

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Kebutuhan akan energi meningkat seiring dengan laju pertumbuhan penduduk yang sangat pesat. Lebih dari 80% kebutuhan energi dunia dipenuhi oleh bahan bakar fosil yang berasal dari minyak bumi dan gas alam, sedangkan bahan bakar tersebut merupakan bahan bakar *unrenewable*. Tingkat pemakaian energi Bahan Bakar Minyak (BBM) di Indonesia cukup tinggi yakni mencapai 5,6 % per tahun [Heriyono, 2008]. Namun, peningkatan konsumsi tersebut tidak diimbangi dengan produksi energi yang memadai. Sehingga upaya pengembangan energi alternatif menjadi penting untuk dilakukan.

Salah satu energi alternatif yang mulai dikembangkan baik di Indonesia maupun di berbagai negara di dunia adalah *biofuel*. Bioetanol merupakan salah satu jenis *biofuel* ramah lingkungan dan berasal dari biomassa yang dikembangkan dengan teknologi bioproses. Namun, saat ini sebagian besar produsen bioetanol masih menggunakan bahan baku yang mengandung gula dan pati dan bersumber dari bahan pangan. Hal tersebut akan berdampak buruk bagi penyediaan kebutuhan pangan. Untuk menghindari hal tersebut, maka perlu dikembangkan teknologi yang mampu memproduksi bioetanol dari biomassa limbah agroindustri yang memiliki banyak lignoselulosa. Penggunaan biomassa limbah agroindustri untuk memproduksi bioetanol juga mengurangi biaya proses pengolahan biomassa sebelum dibuang ke lingkungan dan dapat mengurangi masalah pencemaran lingkungan [Gomez *et al*, 2008].

Salah satu biomassa limbah agroindustri yang berpotensi sebagai sumber bahan baku pembuatan bioetanol adalah *reject pulp*. *Reject pulp* merupakan sisa potongan kayu yang tidak termasak sempurna di dalam tangki digester pada pabrik *pulp* dan *paper*. Industri *pulp* dan *paper* di Provinsi Riau menghasilkan *reject pulp* yang cukup melimpah. *Reject pulp* yang dibuang sebagai limbah padat oleh PT. Riau Andalan *Pulp* dan *Paper* (PT.RAPP) mencapai 159,6 ton per hari [PT.RAPP, 2010]. Tetapi hingga saat ini *reject pulp* belum banyak dimanfaatkan

menjadi produk yang memiliki nilai tambah. Apabila pengembangan produksi bioetanol dari *reject pulp* sebagai bahan bakar alternatif yang bersifat *renewable* dapat dilakukan maka penelitian ini akan menjadi semakin menarik untuk dikembangkan.

Penelitian ini akan memanfaatkan *reject pulp* sebagai bahan baku untuk memproduksi bioetanol. Proses produksi bioetanol dari *reject pulp* meliputi dua tahapan utama yaitu sakarifikasi (hidrolisis) menggunakan enzim dan fermentasi dengan bantuan mikroorganisme. Hidrolisis merupakan tahap penting pada produksi bioetanol dari lignoselulosa. Hidrolisis meliputi pemecahan polimer selulosa dan hemiselulosa menjadi monomer gula penyusunnya seperti glukosa, xilosa dan lainnya. Monomer gula yang terbentuk akan difermentasi menjadi bioetanol. Pemanfaatan enzim sebagai zat penghidrolisis tergantung pada substrat yang menjadi prioritas.

Salah satu faktor penentu harga produksi bioetanol dari biomassa limbah agroindustri adalah harga enzim pendegradasi biomassa yang mengandung selulosa dan hemiselulosa [Yinbo et al, 2006]. Komponen terbesar dalam polisakarida dalam biomassa adalah selulosa dan hemiselulosa, sehingga untuk memecah komponen-komponen tersebut diperlukan enzim yang spesifik [Latifah, 2008]. Proses hidrolisis dan fermentasi untuk memproduksi bioetanol biasanya dilakukan secara terpisah, atau *Separate Hydrolysis and Fermentasi* (SHF). Namun proses tersebut masih kurang efektif karena dilakukan dalam dua buah reaktor dan tidak dilakukan secara berkelanjutan atau simultan tanpa melalui tenggang waktu yang lama, atau biasa disebut dengan istilah *Simultaneous Saccharification and Fermentation* (SSF) [Latifah, 2008].

## **1.2 Perumusan Masalah**

Jumlah *reject pulp* yang dibuang PT.RAPP dalam satu hari sebesar 159,6 ton, dengan jumlah yang cukup besar *reject pulp* belum termanfaatkan secara optimal. Penelitian sebelumnya telah melakukan upaya untuk memanfaatkan *reject pulp* yaitu dengan proses hidrolisis dan fermentasi yang dilakukan secara serentak (SFS) menghasilkan etanol sebesar 9,7 g/L [Lianti, 2009]. Penelitian

yang telah dilakukan pada proses hidrolisisnya menggunakan enzim selulase dan enzim xilanase namun pada proses fermentasi hanya menggunakan khamir *Saccharomyces cerevisiae* saja. Dengan menggunakan khamir *S.cerevisiae* saja pada proses fermentasi, xilosa hasil hidrolisis xilanase tidak terfermentasi, padahal xilosa merupakan jenis glukosa terbesar kedua di alam [Rouhollah *et al*, 2007]. Untuk itu diperlukan jenis khamir yang mampu memfermentasi xilosa.

Rouhollah *et al*, pada tahun 2007 telah melakukan penelitian tentang khamir yang mampu memfermentasi xilosa yaitu dengan menggunakan *Pichia stipitis*. Dengan konsentrasi gula 20 g/L, xilosa yang terfermentasi dapat menghasilkan etanol maksimum sebesar 8,141 g/L. Selain itu, Rouhollah *et al*, 2007 juga telah melakukan fermentasi dengan menggabungkan *P.stipitis-S.cerevisiae* untuk memfermentasi campuran gula yang dapat menghasilkan etanol maksimum sebesar 29,45 g/L.

Latifah [2008] melakukan penelitian terhadap bagas tebu menggunakan proses SSF dengan bantuan enzim selulosa, selobiose dan xilanase serta *yeast Saccharomyces cerevisiae*. Dengan kadar lignoselulosa dalam bagas sekitar 70,2 % berat dapat dikonversi menjadi bioetanol dengan konsentrasi 3,44 gram/liter menggunakan reaktor 5 liter. Produksi etanol dengan bahan baku *reject pulp* membutuhkan kondisi operasi yang optimum, maka perlu dilakukan kombinasi penggunaan enzim selulase, selobiose dan xilanase serta *yeast Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipitis* yang mampu mengkonversi *reject pulp* menjadi etanol.

Pada penelitian ini *reject pulp* akan dijadikan bahan baku produksi bioetanol dengan proses hidrolisis dan fermentasi yang dilakukan secara serentak pada skala laboratorium. Pada proses hidrolisis akan menggunakan dua dan tiga enzim yaitu selulase, xilanase, dan selubiose sedangkan pada proses fermentasi akan digunakan dua khamir yaitu *S.cerevisiae* dan *P.stipitis*. Dengan menggunakan *S.cerevisiae* dan *P.stipitis*, diharapkan menghasilkan bioetanol dengan konsentrasi yang lebih tinggi.

Berikutnya juga dipelajari pengaruh variasi penggunaan enzim dan waktu produksi bioetanol dari *reject pulp* menggunakan enzim selulase, selobiase dan

xilanase serta kombinasi yeast *Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipitis* untuk meningkatkan konversi selulosa dan hemiselulosa dengan proses Sakarifikasi dan Ko-Fermentasi Serentak (SKFS) pada bioreaktor 5 Liter. Diharapkan penelitian ini akan bermanfaat, mengingat pada saat ini dibutuhkan bahan bakar alternatif untuk mengatasi krisis energi. Sekaligus, dengan mengolah limbah industri *pulp* dan *paper* maka dapat mengurangi permasalahan pencemaran lingkungan.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Biomassa *Reject Pulp*

Biomassa adalah bahan organik yang dihasilkan pada proses fotosintesis dan dapat didegradasi secara biologis. Biomassa merupakan sumber daya *renewable* dan di dalamnya tersimpan energi dalam jumlah banyak. Komposisi kimia utama penyusun biomassa adalah selulosa, hemiselulosa dan lignin. Secara umum terdapat tiga jenis sumber penghasil biomassa, yaitu hasil hutan, tumbuhan dan sisa dari kegiatan pertanian. Biomassa dari sisa kegiatan pertanian sangat berpotensi dimanfaatkan menjadi sumber energi mengingat Indonesia merupakan negara agraris. Pemanfaatan biomassa dari sisa kegiatan pertanian seperti jerami padi, bagas, tongkol jagung, tandan kosong sawit (TKS) dan *reject pulp* (limbah padat industri *pulp* dan *paper*) belum optimal. Tabel 2.1. berikut menampilkan contoh-contoh biomassa beserta komposisi kimia yang terkandung di dalamnya.

**Tabel 2.1** Contoh Biomassa dan Komposisi Kimianya

Biomassa	$\alpha$ - Selulosa (% Berat)	Hemiselulosa (% Berat)	Lignin (% Berat)	Lain-lain (% Berat)
Bagas*	52,7	17,5	24,2	5,6
Jerami padi**	37,71	21,99	24,20	16,10
TKS***	45	26	17	12
Tongkol jagung****	40	36	16	8

Sumber: \*Latifah [2008], \*\*Dewi [2002], \*\*\*Isroi [2008], \*\*\*\*Setyawati [2006]

Sedangkan komposisi kimia dari *reject pulp* yang dihasilkan oleh PT. Riau Andalan *Pulp* dan *Paper* disajikan pada Tabel 2.2 berikut.

Industri *pulp* dan *paper* yang ada di propinsi Riau menghasilkan *reject pulp* berlimpah. *Reject pulp* merupakan sisa potongan kayu yang tidak termasuk sempurna di dalam tangki digester akibat adanya mata kayu. Secara singkat proses

diperolehnya *reject pulp* adalah kayu yang telah berbentuk *chip-chip* di masak dalam tangki digester lalu menuju ke proses penyaringan *pulp* (*screening*). Diproses *screening* inilah terjadi penyaringan *pulp* dengan ukuran tertentu dan seragam. Dari proses ini terdapat *pulp* yang tidak lolos *screening* disebut sebagai *reject pulp*. *Reject pulp* ini belum dimanfaatkan secara optimal hanya baru sebatas untuk ditimbun dan dijadikan bahan bakar, namun dengan membakar langsung panas yang dihasilkan tidak mencukupi untuk memenuhi kebutuhan *steam* karena nilai bakarnya rendah [PT.RAPP, 2010].

**Tabel 2.2** Komposisi Kimia *Reject Pulp*

Kandungan Kimia	Nilai (% berat)
$\alpha$ -selulosa	85,16
Hemiselulosa	10,33
Klason-lignin	3.15
Ekstraktif-EB	1.16
Abu ( <i>ash</i> )	0,20

Sumber: PT. RAPP [2010]

*Reject pulp* merupakan lignoselulosa yang memiliki banyak selulosa, hemiselulosa dan lignin yang kemudian dapat dihidrolisa menggunakan enzim atau katalis asam menghasilkan monosakarida berupa glukosa, xilosa dan lain-lain [Sjostrom, 1993]. Setelah dilakukan proses hidrolisa menggunakan katalis asam, maka komponen yang terkandung di dalam *reject pulp* yaitu selulosa 51,43% berat, hemiselulosa 36,07% berat, lignin 5,3% berat dan ekstraktif 7,2% berat [Purnama, 2009]. Selulosa, hemiselulosa, lignin dan ekstraktif yang tersisa di dalam *reject pulp* masih banyak jika dihidrolisa menggunakan katalis asam.

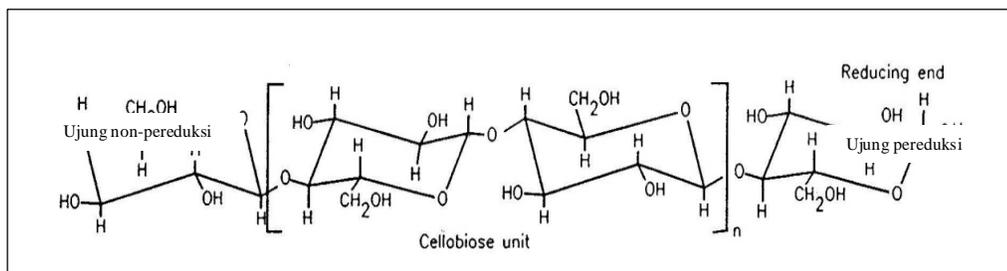
## 2.2 Lignoselulosa

Lignoselulosa merupakan komponen organik di alam yang belum digunakan secara maksimal dan terdiri dari tiga tipe polimer, yaitu selulosa (35-70% berat), hemiselulosa (13-35% berat) dan lignin (13-30% berat) [Shofinita, 2009]. Banyaknya selulosa dan hemiselulosa yang dimiliki dalam biomassa

disebut holoselulosa. Komponen ini merupakan sumber penting untuk menghasilkan produk yang bermanfaat seperti gula dari proses fermentasi, bahan kimia dan bahan bakar cair. Lignoselulosa dapat diperoleh dari bahan kayu, jerami, batang pisang, rumput-rumputan, limbah pertanian/hutan, limbah industri (kayu, kertas) dan bahan berserat lainnya. Kandungan dari ketiga komponen lignoselulosa bervariasi tergantung dari jenis bahannya [Anindyawati, 2009].

### 2.2.1 Selulosa

Selulosa merupakan senyawa organik atau jenis polisakarida yang paling melimpah pada hampir setiap struktur tanaman serta diproduksi juga oleh sebagian kecil dari bakteri. Struktur kimia selulosa berupa polisakarida linear seperti terlihat pada Gambar 2.1. Selulosa adalah salah satu komponen utama dari lignoselulosa yang terdiri dari unit monomer D-glukosa terikat pada ikatan  $\beta$ -1,4-glukosida. Ikatan  $\beta$ -1,4-glukosida pada serat selulosa dapat dipecah menjadi monomer glukosa dengan cara hidrolisis asam atau enzimatik. Dua unit glukosa yang berdekatan terbentuk dari eliminasi satu molekul air antara dua gugus hidroksil pada atom karbon 1 dan 4. Perulangan dari rantai selulosa yang terdiri dari dua buah glukosa akan membentuk selobiose. Kandungan selulosa pada kayu berkisar 45% dari berat kering [Anindyawati, 2009].



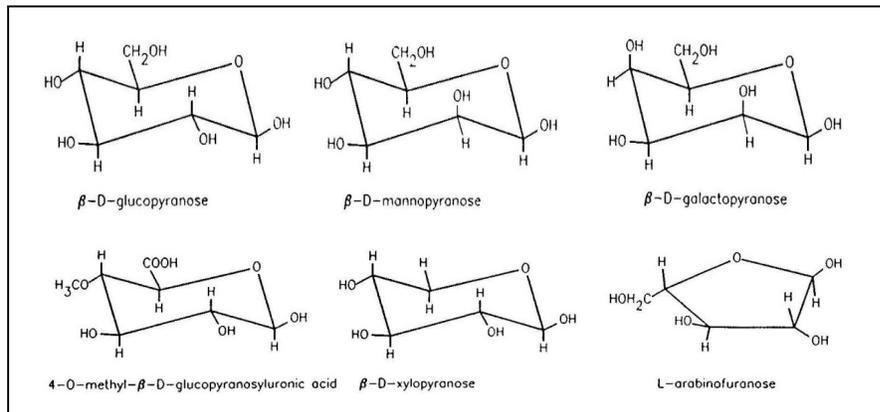
**Gambar 2.1** Struktur Selulosa [Bierman, 1996]

Panjang molekul selulosa ditentukan oleh jumlah unit glukosa di dalam polimer, yang disebut dengan derajat polimerisasi. Derajat polimerisasi selulosa tergantung pada jenis tanaman dan umumnya dalam kisaran 2000–27000 unit glukosa [Isroi, 2008]. Selulosa tidak larut dalam kebanyakan pelarut, tetapi dapat

dilarutkan dalam beberapa asam pekat, seperti asam sulfat (72%), asam klorida (41%), asam trifluoroasetat (100%) dan asam asetat (95%) [Fengel dan Wegener, 1984].

### 2.2.2 Hemiselulosa

Hemiselulosa merupakan kelompok polisakarida dengan berat molekul rendah yang keberadaannya terbanyak kedua setelah selulosa. Hemiselulosa mengikat lembaran serat selulosa membentuk mikrofibril yang mengikat stabilitas dinding sel. Hemiselulosa juga berikatan silang dengan lignin membentuk jaringan kompleks dan memberikan struktur yang kuat. Hemiselulosa terdiri dari kumpulan beberapa unit gula atau disebut heteropolisakarida. Monomer gula penyusun hemiselulosa terdiri dari xilosa, mannososa, glukosa, galaktosa, arabinosa, dan sejumlah kecil asam lainnya seperti terlihat pada Gambar 2.2. Xilosa adalah salah satu gula C-5 dan merupakan gula terbanyak kedua setelah glukosa. Hemiselulosa lebih mudah dihidrolisis daripada selulosa, tetapi gula C-5 lebih sulit difermentasi menjadi etanol.



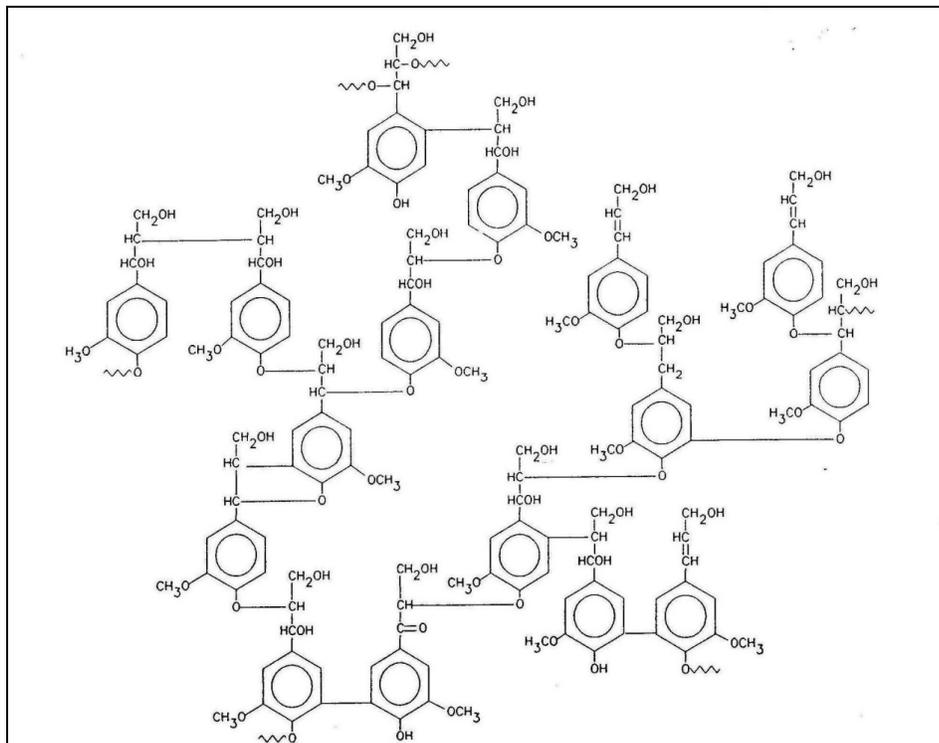
Gambar 2.2 Monomer Gula Hemiselulosa [Bierman 1996]

### 2.2.3 Lignin

Lignin merupakan polimer dengan struktur aromatik yang terbentuk melalui unit-unit penilpropan yang berhubungan oleh beberapa jenis ikatan yang berbeda seperti ditampilkan dalam Gambar 2.3. Lignin adalah material yang

paling kuat dalam biomassa karena strukturnya yang kompleks dan heterogen. Lignin sangat resisten terhadap degradasi, baik secara biologi, enzimatik, maupun kimia. Kandungan karbon yang relatif tinggi dibandingkan dengan selulosa dan hemiselulosa menyebabkan lignin memiliki energi yang tinggi.

Lignin mempunyai kelarutan yang sangat rendah dalam kebanyakan pelarut. Lignin dapat larut dalam asam organik pekat dan alkali encer, namun tidak larut dalam air maupun asam mineral kuat. Lignin dapat diisolasi dengan cara menghidrolisis, mengekstraksi atau mengubahnya menjadi turunan lignin.



**Gambar 2.3** Struktur Lignin [Bierman. 1996]

### 2.3 Enzim pendegradasi lignoselulosa

Enzim merupakan katalisator biologis yang dihasilkan oleh sel-sel hidup dan dapat membantu mempercepat bermacam-macam reaksi biokimia. Kelebihan enzim dibandingkan dengan katalis biasa yaitu dapat meningkatkan produk lebih

tinggi, bekerja pada pH yang relatif netral dan suhu yang relatif rendah, bersifat spesifik dan selektif terhadap substrat tertentu. Enzim memegang peranan penting dalam berbagai reaksi di dalam sel [Richana, 2008].

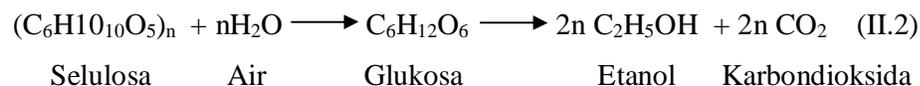
Enzim komersil selulase, selobiose dan xilanase termasuk kedalam golongan enzim hidrolase, dimana enzim ini dapat menghidrolisis pada reaksi hidrolitik rantai panjang. Hidrolisis menggunakan enzim dapat bekerja pada kondisi: pH 4,5-5 dan temperatur 30-50<sup>0</sup>C. Hal ini dapat mengurangi terjadinya masalah korosi, konsumsi utilitas rendah dan bahaya racun rendah [Taherzadeh, 2007].

Enzim berfungsi untuk mengurangi energi aktivasi pada suatu reaksi kimiawi. Enzim dengan substrat membentuk suatu status transisi yang membutuhkan energi aktivasi lebih kecil untu berlangsungnya reaksi tersebut. Secara umum reaksi enzimatik dapat dinyatakan dengan persamaan reaksi (II.1) sebagai berikut :



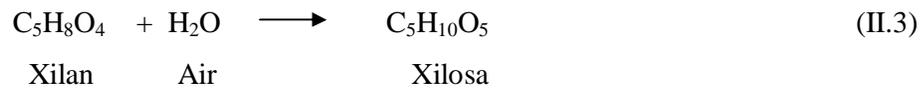
Enzim (E) dan substrat (S) bergabung menjadi kompleks enzim substrat (ES), yang kemudian terurai menjadi produk (P) dan enzim. Dalam reaksi enzimatik, enzim tidak dikonsumsi tetapi dilepaskan kembali untuk reaksi selanjutnya dengan molekul substrat lainnya. Proses ini dilakukan berulang-ulang sampai molekul substansi yang tersedia habis terpakai [Pelczar, 1986].

Enzim pendegradasi selulosa menjadi monosakarida (glukosa) umumnya menggunakan tiga jenis enzim yaitu: endo-glukanase, exo-glukanase dan β-glukosidase. Enzim tersebut biasa disebut sebagai enzim selulase [Taherzadeh, 2007]. Glukosa di konversi menjadi etanol dengan bantuan *yeast Saccharomyces cerevisiae*, seperti persamaan reaksi (II.2) berikut.



Sedangkan enzim selobiose merupakan bagian dari sistem enzim selulase yaitu  $\beta$ -glukosidase. Fungsi enzim ini adalah menghidrolisis selobiosa dan selo-oligosakarida yang terdapat di dalam selulase menjadi glukosa [Latifah, 2008].

Xilanase merupakan kelompok enzim yang memiliki kemampuan menghidrolisis xilan yang terdapat dalam hemiselulosa menjadi xilosa, seperti persamaan reaksi (II.3) berikut.



## 2.4 Etanol

Etanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) adalah sejenis cairan mudah menguap, mudah terbakar, tak berwarna, memiliki bau khas dan merupakan alkohol yang paling sering digunakan dalam kehidupan sehari-hari. Etanol merupakan golongan senyawa alkohol yang memiliki dua atom karbon. Sifat-sifat fisik etanol dapat dilihat pada Tabel 2.3. Sifat-sifat kimia etanol ditentukan oleh rantai hidroksil. Etanol dapat mengalami reaksi dehidrasi, dehidrogenasi, oksidasi, dan esterifikasi. Karakteristik spesifik rantai hidroksil ini yang menyebabkan etanol termasuk zat kimia utama sebagai bahan baku dan produk antara bagi sintesis zat kimia lain sampai sekarang.

Etanol dapat diproduksi dengan sintesa kimia biasa maupun melalui proses fermentasi. Produksi etanol secara kimia dapat disintesis dari etilen melalui reaksi (II.4).



Sedangkan proses fermentasi etanol berlangsung dengan bantuan enzim yang dihasilkan oleh mikroba. Subtrat glukosa dalam keadaan anaerob akan diuraikan menjadi etanol dan  $\text{CO}_2$  mengikuti reaksi (II.5).



Glukosa            Etanol        Karbondioksida

**Tabel 2.3** Sifat-sifat fisik etanol

Sifat Fisik	Nilai
Titik beku	-114,1 <sup>0</sup> C
Titik didih normal	78,32 <sup>0</sup> C
Temperatur kritik	243,1 <sup>0</sup> C
Tekanan kritik	63 atm
Volum kritik	0,167 l/mol
Densitas	0,7893
Indeks bias	1,36143
Viskositas, 20 <sup>0</sup> C	1,17 cP
Panas penguapan, pada titik didih normal	200,6 kalori/gram
Panas pembakaran, 25 <sup>0</sup> C	7092,9 kalori/gram
Flammable limit in air lower	4,3 % volum
Flash point	21,11 <sup>0</sup> C (70 <sup>0</sup> 0)
Kalor spesifik	0,579 kalori/(g <sup>0</sup> C)

Sumber : Kirk dan Othmer [1994]

Etanol dibuat melalui proses fermentasi biomassa tersusun dari karbohidrat atau fraksi glukosa. Bahan yang umum digunakan sebagai bahan mentah adalah tanaman berkadar glukosa tinggi seperti jagung, singkong atau ubi, kelapa sawit, jerami dan lain-lain. Etanol yang diproduksi dari biomassa dan digunakan sebagai campuran bahan bakar lebih dikenal dengan istilah Bioetanol. Bioetanol memiliki nilai oktan lebih tinggi daripada bensin yakni mencapai 108, sedangkan nilai oktan bensin hanya sekitar 87-98. Sehingga, keberadaan bioetanol dapat menggantikan fungsi *Methyl Tertier Butyl Ether* (MTBE) dan *Tetra Ethyl Lead* (TEL) yang kurang ramah lingkungan sebagai bahan aditif untuk meningkatkan nilai oktan bensin [Latifah, 2008].

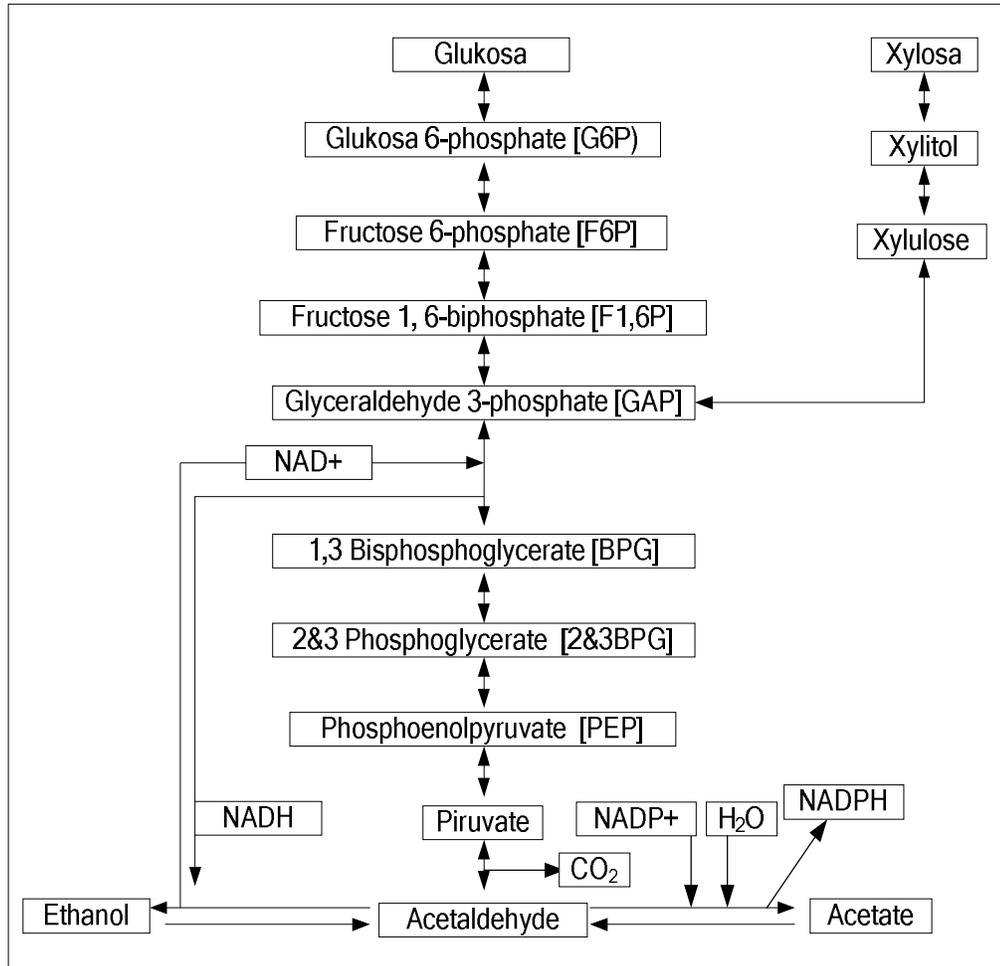
Untuk pengganti bensin, terdapat alternatif gasohol yang merupakan campuran antara bensin dan bioetanol. Bioetanol dapat menghasilkan paling sedikit 20% energi lebih tinggi dibandingkan dengan energi yang digunakan dalam proses produksinya. Selain itu, proses produksi dan pembakaran etanol dapat menurunkan 12% gas rumah kaca dibandingkan dengan bahan bakar fosil [Ida, 2008].

Fermentasi tidak hanya terjadi pada gula heksosa (glukosa). Gula pentosa yang berupa xilosa merupakan monomer dari xilan juga dapat membentuk etanol melalui fermentasi. Reaksi fermentasi xilosa menjadi etanol berlangsung sebagai berikut:



Secara metabolisme proses fermentasi glukosa dan xilosa dapat dilihat pada **Gambar 2.4**. Dari **Gambar 2.4** dapat dilihat bahwa pembentukan etanol pada proses fermentasi diawali dengan perombakan baik glukosa maupun xilosa menjadi *piruvat*, kemudian diubah menjadi asetaldehid, karena tidak ada oksigen bebas ( $O_2$ ) maka untuk bertahan hidup khamir membutuhkan  $NAD^+$ . Untuk mendapatkan  $NAD^+$  khamir harus merubah asetaldehid menjadi etanol. Pada proses fermentasi, produk yang dihasilkan tidak hanya etanol, akan tetapi juga menghasilkan produk seperti asam asetat. Asam asetat dihasilkan jika konsentrasi etanol sudah mengganggu kehidupan khamir. Untuk meningkatkan ketahanan hidup sel *S. cerevisiae* terhadap peningkatan konsentrasi etanol di dalam media hidupnya, akan terjadi peningkatan produksi ergosterol [Del Castillo Agudo, 1992] dan asam lemak jenuh  $C_{18}$  maupun asam lemak tak jenuh  $C_{18:1}$  [Beaven dkk., 1982]. Sintesis sterol (ergosterol), maupun asam lemak dan pemanjangan rantai asam lemak dari  $C_{16}$  (palmitat) menjadi asam lemak  $C_{18}$  (stearat), memerlukan NADPH [Nelson & Cox, 2004]. NADPH diperoleh dari reaksi biokonversi asetaldehid menjadi asetat. Biokonversi asetaldehid menjadi asetat akan menggeser kesetimbangan antara etanol dan asetaldehid ke arah pembentukan asetaldehid (**Gambar 2.4**), sehingga konsentrasi etanol berkurang karena terjadi penyerapan etanol dari lingkungan masuk ke dalam sel khamir. Ketika jumlah asam lemak  $C_{18}$  telah mencukupi, biokonversi asetaldehid menjadi

asetat akan berkurang, sehingga kesetimbangan asetaldehid dan etanol bergeser kembali ke pembentukan etanol.



**Gambar 2.4** Metabolisme *S.cerevisiae* pada Proses Fermentasi glukosa dan xylosa menjadi etanol dan asam asetat [Pitkanen dkk, 2005]

Tahap pertumbuhan khamir sebagai berikut :

1. Fase lambat : pada fase ini massa sel meningkat tapi tidak terjadi pembelahan sel.
2. Fase cepat : pada fase ini terjadi pembelahan sel akan tumbuh dan membelah diri secara eksponensial hingga jumlah maksimum.

3. Fase stasioner : pada fase ini laju pembelahan sel sebanding dengan laju kematian sel, sehingga jumlah sel hidup tetap konstan. Fase ini terjadi akibat pengurangan sumber-sumber nutrisi atau penimbunan zat racun sebagai akhir metabolisme.
4. Fase kematian : pada fase ini tidak ada lagi pembelahan sel dan sel-sel akan mati jika tidak dipindahkan ke media segar lainnya.

## 2.5 Bioreaktor

Bioreaktor (fermentor) merupakan wadah atau tempat yang mampu menyediakan sebuah lingkungan biologis demi menunjang terjadinya reaksi biokimia dari bahan mentah menjadi produk yang dikehendaki. Reaksi biokimia yang terjadi di dalam bioreaktor melibatkan organisme atau komponen biokimia aktif (enzim) yang berasal dari organisme tertentu, baik secara aerobik maupun anaerobik. Bioreaktor dapat dioperasikan dalam dua cara yaitu bioreaktor homogen (*batch, fed batch, semi batch, continuous* dan *multistage*) dan bioreaktor heterogen (sistem imobilisasi sel dan SSF) [Shuler, 2002].

Pada bioreaktor *batch*, proses fermentasi berlangsung secara tertutup tanpa ada penambahan umpan atau nutrisi ke dalam media fermentasi. Produk yang dihasilkan diambil setelah proses fermentasi berakhir. Dalam bioreaktor *fed batch*, proses fermentasi berlangsung secara tertutup tetapi dalam selang waktu tertentu dapat ditambahkan nutrisi selama fermentasi berlangsung. Bioreaktor *semi batch*, selama proses fermentasi berlangsung sebagian produk atau media fermentasi dapat diambil dari bioreaktor. Sedangkan bioreaktor *continuous*, proses fermentasi berlangsung secara kontinu dengan penambahan nutrisi dan pengambilan produk dalam selang waktu tertentu [Ahmad, 1993]. Sistem bioreaktor imobilisasi sel menggunakan biokatalisator berupa enzim. Dan bioreaktor SSF, proses fermentasi dan hidrolisis berlangsung secara berkelanjutan [Latifah, 2008].

Bioreaktor berfungsi untuk menghasilkan produk atau mikroba baik kultur murni atau campuran. Pemilihan bioreaktor ditentukan oleh jenis makhluk hidup yang digunakan, sifat media, parameter bioproses dan faktor produksi. Kinerja bioreaktor berdasarkan pada kinetika reaksi biokimia dan fenomena perpindahan

massa yang terjadi didalam bioreaktor tersebut. Adapun parameter kontrol yang terdapat pada bioreaktor yaitu pH, temperatur, oksigen terlarut dan kecepatan putar pengaduk [Shuler, 2002].

## **2.6 Hidrolisis Enzimatik**

Hidrolisis merupakan suatu proses pemecahan sebagian besar fraksi selulosa dan hemiselulosa dari biomassa menjadi gula penyusunnya. Proses hidrolisis untuk memproduksi etanol dari biomassa dapat dilakukan dengan dua cara yaitu hidrolisis menggunakan asam (*acid hydrolysis*) dan enzim (*enzymatic hydrolysis*). Keuntungan dari hidrolisis dengan enzim yaitu dapat mengurangi penggunaan asam sehingga dapat mengurangi efek negatif terhadap lingkungan [Samsuri, 2007]. Enzim yang digunakan harus sesuai dengan hidrolisis polisakarida. Pada hidrolisis biomassa, komponen yang akan dihidrolisis adalah selulosa dan hemiselulosa [Lee, 1997].

Untuk menghidrolisis selulosa diperlukan enzim selulase. Namun, proses hidrolisis tidak semuanya terjadi secara sempurna, karena sebagian dari hidrolisis selulosa menjadi selobiosa merupakan bentuk dari disakarida yang dikenal sebagai hidrolisis parsial [Himmel *et al*, 1996]. Sehingga diperlukan enzim selobiase untuk menghidrolisis selobiosa tersebut. Sedangkan hemiselulosa dimana kandungan utamanya adalah xylan, dapat dihidrolisis dengan menggunakan enzim xilanase [Lee, 1997]. Oleh karena itu, untuk memproduksi etanol dengan yield yang tinggi maka digunakan kombinasi dari ketiga enzim tersebut yakni selulase, selobiase dan xilanase.

## **2.7 Fermentasi Menggunakan Yeast**

Fermentasi berasal dari bahasa latin yaitu '*fevere*' yang artinya mendidih. Peristiwa mendidih sebenarnya timbul dari gelembung-gelembung CO<sub>2</sub> yang dihasilkan dari proses katabolisme karbohidrat. Kemudian pengertian fermentasi tersebut berkembang dan didefinisikan sebagai proses penguraian yang dilakukan oleh mikroorganisme. Proses penguraian tersebut tidak hanya terhadap

karbohidrat tetapi juga terhadap protein, lemak, asam dan zat-zat lainnya karena ada aktivitas enzim [Ahmad, 1993].

Fermentasi etanol dapat dilakukan oleh *yeast* dan beberapa jenis bakteri. *Yeast* yang sering berperan dalam industri adalah dari golongan *Saccharomyces* yakni *S. cerevisiae*, *S. ellipsoideus*, *S. carlsbergensis*, *S. fragilis* dan *Schizosaccharomyces pombe* [Latifah, 2008]. Diantara beberapa jenis *Saccharomyces* yang paling sering digunakan dalam industri maupun sebagai jasad inang eukariotik adalah *Saccharomyces cerevisiae*.

*Saccharomyces cerevisiae* merupakan *yeast* yang memiliki kemampuan mengubah glukosa menjadi alkohol dan CO<sub>2</sub>. Beberapa kelebihan *Saccharomyces cerevisiae* dalam proses fermentasi yaitu mikroorganisme ini cepat berkembang biak, tahan terhadap kadar alkohol yang tinggi, tahan terhadap suhu yang tinggi, mempunyai sifat stabil dan cepat mengadakan adaptasi. Suhu optimum untuk fermentasi antara 28–30<sup>0</sup>C [Latifah, 2008]. *Yeast* ini dapat digunakan untuk semua heksosa yang diperoleh dari bahan lignoselulosa tetapi *yeast* ini tidak dapat diiggunakan untuk xilosa.

Selain menggunakan *yeast Saccharomyce cerevisiae*, dalam proses fermentasi dapat menggunakan *yeast pichia stipitis*. *Pichia stipitis* merupakan *yeast* yang memiliki kemampuan mengubah xilosa menjadi etanol. *Pichia stipitis* dapat ditemukan dalam isi perut rayap. Kelebihan dari *Pichia stipitis* ini adalah bisa digunakan baik pada proses fermentasi secara aerobik maupun anaerobik. *Yeast* ini tidak tahan terhadap etanol dengan konsentrasi lebih besar dari 30 gr/L.

Kemampuan *Saccharomyces cerevisiae* dan *pichia stipitis* dalam memfermentasi gula dengan konsentrasi awal 20 g/L dapat dilihat pada Tabel 2.4 berikut. Dari Tabel 2.4 dapat dilihat bahwa *pichia stipitis* dapat memfermentasi gula baik heksosa maupaun pentosa, tetapi untuk mendapatkan hasil etanol maksimum membutuhkan waktu yang cukup lama dibandingkan dengan *Saccharomyces cerevisiae*. Untuk mengatasi masalah tersebut maka perlu dilakukan kombinasi antara *pichia stipitis* dengan *yeast* yang mampu memfermentasi glukosa seperti *Saccharomyces cerevisiae*.

**Tabel 2.4** Kemampuan *Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipitis* dalam Memfermentasi Gula

Yeast	Fermentasi	Etanol Maksimum	Waktu Fermentasi (Jam)
<i>Saccharoyces cerevisiae</i>	Glukosa	8,107	18
	Xilosa	0	-
	Manosa	7,280	36
	Galaktosa	6,800	48
<i>Pichia stipitis</i>	Glukosa	8,180	30
	Xilosa	8,141	60
	Manosa	7,440	48
	Galaktosa	7,320	48

Sumber: Rouhollah *et al* [2007]

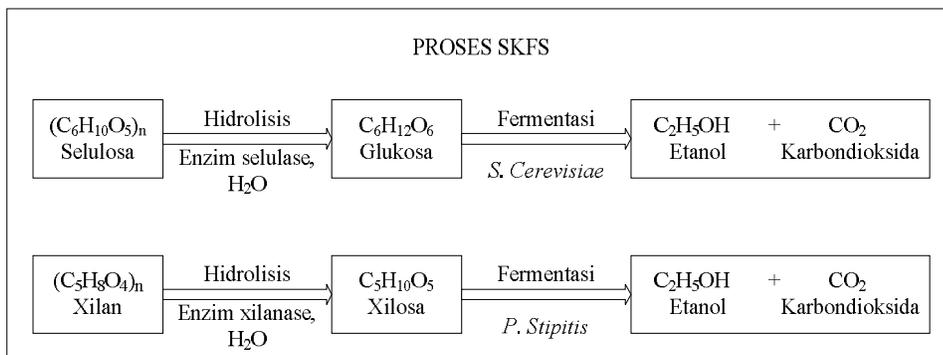
Pertumbuhan *yeast* dalam fermentasi melalui beberapa fasa yakni fasa *lag* (fasa adaptasi), fasa *log* (fasa eksponensial), fasa stasioner dan fasa *declin*. Pada fasa *lag*, pertumbuhan *yeast* relatif sedikit karena sel dalam tahap menyesuaikan diri dengan media fermentasi. Pada fasa *log*, *yeast* telah menyesuaikan diri dengan media (substrat) fermentasi sehingga penimbunan sel berlangsung dengan waktu regenerasi yang cepat. Pada fasa stationer, pertumbuhan *yeast* mencapai keadaan maksimum dan *yeast* yang aktif dan mati relatif seimbang karena nutrisi relatif sedikit. Sedangkan pada fasa *declin*, menunjukkan bahwa sel *yeast* telah banyak yang mati karena nutrisi telah habis. Pertumbuhan mikroorganisme sangat dipengaruhi oleh sumber karbon, nitrogen, mineral, vitamin dan kondisi lingkungan pertumbuhan seperti suhu dan pH [Ahmad, 1993].

## 2.8 Sakarifikasi dan Ko-Fermentasi Serentak (SKFS)

Secara umum, teknologi proses untuk memproduksi bioetanol dapat dibedakan menjadi tiga jenis. Pertama, proses hidrolisis dan fermentasi yang dilakukan secara terpisah disebut *Separated Hydrolysis and Fermentation* (SHF).

Kedua, hidrolisis dan fermentasi berlangsung secara bersamaan dalam reaktor yang sama disebut dengan *Simultaneous Saccharification and Fermentation* (SSF). Ketiga, Sakarifikasi dan Ko-Fermentasi Serentak (SKFS).

Sakarifikasi dan Ko-Fermentasi Serentak (SKFS) merupakan metoda untuk memproduksi bioetanol dengan mengkombinasi antara proses hidrolisis menggunakan enzim dan fermentasi menggunakan *yeast*. Proses SKFS mengacu pada fermentasi dua jenis gula yaitu gula heksosa (C6) dan pentosa (C5) menjadi etanol. Selulosa dan hidrolisat dari hemiselulosa selama *pretreatment* tidak dipisahkan. Hal ini yang memungkinkan gula hemiselulosa dan selulosa dikonversi menjadi etanol secara bersama-sama. Proses SKFS dianggap sebagai perbaikan dari proses SSF dan ketika diuji labor oleh Departemen Energi AS, dalam bioreaktor SSF hanya heksosa saja yang dikonversi menjadi etanol, dan pentosa dapat difermentasi dalam bioreaktor dengan mikroorganisme lain yang berbeda. Oleh karena itu, dua bioreaktor dan dua langkah produksi diperlukan dalam proses SSF. Dalam proses SKFS, disarankan untuk fermentasi heksosa dan pentosa di lakukan dalam bioreaktor tunggal [Taherzadeh, 2007]. Secara skematis reaksi yang terjadi selama proses Sakarifikasi dan Ko-Fermentasi Serentak (SKFS) dapat dilihat pada Gambar 2.4 berikut.



**Gambar 2.4** Proses Sakarifikasi dan Ko-Fermentasi Serentak (SKSF)

[Samsuri, 2007]

## 2.9 Gas Chromatography (GC)

*Gas Chromatography* adalah teknik kromatografi yang bisa digunakan untuk memisahkan senyawa organik yang mudah menguap. Senyawa-senyawa tersebut harus mudah menguap dan stabil pada temperatur pengujian, utamanya dari 50–3000C. GC menggunakan gas sebagai gas pembawa atau fase geaknya. Kelebihan dari GC ini adalah kita dapat menggunakan kolom lebih panjang untuk menghasilkan efisiensi pemisahan yang tinggi. Fasa gas tidak bersifat reaktif terhadap fasa diam dan zat-zat terlarut. Kelemahannya adalah teknik ini terbatas untuk zat yang mudah menguap [Latifah, 2008].

Alat dasar penyusun GC adalah kolom, detektor dan gas pembawa. Gas pembawa yang paling umum dipakai adalah helium, hidrogen atau nitrogen. Pemilihan gas pembawa bergantung pada detektor yang digunakan. *Gas Chromatography* merupakan metode yang tepat dan cepat untuk memisahkan campuran yang sangat rumit. Waktu yang dibutuhkan beragam, mulai dari beberapa detik untuk campuran sederhana sampai berjam-jam untuk campuran yang mengandung 500-1000 komponen. Komponen campuran dapat diidentifikasi dengan menggunakan waktu tambat (waktu retensi) yang khas pada kondisi yang tepat. Waktu tambat ialah waktu yang menunjukkan berapa lama suatu senyawa tertahan dalam kolom [Latifah, 2008]. Untuk senyawa etanol dalam larutan memiliki waktu retensi 8-9 menit.

## **BAB III**

### **TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN**

#### **3.1. Tujuan Penelitian**

Tujuan penelitian yang akan dicapai dari penelitian ini adalah:

1. Mengembangkan teknik konversi selulosa dan hemiselulosa yang terdapat pada *reject pulp* menjadi bioetanol menggunakan enzim selulase, xylanase, dan selubiose serta ragi *Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipitis* menggunakan reaktor Sakarifikasi dan Ko-Fermentasi Serempak (SKFS).
2. Mendapatkan data kondisi proses yang optimum dari proses Sakarifikasi dan Ko-Fermentasi Serempak (SKFS) menggunakan kombinasi enzim selulase, xylanase dan selubiose serta ragi *Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipitis* untuk konversi selulosa yang terdapat pada *reject pulp* menjadi bioetanol pada reaktor skala laboratorium.
3. Mendapatkan data kondisi proses yang optimum dari proses Sakarifikasi dan Ko-Fermentasi Serempak (SKFS) menggunakan kombinasi enzim selulase, xylanase dan selubiose serta ragi *Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipitis* untuk konversi selulosa yang terdapat pada *reject pulp* menjadi bioetanol pada reaktor bench scale.
4. Mengembangkan teknik *zero waste* industri *pulp & paper* dalam rangka menurunkan beban pencemaran lingkungan dan daur ulang limbah padat industri *pulp & paper* di Indonesia.

#### **3.2. Manfaat Penelitian**

Ketergantungan Indonesia akan energi yang berasal dari bahan bakar minyak (BBM) sedemikian besar sehingga kini telah menjadi negara pengimpor net BBM. Penelitian ini memiliki tujuan untuk menyediakan bahan bakar alternatif yang ramah lingkungan dan berbasis sumber daya alam terbarukan. Konflik kenaikan harga BBM merupakan permasalahan yang sering dihadapi

bangsa kita. Selain karena dampaknya yang akan berimbas pada berbagai harga bahan-bahan lainnya, kenaikan harga BBM akan berdampak langsung bagi kehidupan. Hal ini dikarenakan BBM merupakan suatu kebutuhan yang sangat urgen dan tidak dapat dihindarkan dari kehidupan, baik rumah tangga maupun industri, terlebih lagi sektor transportasi.

Bahan bakar yang digunakan masyarakat pada umumnya merupakan bahan bakar yang berasal dari fosil (*fossil fuel*), dan merupakan sumber daya alam yang tidak dapat diperbaharui (*unrenewable resources*). Kontinuitas penggunaan bahan bakar fosil memunculkan dua ancaman serius, yang pertama adalah faktor ekonomi, berupa jaminan ketersediaan bahan bakar fosil untuk beberapa dekade mendatang, masalah suplai, harga, dan fluktuasinya. Sedangkan yang kedua adalah polusi akibat emisi pembakaran bahan bakar fosil ke lingkungan. Polusi yang ditimbulkan oleh pembakaran bahan bakar fosil memiliki dampak langsung maupun tidak langsung kepada kesehatan manusia. Polusi langsung dapat berupa gas-gas berbahaya, seperti CO, NOx, dan UHC (*unburn hydrocarbon*), juga unsur metalik seperti timbal (Pb). Sedangkan polusi tidak langsung mayoritas berupa ledakan jumlah molekul CO<sub>2</sub> yang berdampak pada pemanasan global (*Global Warming Potential*). Kesadaran terhadap ancaman serius tersebut telah mengintensifkan berbagai riset yang bertujuan menghasilkan sumber-sumber energi (*energy resources*) yang lebih terjamin keberlanjutannya (*sustainable*) dan lebih ramah lingkungan (Berita Iptek, 2005).

Pengembangan bioenergi seperti bioetanol dari biomassa sebagai sumber bahan baku yang dapat diperbarui merupakan satu alternatif yang memiliki nilai positif dari aspek sosial dan lingkungan. *Rejact pulp* merupakan salah satu sumber biomassa yang sangat potensial untuk dimanfaatkan sebagai bahan baku produksi bioetanol. Beberapa tahapan proses pada produksi bioetanol dari biomassa adalah perlakuan *pretreatment*, hidrolisa selulosa dan hemiselulosa, fermentasi dan pemisahan bioetanol. Beberapa permasalahan pada produksi bioetanol adalah kebutuhan energi yang besar untuk proses hidrolisis dengan asam dan harga enzim yang cukup mahal jika menggunakan proses hidrolisis enzimatik. Salah satu faktor penentu harga produksi bioetanol dari biomassa limbah pertanian

adalah harga enzim pendegradasi biomassa selulosa dan hemiselulosa (Yinbo dkk., 2006).

Potensi *reject pulp* dari Industri *pulp & paper* yang ada di Provinsi Riau cukup melimpah. *Reject pulp* yang dibuang sebagai limbah padat 2,5% dari total produksi *pulp* sebesar 7000 ton per hari (PT.RAPP, 2008; Chairul, 2009) atau 65.000 ton *reject pulp* per tahun. Dengan perkiraan pesimistik ini, maka akan dapat dihasilkan 25 % bioetanol dari *reject pulp*, atau sekitar 16.500 ton bioetanol per tahun bila kita berhasil memanfaatkan seluruh *reject pulp* dari PT. RAPP. Produksi bioetanol ini dapat digunakan untuk memasok kebutuhan bahan bakar minyak perusahaan atau masyarakat di sekitar pabrik.

Pengembangan teknologi bioproses dengan menggunakan enzim pada proses hidrolisisnya diyakini sebagai suatu proses yang lebih ramah lingkungan (Pan *et al.*, 2004). Pemanfaatan enzim sebagai zat penghidrolisis tergantung pada substrat yang menjadi prioritas. Komposisi terbesar dalam polisakarida adalah selulosa dan hemiselulosa. Umumnya pemanfaatan enzim selulase hanya mampu menghidrolisis selulosa menjadi glukosa pada hidrolisis sempurna, kemudian glukosa difermentasi dengan menggunakan *S. cerevisiae* menjadi bioetanol. Namun demikian proses hidrolisis yang terjadi tidak semuanya sempurna, karena sebagian dari hidrolisis selulosa menjadi selubiosa yang merupakan bentuk dari disakarida yang dikenal sebagai hidrolisis parsial (Himmel, *et al.*, 1996). Selain itu jika kita hanya mengandalkan enzim selulase saja maka yang dapat terkonversi menjadi monosakarida hanya selulosa. Padahal sebagian komposisi karbohidrat *reject pulp* adalah hemiselulosa.

Oleh karena itu beberapa hal yang perlu mendapatkan perhatian dalam penelitian karena masih belum banyak diteliti 1) Pemanfaatan enzim yang spesifik untuk mengkonversi disakarida akibat hidrolisis parsial selulosa menjadi glukosa sebagai monosakarida. 2) Pemanfaatan enzim yang spesifik mengkonversi hemiselulosa menjadi monosakaridanya yaitu yang terbesar adalah xylosa. Jika hal ini dapat dilakukan dengan baik dan berhasil maka akan meningkatkan konversi *reject pulp* menjadi bioetanol. Salah satu enzim yang mampu menghidrolisis selubiosa menjadi monosakaridanya adalah enzim sellubiase

(Himmel, *et al.*, 1996). Enzim xylanase merupakan enzim yang spesifik yang dapat dimanfaatkan untuk menghidrolisis hemiselulosa menjadi xyloza sebagai monosakarida dari hemiselulosa tersebut (Cantarella, *et al.*, 2004).

Mengacu pada fenomena-fenomena di atas maka penelitian ini bertujuan untuk mengkombinasikan penggunaan enzim *selulase*, *xylanase* dan *selubiase*, sehingga diharapkan dapat meningkatkan efisiensi penggunaan enzim dan meningkatkan konversi *reject pulp* menjadi bioetanol dengan memanfaatkan enzim selulase, selubiase dan xylanase secara simultan dengan proses Sakarifikasi dan Ko-Fermentasi Serentak (SKFS). Konversi selulosa dan hemiselulosa *reject pulp* masih dapat ditingkatkan dengan mengkombinasikan ragi *Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipitis*. Penambahan *Pichia stipitis* diharapkan dapat menfermentasi xyloza *reject pulp* menjadi bioetanol sehingga *yield* bioetanol yang dihasilkan dapat ditingkatkan.

Dengan demikian, penelitian ini akan memiliki nilai yang tinggi mengingat Indonesia, dan hampir seluruh negara di dunia, mengalami krisis energi. Keberhasilan penelitian ini akan sangat bermanfaat bagi peningkatan ketersediaan sumberdaya energi yang memanfaatkan melimpahnya limbah industri *pulp and paper*. Keunggulan lain dari produksi bioetanol dari *reject pulp* adalah tidak dibutuhkannya proses *pretreatment* karena biomassa *reject pulp* sudah mengalami proses pemasakan / delignifikasi pada tangki digester pabrik *pulp* dan kandungan lignin sudah cukup rendah. Disamping itu, aplikasi dari hasil penelitian limbah *pulp and paper* yang tidak terolah juga akan sangat bermanfaat bagi lingkungan dengan mengolah limbah serta pemakaian energi yang beremisi rendah. Manfaat yang akan dikembangkan adalah adanya industri dengan teknologi hasil riset dalam negeri yang mendukung tercapainya peta jalan energi mixing di tanah air.

## **BAB IV**

### **METODE PENELITIAN**

Pada penelitian ini bahan baku yang digunakan adalah *reject pulp* yang diperoleh dari PT.RAPP. Metode hidrolisis digunakan secara biologi yaitu dengan menggunakan enzim sebagai biokatalis. Fermentasi dilakukan menggunakan teknik hidrolisis dan fermentasi yang dilakukan secara serentak, melalui proses sakarifikasi dan ko-fermentasi serentak (SKFS). Metode penelitian ini dijelaskan dengan dua tahap tahun kegiatan yaitu kegiatan tahun pertama (2010) dan kegiatan tahun kedua (2011).

#### **4.1 Kegiatan Tahun I (2010)**

##### **4.1.1 Waktu dan Tempat**

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium mikrobiologi Jurusan Biologi FMIPA dan Laboratorium Bioproses Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Riau jl. Bina Widya Km.12,5 Panam.

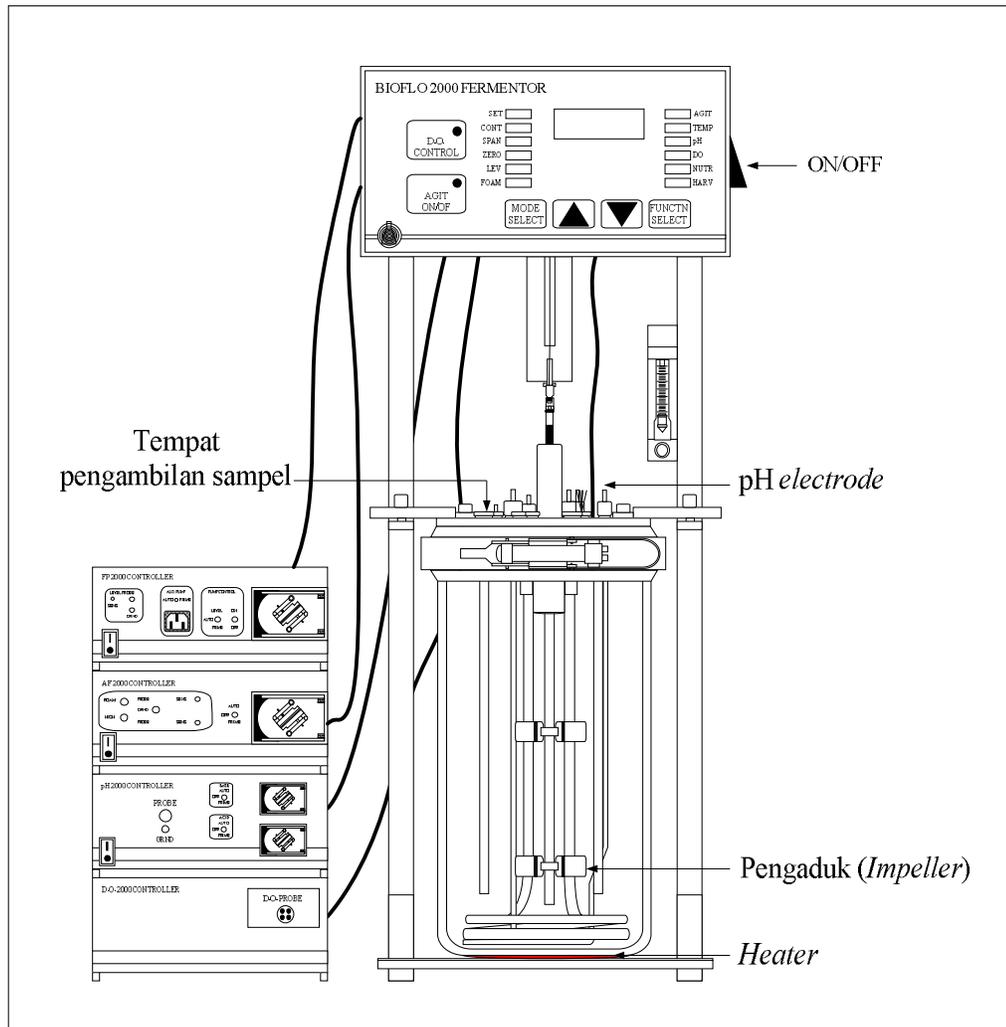
##### **4.1.2 Bahan dan Alat**

###### **Bahan**

Bahan baku utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah *reject pulp* yang merupakan hasil samping dari pengolahan industri *pulp* dan *paper*. Dua spesies *yeast* yang digunakan yaitu *Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipitis*. Kultur ini dipelihara pada media *Potato Dextro Agar* (PDA). Enzim komersial yang digunakan sebagai katalis pada proses hidrolisis yaitu enzim selulase, selobiose dan xilanase. Serta bahan-bahan kimia lain seperti  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ , Buffer Na-sitrat 0,1 M (pH 4; 4,5; 5; 5,5 dan 6 Glukosa dan Aquades, *Buffer* asetat pH 5, glukosa, dan *yeast extract*.

## Alat

Proses Sakarifikasi dan Ko-Fermentasi Serentak terjadi di dalam reaktor berupa BioFlo 2000 Fermentor, analisa etanol menggunakan *Gas Chromatografi* (GC), sterilisasi menggunakan *autoclave*, inkubator, *orbital shaker*, *syringe filter* 0,45  $\mu\text{m}$  CA *membranes corning*, *beaker glass*, erlenmeyer, cawan petri, pemanas (*heater*), pipet volum, timbangan analitik, jarum ose, spatula, dan bunsen. Adapun skema peralatan penelitian dapat dilihat pada Gambar 4.1 berikut.



Gambar 4.1 Skema Peralatan Penelitian

Bioreaktor ini terdiri dari vessel, heater, pengaduk, pH meter, *air flowmeter*, *dissolved oxygen*, serta controller dari masing-masing unit. Spesifikasi dari BioFlo 2000 Fermentor dapat dilihat pada Gambar 4.1.

#### 4.1.3 Variabel Penelitian

Untuk mencapai tujuan penelitian, maka variabel proses yang digunakan dalam penelitian yaitu:

##### A. Variabel Penelitian Skala Laboratorium

###### a. Variabel Tetap

Penentuan variabel tetap pada penelitian ini dilakukan berdasarkan penelitian sebelumnya [Lianti, 2009]. Pada penelitian sebelumnya dilakukan dengan menggunakan tabung reaksi dengan jumlah *reject pulp* 0,25 gram. Dengan menggunakan tabung reaksi volumenya terlalu kecil, yang memungkinkan efek dari *shaker* juga kecil sehingga kontak antara enzim dengan *reject pulp* dan hasil hidrolisis dengan khamir kecil. Sehingga dalam penelitian ini diperbesar dengan jumlah *reject pulp* 0,50 gram. Adapun variabel tetap adalah sebagai berikut :

- **Massa sampel (*reject pulp*) : 0,50 gr**
- **Massa enzim selulase : 0,050 gr**

Enzim selulase yang digunakan diperoleh dari *Aspergillus niger* mampu mereduksi selulosa menjadi glukosa 1,0  $\mu\text{mol}$  per jam, untuk setiap unitnya. Setiap mg solid terdapat 0,3 unit.

- **Massa enzim xilanase : 0,050 gr**

Enzim xilanase yang digunakan diperoleh dari *Thermomyces lanuginosus*, setiap 1 gram solid terdapat 2500 unit.

- **Massa enzim selubiose : 0,050 gr**

###### b. Variabel Berubah Skala Laboratorium

Untuk mencapai tujuan penelitian diperlukan variabel berubah terhadap faktor yang berpengaruh, baik pada proses hidrolisis maupun

fermentasi. Pada penelitian ini variabel berubah yang digunakan yaitu pH dan waktu. Adapun variabel berubah sebagai berikut :

- Waktu pengambilan sampel SKFS : 6, 12, 24, 48, 72, dan 96 jam.
- pH larutan buffer Na-sitrat (0,1 M) : 4; 4,5; 5; 5,5; 6.
- Penggunaan enzim : a. Enzim selulase dan xilanase  
b. Enzim selulase, selobiose dan xilanase

## **B. Variabel Penelitian Skala 5 Liter**

### **a. Variabel tetap**

Adapun yang menjadi variabel tetap pada penelitian ini yaitu:

- Massa *reject pulp* : 100 gr
- Enzim selulase : 1 gr
- Enzim selobiose dan xilanase : 0,25 gr
- pH : 5
- Temperatur : Temperatur kamar
- Kecepatan pengadukan : 170 rpm

### **b. Variabel berubah**

Yang menjadi variabel berubah dalam penelitian ini adalah:

- Penggunaan enzim : a. Enzim selulase  
b. Enzim selulase dan xilanase  
c. Enzim selulase, selobiose dan xilanase
- Waktu pengambilan sampel : 6, 12, 24, 48, 72 dan 96 jam

#### **4.1.4 Prosedur Penelitian**

Pada penelitian ini menggunakan proses Sakarifikasi dan Ko-Fermentasi Serentak (SKFS) dengan kombinasi tiga jenis enzim komersial (selulase, selobiose dan xilanase) pada proses hidrolisis dan kombinasi *yeast*

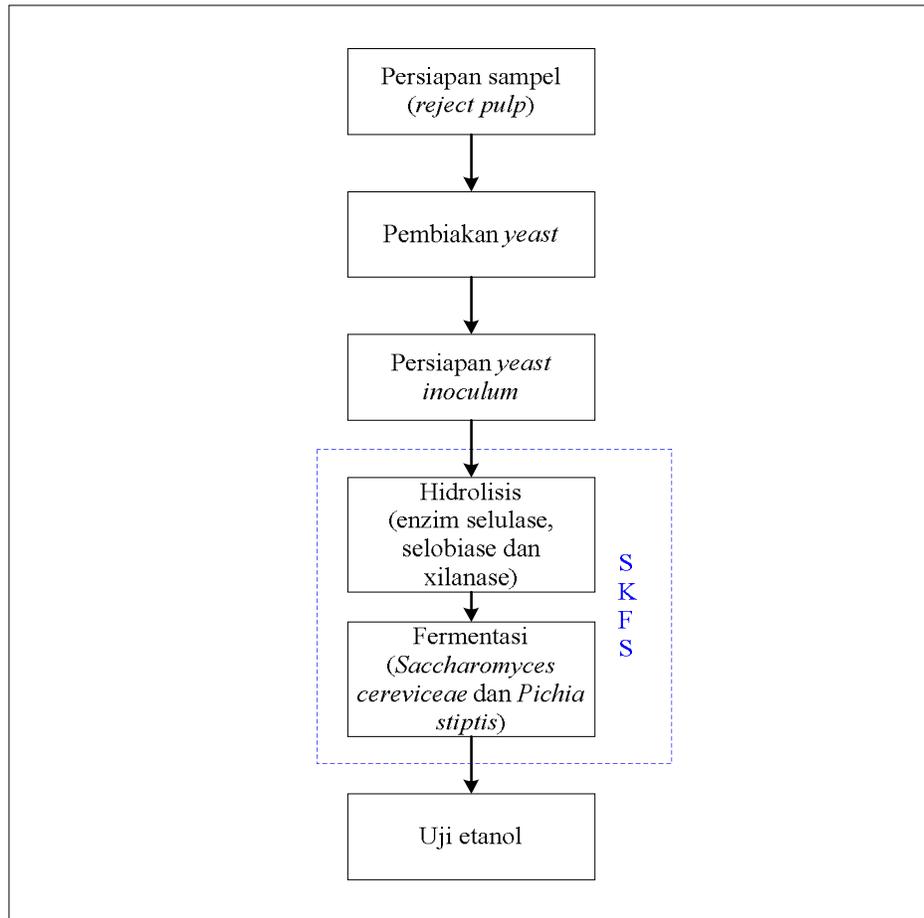
*Saccharomyces cereviceae* dan *Pichia stipitis* ketika terjadi proses fermentasi. Skema penelitian dapat dilihat pada Gambar 4.2.

### **Persiapan *Reject Pulp***

*Reject pulp* yang digunakan di ambil dari PT. RAPP, Pangkalan Kerinci. Sebelum digunakan, *reject pulp* terlebih dahulu dicuci hingga bersih dan kemudian dikeringkan. Setelah itu, *reject pulp* dihaluskan hingga berukuran kurang lebih 40–60 mesh sehingga ukuran partikel lebih seragam. Lalu dikeringkan kembali dengan menggunakan oven pada suhu 60–70<sup>0</sup>C sehingga kadar air maksimal didalam *reject pulp* mencapai 10% dan disimpan di tempat kering. Perhitungan kadar Air sesuai dengan standar **SNI 08–7070–2005**.

### **Pembiakan *Yeast***

*Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipitis* di *preculture* pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA) di dalam *petri dish* (kentang 200 gr/L, *dextrosa* 10 gr/L dan agar 15 gr/L). Sebelum digunakan media PDA disterilisasi menggunakan *autoclave* temperatur 121 <sup>0</sup>C selama 20 menit [Gozan, 2007]. Tujuan dari sterilisasi ini adalah untuk membunuh mikroorganisme lain yang tidak diinginkan selama proses pembiakan berlangsung. Biarkan PDA dingin selama lebih kurang 24 jam hingga uap yang ada di *petri dish* habis. Selanjutnya tanam *yeast* ke dalam PDA menggunakan jarum ose dengan kondisi steril. Proses inkubasi dillakukan selama 2-4 hari pada suhu 28-32<sup>0</sup>C, kemudian *yeast* dapat digunakan pada proses SKFS. Tujuan dari pembiakan ini adalah untuk mendapatkan jumlah *yeast* yang cukup untuk memulai proses fermentasi.



**Gambar 4.2** Diagram Alir Tahapan Penelitian

### **Persiapan Yeast Inoculum**

*Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipitis* fresh dari stock pembiakan di *preculture* pada 500 ml medium yang terdiri dari glukosa 10 g/L, *yeast extract* 1,0 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,1 g/L, dan  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,1 g/L di dalam *erlenmeyer* 1000 ml [Gozan, 2007]. Sebelum di inokulasi, medium di sterilisasi menggunakan *autoclave* pada tekanan 15 psia dan temperatur  $121^\circ\text{C}$  selama 15 menit. Setelah medium dingin, kemudian kedalam masing-masing medium tersebut ditambahkan *yeast* sebanyak 7-8 ose lalu di *shaker* selama 24 jam dengan kecepatan putaran 150 rpm. Fungsi *shaker* adalah mempermudah difusi oksigen ke dalam medium dan campuran menjadi homogen. Adapun kegunaan dari

inokulum ini adalah mengadaptasikan sel terhadap media fermentasi, sehingga diharapkan fasa lag sebagai awal fermentasi dilewati.

### **Sakarifikasi dan Ko-Fermentasi Serentak (SKFS)**

Proses SKFS ini menggabungkan antara hidrolisis enzim dan fermentasi yang dilakukan serentak di dalam satu reaktor. Enzim yang digunakan adalah selulase, selobiose dan xilanase, serta yeast yang digunakan adalah *Saccharomyces Serevisiae* dan *Pichia Stipitis*. Medium untuk SKFS sebanyak 5000 ml terdiri dari sampel *reject pulp* (100 gram), *nutrients* medium (500 ml), bufer asetat pH 5 (500 ml), enzim, *yeast inoculum* (masing-masing 500 ml) dan aquades. *Nutrients* medium terdiri dari 1,0 gr/L  $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ ; 0,05 gr/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  dan 2 gr/L *yeast extract*.

Untuk run pertama menggunakan satu jenis enzim yaitu enzim selulase. *Reject pulp*, *nutrients medium*, bufer asetat pH 5 dan aquades di masukkan ke dalam bioreaktor. Campuran bahan disterilisasi selama 15 menit pada *autoclave* dengan tekanan 15 psia dan temperatur  $121^\circ\text{C}$ . Setelah campuran dingin, lalu ke dalam campuran dimasukkan enzim selulase dan *yeast inoculum*. Kemudian dilakukan proses SKFS dengan kecepatan 170 rpm dan suhu  $\pm 30^\circ\text{C}$ . Kultivasi diambil tiap 6, 12, 24, 48, 72 dan 96 jam dan disaring menggunakan *Syringe filter*  $0,45 \mu\text{m}$  CA *membranes corning* dan dimasukkan ke dalam *test tube*. Setelah itu dilakukan pengujian konsentrasi etanol yang dihasilkan menggunakan *Gas Chromatografi* (GC).

Untuk run kedua menggunakan 2 jenis enzim yaitu enzim selulase (1 gram) dan xilanase (0,25 gram). Sedangkan untuk run ketiga menggunakan 3 jenis enzim yaitu enzim selulase (1 gram) , selobiose (0,25 gram) dan xilanase (0,25 gram). Cara kerja yang digunakan sama dengan cara kerja pada run pertama.

### **Analisa**

#### **a. Analisa *Reject Pulp***

*Reject pulp* perlu dianalisa komposisi kimianya. Komponen kimia tersebut antara lain: selulosa, hemiselulosa, lignin dan ekstraktif. Analisa kadar

selulosa didalam reject pulp menggunakan standar **TAPPI T 203 om-93**, untuk menganalisa kadar hemiselulosa menggunakan standar **SII 0528-81** sedangkan analisa kadar ekstraktif menggunakan standar **TAPPI T-222 cm-98**.

**b. Analisa Konsentrasi Bioetanol**

Konsentrasi bioetanol dapat dianalisa dengan *Gas Chromatography* (GC) jenis CARBOWAX/PEG-20M (3 m, 4,60 mm, FID) pada temperatur 55<sup>0</sup>C. Sebelum sampel diinjeksikan ke dalam GC, terlebih dahulu dilakukan pengukuran terhadap larutan standar yang akan digunakan sebagai dasar perhitungan konsentrasi etanol.

## 4.2 Kegiatan Tahun II (2011)

### 4.2.1 Bahan dan Alat

#### Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

*Reject pulp*, *Potato* Dekstro Agar (PDA), *Pichia Stipitis*, Enzim Selulase, Xilanase, Selobiase, *Yeast Extract*,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , *Buffer* Na-sitrat, Glukosa, Agar-agar,  $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$  dan *Aquades*. Berikut ini fungsi dari bahan-bahan kimia:

1.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  sebagai sumber  $\text{K}^+$  dan P.  $\text{K}^+$  berfungsi sebagai kofaktor enzim dan P berguna untuk sintesis asam nukleat.
2.  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  sebagai sumber Mg yang merupakan kofaktor enzim.
3.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  sebagai sumber nitrogen yang berguna bagi pembentukan asam nukleat.
4. *Yeast extract* berupa ragi pengembang roti yang berfungsi penyedia asam-asam amino dan vitamin.
5. *Buffer* Na-sitrat berfungsi untuk menjaga kondisi pH sesuai dengan besaran yang diinginkan.

#### Alat

Peralatan yang digunakan sebagai berikut :

Tabung reaksi dan rak, *autoclave*, inkubator, *shaker*, *beaker glass*, labu erlenmeyer, *gas chromatography*, pipet ukur, *petri dish*, jarum ose, pemanas (*heater*), timbangan analitik, spatula, bunsen, *sentrifuge tube*. Proses Sakarifikasi dan Ko-Fermentasi Serentak skala 10 L menggunakan Fermentor BioFlo 2000 (Gambar 4.1).

### 4.2.2 Variabel Penelitian

Untuk mencapai tujuan penelitian, maka variabel proses yang digunakan dalam penelitian yaitu:

## A. Variabel Penelitian Skala Laboratorium

### Variabel Tetap

- pH larutan *buffer* Na-sitrat : 5
- Massa enzim selulase : 0,05 gr
- Massa enzim xilanase : 0,05 gr
- Massa enzim selobiase : 0,05 gr

Pemilihan massa enzim mengacu pada karakteristik jumlah enzim yang mampu menghidrolisis substrat. Rifai dan Mulyono (2011) melakukan proses SFS dengan enzim selulase, xilanase, dan selobiase menggunakan perbandingan enzim - substrat sebesar 1 : 10 (0,05 gr enzim : 0,5 gr *reject pulp*).

### Variabel Berubah

- Massa sampel (*reject pulp*) : 0,5; 0,75; dan 1 gr
- Waktu pengambilan sampel SFS : 6, 12, 24, 48, 72, dan 96 jam
- Penggunaan enzim : a. Enzim selulase  
b. Enzim selulase dan xilanase  
c. Enzim selulase, selobiose dan xilanase

## B. Variabel Penelitian Skala 10 Liter

Percobaan skala 10 L menggunakan proses SKFS seperti tata cara skala fermentor 5 L yang dilakukan pada kegiatan tahun I (2010).

### Variabel tetap

Adapun yang menjadi variabel tetap pada penelitian ini yaitu:

- Massa *reject pulp* : 200 gr
- Enzim selulase : 2 gr
- Enzim selobiase dan xilanase : 0,5 gr
- pH : 5
- Temperatur : Temperatur kamar
- Kecepatan pengadukan : 170 rpm

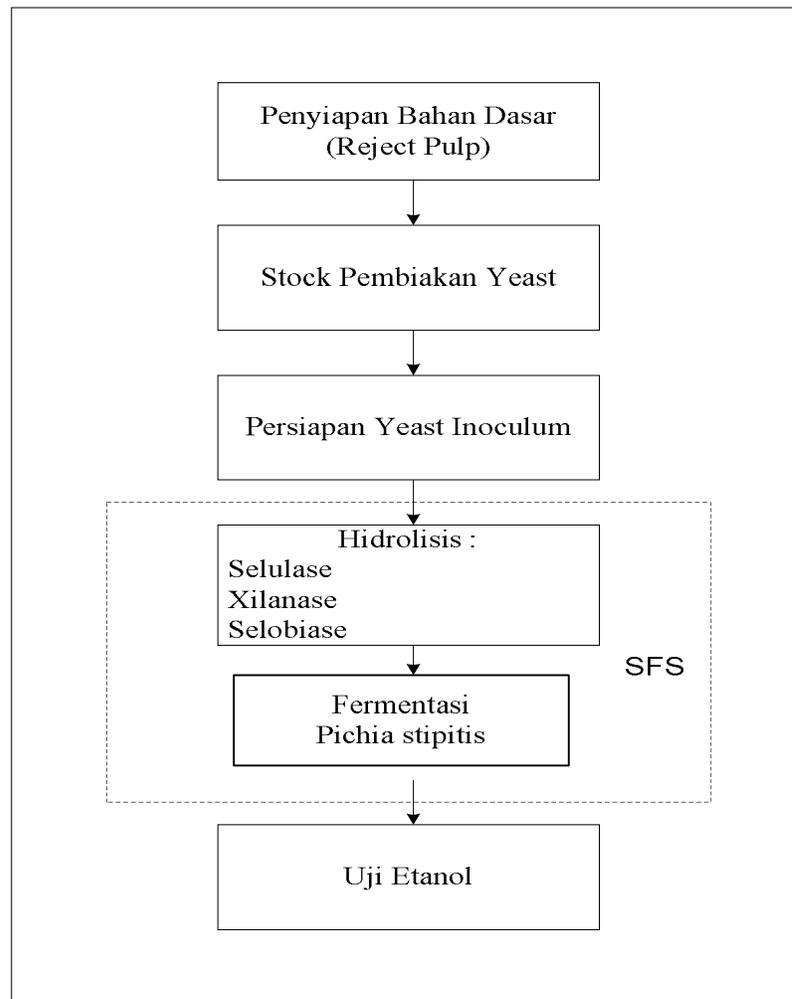
### Variabel berubah

Yang menjadi variabel berubah dalam penelitian ini adalah:

- Penggunaan enzim : a. Enzim selulase  
b. Enzim selulase dan xilanase  
c. Enzim selulase, selobiase dan xilanase
- Waktu pengambilan sampel : 6, 12, 24, 48, 72 dan 96 jam

#### 4.2.3 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian mengacu pada prosedur Sabki (2009) yang juga melakukan proses SFS dengan enzim selulase, xilanase, dan selobiase serta yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Beberapa prosedur yang harus dilalui dapat dilihat pada Gambar 3.3.



**Gambar 4.3** Diagram Alir Tahapan Penelitian

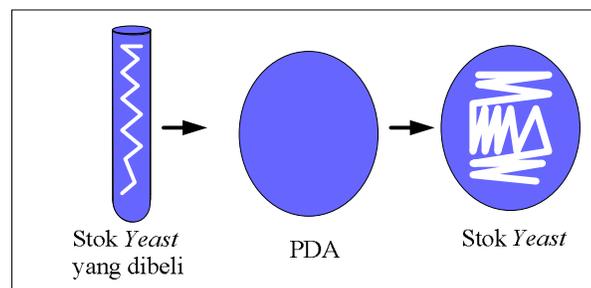
Tahapan prosedur pengerjaan tersebut sebagai berikut :

### Penyiapan Bahan Dasar

*Reject Pulp* diambil dari PT.RAPP Pangkalan Kerinci. *Reject pulp* dicuci dengan air pada suhu kamar, kemudian dikeringkan dan dihaluskan (*diblender*) dengan ukuran 60-80 *mesh*. Komponen kimia tersebut antara lain: selulosa, hemiselulosa, lignin dan ekstraktif. Analisa kadar selulosa didalam reject pulp menggunakan standar **TAPPI T 203 om-93**, untuk menganalisa kadar hemiselulosa menggunakan standar **SII 0528-81** sedangkan analisa kadar ekstraktif menggunakan standar **TAPPI T-222 cm-98**.

### Stok Pemiakan Yeast

*Yeast* di-*preculture* pada 10 ml media *Potato Dextrose Agar* (PDA) di dalam cawan petri (*dextrosa* 10  $\text{g}^{-1}$ , kentang 200  $\text{g}^{-1}$  dan agar 15  $\text{g}^{-1}$ ). Sebelum digunakan media PDA disterilisasi uap dalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah dingin PDA dituang ke dalam cawan petri, tutup cawan petri dengan penutupnya lalu biarkan hingga medium mengeras. Setelah mengeras ambil biakan murni dengan jarum ose steril lalu goreskan pada permukaan medium yang baru dan tutup kembali dengan penutupnya kemudian diinkubasi selama 2-4 hari pada suhu kamar, kemudian digunakan untuk inokulum *yeast*. Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada Gambar 4.4.

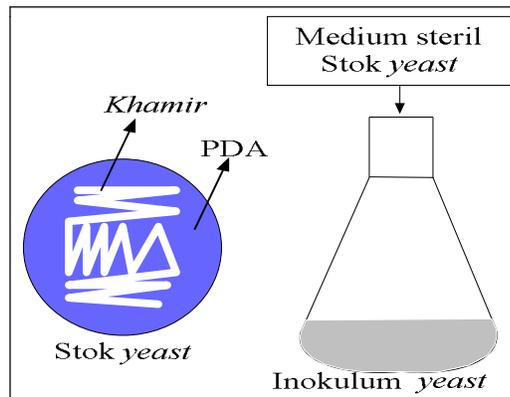


**Gambar 4.4** Pemiakan Yeast

### Persiapan Inokulum *Yeast*

Pembuatan inokulum *yeast* bertujuan untuk mengadaptasikan sel *yeast* terhadap media fermentasi. Dengan adanya adaptasi diharapkan fase lambat sebagai tahap awal fermentasi dilewati. Tahapan persiapan inokulum *yeast* dapat dilihat pada Gambar 4.5.

*Pichia stipitis* segar dari stok pembiakan diinokulasi dalam 150 ml medium (glukosa 1,5 gr; *yeast extract* 0,15 gr;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,015 gr;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,015 gr;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,015 gr; dan *aquades*) dalam 250 ml erlenmeyer. Sebelum diinokulasi, medium disterilisasi uap dalam *autoclave* pada suhu  $121^\circ\text{C}$  selama 15 menit, kemudian didinginkan. Setelah dingin *yeast* dimasukkan ke dalam medium lalu *dishaker* selama 24 jam. Fungsi *shaker* adalah mempermudah difusi oksigen ke dalam medium dan campuran menjadi homogen. Kegunaan inokulasi ini adalah mengadaptasikan sel terhadap media fermentasi, sehingga diharapkan *lag phase* sebagai awal fermentasi dilewati.



**Gambar 4.5** Pembuatan Inokulum *Yeast*

### Sakarifikasi dan Fermentasi

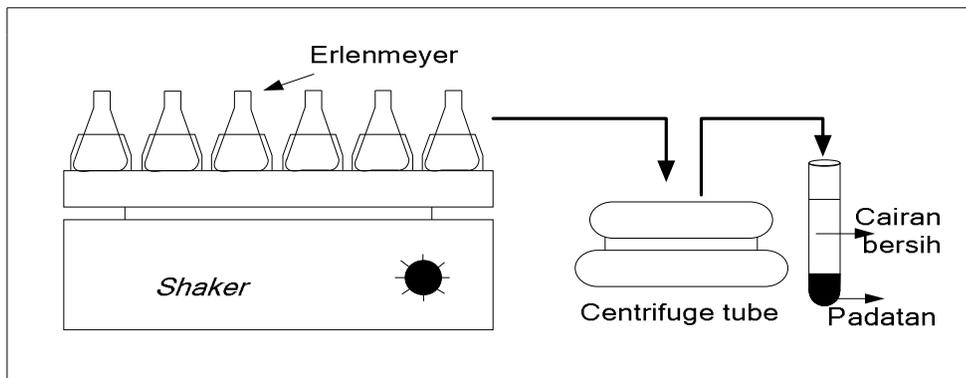
Proses sakarifikasi dan fermentasi dilakukan serentak dalam satu labu erlenmeyer 100 ml. Medium untuk SSF sebanyak 27,5 ml terdiri dari :

- Sampel *reject pulp* = 0,50; 0,75; dan 1 gr
- Nutrien medium = 7,5 ml

Nutrien medium terdiri dari ( $1 \text{ gl}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ ;  $0,05 \text{ gl}^{-1} \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  dan  $2 \text{ gl}^{-1} \text{yeast extract}$ )

- *Buffer* Na-sitrat (pH 5) = 1,5 ml
- Enzim selulase = 0,05 gr
- Enzim xilanase = 0,05 gr
- Enzim selobiase = 0,05 gr
- Inokulum yeast *Pichia stipitis* = 15 ml
- *Aquades* = 3,5 ml

Semua bahan, kecuali enzim dan inokulum disterilisasi selama 15 menit pada 121°C menggunakan *autoclave*. Enzim dan inokulum ditambahkan setelah media steril dingin. Kemudian *dishaker* dengan kecepatan 150 rpm selama 6 jam dan dilakukan juga untuk 12, 24, 48, 72 dan 96 jam. Kultivasi diambil dan dimasukkan dalam *micro sentrifuge tube*. Pisahkan cairan bersih dan endapan dalam tabung *sentrifuge*, kemudian analisa konsentrasi etanol yang dihasilkan dengan menggunakan *gas chromatography*. Skema peralatan penelitian dapat dilihat pada Gambar 4.6.



**Gambar 4.6** Skematik Peralatan Penelitian

## BAB V

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### Kegiatan Tahun I (2010)

##### 5.1 Analisa Komposisi *Reject Pulp*

Bahan baku yang digunakan pada proses Sakarifikasi dan Ko-Fermentasi Serentak (SKFS) berupa limbah padat (*reject pulp*) industri *pulp* dan Paper PT.RAPP, Pangkalan Kerinci. *Reject pulp* ini diketahui tersusun dari beberapa komponen kimia yang dapat dikonversi menjadi bioetanol. Komponen kimia tersebut antara lain: alfa-selulosa, hemiselulosa, lignin dan ekstraktif. Hasil analisa berdasarkan Lampiran B dapat dilihat pada Tabel 5.1.

**Tabel 5.1** Komposisi *Reject Pulp*

<b>Kandungan Kimia</b>	<b>Nilai (%)</b>
Alfa-selulosa	84,91
Hemiselulosa	10,60
Klason-Lignin	3,20
Ekstraktif –EB	1,295

Dari data pada Tabel 5.1 dapat dilihat bahwa *reject pulp* memiliki kadar alfa-selulosa yang tinggi yaitu sebesar 84,91% dan kadar hemiselulosa 10,6%. Kadar holoselulosa didalam *reject pulp* sekitar 95,51%. Sehingga 95,51% komponen yang ada didalam *reject pulp* tersebut dapat dikonversi menjadi etanol. Dan kadar lignin dan ekstraktif yang rendah sekitar 3,2% dan 1,29%. Hal ini disebabkan karena pada proses pembuatan kertas yang dilakukan oleh PT. RAPP telah melalui proses delignifikasi. Sedangkan hasil analisa yang dilakukan oleh PT.RAPP, kadar selulosa dan hemiselulosa sekitar 85,16% dan 10,33%. Kadar holoselulosanya mencapai 95,49%. Jika dibandingkan dengan hasil analisa *reject*

*pulp* yang dilakukan oleh PT. RAPP, selisih kadar holoselulosa yang dihasilkan tidak jauh berbeda.

## 5.2 Analisa Yeast Inokulum

*Yeast* inokulum yang akan digunakan pada proses SKFS terlebih dahulu di analisa dengan tujuan untuk menentukan jumlah *yeast* yang terdapat didalam *yeast* inokulum. Cara menentukan jumlah *yeast* yang digunakan dengan melihat nilai OD (*Optical Density*). Penentuan nilai OD dilakukan secara analisis spektrofotometer. Prinsip kerja dari spektrofotometer adalah analisis turbidometri, yaitu menganalisis konsentrasi suatu zat berdasarkan tingkat kekeruhannya yang dibandingkan dengan larutan blanko. Larutan blanko merupakan larutan perbandingan yang tidak mengandung bahan yang akan di analisa. Analisis dilakukan dengan mengambil data absorbansi dengan panjang gelombang yang digunakan yaitu 600 nm. Panjang gelombang ini digunakan untuk menganalisis konsentrasi sel. Setelah dilakukan pengujian, diperoleh nilai OD untuk masing-masing *yeast* inokulum seperti terlihat pada Tabel 5.2.

**Tabel 5.2** Nilai OD *Yeast* Inokulum

<i>Yeast</i> Inokulum	Nilai OD
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,32
<i>Pichia stipitis</i>	0,35

## 5.3 Hasil Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak

Sebelum digunakan bahan baku (*reject pulp*) dicuci dengan air suhu kamar, kemudian dikeringkan lalu diseragamkan ukuranya 40-60 *mesh*. Berat sampel ditimbang sebanyak 0,5 gram kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer 100 ml, lalu ditambahkan nutrien medium, Na-sitrat buffer (0,1 M) (pH = 4; 4,5; 5; 5,5 dan 6) dan aquades. Kemudian disterilisasi uap dengan menggunakan *autoclave* selama 15 menit. Setelah dingin kemudian ditambahkan enzim dan inokulum khamir, dan *dishaker* sesuai variabel waktu (6, 12, 24, 48, 72 dan 96 jam). Hasil proses SKSF kemudian dipisahkan dengan menggunakan *sentifuge tube* sehingga

diperoleh cairan bersih. Cairan bersih yang diperoleh kemudian dianalisa dengan menggunakan Gas Kromatografi (GC).

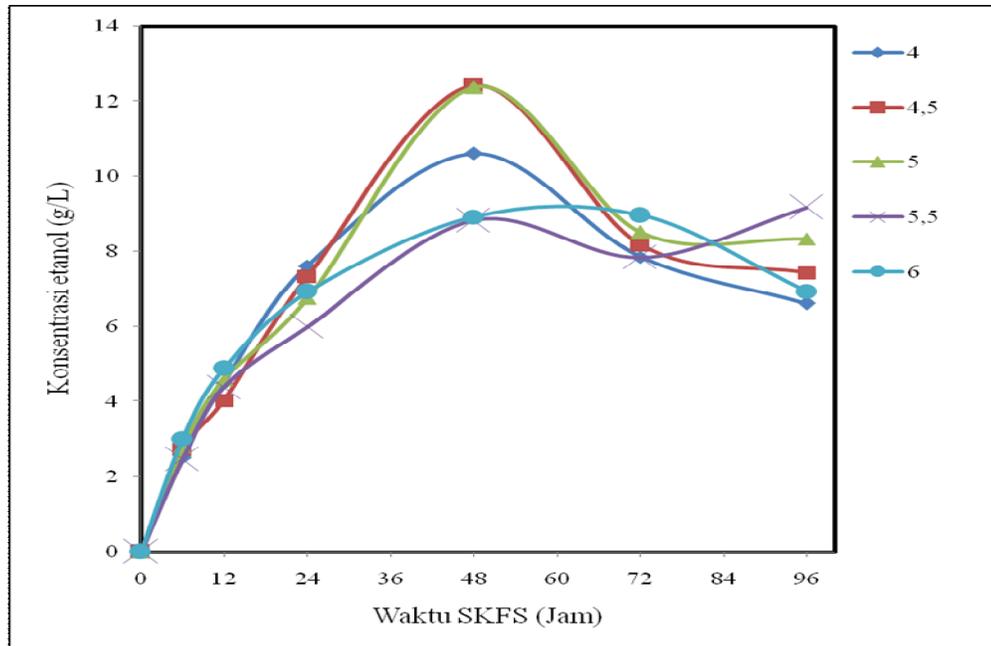
Derajat keasaman (pH) merupakan satu diantara beberapa faktor penting yang mampu mempengaruhi proses fermentasi etanol. Derajat keasaman optimum untuk proses fermentasi adalah antara 4-5. Pada pH di bawah 3, proses fermentasi akan berkurang kecepatannya [Samsuri, 2007]. Pada penelitian ini divariasikan kondisi pH pada proses SKFS yaitu 4; 4,5; 5; 5,5 dan 6. Derajat keasaman yang diinginkan diperoleh dengan menambahkan Na-sitrat *buffer* (0,1 M), penambahan *buffer* disini dimaksudkan agar kondisi pH sesuai dengan besaran yang diinginkan.

### 5.3.1. Hasil Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak (2 Enzim Selulase dan Xylanase) Skala Laboratorium

Data hasil analisa etanol hasil proses SKFS yang diperoleh dapat dilihat pada **Tabel 5.3**. Hasil konsentrasi etanol dari proses SKFS dengan variasi 2 enzim selulase dan xylanase yang diperoleh ditampilkan pada **Gambar 5.1** sedangkan untuk konversi dapat dilihat pada **Tabel 5.4**.

**Tabel. 5.3** Hasil Proses SKFS (2 Enzim Selulase dan Xylanase) Skala Laboratorium

No	Waktu pengambilan sampel (jam)	Kadar Etanol (g/L)				
		pH				
		4	4,5	5	5,5	6
1	0	0	0	0	0	0
2	6	2,520	2,730	2,800	2,490	3,020
3	12	4,490	4,020	4,590	4,380	4,880
4	24	7,610	7,330	6,750	6,010	6,930
5	48	10,600	12,410	12,360	8,830	8,940
6	72	7,850	8,170	8,520	7,840	8,970
7	96	6,610	7,440	8,340	9,170	6,930

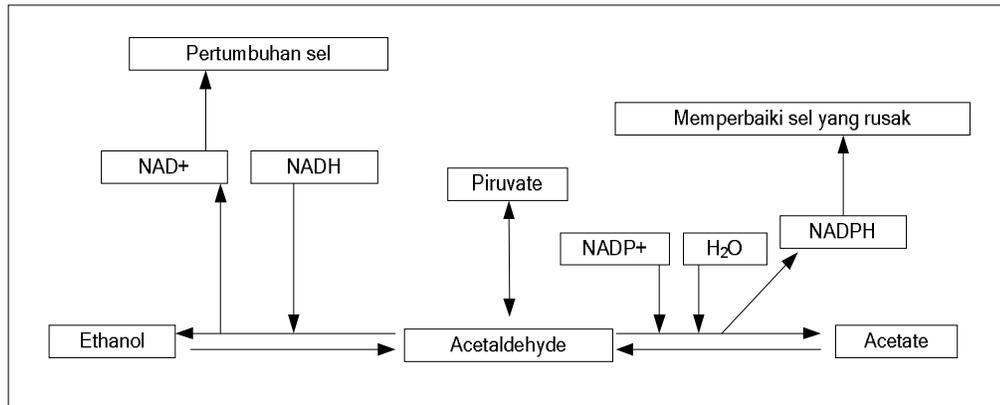


**Gambar 5.1** Hasil Etanol Melalui Proses SKSF dengan Variasi pH 2 Enzim (Selulase dan Xylanase) Skala Laboratorium

Dari **Gambar 5.1** Konsentrasi etanol yang dihasilkan paling tinggi terjadi pada jam ke-48. Pada pH 4,5 yaitu sebesar 12,410 g/L, kemudian pH 5 sebesar 12,360 g/L, pH 4 sebesar 10,600 g/L, pH 6 sebesar 8,940 g/L dan terendah pH 5,5 sebesar 8,830 g/L. Hal ini terjadi pada semua variasi pada penelitian ini, sehingga dapat dikatakan bahwa waktu fermentasi optimum adalah 48 jam.

Jika dilihat pada awal proses yaitu pada waktu 6 jam konsentrasi etanol yang dihasilkan untuk semua variabel cukup rendah (2,490 g/L-3,020 g/L), kemudian terus meningkat hingga jam ke-48 (8,830 g/L -12,410 g/L). Setelah jam ke-48 konsentrasi etanol yang dihasilkan cenderung menurun, yang menunjukkan khamir sudah tidak bekerja menghasilkan etanol secara optimal. Fase tersebut disebabkan kadar glukosa yang semakin berkurang dan pembentukan etanol produk dari fermentasi dapat menghambat pertumbuhan khamir. Penelitian Pitkanen dkk (2005) menunjukkan hal serupa yaitu setelah 48 jam konsentrasi etanol yang dihasilkan cenderung turun, sebaliknya terjadi peningkatan pembentukan asam asetat. Ini sesuai dengan alur metabolisme glukosa dan xylosa

secara anaerob oleh khamir *S.cerevisiae* seperti yang digambarkan pada tinjauan pustaka (**Gambar 2.4**).



**Gambar 5.2** Pembentukan Etanol dan Asam Asetat dalam Fermentasi

Pada fermentasi sistem *batch*, etanol yang dihasilkan selama proses fermentasi dapat menghambat pertumbuhan khamir pada konsentrasi tertentu sesuai dengan galur khamirnya. Dilihat dari **Gambar 5.2**, jika etanol yang dihasilkan berlebih dan mulai mengganggu kehidupan khamir, maka untuk meningkatkan ketahanan hidup sel *S. cerevisiae* terhadap peningkatan konsentrasi etanol di dalam media hidupnya, akan terjadi peningkatan produksi ergosterol [Del Castillo Agudo, 1992] dan asam lemak jenuh  $C_{18}$  maupun asam lemak tak jenuh  $C_{18:1}$  [Beaven dkk., 1982]. Jadi selain komposisi asam lemak tak jenuhnya meningkat, ternyata sintesis asam lemak  $C_{18}$  baik yang jenuh maupun tak jenuh juga meningkat. Asam lemak  $C_{18}$  ini kemudian digunakan untuk meningkatkan sintesis fosfolipid beresidu asam lemak  $C_{18}$ . Peningkatan sintesis asam lemak  $C_{18}$  diperlukan untuk menjaga integritas dari membran sel *S. cerevisiae* dalam lingkungan konsentrasi etanol tertentu sesuai dengan galur khamirnya [Beaven dkk., 1982]. Sintesis sterol (ergosterol), maupun asam lemak dan pemanjangan rantai asam lemak dari  $C_{16}$  (palmitat) menjadi asam lemak  $C_{18}$  (stearat), memerlukan NADPH [Nelson & Cox, 2004]. NADPH diperoleh dari reaksi biokonversi asetaldehid menjadi asetat. Biokonversi asetaldehid menjadi asetat

akan menggeser kesetimbangan antara etanol dan asetaldehid ke arah pembentukan asetaldehid (**Gambar 5.2**), sehingga konsentrasi etanol berkurang karena terjadi penyerapan etanol dari lingkungan masuk ke dalam sel khamir. Hal ini menyebabkan setelah 48 jam terjadi penurunan konsentrasi etanol (**Gambar 5.1**). Ketika jumlah asam lemak C<sub>18</sub> telah mencukupi, biokonversi asetaldehid menjadi asetat akan berkurang, sehingga kesetimbangan asetaldehid dan etanol bergeser kembali ke pembentukan etanol. Hal ini menjelaskan terjadinya kenaikan kembali produksi etanol setelah jam ke-72 pH 5,5 (**Gambar 5.1**).

### **Konversi *Reject Pulp* Menjadi Bioetanol.**

Konversi *reject pulp* menjadi bioetanol melalui proses SKFS yang dapat dilihat pada **Tabel 5.4**.

**Tabel 5.4.** Tabulasi Hasil Perhitungan Konversi *Reject Pulp* Menjadi Bioetanol Melalui Proses SKSF (2 enzim selulase dan xylanase) skala Laboratorium

No	Waktu pengambilan sampel (jam)	Konversi (%)				
		pH				
		4	4,5	5	5,5	6
1	0	0	0	0	0	0
2	6	13,860	15,015	15,345	13,640	16,610
3	12	24,695	22,110	25,245	24,090	26,840
4	24	41,855	40,315	37,125	33,055	38,060
5	48	<b>58,300</b>	<b>68,255</b>	<b>67,980</b>	<b>48,565</b>	<b>49,115</b>
6	72	43,175	44,935	46,860	43,120	49,335
7	96	36,685	40,865	45,870	50,435	37,565

Dari **Tabel 5.4** dapat diketahui bahwa pH mempengaruhi konversi *reject pulp* menjadi bioetanol melalui proses SKFS (hidrolisis : enzim selulase dan xilanase ; fermentasi : *S.cerevisiae* dan *P.stipitis* ), hal ini dapat dilihat konversi yang diperoleh tiap pH hasilnya berbeda. Konversi *reject pulp* yang diperoleh pada pH 4 antara 13,860 %-58,300%, kemudian pH 4,5 antara 15,015%-68,255%, pH 5 antara 15,345 %-67,980%, pH 5,5 antara 13,649%-50,435% dan pH 6 antara 16,610%-49,335%. Dilihat secara keseluruhan, konversi tertinggi terjadi

pada jam ke-48 yaitu pada pH 4,5 sebesar 68,255 %, pH 5 sebesar 67,980 %, pH 4 sebesar 58,300 %, pH 6 sebesar 49,115 % dan pH 5,5 sebesar 48,565 %.

### Perbandingan Hasil SSF dan SKFS

Komposisi bahan baku (*reject pulp*) yang digunakan pada proses SFS [Lianti, 2009] tidak jauh berbeda dengan penelitian ini (melalui proses SKFS). Perbedaan hasil tertinggi dapat dilihat pada **Tabel 5.5**.

**Tabel 5.5.** Hasil Tertinggi Pada Proses SFS dan SKFS

No	pH Proses	SFS (Lianti,2009) Hasil yang diperoleh (g/L)	SKFS Hasil yang diperoleh (g/L)
1	4,0	9,4	10,600
2	4,5	8,7	12,410
2	5,0	4,3	12,360
4	5,5	9,7	9,170
5	6,0	7,5	8,970

Pada SFS [Lianti 2009], untuk proses hidrolisisnya menggunakan enzim selulase dan xilanase, untuk proses fermentasi hanya menggunakan khamir *S.cerevisiae* saja. Dilihat dari **Tabel 4.5** hasil proses SFS tertinggi terjadi pada pH 5,5 yaitu sebesar 9,7 g/L sedangkan pH 4 dan pH 4,5 lebih rendah, pada pH 4 sebesar 9,4 g/L dan pH 4,5 sebesar 8,7 g/L, sehingga dapat dikatakan belum bisa membuktikan bahwa pH optimum proses hidrolisis dan fermentasi adalah 4-5. Hal ini disebabkan ukuran bahan baku (*reject pulp*) yang digunakan pada SFS tidak seragam sehingga kondisi proses masing-masing pH juga tidak seragam. Selain itu proses SFS dilakukan dengan menggunakan tabung reaksi. Tabung reaksi volumenya terlalu kecil, yang memungkinkan efek dari *shaker* juga kecil sehingga kontak antara enzim dengan *reject pulp* dan hasil hidrolisis dengan khamir kecil.

Pada proses SKFS untuk proses hidrolisisnya menggunakan enzim selulase dan xilanase, untuk proses fermentasi menggunakan khamir *S.cerevisiae* dan *P.stipitis*. Dari **Tabel 5.5** hasil pada SKFS, membuktikan bahwa proses hidrolisis dan fermentasi yang optimum terjadi pada pH 4-5. Jika dilihat secara keseluruhan hasil SKFS lebih tinggi dibandingkan proses SFS, Pada SKFS hasil

tertinggi 12,410 g/L sedangkan pada proses SFS diperoleh 9,7 g/L akan tetapi karena proses dilakukan dengan wadah yang berbeda, pada SFS menggunakan tabung reaksi sedangkan SKFS menggunakan Erlenmeyer 100 ml, dengan demikian belum bisa disimpulkan bahwa proses SKFS pada penelitian ini lebih unggul dibandingkan proses SFS.

### 5.3.2 Hasil Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak (3 Enzim Selulase, Xylanase dan Selubiose) Skala Laboratorium

Data hasil analisa etanol hasil proses SKFS yang diperoleh dapat dilihat pada **Tabel 5.6**. Hasil konsentrasi etanol dari proses SKFS dengan variasi 2 enzim selulase dan xylanase yang diperoleh ditampilkan pada **Gambar 5.3** sedangkan untuk konversi dapat dilihat pada **Tabel 5.7**.

Tabel 5.6 Hasil Proses SKFS (3 Enzim Selulase, Xylanase dan selubiose) Skala Laboratorium

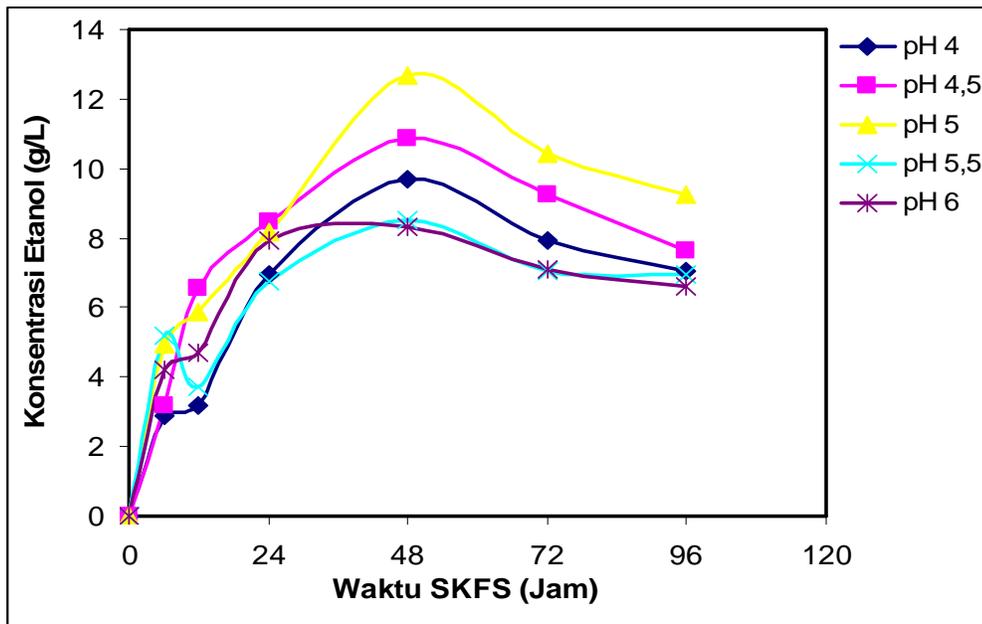
No	Waktu SKFS (jam)	Konsentrasi Etanol (g/L)				
		pH				
		4	4,5	5	5,5	6
1	0	0	0	0	0	0
2	6	2,900	3,200	4,940	5,170	4,230
3	12	3,200	6,580	5,880	3,740	4,700
4	24	6,970	8,480	8,160	6,760	7,930
5	48	9,670	10,890	12,670	8,540	8,340
6	72	7,940	9,240	10,440	7,070	7,110
7	96	7,070	7,620	9,260	6,940	6,590

Derajat keasaman (pH) merupakan satu diantara beberapa faktor penting yang mampu mempengaruhi proses fermentasi etanol. Derajat keasaman optimum untuk proses fermentasi adalah antara 4-5. Pada pH < 3, proses fermentasi akan berkurang kecepatannya [Samsuri, 2007]. Pada penelitian ini divariasikan kondisi pH pada proses SKFS yaitu 4; 4,5; 5; 5,5 dan 6. Derajat keasaman yang

diinginkan diperoleh dengan menambahkan *Na-citrate buffer*, penambahan *buffer* disini dimaksudkan agar kondisi pH sesuai dengan besaran yang diinginkan.

Konsentrasi etanol paling tinggi dihasilkan pada proses dengan waktu SKFS 48 jam, tertinggi pada pH 5 yaitu sebesar 12,670 g/L dan terendah pada pH 6 yaitu 8,340 g/L. Dari **Gambar 5.3** dapat disimpulkan bahwa waktu dan pH optimum untuk proses SKFS adalah 48 jam pada pH 5.

Peningkatan konsentrasi etanol pada pH 4, 4,5, 5, 5,5 dan 6 hingga jam ke-48 menunjukkan bahwa *yeast* berada pada fase eksponensial (*log phase*). Sedangkan pada jam ke-72 hingga jam ke-96, *yeast* mengalami fase stasioner yang menunjukkan *yeast* sudah tidak bekerja lagi secara optimal. Fase tersebut disebabkan kadar glukosa yang semakin berkurang dan pembentukan produk samping dari fermentasi. Produk samping tersebut berupa asam asetat yang terbentuk dari etanol yang mengalami reaksi lanjut [Gozan, 2007].



**Gambar 5.3** Hasil Etanol pada Proses SKFS dengan Variasi pH

Hasil perhitungan konversi *reject pulp* menjadi bioetanol dengan proses SKFS dapat dilihat pada **Tabel 5.7**. Dari **Tabel 5.7** dapat diketahui bahwa *reject pulp* memiliki potensi untuk dikonversi menjadi bioetanol. Dilihat secara

keseluruhan, konversi etanol tertinggi terjadi pada jam ke-48 yaitu pada pH 5 sebesar 69,688 %, pH 4,5 sebesar 59,898 %, pH 4 sebesar 53,187 %, pH 5,5 sebesar 46,972 % dan pH 6 sebesar 45,872 %. Dari hasil konversi dapat dilihat pH dan waktu SKFS mempengaruhi konversi *reject pulp* menjadi etanol, dengan konversi tertinggi 69,688% yaitu pada pH 5 dan waktu SKFS 48 jam. Hasil konversi yang didapatkan tidak dapat mencapai 100 %, hal ini dikarenakan tidak seluruh glukosa terkonversi menjadi etanol tetapi sebagian glukosa menjadi CO<sub>2</sub>, dengan reaksi sebagai berikut:



Tabel 5.7 Tabulasi Hasil Perhitungan Konversi *Reject Pulp* Menjadi Bioetanol Melalui Proses SKSF (3 enzim selulase, xylanase dan selubiose) skala Laboratorium

No	Waktu SKFS (jam)	Konversi (%)				
		pH				
		4	4,5	5	5,5	6
1	0	0	0	0	0	0
2	6	15,951	17,601	27,171	28,436	23,266
3	12	17,601	36,192	32,341	20,571	25,851
4	24	38,337	46,642	44,882	37,182	43,617
5	48	53,187	59,898	69,688	46,972	45,872
6	72	43,672	50,822	57,423	38,887	39,107
7	96	38,887	41,912	50,932	38,172	36,247

Pada variasi penggunaan 2 enzim selulase dan xylanase telah dilakukan konversi *reject pulp* menjadi bioetanol menggunakan proses SKFS perbedaannya dengan penelitian ini adalah pada enzim yang digunakan. Pada penelitian ini sedangkan pada penelitian sebelumnya hanya

Perbandingan konsentrasi etanol yang dihasil dari penggunaan dua enzim (selulase dan xilanase) dengan tiga enzim (selulase, xilanase dan selobiase) untuk proses hidrolisis dapat dilihat pada Tabel 4.8. Dari **Tabel 5.8** dapat dilihat hasil konsentrasi etanol dengan proses SKFS menggunakan tiga enzim (selulase,

xilanase dan selobiase) menghasilkan konsentrasi etanol lebih tinggi yaitu 12,67 g/L sedangkan hasil konsentrasi dengan menggunakan dua enzim (selulase dan xilanase) sebesar 12,41 g/L. Hal ini disebabkan karena pada proses hidrolisis selulosa tidak semuanya terkonversi menjadi glukosa melainkan ada yang membentuk selobiosa, dimana untuk menghidrolisis selobiosa dibutuhkan enzim selobiase.

**Tabel 5.8** Perbandingan Konsentrasi Hasil Proses SKFS

No	pH Proses	Konsentrasi etanol (2 enzim selulase dan xilanase) (g/L)	Konsentrasi etanol (3 enzim selulase, xilanase, selobiase) (g/L)
1	4,0	10,60	9,67
2	4,5	12,41	10,89
2	5,0	12,36	12,67
4	5,5	9,17	8,54
5	6,0	8,97	8,34

### 5.3.3 Hasil Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak Skala 5 Liter

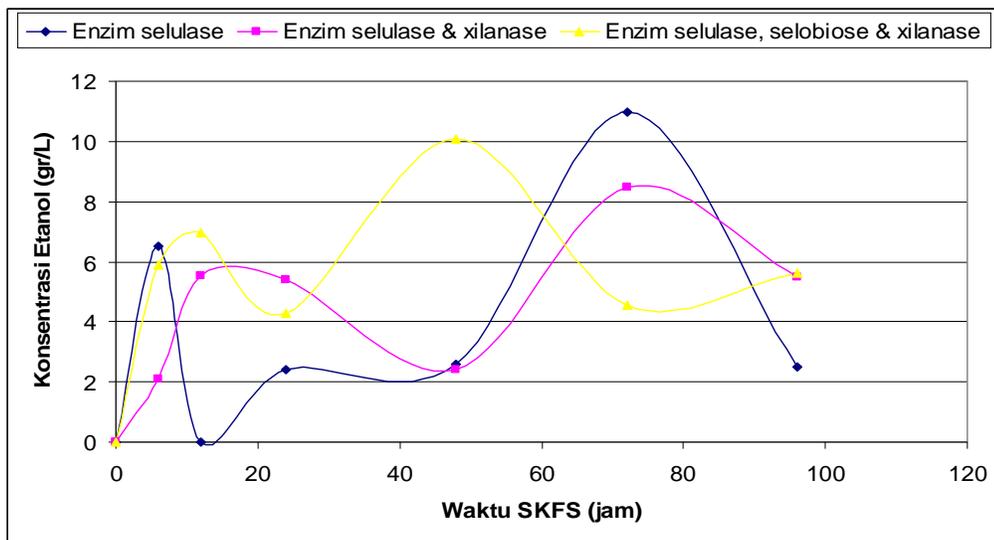
Penggunaan enzim sangat mempengaruhi etanol yang terbentuk pada proses SKFS. Variasi enzim yang digunakan adalah enzim selulase; enzim selulase dan xilanase; enzim selulase, selobiase dan xilanase. Data hasil analisa etanol hasil proses SKFS skala 5 Liter yang diperoleh dapat dilihat pada **Tabel 5.9**. Hasil konsentrasi etanol dari proses SKFS dengan variasi penggunaan enzim ditampilkan pada **Gambar 5.4** sedangkan untuk konversi dapat dilihat pada **Tabel 5.10**.

Dari Gambar 5.4 dapat dilihat dengan menggunakan enzim selulase menghasilkan etanol dengan konsentrasi tertinggi yaitu 10,97 gr/L tetapi membutuhkan waktu yang lama untuk mencapai hasil maksimum yaitu 72 jam. Paa saat menggunakan dua enzim yaitu enzim selulase dan xilanase membutuhkan waktu maksimum 72 jam untu mencapai produksi etanol maksimal sebesar 8,49

gr/L. Sedangkan pada saat menggunakan tiga enzim yaitu enzim selulase, selobiose dan xilanase membutuhkan waktu yang lebih cepat jika dibandingkan dengan penggunaan satu enzim dan dua enzim. Waktu yang dibutuhkan hanya 48 jam dengan konsentrasi etanol mencapai 10,07 g/L. Dapat disimpulkan bahwa dengan menggunakan tiga enzim membutuhkan waktu yang relatif lebih cepat untuk memproduksi etanol.

**Tabel. 5.9** Konsentrasi Etanol Hasil Proses SKFS Skala 5 Liter

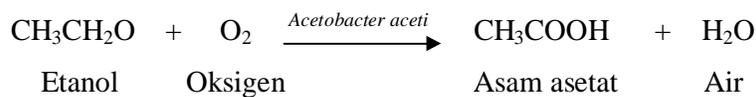
Waktu SKFS (jam)	Konsentrasi Etanol (gr/L)		
	Enzim selulase	Enzim selulase & xilanase	Enzim selulase, selobiose & xilanase
0	0	0	0
6	6.5	2.08	5.87
12	-	5.51	6.96
24	2.41	5.4	4.27
48	2.6	2.39	10.07
72	10.97	8.49	4.55
96	2.52	5.47	5.61



**Gambar 5.4** Hasil Etanol pada Proses SKFS skala 5 L dengan Variasi Enzim

Penurunan konsentrasi etanol yang terbentuk terjadi pada penggunaan enzim selulase. Terjadi penurunan yang signifikan dari jam ke-6 sampai jam ke-

12 sebesar 6,5 gr/L dan pada akhir proses dari jam ke-72 sampai jam 96 juga mengalami penurunan sebesar 8,45 gr/L. Pada penggunaan dua enzim juga mengalami penurunan dari jam ke-12 sampai jam ke-24 dan ke-48 dan juga pada jam ke-72 sampai jam ke-96. Masing-masing penurunan konsentrasi etanol yaitu 0,11 gr/L, 3,12 gr/L dan 3,02gr/L. Pada saat penggunaan 3 enzim (enzim selulase, selobiose dan xilanase) juga mengalami penurunan konsentrasi etanol dari jam ke-12 sampai jam ke-24 sebesar 2,69 gr/L dan pada jam ke-48 sampai jam ke-72 sebesar 5,52 gr/L. Penurunan ini disebabkan karena selama pengambilan sampel ada sebagian oksigen yang masuk sehingga membuat proses anaerob yang tidak sempurna dan membuat proses sedikit aerob sehingga memungkinkan tumbuhnya *Acetobacter aceti* yang dapat mengkonversi alkohol menjadi asam asetat yang ditandai dengan bau masam pada sampel sehingga menurunkan konsentrasi etanol yang dihasilkan [Rikana, 2009]. Berikut reaksi oksidasi etanol menjadi asam asetat dengan asetaldehid sebagai produk intermediet yang dihasilkan.



Hasil perhitungan konversi *reject pulp* menjadi bioetanol menggunakan proses SKFS berdasarkan Lapiroan D dapat dilihat pada **Tabel 5.10** berikut.

**Tabel 5.10.** Hasil Konversi *Reject Pulp* Menjadi Bioetanol dengan Proses SKFS

Waktu SKFS (jam)	Konversi Etanol (%)		
	Enzim selulase	Enzim selulase & xilanase	Enzim selulase, selobiose & xilanase
0	0%	0%	0%
6	32.50%	10.40%	29.35%
12	0%	27.55%	34.80%
24	12.05%	27.00%	21.35%
48	13.00%	11.95%	50.35%
72	54.85%	42.45%	22.75%
96	12.60%	27.35%	28.05%

Dari **Tabel 5.10** dapat bahwa konversi *reject pulp* menjadi etanol tertinggi dengan menggunakan enzim selulase yaitu 54,85% dan membutuhkan waktu 72

jam. Pada penggunaan dua enzim yaitu enzim selulase dan xilanase, konversi maksimum juga didapat dalam waktu 72 jam sebesar 42,45%. Sedangkan pada penggunaan tiga enzim (enzim selulase, selobiose dan xilanase) membutuhkan waktu yang lebih cepat untuk menghasilkan konversi maksimal. Waktu yang dibutuhkan untuk mencapai konversi 50,35% selama 48 jam.

#### 5.4 Perbandingan Hasil SFS dan SKFS

Pada penelitian ini menggunakan proses SKFS. Jika dibandingkan dengan penelitian sebelumnya yang menggunakan proses Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak (SFS) dengan bahan baku *reject pulp* ataupun bagas, hasil yang diperoleh lebih tinggi. Perbedaan dari proses ini terletak pada *yeast* yang digunakan. Perbandingan konsentrasi etanol hasil penelitian menggunakan proses SFS dan SKFS dapat dilihat pada Tabel 5.11.

**Tabel 5.11** Perbandingan Konsentrasi Etanol dengan Proses SFS dan SKFS

Variabel.	SFS [Lianti,2009]	SFS [Latifah,2008]	SKFS [penelitian ini]
Bahan baku	<i>Reject pulp</i>	Bagas	<i>Reject pulp</i>
Volum larutan (ml)	6,75	3500	5000
Enzim	Selulase dan xilanase	Selulase, xilanase dan selubiose	Selulase, xilanase dan selubiose
Yeast	<i>Saccharomyces cerviceae</i>	<i>Saccharomyces cerviceae</i>	<i>Saccharomyces cerviceae</i> dan <i>Pichia stipitis</i>
Waktu optimum (jam)	96	96	<sup>(a)</sup> = 72 <sup>(b)</sup> = 72 <sup>(c)</sup> = 48
Konsentrasi etanol maksimum (gr/L)	9,7	3,4	<sup>(a)</sup> = 10,97 <sup>(b)</sup> = 8,49 <sup>(c)</sup> = 10,07

Enzim selulase<sup>(a)</sup>, Enzim selulase dan xilanase<sup>(b)</sup>, Enzim selulase, selobiose dan xilanase<sup>(c)</sup>

Dari **Tabel 5.11** dapat dilihat hasil SKFS menggunakan satu dan tiga enzim lebih tinggi dibandingkan dengan SFS. Pada SKFS. Dengan bahan baku

*reject pulp* konsentrasi etanol tertinggi yang diperoleh menggunakan proses SKFS mencapai 10,97 gr/L dan 10,07 gr/L, sedangkan yang menggunakan proses SFS yang menggunakan dua enzim diperoleh konsentrasi etanol sebesar 9,7 g/L. Hal ini disebabkan karena pada proses SFS hanya menggunakan *yeast Saccharomyces cereviceae* yang tidak mampu memfermentasi xilosa [Rouhollah *et al*, 2007], sehingga xilosa hasil hidrolisis xilanase tidak terfermentasi. Sedangkan pada proses SKFS ini mengkombinasikan *yeast Saccharomyces cereviceae* dan *Pichia stipitis*. Dimana *Pichia stipitis* mampu memfermentasi xilosa yang terbentuk dari hasil degradasi xilan menggunakan enzim xilanase.

Jika dilihat dari bahan baku yang digunakan, proses SKFS yang menggunakan *reject pulp* menghasilkan etanol dengan konsentrasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan etanol yang dihasilkan dengan proses SFS berbahan baku bagas. Dari Tabel 5.11 dapat dilihat konsentrasi etanol tertinggi menggunakan bahan baku *reject pulp* mencapai 10,97%. Sedangkan konsentrasi etanol maksimal proses SFS yang menggunakan bagas hanya 3,44%. Hal ini disebabkan karena kadar holoseluosa didalam *reject pulp* mencapai 95,51% sedangkan bagas sekitar 70,2%. Selain itu, xilosa yang terbentuk juga tidak dapat terfermentasi karena proses SFS hanya menggunakan *yeast Saccharomyces cereviceae*.

## Kegiatan Tahun II (2011)

### 5.5 Hasil Analisa Komposisi *Reject Pulp*

Bahan baku yang digunakan pada proses Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak (SSF) berupa limbah padat (*reject pulp*) industri *pulp* dan kertas PT.RAPP, Pangkalan Kerinci. *Reject pulp* ini diketahui tersusun dari beberapa komponen kimia yang dapat dikonversi menjadi bioetanol. Komponen kimia tersebut antara lain: alfa-selulosa, hemiselulosa, lignin dan ekstraktif. Hasil analisa **Komposisi *Reject Pulp*** dapat dilihat pada Tabel 5.12.

**Tabel 5.12** Komposisi *Reject Pulp*

<b>Kandungan Kimia</b>	<b>Nilai (%)</b>
Alfa-selulosa	91,46 %
Hemiselulosa	4,79 %
Lignin	3 %
Ekstraktif	0,75 %

Dari Tabel 5.12 terlihat bahwa komposisi kimia penyusun *reject pulp* terbesar adalah selulosa dan hemiselulosa yaitu 91,46% dan 4,79%. Dari keempat komposisi kimia penyusun *reject pulp* di atas, hanya selulosa dan hemiselulosa saja yang bisa dimanfaatkan oleh *yeast* menjadi bioetanol melalui proses fermentasi.

### 5.6 Hasil Analisa Proses Inokulasi *Yeast*

Pada persiapan *yeast* inokulum *Pichia stipitis* yang akan digunakan pada proses SFS setelah 24 jam akan dianalisa terlebih dahulu dengan analisis spektrofotometer (Mulyono, 2011 dan Rouhollah, 2007). Proses analisa ini bertujuan untuk menentukan jumlah *Pichia stipitis* yang terdapat didalam *yeast* inokulum. Cara menentukan jumlah *Pichia stipitis* yang digunakan dengan

melihat nilai OD (*Optical Density*). Prinsip kerja dari spektrofotometer adalah analisis turbidometri, yaitu menganalisis konsentrasi suatu zat berdasarkan tingkat kekeruhannya yang dibandingkan dengan larutan blanko. Larutan blanko merupakan larutan pembanding yang tidak mengandung bahan yang akan di analisa. Analisis dilakukan dengan mengambil data absorbansi dengan panjang gelombang yang digunakan yaitu 600 nm. Panjang gelombang ini digunakan untuk menganalisis konsentrasi sel. Setelah dilakukan pengujian, diperoleh nilai OD untuk *yeast* inokulum *pichia stipitis* sebesar 0,617. Nilai ini memenuhi syarat nilai OD untuk proses fermentasi yang berkisar antara 0,1-0,8 (Rouhollah, 2007).

### **5.7 Hasil Analisa Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak**

Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak (SFS) merupakan metode yang dapat digunakan dalam memproduksi bioetanol dari bahan baku berlignoselulosa. Pada SFS proses hidrolisis dan fermentasi berlangsung dalam satu wadah reaktor. Proses hidrolisis menggunakan tiga jenis enzim (selulase, xilanase, dan selobiase) yang memiliki peranan spesifik untuk memecah polimer selulosa dan hemiselulosa menjadi monomernya. Monomer gula selulosa dan hemiselulosa dari bahan *reject pulp* merupakan sumber substrat yang dapat langsung difermentasi oleh *yeast Pichia stipitis* sehingga mencegah monomer gula menjadi inhibitor pada proses hidrolisis (Lelana, 2010). Kerja enzim akan mempengaruhi jumlah etanol yang terbentuk. Enzim memiliki karakteristik jumlah substrat yang mampu dihidrolisisnya. Penggunaan perbandingan enzim dengan jumlah substrat yang tepat akan memberikan hasil hidrolisis yang optimal. Hasil hidrolisis enzim menghasilkan monomer gula yang kemudian akan difermentasi menjadi bioetanol. Etanol yang dihasilkan dari proses SFS dianalisa menggunakan *Gas Chromatography* (GC). Konsentrasi bioetanol yang diperoleh dari variasi massa *reject pulp* dan waktu fermentasi dapat dilihat pada **Tabel 5.13** s/d **Tabel 5.15** dan **Gambar 5.5** s/d **Gambar 5.7**.

**Tabel 5.13** Konsentrasi Bioetanol Hasil Proses SSF dengan Massa *Reject Pulp* dan enzim Selulase

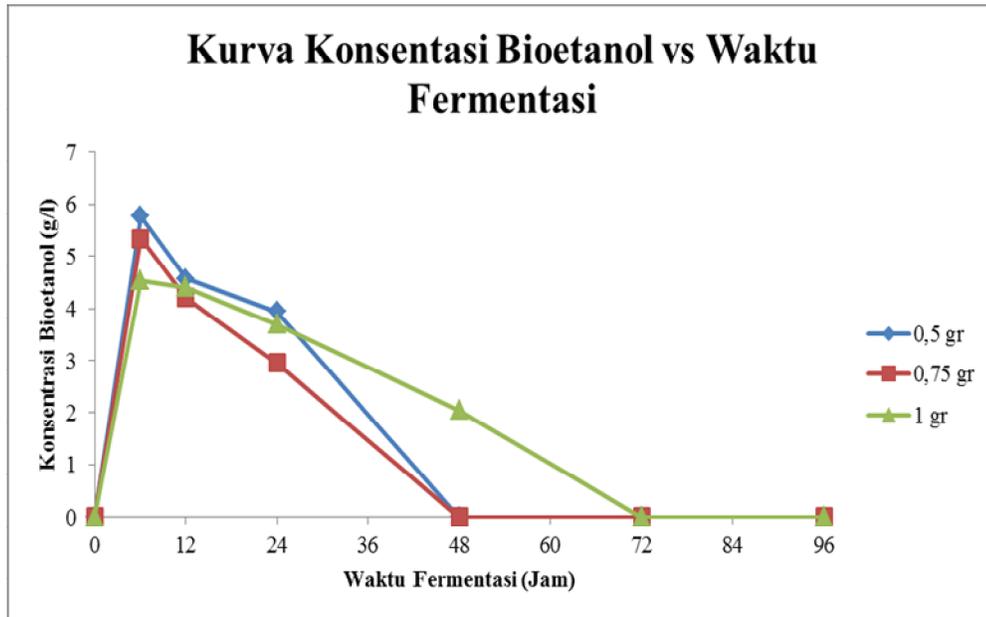
Waktu SFS (jam)	Konsentrasi Biotanol (g/L)		
	Massa <i>Reject Pulp</i>		
	0,5 gr	0,75 gr	1 gr
0	0	0	0
6	5,77	5,34	4,54
12	4,57	4,21	4,4
24	3,94	2,95	3,7
48	0	0	2,05
72	0	0	0
96	0	0	0

**Tabel 5.14** Konsentrasi Bioetanol Hasil Proses SSF dengan Massa *Reject Pulp* dan enzim Selulase dan xylanase

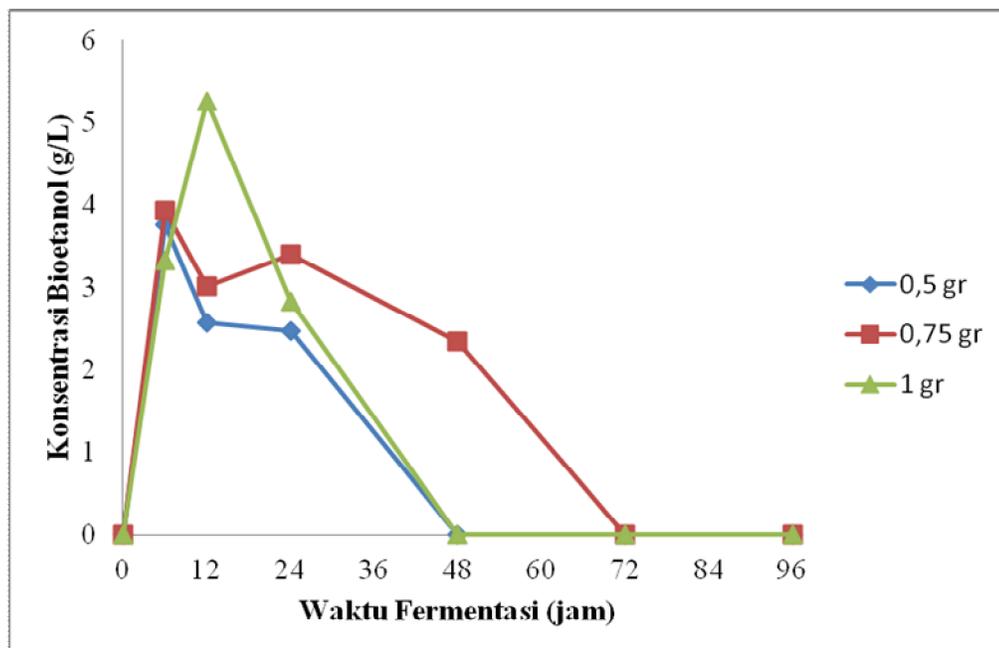
Waktu SFS (jam)	Konsentrasi Biotanol (g/L)		
	Massa <i>Reject Pulp</i>		
	0,5 gr	0,75 gr	1 gr
0	0	0	0
6	3,76	3,93	3,33
12	2,57	3,02	5,25
24	2,48	3,4	2,83
48	0	2,34	0
72	0	0	0
96	0	0	0

**Tabel 5.15** Konsentrasi Bioetanol Hasil Proses SSF dengan Massa *Reject Pulp* dan enzim Selulase, xylanase dan selubiose

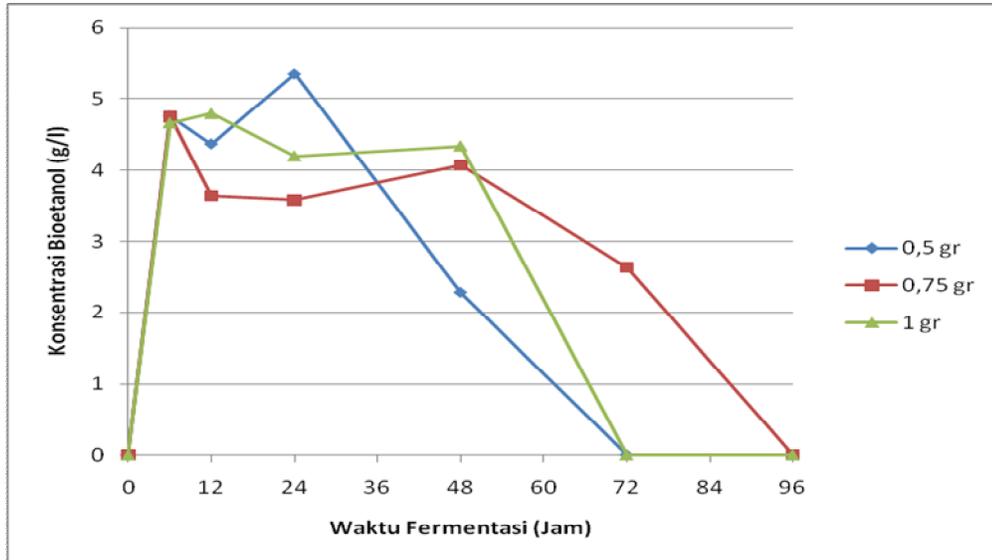
Waktu SFS (jam)	Konsentrasi Biotanol (g/L)		
	Massa <i>Reject Pulp</i>		
	0,5 gr	0,75 gr	1 gr
0	0	0	0
6	4,76	4,75	4,66
12	4,37	3,64	4,79
24	5,35	3,58	4,2
48	2,28	4,07	4,34
72	0	2,64	0
96	0	0	0



**Gambar 5.5** Hasil Bioetanol pada Proses SSF dengan Variasi Massa *Reject Pulp* dan enzim Selulase



**Gambar 5.6** Hasil Bioetanol pada Proses SSF dengan Variasi Massa *Reject Pulp* dan enzim Selulase dan xylanase



**Gambar 5.7** Hasil Bioetanol pada Proses SSF dengan Variasi Massa *Reject Pulp* dan enzim Selulase, xylanase dan selubiose

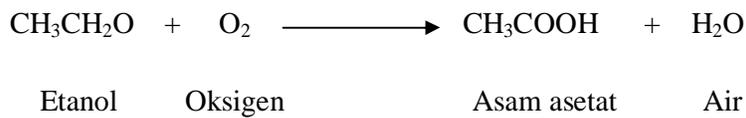
Dari Gambar 4.5 dapat dilihat dengan menggunakan massa *reject pulp* 0,5 gram menghasilkan bioetanol dengan konsentrasi tertinggi yaitu 5,77 gr/l dengan waktu fermentasi yaitu 6 jam. Peningkatan massa *reject pulp* dan lamanya waktu fermentasi ternyata tidak menyebabkan konsentrasi bioetanol menjadi tinggi. Hal kemungkinan disebabkan oleh beberapa hal seperti kerusakan enzim, adanya komponen lain dalam *reject pulp* seperti lignin dan ekstraktif, serta kondisi operasi optimum yang tidak tercapai seperti pH dan temperatur. Penurunan produksi bioetanol begitu signifikan (Gambar 5.5) sampai kadar bioetanol tidak lagi terdeteksi (0 g/l) pada waktu fermentasi 48 jam untuk penggunaan massa *reject pulp* 0,5 dan 0,75 gram. Sedangkan pada penggunaan massa *reject pulp* 1 gram, produksi bioetanol berhenti pada waktu fermentasi 72 jam.

Dari Gambar 5.6 dapat dilihat bahwa etanol sudah terbentuk pada waktu SFS 6 sampai 72 jam. Pada penggunaan jumlah substrat *reject pulp* 0,5 gram, konsentrasi etanol tertinggi dicapai pada waktu 6 jam yaitu sebesar 3,76 g/L. Selanjutnya pada waktu 12 jam bioetanol yang dihasilkan berangsur-angsur menurun menjadi 2,57 g/L hingga jam ke-48 tidak terdeteksi lagi adanya etanol

yang terbentuk. Penambahan jumlah *reject pulp* menjadi 0,75 gram, menghasilkan konsentrasi etanol tertinggi pada waktu 6 jam yaitu sebesar 3,93 g/L. Kemudian terjadi penurunan konsentrasi etanol pada waktu 12 jam. Konsentrasi kembali mengalami kenaikan yang tidak terlalu signifikan pada 24 jam dan akhirnya kembali mengalami penurunan hingga tidak ada lagi etanol yang dapat terdeteksi pada 72 jam. Pada konsentrasi substrat 1 gram, proses produksi etanol langsung berjalan dengan baik ditandai pada jam ke-6 adanya konsentrasi bioetanol sebesar 3,33 g/L dan terus mengalami kenaikan hingga mencapai konsentrasi tertinggi 5,25 g/L. Pada kondisi ini menunjukkan bahwa substrat gula yang masih banyak pada media fermentasi sehingga masih bisa digunakan dengan baik oleh *yeast* untuk memproduksi etanol. Dan laju produksi etanol masih lebih tinggi daripada laju penguraian/degradasi etanol menjadi produk lanjutan. Maka dapat disimpulkan disini bahwa pada jumlah substrat 1 gram proses sakarifikasi dan fermentasi serentak dengan menggunakan jumlah enzim dan *yeast* yang sama lebih banyak menghasilkan konsentrasi bioetanol dibanding jumlah substrat 0,75 dan 0,5 gram.

Dari Gambar 5.7 dapat dilihat bahwa bioetanol sudah terbentuk pada waktu SFS 6 sampai 72 jam. Pada penggunaan jumlah substrat *reject pulp* 0,5 gram, konsentrasi bioetanol tertinggi diperoleh pada waktu 24 jam yaitu sebesar 5,35 gr/L. Selanjutnya pada waktu 48 jam, konsentrasi bioetanol terus menurun menjadi 2,28 gr/L hingga tidak terdeteksi lagi adanya bioetanol yang terbentuk pada 72 dan 96 jam. Penambahan jumlah *reject pulp* menjadi 0,75 gram, menghasilkan konsentrasi bioetanol tertinggi pada waktu 6 jam yaitu sebesar 4,75 gr/L. Kemudian terjadi penurunan konsentrasi bioetanol pada waktu 12 dan 24 jam. Kenaikan konsentrasi bioetanol kembali terjadi pada 48 jam menjadi 4,07 gr/L dan akhirnya kembali mengalami penurunan hingga tidak ada lagi bioetanol yang dapat terdeteksi pada 96 jam. Pada penggunaan jumlah *reject pulp* 1 gram, konsentrasi bioetanol tertinggi diperoleh pada waktu SFS 12 jam yaitu sebesar 4,79 gr/L. Konsentrasi bioetanol tidak mengalami penurunan yang signifikan sampai 48 jam, tetapi pada jam ke 72 dan 96 tidak terdeteksi lagi adanya bioetanol yang dihasilkan.

Penurunan konsentrasi bioetanol sebelum mencapai konsentrasi optimum yang diperoleh pada tiap variabel jumlah substrat *reject pulp* ini disebabkan karena laju proses hidrolisis yang lebih rendah dibandingkan laju fermentasinya. Saat laju fermentasi yang cepat dan kondisi kekurangan substrat gula untuk proses fermentasi, sebagian *yeast Pichia stipitis* cenderung untuk mengkonsumsi bioetanol. Bioetanol dengan bantuan oksigen yang masih terdapat dalam fermentor mengalami reaksi lanjut membentuk asam asetat dan air.



Pembentukan asam asetat akan mempengaruhi kondisi pH proses hidrolisis sehingga terjadinya penurunan aktifitas enzim setelah aktifitas puncaknya. Pengaruh dari terdapatnya senyawa kimia yang masih tersisa pada *reject pulp* dan bioetanol yang terbentuk pada proses persiapan inokulum juga berperan sebagai inhibitor yang dapat menghambat proses hidrolisis enzim pada SFS (Sun dan Cheng, 2002). Terhambatnya proses hidrolisis menyebabkan tidak terbentuknya lagi monomer gula yang berperan sebagai substrat untuk fermentasi.

Penambahan konsentrasi substrat *reject pulp* tidak menyebabkan terjadinya hasil optimal pembentukan bioetanol. Hasil konsentrasi bioetanol optimum diperoleh pada jumlah *reject pulp* 0,5 gram dan waktu SFS 24 jam yaitu sebesar 5,35 gr/L (Gambar 5.7). Pada waktu yang sama konsentrasi bioetanol yang diperoleh pada jumlah *reject pulp* 0,75 dan 1 gram masing-masing sebesar 3,58 dan 4,2 gr/L. Ditinjau dari proses hidrolisis, penambahan jumlah *reject pulp* tanpa mengubah jumlah enzim menyebabkan semakin banyaknya jumlah *reject pulp* yang harus dihidrolisis, sementara enzim memiliki keterbatasan dalam aktifitasnya. Hasil konsentrasi bioetanol optimum pada 0,5 gr, membuktikan bahwa proses hidrolisis optimum terjadi pada perbandingan jumlah enzim dan *reject pulp* 1 : 10.

## 5.8 Konversi *Reject Pulp* menjadi Bioetanol

Hasil perhitungan konversi *reject pulp* menjadi bioetanol menggunakan proses SSF dapat dilihat pada **Tabel 5.16** s/d **Tabel 5.18** berikut.

**Tabel 5.16** Hasil Konversi *Reject Pulp* Menjadi Bioetanol dengan Proses SSF dengan enzim selulase

Waktu SSF (jam)	Konversi Bioetanol (%)		
	Massa <i>Reject Pulp</i> 0,5 gram	Massa <i>Reject Pulp</i> 0,75 gram	Massa <i>Reject Pulp</i> 1 gram
6	31,74%	19,58%	12,49%
12	25,14%	15,44%	12,10%
24	21,67%	10,82%	10,18%
48	0%	0%	5,64%
72	0%	0%	0%
96	0%	0%	0%

Konversi *reject pulp* menjadi bioetanol tertinggi pada Proses SSF dengan enzim selulase dengan menggunakan massa *reject pulp* 0,5 gram yaitu 31,74% membutuhkan waktu 6 jam. Pada penggunaan massa *reject pulp* yang lebih tinggi, konversi menjadi bioetanol semakin menurun. Pada waktu SSF 48 jam bioetanol tidak lagi terdeteksi untuk variabel massa *reject* 0,5 dan 0,75 gram. Penurunan konversi *reject pulp* pada penelitian ini diduga karena adanya faktor-faktor yang menghambat proses sakarifikasi *reject pulp* menjadi glukosa, seperti kerusakan enzim, adanya lignin dan ekstraktif serta kondisi operasi pada proses SSF tidak pada kondisi optimum. Namun, pada prinsipnya proses fermentasi glukosa menjadi bioetanol menggunakan *yeast Pichia stipitis* berjalan dengan baik.

Dari Tabel 5.17 Konversi *Reject Pulp* Menjadi Bioetanol dengan Proses SSF dengan enzim selulase dan xylanase didapat bahwa persentase konversi *reject pulp* menjadi bioetanol tertinggi pada setiap konsentrasi *reject pulp* dalam volume tetap larutan SFS tetap, berturut-turut sebesar 21,75%; 15,16%; 15,19%. Pada

penggunaan massa reject pulp yang semakin tinggi, pada setiap jamnya justru mengalami fluktuasi perubahan nilai konversi yang dihasilkan. Fluktuasi yang dihasilkan diduga karena adanya faktor-faktor yang menghambat proses sakarifikasi reject pulp menjadi glukosa dan xilosa, seperti kerusakan yang terjadi pada sebagian enzim, adanya senyawa kimia yang masih tersisa didalam reject pulp serta kondisi operasi yang tidak optimum. Namun, pada prinsipnya proses fermentasi glukosa dan xilosa menjadi bioetanol menggunakan yeast *pichia stipitis* berjalan baik.

**Tabel 5.17** Hasil Konversi *Reject Pulp* Menjadi Bioetanol dengan Proses SSF dengan enzim selulase dan xylanase

Waktu SSF (jam)	Konversi Bioetanol (%)		
	Massa <i>Reject Pulp</i> 0,5 gram	Massa <i>Reject Pulp</i> 0,75 gram	Massa <i>Reject Pulp</i> 1 gram
6	21,75%	15,16%	9,63%
12	14,87%	11,65%	15,19%
24	14,35%	13,11%	8,19%
48	0%	9,02%	0%
72	0%	0%	0%
96	0%	0%	0%

**Tabel 5.18** Hasil Konversi *Reject Pulp* Menjadi Bioetanol dengan Proses SSF dengan enzim selulase dan xylanase

Waktu SSF (jam)	Konversi Bioetanol (%)		
	Massa <i>Reject Pulp</i> 0,5 gram	Massa <i>Reject Pulp</i> 0,75 gram	Massa <i>Reject Pulp</i> 1 gram
6	31,74%	19,58%	12,49%
12	25,14%	15,44%	12,10%
24	21,67%	10,82%	10,18%
48	0%	0%	5,64%
72	0%	0%	0%
96	0%	0%	0%

Dari **Tabel 5.18** Hasil Konversi *Reject Pulp* Menjadi Bioetanol dengan Proses SSF dengan enzim selulase dan xylanase, konversi *reject pulp* menjadi bioetanol tertinggi dengan menggunakan massa *reject pulp* 0,5 gram yaitu 31,74% membutuhkan waktu 6 jam. Pada penggunaan massa *reject pulp* yang lebih tinggi, konversi menjadi bioetanol semakin menurun. Pada waktu SSF 48 jam bioetanol tidak lagi terdeteksi untuk variabel massa *reject* 0,5 dan 0,75 gram. Penurunan konversi *reject pulp* pada penelitian ini diduga karena adanya faktor-faktor yang menghambat proses sakarifikasi *reject pulp* menjadi glukosa, seperti kerusakan enzim, adanya lignin dan ekstraktif serta kondisi operasi pada proses SSF tidak pada kondisi optimum. Namun, pada prinsipnya proses fermentasi glukosa menjadi bioetanol menggunakan yeast *Pichia stipitis* berjalan dengan baik.

### **5.9 Perbandingan Konsentrasi Bioetanol dalam Penelitian ini dengan Penelitian sebelumnya**

Konsentrasi bioetanol dengan proses Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak (SSF) dapat dibandingkan dengan proses Sakarifikasi dan Ko-Fermentasi Serentak (SSKF) menggunakan *reject pulp* sebagai bahan dasar dapat dilihat pada Tabel 5.19. Dari Tabel 5.19 dapat dilihat bahwa penggunaan *pichia stipitis* untuk proses fermentasi gula secara langsung menghasilkan konsentrasi bioetanol yang lebih tinggi dibandingkan penggunaannya pada proses SKFS maupun SFS. Fermentasi gula murni menggunakan yeast *pichia stipitis* menghasilkan konsentrasi bioetanol paling besar yaitu 30,23 g/L dengan waktu optimum 72 jam, hal ini dikarenakan gula murni yang menjadi substrat utama langsung difermentasi sehingga fermentasi berlangsung sesuai jumlah substrat yang tersedia pada awal proses.

Sementara pada proses SFS dan SKFS dibutuhkan waktu terlebih dahulu untuk substrat bahan baku menjalani proses hidrolisis untuk menghasilkan monomermonomer gula. Proses fermentasi baru akan berjalan pada saat substrat bahan baku yang mengandung komponen polisakarida telah diubah dalam bentuk monomer-monomer gulanya. Gangguan dari inhibitor pada saat hidrolisis dapat

mempengaruhi jumlah gula yang terbentuk sehingga proses fermentasinya tidak berlangsung optimum karena kekurangan substrat gula monosakarida.

**Tabel 5.19** Perbandingan Konsentrasi Bioetanol pada Proses Fermentasi, SSF dan SSKF

Variabel	Rouhollah,2007	Lianti, 2009	Mulyono, 2011	Penelitian ini	Penelitian ini	Penelitian ini
	Fermentasi	(SSF)	(SSKF)	(SSF)	(SSF)	(SSF)
Bahan baku	gula	<i>reject pulp</i>	<i>reject pulp</i>	<i>reject pulp</i>	<i>reject pulp</i>	<i>reject pulp</i>
Ukuran Reject Pulp (mesh)	-	Dihaluskan tanpa penyeragaman	20-40 40-60 60-80	60-80	60-80	60-80
Volum larutan (ml)	100	6,75	27,5	27,5	27,5	27,5
Enzim	-	<i>Selulase dan xilanase</i>	<i>Selulase, xilanase dan selubiose</i>	<i>Selulase</i>	<i>Selulase dan xilanase</i>	<i>Selulase, xilanase dan selubiose</i>
Enzim/substrat* (gr/gr)	-	0,025/0,25	0,05/0,5	0,05/0,5 0,05/0,75 0,05/1	0,05/0,5 0,05/0,75 0,05/1	0,05/0,5 0,05/0,75 0,05/1
Yeast	<i>Pichia stipitis</i>	<i>Saccharomyces cereviceae</i>	<i>Saccharomyces cereviceae dan Pichia stipitis</i>	<i>Pichia stipitis</i>	<i>Pichia stipitis</i>	<i>Pichia stipitis</i>
<i>Optical density</i>	-	-	**0,21 *** 0,24	0,617	0,617	0,617
pH medium	4,5	4; 4,5; 5; 5,5 dan 6	5	5	5	5
Waktu optimum (jam)	72	96	48	12	12	24
Konsentrasi bioetanol maksimum (gr/L)	30,33	9,7	13,04	5,77	5,25	5,35

\*massa masing-masing enzim didalam substrat, \*\* *Saccharomyces cereviceae*, \*\*\* *Pichia stipitis*

Penyeragaman ukuran sangat berpengaruh pada lama waktu yang dibutuhkan unntuk sebuah proses sakarifikasi dan fermentasi serentak. Lianti (2009), melakukan proses SFS dengan bahan baku *reject pulp* yang telah dihaluskan tanpa adanya penyeragaman ukuran dengan bantuan fermentor *Saccharomyces cereviceae* dan didapat konsentrasi etanol maksimum 9,7 g/L pada waktu 92 jam, jauh lebih lama bila dibandingkan penelitian ini yang menggunakan fementor *Pichia stipitis*. hal ini disebabkan oleh enzim dan yeast yang mengalami kesulitan dalam mengakses bahan baku untuk melakukan proses

hidrolisis dan fermentasi akibat distribusi bahan baku dan luas permukaan yang tidak merata.

Penelitian ini melakukan variasi konsentrasi substrat *reject pulp*. Dimana variasi ini belum pernah dilakukan pada penelitian-penelitian sebelumnya. Lianti (2009) dan Mulyono (2011) melakukan penelitian dengan perbandingan konsentrasi enzim terhadap substrat yang tetap yaitu 1:10. Penelitian ini memvariasikan jumlah *reject pulp* terhadap jumlah enzim yang tetap yaitu 1:10, 1:15, dan 1:20, dengan hasil konsentrasi bioetanol maksimum didapat pada nilai perbandingan enzim terhadap reject pulp berbeda-beda untuk variasi penggunaan kombinasi enzim. Penggunaan enzim selulase menghasilkan konsentrasi bioetanol 5,77 gr/L pada variasi 1: 10 (0,05 gram enzim terhadap 0,5 gram *reject pulp*). Penggunaan kombinasi enzim selulase dan xylanase menghasilkan konsentrasi bioetanol 5,25 gr/L pada variasi 1:20 (0,05 gram enzim terhadap 1 gram *reject pulp*). Proses hidrolisis yang berjalan tidak sempurna diduga juga ikut membentuk molekul selubiosa yang merupakan jenis disakarida hasil hidrolisis parsial, molekul selubiosa yang terbentuk akan mudah dihidrolisis lebih lanjut menggunakan enzim selubiase seperti pada penelitian Mulyono (2011).

Berdasarkan pengamatan nilai OD (*optical density*), maka besarnya nilai yang ditampilkan juga berpengaruh terhadap konsentrasi etanol maksimum yang bisa dihasilkan. Pada volum larutan yang sama 27,5 ml, dengan OD *yeast* inokulum untuk *Saccharomyces cerevisiae* 0,21 dan *Pichia stipitis* 0,24 akan menghasilkan konsentrasi bioetanol yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan dengan nilai OD inokulum 0,617. hal ini mengindikasikan bahwa jumlah populasi *yeast* yang lebih banyak dan lebih rapat maka proses fermentasi akan berlangsung lebih cepat. Namun jika tidak diiringi laju hidrolisis yang seimbang maka *yeast* dalam usaha mempertahankan hidupnya akan cenderung mengkonsumsi etanol yang tersedia didalam proses metabolisme. Sehingga konsentrasi etanol yang ingin dicapai lebih tinggi justru semakin menurun.

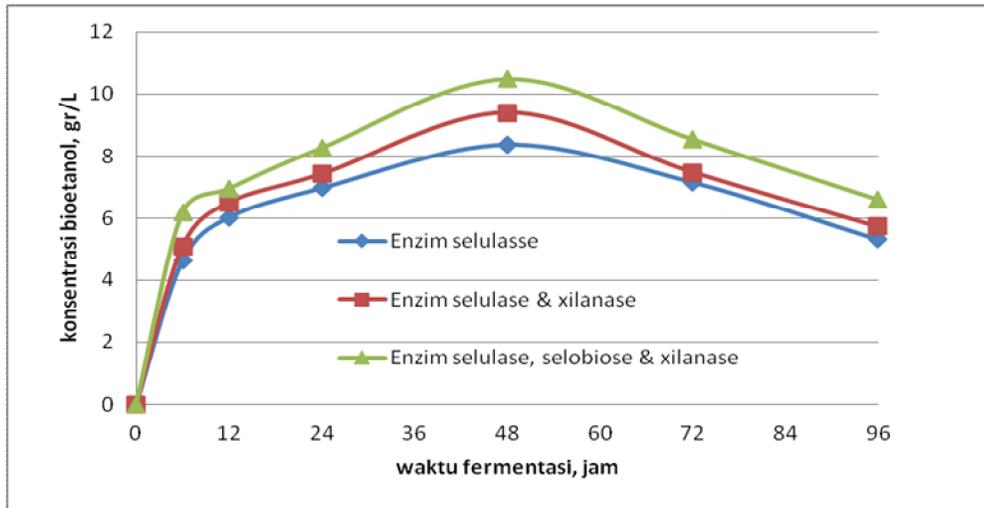
### 5.10 Hasil Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak Skala 10 Liter

Penggunaan enzim sangat mempengaruhi bioetanol yang terbentuk pada proses SKFS. Pada percobaan konversi reject pulp menjadi bioetanol dengan proses SKFS menggunakan biofermentor 10 L, variasi enzim yang digunakan adalah enzim selulase; enzim selulase dan xilanase; enzim selulase, selobiose dan xilanase. Data hasil analisa bioetanol pada biofermentor skala 10 Liter dapat dilihat pada **Tabel 5.20**. Profil konsentrasi bioetanol dari proses SKFS dengan variasi penggunaan enzim ditampilkan pada **Gambar 5.8**.

**Tabel. 5.20** Konsentrasi Etanol Hasil Proses SKFS Skala 10 Liter

Waktu SKFS (jam)	Konsentrasi Etanol (gr/L)		
	Enzim selulase	Enzim selulase & xilanase	Enzim selulase, selobiose & xilanase
0	0	0	0
6	4,62	5,08	6,18
12	6,03	6,51	6,96
24	6,98	7,43	8,27
48	8,38	9,39	10,47
72	7,17	7,49	8,55
96	5,32	5,73	6,61

Dari Gambar 4.8 dapat dilihat dengan menggunakan variasi 3 enzim selulase, xilanase dan selubiose menunjukkan hasil bioetanol dengan konsentrasi tertinggi untuk semua pengamatan waktu. Konsentrasi bioetanol tertinggi tercapai pada waktu fermentasi 48 jam dengan konsentrasi 10,47 gr/L. Penggunaan variasi dua enzim yaitu enzim selulase dan xilanase menghasilkan konsentrasi bioetanol tertinggi 9,39 gr/L dan untuk variasi satu enzim selulase menghasilkan konsentrasi bioetanol tertinggi 8,38 gr/L.



**Gambar 5.8** Hasil bioetanol pada Proses SKFS dengan Variasi Enzim menggunakan biofermentor 10 L

## BAB VI

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang sudah dilaksanakan maka dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

1. Penggunaan proses Sakarifikasi dan Ko-Fermentasi Serentak menghasilkan bioetanol dengan konsentrasi bioetanol yang lebih tinggi dibandingkan dengan proses SFS.
2. Konsentrasi bioetanol tertinggi yang dihasilkan melalui proses SKFS skala laboratorium dengan variasi enzim selulase dan xilanase mencapai konsentrasi etanol 12,410 g/L pada pH 4,5 jam ke-48 dengan konversi *reject pulp* menjadi bioetanol sebesar 68,255 %.
3. Konsentrasi bioetanol tertinggi yang dihasilkan melalui proses SKFS skala laboratorium dengan variasi enzim selulase, xilanase dan selubiose mencapai konsentrasi etanol 12,670 g/L pada pH 5 jam ke-48 dengan konversi *reject pulp* menjadi bioetanol sebesar 69,688%.
4. Konsentrasi bioetanol tertinggi yang dihasilkan melalui proses SKFS skala biofermentor 5 L dengan variasi enzim selulase, xilanase dan selubiose mencapai 10,97% menggunakan enzim selulase dengan waktu 72 jam.
5. Konsentrasi bioetanol tertinggi yang dihasilkan melalui proses SFS skala laboratorium dengan enzim selulase dan yeast *pichia stipitis* serta variasi massa substrat mencapai konsentrasi bioetanol 5,77 g/L pada jam ke-6.
6. Konsentrasi bioetanol tertinggi yang dihasilkan melalui proses SFS skala laboratorium dengan enzim selulase, enzim xylanase dan yeast *pichia stipitis* serta variasi massa substrat mencapai konsentrasi bioetanol 5,25 g/L pada jam ke-12.

7. Konsentrasi bioetanol tertinggi yang dihasilkan melalui proses SFS skala laboratorium dengan enzim selulase, enzim xylanase dan yeast *pichia stipitis* serta variasi massa substrat mencapai konsentrasi bioetanol 5,35 g/L pada jam ke-24.
8. Konsentrasi bioetanol tertinggi yang dihasilkan melalui proses SKFS skala biofermentor 10 L dengan variasi enzim selulase, xilanase dan selubiose mencapai 10,47% menggunakan enzim selulase dengan waktu 48 jam.

### **5.1 Saran**

Untuk pengembangan produksi bioetanol berbahan baku lignoselulosa, lebih lanjut perlu melakukan variasi suhu proses, variasi jumlah enzim yang digunakan, dan variasi konsentrasi inokulum khamir yang digunakan. Pengembangan bioreaktor dengan volume lebih besar juga perlu dilakukan untuk menguji kehandalan proses SFS dan SKFS dapat teruji. Berikutnya pengembangan tahap pemisahan perlu diuji coba agar bioetanol dapat dimurnikan dengan cara destilasi untuk meningkatkan kemurnian bioetanol yang dihasilkan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anindyawati, T, 2009, Prospek Enzim dan Limbah Lignoselulosa untuk Produksi Bioetanol, Pusat Penelitian Bioteknologi, LIPI.
- Aryanti, 2009, Pengolahan Bioetanol dari Berbagai Bahan Baku. *Simposium nasional lingkungan 2009*.
- Brunow, G., Karhunen, P., Lundquist, K., Olson, S. dan Stomberg, R. 1995, "Investigation of Lignin Models of the Biphenyl Type by X-Ray Crystallography dan NMR Spectroscopy". *J. Chem. Crystallogr.* 25, 1-10.
- Budiani, A., Riza, A., Putranto., Minarsih, H., Fitranti, N., Santoso, D., 2009. "Kloning gen penyandi -1,6-glukanase kapang secara cepat dengan teknik RT-PCR menggunakan primer spesifik". *Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia*, Bogor.
- Chairul dan Edy, S., 2009. Hidrolisa *Reject Pulp* Menjadi Glukosa Menggunakan Katalis Asam Sulfat: Pengaruh Temperatur Dan Waktu, Prosiding Seminar Nasional ke-2 Added Value of Energy Resources (AVoER) 2009 29 – 30 Juli 2009.
- Connerly, P, 2007, A Series of Experiments Investigation Yeast Growth and Protein Composition, Natural Science and Mathematics Division, Indiana University East.
- Dimitriu, S, 2005, Polysaccharides, Marcel Dekker, Inc.
- Fengel, D. dan G. Wegener, 1984, Kayu, Kimia Ultra Struktur dan Reaksi-reaksi, Gajah Mada Universitas Press.
- Gozan, M., Samsuri, M., Mardias, R., Baiquni, M., Hermansyah, H., Wijanarko, A., . Prasetya, B., dan Nasikin M., 2007, "Sakarifikasi Dan Fermentasi Bagas Menjadi Ethanol Menggunakan Enzim Selulase Dan Enzim Sellobiase". *Jurnal teknologi*, 3: 209-215.
- Gozan, M., Samsuri, M., Hermansyah, H., Prasetya, B., dan Nasikin M.. 2006. *Ethanol Propduction from Bagase with Combination of Cellulase-Cellubiase in Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) using white Rot Fungi Pre-Treatment*. Journal Chemical and Natural Resources Engineering, University Teknologi Malaysia.
- Haagensen, F, 2006, *Enzymes for Biomass and Forestry*, Novozymes North
- Iskandar, M, 2010, *Outlook Energi Indonesia 2010*. Jakarta : BPPT.
- Kadar, Z., Szengyel, Z., and Reczey, K., 2004. "Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol". *Ind. Crop.Prod.* 20, 103-110.
- Kirk, J., dan Othmer, 1994, Encyclopedia of Chemical Technology. *Vol. 10 Fourth Edition*, John Wiley and Sons, Inc
- Kussuryani, Y. dan Anwar, C., 2009, "Aplikasi SNI 7390: 2008, Analisa Bioetanol dan Campurannya dengan Bensin", *Penelitian pada LEMIGAS*, Jakarta.

- Latifah, S., 2008. "Sakarifikasi Dan Fermentasi Serentak Untuk Produksi Bioetanol Dari Hasil Samping Industri Gula". *Skripsi*. Fakultas teknik, Universitas Riau, Pekanbaru
- Lee, S. S., J.K.Ha., H.S. Kang., T.Mc. Alister. and K.J. Cheng., 1997, "Overview of Energy Metabolism, Substrate Utilization and Fermentation Characteristics of Ruminant Anaerobic Fungi", *Korean J. Anim Nut, Feedstuffs* 21:295-314.
- Lianti, N. 2009. "Sakarifikasi Dan Fermentasi Serentak Untuk Produksi Bioetanol Dari Reject Pulp Dengan Menggunakan Enzim Selulase Dan Enzim Xylanase". *Skripsi*. Fakultas teknik, Universitas Riau, Pekanbaru.
- Meryandini, A., Widhyastuti, N., dan Lestari, Y., 2008. "Pemurnian dan Karakterisasi Xilanase *Streptomyces* sp. Skk1-8". *Makara Sains*, vol 12 :55-60.
- Mulyanto., Widjaja, T., Hakim, A., dan Frastiawan, E., 2009. "Produktivitas Etanol dari Molases dengan Proses Fermentasi Kontinyu Menggunakan *Zymomonas mobilis* dengan Teknik Immobilisasi Sel karaginan dalam Bioreaktor Packed-bed". *Laboratorium Teknologi Biokimia* Jurusan Teknik Kimia FTI-ITS Kampus ITS Sukolilo, Surabaya.
- Mulyono, T, 2011, Variasi Ukuran Partikel Reject Pulp pada Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak untuk Produksi Bioetanol, *Laporan Penelitian*, Fakultas Teknik Universitas Riau Pekanbaru.
- OPEC (2009) *Annual Statistical Bulletin 2008*, Organization of the Petroleum Exporting Countries.
- PT. RAPP, 2008, *Produksi Pulp dan Komposisi Reject Pulp PT. RAPP*. Komunikasi internal dengan Unit Digerster PT. RAPP. Pangkalan Kerinci.
- Rachmaniah, O., Febriyanti Lisa, S., dan Lazuardi, K., 2009, "Pengaruh *Liquid Hot Water* terhadap Perubahan Struktur Sel Bagas". *Teknologi Industri*, ITS.
- Richana, N., 2002. "Produksi dan Prospek Enzim Xilanase dalam Pengembangan Bioindustri di Indonesia". *Buletin AgroBio* 5 : 29-36
- Rifai, M, 2011, Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak *Reject Pulp* Menjadi Bioetanol Menggunakan Enzim Selulase dan Xilanase serta Kombinasi *Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipitis*, *Laporan Penelitian*, Fakultas Teknik Universitas Riau, Pekanbaru.
- Rismijana, J., Indriani Naomi, I dan Pitriyani, T. 2003., "Penggunaan Enzim Selulase-Hemiselulase pada Proses Deinking Kertas Koran Bekas". *Jurnal Matematika dan Sains* 8 : 67-71.
- Riyanti. E. I., 2009. "Biomassa Sebagai Bahan Baku Bioetanol". *Jurnal Litbang Pertanian*, 28: 101-110.
- Rouhollah, H., iraj, N., giti, E., And sorah, A., 2007. "Mixed sugar fermentation by *pichia stipitis*, *sacharomyces cerevisiae*, and an isolated xylose fermenting *kluveromyces marxianus* and their cocultures". *African Journal of biotechnologi*. Vol.6 (9) : 1110-1114.

- Sabki, 2009, "Sakarifikasi dan Fermentasi Limbah Reject Pulp Untuk Produksi Bioetanol Menggunakan Enzim Selulase, Xylanase dan Selubiase", *Laporan Penelitian*, Fakultas Teknik Universitas Riau Pekanbaru.
- Samsuri, M., Gozan, M., Mardias, R., Baiquni, M., Hermansyah, H., Wijanarko, A., Prasetya, B., dan Nasikin M., 2007, "Pemanfaatan Sellulosa Bagas untuk Produksi Ethanol Melalui Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak dengan Enzim Xylanase". *Makara teknologi*, vol 11 : 17-24.
- Saraswati., 2006, "Fermentasi Ethanol Menggunakan Bakteri Zymomonas Mobilis dari Glukosa Hasil Hidrolisa Enzimatik Bagas". *Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia Indonesia 2006*, Palembang.
- Sari, P, 2011, Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak untuk Produksi Bioetanol dari Limah Industri *Pulp* dan *Paper*, *Laporan Penelitian*, Fakultas Teknik Universitas Riau Pekanbaru.
- Soerawidjaja Tatang Hernas., dkk. 2009. "Efektivitas Kombinasi Proses Perendaman Dengan Amoniak Dan Asam Pada Pengolahan Awal Biomassa Sebagai Bahan Mentah Pembuatan Bioetanol". Bandung.
- Soetrisnanto, D, 1999, Pembuatan Asam Sitrat dari Sagu dengan Cara Fermentasi pada Media Cair, Laporan Kegiatan, Fakultas Teknik Universitas Diponegoro.
- Sun, Y. and Cheng, J., 2002, "Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for Ethanol Production: A review", *Bioresource Technol*, 83(1), 1-11.
- Taherzadeh, M.J., dan Karimi, K., 2007. " Enzyme-Based Hydrolysis For Ethanol From Lignosellulosic Materials: A Review, *BioResources* 2(4), 707-738.
- Takagi, M., Abe S., Suzuki S., Emert G. H. Yata N., 1977, *A method for production of ethanol directly from cellulose using cellulose and yeast*, Proceedings of Bioconversion symposium, Delhi, 551-571.
- TAPPI, 1996, *TAPPI Test Methods*, Atlanta: TAPPI Press.
- Wyman, C. E., 1996. *Handbook on Bioethanol: Production and Utilization*, Washington DC, Taylor & Francis.
- Yonita, D. 2009. "Hidrolisa *Reject Pulp* Menjadi Glukosa Menggunakan Katalis Asam Sulfat : Pengaruh Temperatur dan Waktu". *Skripsi*. Fakultas teknik, Universitas Riau, Pekanbaru.

**LAMPIRAN**  
**ARTIKEL SEMINAR NASIONAL**