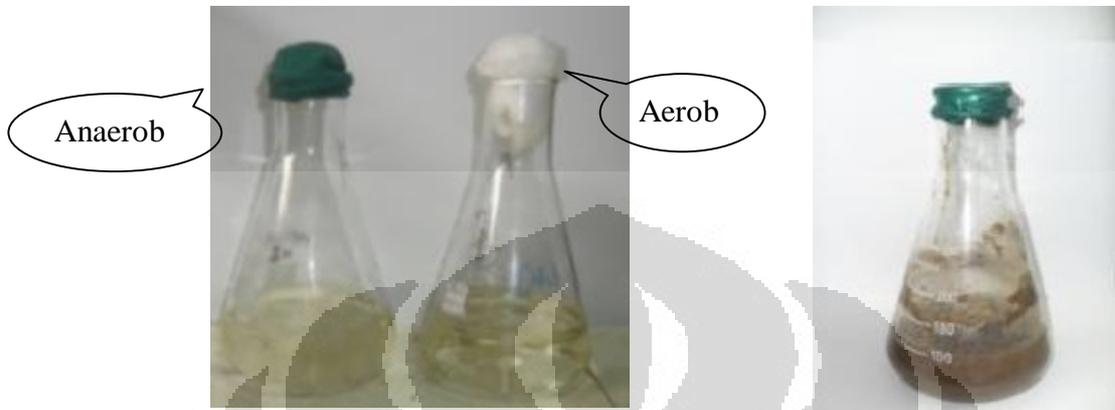
Kromatogram HPLC T 37° C, pH 5,0 enkapsulasi sel, t = 24 jam



Kromatogram HPLC T 37° C, pH 5,0 enkapsulasi sel, t = 96 jam

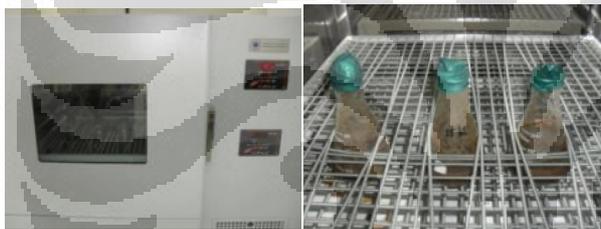


Lampiran 8 : Foto-foto Penelitian

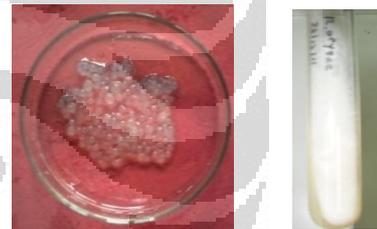


Fermentasi subtrat glukosa

Fermentasi subtrat TKKS



Shaker inkubator



*Rhizopus oryzae*



HPLC



Sampling etanol dan glukosa