II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bioetanol

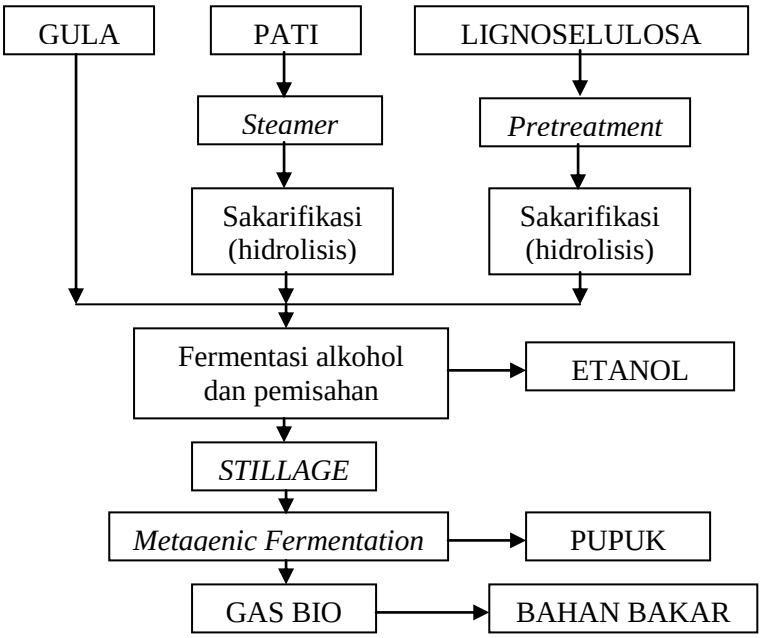
Bioetanol merupakan etanol yang dihasilkan dari fermentasi glukosa yang dilanjutkan proses destilasi. Bioetanol adalah cairan yang dihasilkan melalui proses fermentasi gula dari penguraian sumber karbohidrat dengan bantuan mikroorganisme. Bioetanol dapat diproduksi dari bahan baku pertanian seperti jagung, singkong, sorgum, kentang, gandum, tebu, bit, rumput laut dan juga limbah biomassa seperti tongkol jagung, limbah jerami, dan limbah sayuran lainnya (Anonim, 2007).

Bioetanolyang disebut juga etil alkohol dengan rumus kimianya C_2H_5OH atau CH_3CH_2OH mempunyai sifat fisika kimia tertentu. Bioetanol mempunyai titik didih 78,4^{0}C, tidak berwarna, mudah menguap (*volatile*), dapat bercampur dengan air, mudah terbakar, dan berbau tajam (menyengat).Bioetanol termasuk bahan berbahaya dan beracun (B3) dan memiliki spesific gravity 0,7851 pada suhu 200^{0}C. Bioetanol secarasifatkimia yaitu dapatbereaksisecaradehidrasi, dehidrogenasi, oksidasi, esterifikasi (Dea, 2009).

Berdasarkan bahan bakunya, ada dua jenis generasi yaitu bioetanol generasi pertama dan bioetanol generasi kedua. Bioetanol generasi pertama, bahan baku yang digunakan berasal dari bahan berpati yang berbasis bahan pangan (Rachmaniah *et al*., 2009). Bioetanol generasi kedua, bahan bakunya berasal dari

limbah biomassa (Sari, 2013). Bioetanol generasi pertama mulai dikembangkan di Indonesia, namun bioetanol generasi ini harganya masih relatif tinggi karena bahan bakunya juga digunakan sebagai bahan pangan dan pakan. Bahan baku yang berbasis bahan makanan akan mengakibatkan persaingan antara kebutuhan energi dengan kebutuhan pangan, dan terbentur penggunaan lahan yang luas untuk tanaman pangan tersebut. Untuk menurunkan harga dan menghindari konflik antar pangan dan energi, bioetanol generasi kedua perlu dikembangkan.

Bioetanol generasi kedua menggunakan bahan limbah biomassa. Limbah biomassa mempunyai jumlah cukup besar di Indonesia. Tahapan pembuatan bioetanol generasi kedua terdiri dari proses penghalusan, perlakuan awal (delignifikasi), hidrolisis (sakarifikasi), fermentasi, dan dilanjutkan proses destilasi (pemurnian). Perbedaan proses produksi bioetanol generasi pertama dan bioetanol generasi kedua dapat dilihat Gambar 1.



Gambar 1. Tahapan proses bioetanol berdasarkan bahan bakunya
Sumber : Anindyawati, 2009

Bioetanol memiliki beberapa kelebihan dibandingkan bahan bakar minyak. Bioetanol yang dikombinasikan dengan BBM terbukti dapat mengurangi emisi karbon monoksida dan asap lainnya dari kendaraan. Semakin sedikitnya sumber energi fosil yang ada di bumi dan semakin tingginya pencemaran lingkungan menjadi faktor utama dibutuhkannya energi alternatif yang lebih ramah lingkungan. Selain itu, etanol juga bisa terurai sehingga dapat mengurangi emisi gas buang berbahaya (Komarayati, 2010).

2.2 Tandan Kosong Kelapa Sawit

Tandan kosong kelapa sawit merupakan limbah utama dari industri pengolahan kelapa sawit yang jumlahnya sangat melimpah. TKKS tersebut memiliki potensi untuk diolah menjadi berbagai macam produk. Potensi pemanfaatan TKKS antara lain untuk kompos, pulp, bioetanol, dan serat (Yanti, 2013). Tandan kosong kelapa sawit (TKKS) dapat dilihat pada Gambar 2.

Gambar 2. Tandan kosong kelapa sawit
Sumber : Anonim, 2007

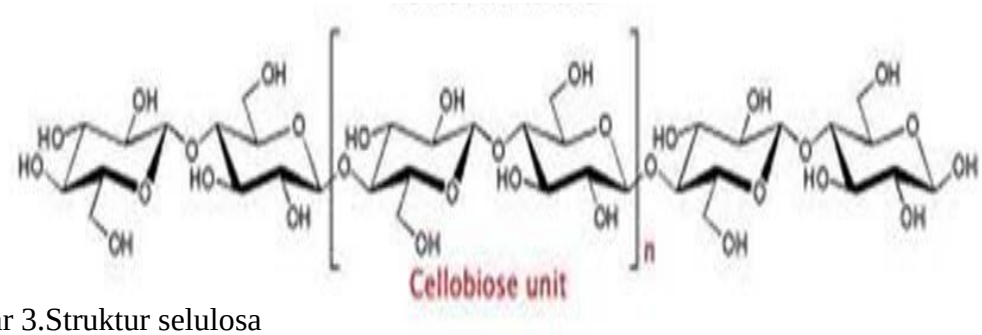
Komponen utama TKKS pada kelapa sawit ialah lignoselulosa (selulosa, hemiselulosa dan lignin). Data komponen lignoselulosa TKKS dari berbagai penelitian disajikan pada Tabel 1. Selulosa adalah rantai lurus homopolisakarida yang tersusun atas unit - unit D-glukosa. Hemiselulosa merupakan polisakarida yang berikatan dengan selulosa pada bagian tanaman yang telah mengalami delignifikasi. Lignin merupakan polimer fenolik dan relatif sulit didegradasi, karena polimer struktural yang berasosiasi dengan selulosa dan hemiselulosa.

Tabel 1. Komponen lignoselulosa tandan kosong kelapa sawit

Selulosa	Hemiselulosa	Lignin	Pustaka
45,95%	22,84%	16,49%	Darnoko, 1992
42,24 %	22,39 %	28,24%	Wibowo, 1994
45,95 %	22,84 %	16,49 %	Aryafatta, 2008
42,3 %	28,56 %	22,42 %	Widyasari, 2011
49,76 %	28,92 %	22,42 %	Feriandi, 2011 dan Yanti, 2013
50,13%	24,32%	24,15%	Caecilia, 2015 *)

*peneliti

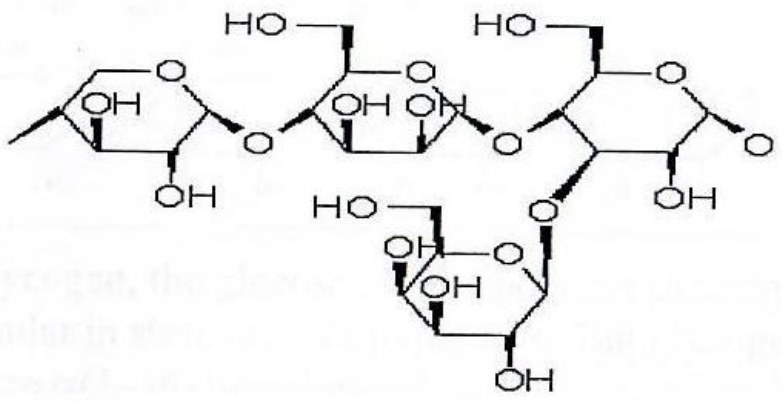
Kandungan selulosa TKKS berkisar antara 42,24%-50,13% (Tabel 1). Selulosa adalah salah satu komponen utama dari lignoselulosa yang terdiri dari unit monomer D-glukosa yang terikat pada ikatan 1,4-glikosidik. Selulosa cenderung membentuk mikrofibril melalui ikatan inter dan intra molekuler sehingga membentuk struktur yang larut. Mikrofibril selulosa terdiridari 2 tipe, yaitu kristalin dan amorf (Anindyawati,2009). Adapun struktur selulosa dapat dilihat dibawah ini :



Gambar 3.Struktur selulosa
Sumber : Hidayat, 2009

Hemiselulosa pada TKKS berkisar antara 22,39%-28,92% (Tabel 1). Hemiselulosa merupakan salah satu penyusun dinding sel tumbuhan selain selulosa dan lignin. Kandungan hemiselulosa yang merupakan polimer dari kompleks karbohidrat terdapat sekitar 25-30% (Perez *et al*., 2002). Hemiselulosa yang terdiri dari beberapa unit gula atau disebut heteropolisakarida, dan dikelompokkan berdasarkan residu gula utama sebagai penyusunnya seperti xylan, mannan, galactan dan glucan. Hemiselulosa terikat dengan polisakarida, protein dan lignin dan lebih mudah larut dibandingkan dengan selulosa (Anindyawati, 2009).

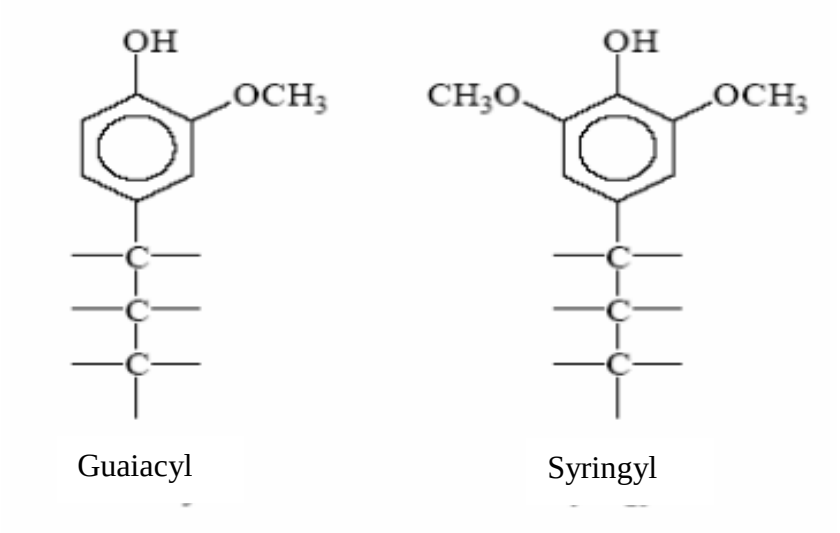
Hemiselulosa merupakan polisakarida non selulosa yang pokok dan terdapat dalam serat dengan berat molekul 4000-15000. Hemiselulosa merupakan polisakarida lain yang terdapat dalam serat dan tergolong senyawa organik. Hemiselulosa terdapat di dinding sel bersamaan dengan selulosa, terutama di daerah amorf dan juga dalam lamella tengah (Anindyawati,2009). Molekul hemiselulosa mudah menyerap air dan bersifat plastis, hidrofil, dan mempunyai permukaan kontak yang lebih luas antar molekul. Berikut adalah gambar struktur hemiselulosa yang disajikan dalam Gambar 4.



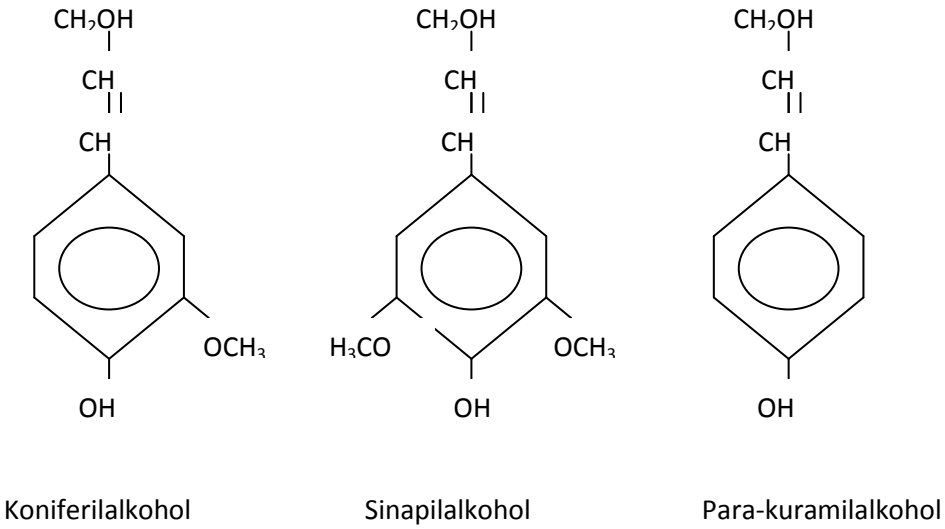
Gambar 4. Struktur hemiselulosa
Sumber : Hidayat, 2009

Lignin pada TKKS berkisar antara 16,49%-28,24% (Tabel 1). Lignin merupakan zat organik yang memiliki polimer terbanyak setelah selulosa dan merupakan komponen penting dalam tanaman. Lignin tersusun atas jaringan polimer fenolik yang berfungsi merekatkan serat selulosa dan hemiselulosa sehingga sangat kuat (Sun and Cheng, 2002). Lignin yang terdapat pada dinding sel sekunder tanaman sekitar 20-40%. Komponen lignin pada sel tanaman (monomer guasil dan siringil) berpengaruh terhadap pelepasan dan hidrolisis polisakarida (Anindyawati, 2009). Lignin sangat resisten terhadap degradasi baik secara biologi maupun kimia, karena kandungan karbon yang paling tinggi dibandingkan dengan selulosa dan hemiselulosa.

Struktur lignin sangat berbeda bila dibandingkan polisakarida karena terdiri atas sistem aromatik yang tersusun atas unit-unit fenilpropana: unit guaiacyl (G) dari prekusor trans-koniferil alkohol, unit syringyl (S) dari prekusor trans-sinapil alkohol, dan p-hidroksipenil (H) dari prekusor trans-p-koumaril alkohol. Adapun unit penyusun lignin dan struktur lignin pada Gambar 5 dan 6.



Gambar 5. Unit-unit penyusun lignin
Sumber : Ibrahim, 1998



Gambar 6. Struktur lignin
Sumber : Anonim, 2008

Lignin yang melindungi selulosa bersifat tahan terhadap hidrolisa disebabkan oleh adanya ikatan aril alkil dan ikatan eter. Lignin pada pemanasan suhu tinggi akan mengakibatkan perubahan struktur dengan membentuk asam format, methanol, aseton, asam asetat, vormil sedangkan bagian lainnya mengalami kondensasi (Loebis, 2008). Lignin merupakan polimer alami dan tergolong ke dalam senyawa rekalsitran karena tahan terhadap degradasi atau

tidak terdegradasi dengan cepat di lingkungan. Molekul lignin adalah senyawa polimer organik kompleks yang terdapat pada dinding sel tumbuhan dan berfungsi memberikan kekuatan pada tanaman. Lignin tersusun dari 3 jenis senyawa fenilpropanoid (Gambar 5), yaitu alkohol kumaril, alkohol koniferil dan alkohol sinapil. Ketiganya tersusun secara random membentuk polimer lignin yang amorfus (tidak beraturan). Kandungan lignin yang tinggi pada TKKS dan struktur lignin yang tidak teratur, menyebabkan kendala dalam pembuatan bietanol. Salah satu cara untuk menghilangkan senyawa lignin yang mengikat selulosa dan hemiselulosa adalah dengan dilakukan perlakuan awal.

2.3 Perlakuan Awal

Biomassa lignoselulosa memerlukan perlakuan awal (*pretreatment*) sebelum dihidrolisis menjadi gula dan difermentasi menjadi bioetanol. Perlakuan awal merupakan perlakuan pendahuluan terhadap bahan lignoselulosa sehingga mempermudah pelepasan hemiselulosa dan selulosa yang terikat kuat dengan lignin. Perlakuan awal dapat dilakukan secara fisik, kimia, biologis, ataupun kombinasi dari metode-metode itu. Penggunaan metode perlakuan awal telah dilakukan pada biomassa yang berbeda-beda, dan hasilnya bervariasi untuk setiap metode maupun jenis bahan yang digunakan (Isroi, 2013).

Perlakuan awal secara kimia yang biasa digunakan untuk delignifikasi biomassa adalah asam dan basa. Perlakuan awal basa biasanya menggunakan larutan seperti NaOH, $Ca(OH)_2$, dan amonia. Penggunaan perlakuan awal secara basa juga tergantung pada kandungan lignin yang terdapat dalam biomassa (Bjerre

et al., 1996). Perlakuan awal secara asam digunakan tergantung pada kandungan biomassa, karena perlakuan ini menggunakan asam sulfat dan asam klorida pekat. Penggunaan larutan asam pekat tidak ekonomis dalam aplikasi secara komersial karena asam pekat merupakan larutan beracun, korosif dan berbahaya (Sivers dan Zacchi, 1995).

Perlakuan awal secara biologi menggunakan mikroorganisme untuk menghilangkan lignin dan hemiselulosa. Mikroorganisme yang dapat mendegradasi lignin antaralain dari kelompok *Actinomycetes* yang dapat menghasilkan enzim ligninase, jamur *Aspergillus niger* yang dapat menghasilkan enzim xilanase (Gawande dan Kamat, 1999). Penggunaan perlakuan awal secara biologi memerlukan energi dan dampak lingkungan yang rendah, namun memerlukan waktu yang panjang (Sun and Cheng, 2002).

2.4 Hidrolisis Enzimatis

Hidrolisis merupakan proses pemecahan senyawa polisakarida di dalam biomassa lignoselulosa (selulosa dan hemiselulosa) menjadi monomer gula penyusunnya (glukosa dan xylosa). Secara umum teknik hidrolisis dibagi menjadi dua, yaitu hidrolisis berbasis asam dan hidrolisis enzim. Hidrolisis sempurna selulosa akan menghasilkan glukosa, sedangkan hemiselulosa menghasilkan beberapa monomer gula pentose (C5) dan heksosa (C6).

Hidrolisis enzim merupakan proses penguraian suatu polimer yang kompleks menjadi monomer penyusunnya dengan menggunakan enzim (Perez *et al*., 2002). Hidrolisis enzimatis memiliki keuntungan dibandingkan hidrolisis

asam, yakni tidak terjadi degradasi gula hasil hidrolisis, kondisi proses yang mudah (suhu dan pH rendah), berpotensi menghasilkan hasil yang tinggi dan biaya pemeliharaan relatif rendah karena tidak menggunakan bahan korosif (Taherzadeh and Karimi, 2008). Kelemahan hidrolisis enzimatis adalah waktu hidrolisis yang digunakan lebih lama, kerja enzim dihambat oleh produk, dan harga enzim yang lebih mahal dibandingkan dengan asam sulfat. Hidrolisis enzimatis merupakan teknologi yang paling sering digunakan oleh peneliti dalam mengkonversi biomassa menjadi gula reduksi yang selanjutnya dapat dikonversi menjadi bioetanol (Ikhsan *et al*., 2008).

Enzim adalah biomolekul berupa protein yang berfungsi sebagai katalis (senyawa yang mempercepat proses reaksi tanpa habis bereaksi) dalam suatu reaksi kimia organik. Selulase adalah enzim kompleks yang mampu memutuskan ikatan glikosidik β-1,4 (Winarno, 1984). Beberapa faktor yang mempengaruhi aktivitas enzimselulase adalah konsentrasi enzim, konsentrasi substrat, pH, suhu dan senyawa penghambat. Pada umumnya terdapat hubungan optimum antara konsentrasi enzim dan substrat bagi aktivitas maksimum. Enzim berfungsi secara optimum pada pH dan suhu tertentu (Muljono *et al*.dalam Ira, 1991).

Menurut Septiyani (2011) hidrolisis enzimatik yang sempurna dengan enzim selulase memerlukan aksi sinergis dari tiga tipe enzim ini, yaitu :

1. Endo-1,4-β-D-glucanase (endoselulase, carboxymethyl cellulase atau CMCase), yang mengurai polimer selulosa secara random padaikatan internal α-1,4-glikosida untuk menghasilkan oligodekstrin dengan panjang rantai yang bervariasi.

2. Exo-1,4-β-D-glucanase (cellobiohydrolase), yang mengurai selulosa dari ujung pereduksi dan non pereduksi untuk menghasilkan selobiosa dan atau glukosa.
3. β–glucosidase (cellobiase), yang mengurai selobiosa untuk menghasilkan glukosa.

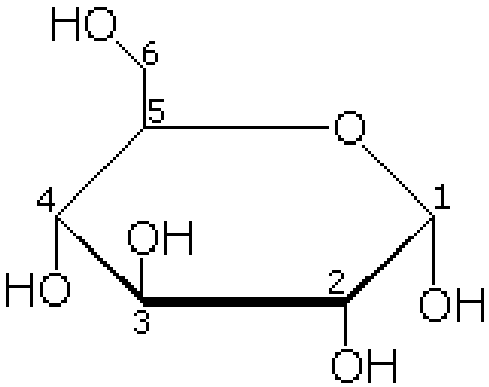
Mekanisme kerja enzim yaitu substrat terikat ke enzim secara *reversible*, membentuk kompleks enzim-substrat. Enzim kemudian mengatalisasi reaksi kimia dan melepaskan produk (Poedjiati, 1994). Menurut Poedjiati (1994), enzim dapat mempercepat suatu reaksi 10^8 sampai 10^{11} kali dengan menurunkan energi aktivasi suatu reaksi kimia pada suhu dan tekanan yang rendah. Secara teoritis, konsentrasi enzim berbanding linear dengan kecepatan reaksinya. Semakin tinggi konsentrasi enzim yang digunakan maka semakin cepat proses hidrolisis selulosa, namun pada konsentrasi tertentu enzim tidak lagi memberikan kecepatan reaksi melebihi V_{max}nya (Mandels *et al.* dalam Septiyani, 2011).

2.5 Gula Reduksi

Gula reduksi merupakan jenis gula yang mampu mereduksi beberapa jenis ion seperti perak dan tembaga. Sifat mereduksi ini disebabkan oleh adanya gugus hidroksil, aldehid atau keton bebas dalam molekul karbohidrat (gula). Karbohidrat yang termasuk dalam gula reduksi adalah semua jenis monosakarida dan beberapa disakarida yang masih memiliki gugus hidroksil, aldehid atau keton bebas pada atom C_1nya (Poedjiati, 1994).

Salah satu monosakarida yang termasuk gula reduksi adalah glukosa. Glukosa ($C_6H_{12}O_6$berat molekul 180.18) adalah heksosa-monosakarida yang

mengandung enam atom karbon. Glukosa merupakan aldehida (mengandung gugus -CHO). Struktur glukosa terdapat pada Gambar 7. Lima karbon dan satu oksigennya membentuk cincin yang disebut cincin piranosa, bentuk paling stabil untuk aldosa berkarbon enam. Dalam cincin ini, tiap karbon terikat pada gugus samping hidroksil dan hidrogen kecuali atom kelimanya, yang terikat pada atom karbon keenam di luar cincin, membentuk suatu gugus CH_2OH. Struktur cincin ini berada dalam kesetimbangan dengan bentuk yang lebih reaktif.



Gambar 7. Struktur glukosa (α-D-glukopiranosa)
Sumber : Anonim, 2009