

**OPTIMASI PRODUKSI BIOETANOL DARI TANDAN
KOSONG KELAPA SAWIT MENGGUNAKAN METODE
SAKARIFIKASI DAN FERMENTASI SERENTAK**

(Skripsi)

Oleh

ROSI MAULIANA SARI



**FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2016**

ABSTRACT

OPTIMIZATION OF BIOETHANOL PRODUCTION FROM EMPTY PALM FRUIT BUNCH USING SIMULTANEOUS SACCHARIFICATION AND FERMENTATION METHOD

By

ROSI MAULIANA SARI

Empty palm fruit bunch (EPFB) - a waste of the palm oil industry - contains high cellulose and hemicellulose (holocellulose). EPFB can be potentially used as raw materials of bioethanol production. One of the effective and efficient methods for secondary bioethanol production is simultaneous saccharification and fermentation method (SSF). The purpose of this research was to find out the optimum conditions of SSF substrate concentration, cellulase concentration, and starter concentration for producing bioethanol from EPFB holocellulose. The experimental design used in this research was a response surface method (RSM) with 2^3 factorial consisting of 3 factors, namely EPFB holocellulose concentrations (3,3; 5; 7,5; 10; and 11,7% (w/v)), cellulase concentration (16,6; 20; 25; 30; and 33,4 FPU), and *Saccharomyces cerevisiae* concentration (5,8; 7,5; 10; 12,5; and 14,2% (v/v)). The SSF process was carried out at 38⁰C and 150 rpm for 72 hours. After 72 hours, the filtrate was taken and

analyzed to determine ethanol content, reduced sugar content, and total *S. cerevisiae* colony. The collected data were analyzed to find out the optimum condition of SSF. The optimum condition of the SSF was not found out yet. The best SSF conditions occurred at the substrate concentration of 10%, enzyme concentration of 30 FPU, and *S. cerevisiae* starter concentration of 12,5%. These conditions yielded the highest ethanol content (0.812%), with residual reduced sugar of 18,164 g/L and total colonies of *S. cerevisiae* as much as 5,58 log (colonies/mL).

Keywords : Empty palm fruit bunch, bioethanol, SSF, cellulase, *Saccharomyces cerevisiae*.

ABSTRAK

OPTIMASI PRODUKSI BIOETANOL DARI TANDAN KOSONG KELAPA SAWIT MENGGUNAKAN METODE SAKARIFIKASI DAN FERMENTASI SERENTAK

Oleh

ROSI MAULIANA SARI

Tandan kosong kelapa sawit (TKKS) - limbah dari industry kelapa sawit – mengandung selulosa dan hemiselulosa (holoselulosa) tinggi. TKKS dapat berpotensi digunakan sebagai bahan baku produksi bioetanol. Salah satu metode yang efektif dan efisien untuk produksi bioetanol kedua yaitu metode simultan sakarifikasi dan fermentasi (SSF). Tujuan penelitian ini yaitu untuk mengetahui kondisi optimum SSF konsentrasi substrat, konsentrasi enzim selulase dan konsentrasi starter untuk memproduksi bioetanol dari holoselulosa TKKS. Rancangan percobaan yang digunakan pada penelitian ini yaitu metode permukaan respon (RSM) secara faktorial 2^3 yang terdiri dari 3, yaitu konsentrasi holoselulosa TKKS (3,3; 5; 7,5; 10; dan 11,7% (b/v)), konsentrasi selulase (16,6; 20; 25; 30; dan 33,4 FPU), dan konsentrasi *S. cerevisiae* (5,8; 7,5; 10; 12,5; dan 14,2% (v/v)). Proses SSF dilakukan pada suhu 38⁰C dan goyangan 150 rpm selama 72 jam. Setelah 72 jam, filtrat diambil dan dianalisa untuk menentukan

kadar etanol, kadar gula reduksi, dan total koloni *S. cerevisiae*. Data yang terkumpul dianalisis untuk mengetahui kondisi SSF yang optimum. Kondisi optimum belum ditemukan pada penelitian ini. Kondisi SSF terbaik terjadi pada konsentrasi substrat 10%, konsentrasi enzim 30 FPU, dan konsentrasi starter *S. cerevisiae* 12,5%. Kondisi ini menghasilkan kadar etanol tertinggi yaitu 0,812% (v/v) dengan sisa gula reduksi sebanyak 18,164 g/L dan total koloni *S. cerevisiae* sebanyak 5,58 log (koloni/mL).

Kata kunci : Tandan kosong kelapa sawit, bioetanol, SSF, selulase, *Saccharomyces cerevisiae*.

**OPTIMASI PRODUKSI BIOETANOL DARI TANDAN
KOSONG KELAPA SAWIT MENGGUNAKAN METODE
SAKARIFIKASI DAN FERMENTASI SERENTAK**

Oleh

ROSI MAULIANA SARI

Skripsi

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar
SARJANA TEKNOLOGI PERTANIAN**

pada

**Jurusan Teknologi Hasil Pertanian
Fakultas Pertanian Universitas Lampung**



**FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2016**

Judul Skripsi : **OPTIMASI PRODUKSI BIOETANOL
DARI TANDAN KOSONG KELAPA SAWIT
MENGUNAKAN METODE
SAKARIFIKASI DAN FERMENTASI
SERENTAK**

Nama Mahasiswa : **Rosi Mauliana Sari**

Nomor Pokok Mahasiswa : **1114051050**

Program Studi : **Teknologi Hasil Pertanian**

Fakultas : **Pertanian**



MENYETUJUI
1. Komisi Pembimbing

Ir. Sutikno, M.Sc., Ph.D.
NIP 19560114 198603 1 002

Ir. Marniza, M.Si.
NIP 19650705 199003 2 001

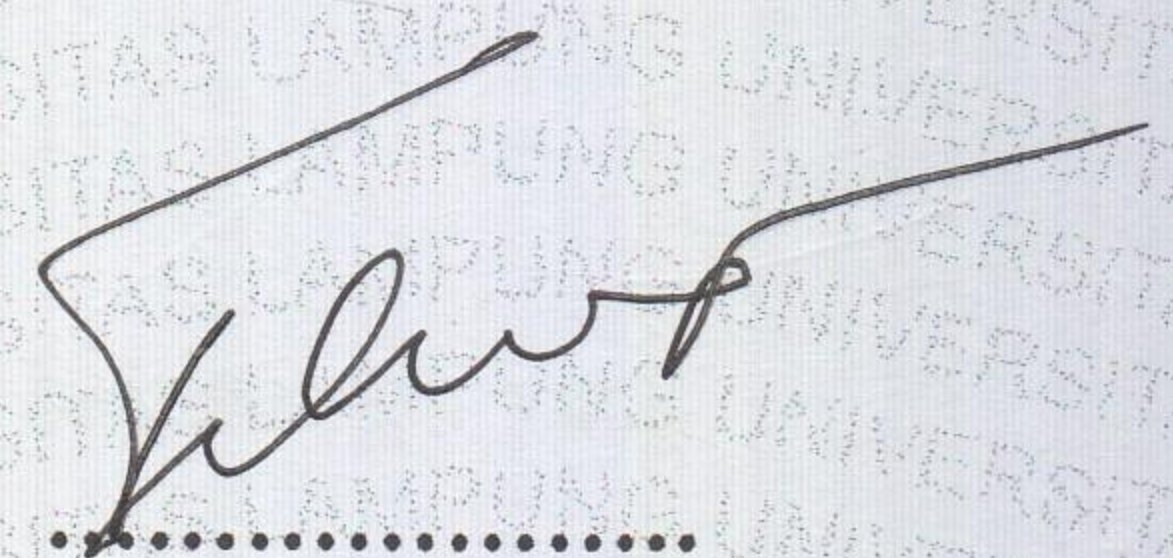
2. Ketua Jurusan

Ir. Susilawati, M.Si.
NIP 19610806 198702 2 001

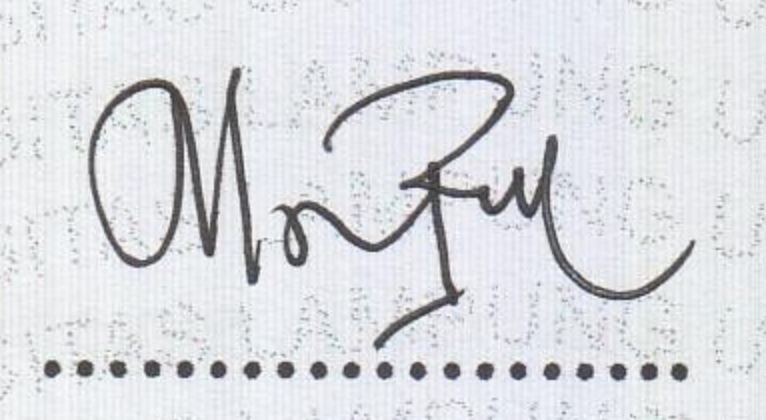
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

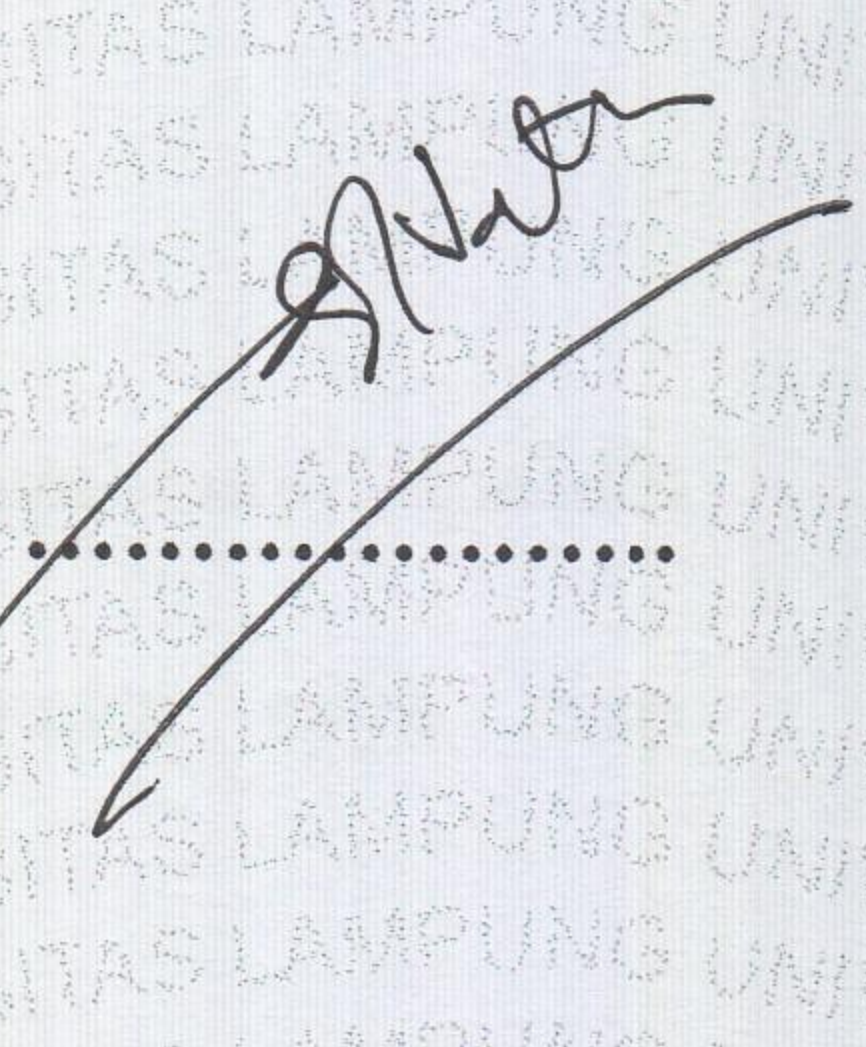
Ketua : Ir. Sutikno, M.Sc., Ph.D.



Sekretaris : Ir. Marniza, M.Si.



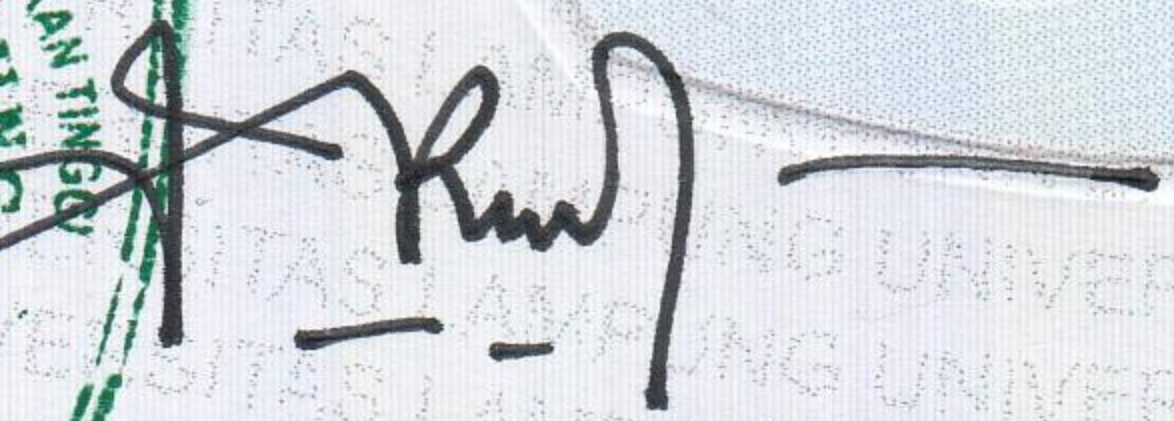
**Penguji
Bukan Pembimbing : Dr. Dewi Sartika, S.T.P., M.Si.**



2. Dekan Fakultas Pertanian



Prof. Dr. Ir. Irwan Sukri Banuwa, M.Si.
NIP 19611020 198603 1 002



Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 26 Januari 2016

PERNYATAAN KEASLIAN HASIL KARYA

Saya - Rosi Mauliana Sari NPM 1114051050 menyatakan bahwa apa yang tertulis dalam karya ilmiah ini adalah hasil kerja saya sendiri yang berdasarkan pada pengetahuan dan informasi yang telah saya dapatkan. Karya ilmiah ini tidak berisi material yang telah dipublikasikan sebelumnya atau dengan kata lain bukanlah hasil dari plagiat karya orang lain.

Demikianlah pernyataan ini saya buat dan dapat dipertanggungjawabkan. Apabila dikemudian hari terdapat kecurangan dalam karya ini, maka saya siap mempertanggungjawabkannya.

Bandar Lampung, 26 Januari 2016
Yang membuat pernyataan



Rosi Mauliana Sari
NPM. 1114051050

RIWAYAT HIDUP

Penulis yang dilahirkan di Kota Metro pada tanggal 19 September 1990 merupakan anak kedua dari dua bersaudara, pasangan Bapak As Ro'i dan Ibu Jeminah. Penulis mengawali pendidikan formal di Taman Kanak-Kanak Perwanida dan menyelesaikannya pada tahun 1997. Pada tahun yang sama penulis melanjutkan sekolah dasar di Sekolah Dasar Negeri (SDN) 1 Metro Timur, dan menyelesaikannya pada tahun 2003. Penulis langsung melanjutkan pendidikannya ke Sekolah Menengah Pertama Negeri (SMPN) 2 Metro dan menyelesaikannya pada tahun 2006. Pendidikan penulis dilanjutkan lagi di Sekolah Menengah Atas Negeri (SMAN) 4 Metro dan menyelesaikannya pada tahun 2009. Setelah penulis menyelesaikan pendidikannya di SMA, pada tahun 2011 penulis diterima sebagai mahasiswi Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Lampung melalui jalur Penerimaan Mahasiswa Perluasan Akses Pendidikan (PMPAP).

Selama berada di bangku perkuliahan, penulis pernah menjadi asisten praktikum di beberapa mata kuliah ; yaitu Mata Kuliah Uji Sensori pada tahun ajaran 2013/2014, Mata Kuliah Teknologi Bioproses pada tahun ajaran 2014/2015, dan Mata Kuliah Teknologi Bioenergi pada tahun ajaran 2015/2016. Tahun 2014, penulis melaksanakan Praktik Umum di PT. Keong Nusantara Abadi (KNA) Jl. Raya Branti Km. 18 Desa Bumisari RK II, Natar II, Lampung Selatan.

Tahun 2015, penulis melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) Tematik di Desa Moris Jaya, Kecamatan Banjar Agung, Kabupaten Tulang Bawang. Selama menjadi mahasiswi, penulis aktif di organisasi kemahasiswaan Forum Studi Islam sebagai anggota bidang Studi Syiar Islam (SSI) pada periode 2013-2014 dan Himpunan Mahasiswa Jurusan Teknologi Hasil Pertanian sebagai anggota bidang Pendidikan dan Penalaran pada periode 2013-2014.



***"Dan seandainya pohon-pohon di bumi
menjadi pena dan laut (menjadi tinta),
ditambahkan kepadanya tujuh laut (lagi)
sesudah (kering) nya, niscaya tidak akan
habis-habisnya (dituliskan) kalimat Allah.
Sesungguhnya Allah Maha Perkasa lagi
Maha Bijaksana"***

(Q.S. Luqman : 27)





**Jadilah ORANG yang BAIK meski
dalam kondisi TIDAK BAIK**

Serahkan

Semua persoalan kita

Kepada TUHAN kita

Jangan ! Pikul Sendiri

KITA nggak akan MAMPU

Siapalah KITA ini yang
TIDAK MAMPU apa-apa

Kecuali

Diberi KEMAMPUAN oleh TUHAN

"Ayo KITA belajar untuk TIDAK SOMBONG"

SANWACANA

Alhamdulillahirobbil'alamin, puji dan syukur Penulis haturkan kepada Allah SWT karena atas izin, karunia, pertolongan dan ridho-Nya, Penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul "**Optimasi Produksi Bioetanol dari Tandan Kosong Kelapa Sawit Menggunakan Metode Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak**". Selama pelaksanaan penelitian dan proses penulisan skripsi, telah banyak pihak yang memberikan bantuan, doa dan motivasi yang besar kepada penulis. Untuk itu, pada kesempatan ini penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang tulus kepada:

1. Bapak Ir. Sutikno, M.Sc., Ph.D. selaku ketua komisi pembimbing terima kasih atas segala bimbingan, bantuan, saran, dan dukungan yang diberikan selama proses penyusunan skripsi penulis.
2. Ibu Ir. Marniza, M.Si., selaku anggota komisi pembimbing terima kasih atas segala pelajaran, bimbingan, saran, dan motivasi yang diberikan selama proses penyusunan skripsi penulis.
3. Ibu Dr. Dewi Sartika, S.T.P., M.Si., selaku penguji utama yang telah banyak memberikan kritik, saran bimbingan, dan motivasi terhadap karya skripsi penulis.
4. Ibu Ir. Susilawati, M.Si. selaku Ketua Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian Universitas Lampung, atas segala bantuan dan saran yang telah diberikan.

5. Ibu Ir. Otik Nawansih, M.P. selaku pembimbing akademik yang telah memberikan masukan dan bimbingan selama Penulis duduk di bangku kuliah menimba ilmu di Jurusan Teknologi Hasil Petanian Fakultas Pertanian Universitas Lampung.
6. Seluruh bapak dan ibu dosen THP serta karyawan yang telah membantu dan membimbing penulis selama perkuliahan dan penelitian ini.
7. Keluargaku tercinta: Ayah dan Mamak, Atu, Joni Agus Firdaus serta seluruh saudaraku, atas do'a, semangat, nasihat, motivasi, kasih sayang, serta waktu yang telah diluangkan..
8. Keluarga besar THP angkatan 2011 "*Janji Gerhana*" : Isah, Artha, Neri, Ani, Anitsa (Bundo), Marle, Inun, Ratri, St, Tias, Wika, Armal, Uul, Rifka, Nabil, Yoan, Ira, Icha, Ichacil, Fida, Satria, Algi, Tesa, Isna, Rian (Basing), Wildan, kakak angkatan 2008-2010, adik-adik angkatan 2012, 2013, dan 2014 atas bantuan, kekeluargaan, dan semangatnya selama ini.

Akhir kata, semoga Allah SWT berkenan memberkahi skripsi ini dan memberikan kemampuan kepada penulis untuk mengaplikasikan ilmu yang baik selama kuliah dalam kehidupan sehari-hari serta Allah SWT berkenan membalas segala bantuan semua pihak yang telah banyak membantu penulis. Aamiin. *Jazakumullah khairan katsiran* dan penulis berharap skripsi ini dapat memberikan informasi yang bermanfaat.

Bandar Lampung, 26 Januari 2016

Rosi Mauliana Sari

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL	v
DAFTAR GAMBAR	vi
DAFTAR LAMPIRAN	ix
I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang dan Masalah	1
1.2. Tujuan Penelitian	3
1.3. Kerangka Pemikiran	3
1.4. Hipotesis	6
II. TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1. Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS)	7
2.2. Metode <i>Simultaneous Saccharification and Fermentation</i> (SSF)	12
2.2.1. Perlakuan Awal TKKS	14
2.2.2. Sakarifikasi Enzimatis	16
2.2.3. Fermentasi Holoselulosa	21
2.3. Bioetanol	23
III. METODOLOGI PENELITIAN	27
3.1. Tempat dan Waktu Penelitian	27
3.2. Bahan dan Alat	27
3.3. Metode dan Pengumpulan Data Penelitian	28
3.4. Pelaksanaan Penelitian	29
3.4.1. Persiapan Bahan Baku	30
3.4.2. <i>Pretreatment</i> Menggunakan Basa	31
3.4.3. Penentuan Aktivitas Enzim	32
3.4.4. Produksi Etanol dengan Metode SSF	34
3.4.4.1. Persiapan Kultur <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	34
3.4.4.2. Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak (SSF) .	34
3.5. Pengamatan	36
3.5.1. Analisis Gula Reduksi	36
3.5.1.1. Pembuatan Ragensia	36
3.5.1.2. Pembuatan Kurva Standar	37

3.5.2. Kadar Etanol	38
3.5.3. Total Koloni	38
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	40
4.1. Kadar Etanol	40
4.2. Sisa Kadar Gula Reduksi	46
4.3. Total Koloni <i>S. cerevisiae</i>	49
V. KESIMPULAN DAN SARAN	51
5.1. Kesimpulan	51
5.2. Saran	51
DAFTAR PUSTAKA	52
LAMPIRAN	60

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Komponen lignoselulosa TKKS	8
2. Faktor, kode dan taraf perlakuan metode RSM secara factorial 2^3 dengan 3 varibel bebas pada proses pembuatan bioetanol dari TKKS	29
3. Rancangan percobaan menggunakan metode RSM secara faktorial 2^3 dengan 3 variabel bebas	30
4. Rata-rata total koloni <i>S. cerevisiae</i> pada akhir proses SSF	49

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. TKKS yang telah dihancurkan	7
2. Susunan struktur lignoselulosa pada dinding sel tanaman	9
3. Struktur lignin	10
4. Struktur hemiselulosa	11
5. Struktur selulosa	12
6. Tahapan proses pembuatan etanol dengan metode SSF	13
7. Skema <i>pretreatment</i> bahan berlignoselulosa	15
8. Mekanisme kerja <i>subgroup</i> enzim selulase dalam menghidrolisis selulosa	19
9. Senyawa-senyawa inhibitor yang dapat terbentuk selama proses hidrolisis lignoselulosa	20
10. Proses konversi glukosa menjadi etanol	21
11. Tahapan proses produksi bioetanol generasi kedua dari biomassa lignoselulosa	25
12. Tahapan proses produksi bioetanol generasi ketiga	26
13. Persiapan bahan baku	31
14. Proses <i>pretreatment</i> menggunakan basa	32
15. Metode SSF	35
16. Plot kontur pengaruh konsentrasi substrat dan konsentrasi enzim terhadap kadar etanol selama proses SSF 72 jam	42

17. Pengaruh konsentrasi substrat dan konsentrasi enzim terhadap kadar etanol selama proses SSF 72 jam	42
18. Fermentor jenis botol ulir dengan kapasitas 30 mL	45
19. Plot kontur pengaruh konsentrasi substrat dan konsentrasi enzim terhadap kadar gula reduksi sisa fermentasi selama proses SSF 72 jam	47
20. Pengaruh konsentrasi substrat dan konsentrasi enzim terhadap kadar gula reduksi sisa fermentasi selama proses SSF 72 jam	48
21. Total koloni <i>S. cerevisiae</i> setelah proses SSF selama 72 jam ...	50
22. Kurva standar glukosa / gula reduksi	66
23. TKKS basah dari PTPN VII di Bekri, Lampung Tengah	70
24. TKKS yang sudah dikeringkan dan digrinder	70
25. TKKS yang sudah dicecilkan ukurannya hingga 40 mesh dan dikeringkan hingga berat konstan untuk <i>dipretreatment</i>	70
26. TKKS yang telah diberi larutan NaOH 1 M dan dihomogenkan dengan <i>shaker</i> untuk siap dipanaskan	71
27. Proses <i>pretreatment</i> TKKS terjadi pada suhu 121 ⁰ C selama 15 menit menggunakan autoklaf	71
28. Pembilasan TKKS yang sudah <i>dipretreatment</i>	71
29. Pengeringan holoselulosa TKKS yang sudah <i>dipretreatment</i> hingga berat konstan	71
30. Holoselulosa TKKS yang sudah dikeringkan hingga berat Konstan	72
31. Holoselulosa TKKS yang sudah dihaluskan dan siap dihidrolisis dan fermentasi serentak	72
32. Penimbangan substrat dengan berbagai konsentrasi	72
33. Kultur <i>S. cerevisiae</i> yang telah disiapkan	73
34. Persiapan sampel untuk proses SSF	73

35. Pemberian enzim selulase dan starter <i>S. cerevisiae</i> ke sampel yang sudah disterilisasi	73
36. Proses SSF holoselulosa TKKS menggunakan <i>shaker water bath</i> pada suhu 38 ⁰ C, 150 rpm selama 72 jam	73
37. Penyaringan sampel setelah diinkubasi	73
38. Filtrat hasil SSF yang siap dianalisis	74
39. Sampel bioetanol dari TKKS yang siap dianalisis kadar etanolnya	74
40. Analisis kadar gula reduksi sampel	74
41. Perhitungan total koloni <i>S. cerevisiae</i> dari sampel bioetanol	74

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Kadar etanol, kadar gula reduksi dan total koloni <i>S. cerevisiae</i> hasil produksi bioetanol dari holoselulosa TKKS dengan metode SSF yang diinkubasi selama 72 jam pada goyangan 150 rpm dan suhu 38 ⁰ C	61
2. Hasil analisis kadar etanol pada produksi bioetanol menggunakan metode SSF dari TKKS	62
3. Hasil analisis keragaman pengaruh konsentrasi substrat, konsentrasi enzim, dan konsentrasi starter terhadap kadar etanol	62
4. Hasil analisis keragaman kadar etanol dari optimasi pembuatan bioetanol dari TKKS	63
5. Nilai estimasi koefisien regresi kadar etanol dari TKKS	63
6. Plot distribusi normal model regresi linier untuk respon kadar etanol dari TKKS	64
7. Hasil perhitungan total rendemen etanol pada produksi bioetanol menggunakan metode SSF dari TKKS	64
8. Hasil analisis keragaman total rendemen etanol pada produksi bioetanol dari TKKS	65
9. Hasil analisis keragaman total rendemen etanol terhadap substrat holoselulosa TKKS	65
10. Nilai estimasi koefisien regresi total rendemen etanol dari substrat TKKS.....	65
11. Plot distribusi normal model regresi linier untuk respon total rendemen etanol dari substrat TKKS	66
12. Kurva standar glukosa / gula reduksi	66

13. Hasil analisis kadar gula reduksi pada produksi bioetanol menggunakan metode SSF dari TKKS	67
14. Hasil analisis keragaman pengaruh konsentrasi substrat, konsentrasi enzim, dan konsentrasi starter terhadap kadar gula reduksi	68
15. Hasil analisis keragaman kadar gula reduksi dari optimasi produksi bioetanol dari TKKS secara SSF	68
16. Nilai estimasi koefisien regresi kadar gula reduksi dari TKKS .	68
17. Plot distribusi normal model regresi linier untuk respon kadar gula reduksi dari TKKS	69
18. Hasil perhitungan total koloni <i>S. cerevisiae</i> pada produksi bioetanol menggunakan metode SSF dari TKKS	69
19. Foto-foto penelitian	70

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Persediaan Bahan Bakar Minyak (BBM) di Indonesia semakin menipis. Selama tahun 2004-2013, total cadangan minyak bumi Indonesia menurun sebesar 12,31% (Statistik Minyak Bumi, 2013). Sugiyono *et al.* (2014) menyatakan dalam draft Outlook Energi Indonesia bahwa cadangan minyak bumi di Indonesia hanya dapat dimanfaatkan \pm 12 tahun lagi, jika tidak ditemukan cadangan baru. Hal ini diperkuat dengan turunnya total cadangan minyak bumi Indonesia selama tahun 2013-2014 dari 7.549,80 *Million Stock Tank Barrels* (MMSTB) menjadi 7.375,20 MMSTB (Statistik Migas ESDM, 2015). Untuk mengatasi keterbatasan persediaan BBM tersebut, pemerintah telah berupaya mengembangkan Bahan Bakar Nabati (BBN) yang tercantum dalam Peraturan Presiden No.5 Tahun 2006. Salah satu BBN yang sudah dikembangkan yaitu bioetanol.

Bioetanol ada dua macam berdasarkan bahan baku yang digunakan, yaitu bioetanol generasi pertama, bioetanol generasi kedua dan bioetanol generasi ketiga. Bioetanol generasi pertama merupakan bioetanol yang berasal dari tanaman pertanian yang mengandung pati atau gula seperti jagung, singkong, gandum, dan tebu. Bioetanol generasi kedua yaitu bioetanol yang berasal dari bahan nabati yang mengandung selulosa dan hemiselulosa (holoselulosa) tinggi. Bioetanol generasi ketiga merupakan bioetanol yang berasal dari *algae* yaitu

mikroalga dan makroalga (rumput laut) (Dragon *et al.*, 2010). Bahan berholoselulosa merupakan alternatif untuk mengatasi bahan berpati yang lebih banyak dimanfaatkan sebagai bahan pangan dan pakan dibandingkan untuk produksi bioetanol. Bahan yang mengandung holoselulosa tinggi banyak terdapat dalam limbah padat agroindustri seperti tandan kosong kelapa sawit (TKKS), bagas tebu, kulit kakao dan jerami padi. Salah satu limbah padat agroindustri yang melimpah tetapi belum dimanfaatkan secara maksimal adalah TKKS.

TKKS memiliki potensi sebagai bahan baku bioetanol. Hal itu dikarenakan kandungan holoselulosa (selulosa dan hemiselulosa) TKKS cukup tinggi. Menurut Caecilia (2015), TKKS mengandung 50,13% selulosa dan 24,32% hemiselulosa. Selain itu, TKKS berpotensi sebagai bahan baku bioetanol karena jumlahnya melimpah. Tahun 2014, jumlah TKKS di Indonesia \pm 42,17 juta ton.

Proses produksi bioetanol dari TKKS memerlukan beberapa tahap. Tahap pertama, TKKS diberi perlakuan awal (*pretreatment*) untuk memisahkan lignin dari komponen holoselulosa. *Pretreatment* diperlukan untuk mempermudah hidrolisis holoselulosa TKKS. Tahap kedua yaitu hidrolisis holoselulosa TKKS menjadi gula reduksi seperti glukosa. Tahap ketiga yaitu fermentasi dengan mikroorganisme untuk mengkonversi gula reduksi menjadi etanol. Tahap keempat yaitu destilasi atau permurnian bioetanol menjadi etanol.

Salah satu metode yang efektif dan efisien dalam memproduksi bioetanol yaitu Metode *Simultaneous Saccharification and Fermentation* (SSF). Metode SSF merupakan proses sakarifikasi dan fermentasi yang dilakukan serentak dalam satu bioeraktor (Rana *et al.*, 2014). Metode SSF sering digunakan karena biaya

produksi lebih rendah dan menghasilkan kadar etanol yang lebih tinggi sehingga metode SSF lebih efisien dan lebih efektif dalam produksi bioetanol (Wyman *et al.*, 1992) serta mencegah terhambatnya kinerja enzim oleh produk glukosa dan selobiosa hasil sakarifikasi holoselulosa (Olofsson *et al.*, 2008). Menurut Sutikno *et al.* (2013), kondisi hidrolisis TKKS yang optimal pada metode SHF (*Separate Hydrolysis and Fermentation*) adalah menggunakan konsentrasi enzim selulase 25 FPU dan konsentrasi substrat holoselulosa 7,5%. Namun belum diketahui kondisi optimal produksi bioetanol dari TKKS dengan metode SSF. Untuk itu, penelitian ini dilakukan untuk menemukan kondisi optimum tersebut.

1.2. Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kondisi optimum konsentrasi substrat, konsentrasi enzim selulase dan konsentrasi starter untuk memproduksi bioetanol dari holoselulosa TKKS dengan metode SSF.

1.3. Kerangka Pemikiran

Bioetanol dari TKKS yang diproduksi secara hidrolisis dan fermentasi secara terpisah atau yang biasa disebut *Separate Hydrolysis and Fermentation* (SHF) masih memiliki kelemahan. Kelemahannya adalah terjadinya inhibisi kerja enzim selulase secara kompetitif oleh produk hidrolisis yaitu selobiosa yang menghambat Endo dan Exo-glukanase sedangkan glukosa menghambat β -glukosidase (Oghren *et al.*, 2007). Selain itu, gula mannososa, xylosa, dan galaktosa memiliki efek penghambatan yang signifikan pada aktivitas enzim selulase selama

hidrolisis selulosa (Xiao *et al.*, 2004). Akibatnya, rendemen gula reduksi yang dihasilkan rendah dan mempengaruhi rendemen etanol juga rendah (Gauss *et al.*, 1976). Penjelasan tersebut sesuai dengan pendapat Xiao *et al.* (2004) bahwa selama proses SHF dapat terjadi akumulasi penghambatan produk hidrolisis enzimatis (glukosa dan selobiosa) dan penurunan laju reaksi. Salah satu alternatif untuk mengatasi masalah tersebut dengan melakukan proses hidrolisis dan fermentasi secara serentak dalam satu bioreaktor atau yang biasa disebut metode *Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF)* (Rana *et al.*, 2014).

Metode SSF dikenal sebagai metode yang efektif dan efisien dalam memaksimalkan produksi bioetanol dibandingkan dengan metode SHF (Oloffson *et al.*, 2008). Penggunaan SSF dapat menghasilkan produktivitas yang lebih tinggi dibandingkan metode SHF. Saat kondisi substrat dan enzim selulase yang sama, secara teoritis metode SHF menghasilkan derajat konversi glukosa menjadi etanol $\pm 40\%$ sedangkan SSF dapat mencapai 60% (Stenberg *et al.*, 2000). Gauss *et al.* (1976) juga menyatakan bahwa metode SSF dapat meningkatkan rendemen etanol karena glukosa hasil hidrolisis langsung difermentasi oleh ragi menjadi etanol. Proses tersebut sangat berfungsi untuk mencegah adanya inhibisi kerja enzim selulase oleh glukosa dan selobiosa sehingga proses hidrolisis tetap optimal dan konsentrasi glukosa tetap rendah. Manfaat lainnya adalah waktu reaksi keseluruhan lebih singkat, dan volume bioreaktor yang lebih rendah (Buruiana, 2013) sehingga lebih efektif dan mengurangi biaya produksi secara keseluruhan (Rana *et al.*, 2014).

Metode SSF yang digunakan pada TKKS untuk produksi bioetanol belum optimum. Penyebabnya adalah belum adanya titik optimum konsentrasi substrat

dan konsentrasi enzim selama proses SSF. Secara teoritis, konsentrasi enzim dan konsentrasi substrat merupakan faktor yang penting dalam proses SSF. Mandels *et al.* (1976) menjelaskan bahwa semakin tinggi konsentrasi enzim yang digunakan maka semakin cepat proses hidrolisisnya. Namun, pada konsentrasi tertentu enzim tidak lagi dapat meningkatkan kecepatan reaksi melebihi V_{max} -nya. Penjelasan tersebut menekankan bahwa konsentrasi enzim berbanding linear dengan kecepatan reaksinya. Hal tersebut diikuti dengan pernyataan Poedjadi (1994) yaitu peningkatan konsentrasi substrat dapat meningkatkan kecepatan reaksi dan gula reduksi yang dihasilkan (Ouyang *et al.*, 2009). Jika peningkatan konsentrasi substrat dan konsentrasi enzim digunakan dalam metode SSF maka dimungkinkan kondisi optimum konsentrasi enzim dan substrat berbeda dengan hasil metode SHF. Sutikno *et al.* (2013) menemukan kondisi hidrolisis enzimatis yang terbaik secara SHF untuk TKKS adalah 25 FPU enzim selulase (SQzyme CS P) dan 7,5% konsentrasi substrat holoselulosa.

Selain konsentrasi enzim dan konsentrasi substrat yang mempengaruhi hidrolisis, ada beberapa faktor yang mempengaruhi kondisi fermentasi selama proses SSF. Faktor utama yang mempengaruhi proses fermentasi adalah jenis dan konsentrasi starter. Selama proses fermentasi sangat penting menggunakan mikroorganisme yang kuat dalam menghasilkan produktivitas etanol dan toleransi yang tinggi terhadap senyawa inhibitor dan alkohol (Olsson dan Hahn-Hagerdal, 1993). Salah satu starter yang memiliki ciri-ciri tersebut adalah *Saccharomyces cerevisiae*. Konsentrasi starter *S. cerevisiae* yang optimal yaitu 10% pada fermentasi tetes tebu (Wardani dan Pertiwi, 2013) dan kulit pisang (Sukowati *et al.*, 2014). Faktor pendukung yang mempengaruhi proses fermentasi ialah suhu

inkubasi, waktu fermentasi, dan goyangan. Suhu optimal *S. cerevisiae* dalam proses fermentasi adalah 38⁰C (Tengborg, 2001) dan waktu fermentasi terbaik untuk TKKS adalah 72 jam (Triwahyuni *et al.*, 2015). Goyangan inkubasi yang optimal sebesar 150 rpm (Rana *et al.*, 2014).

Berdasarkan penemuan di atas, pada penelitian ini dilakukan optimasi metode SSF pada holoselulosa TKKS dengan menggunakan 20, 25, 30 FPU enzim selulase (SQzyme CS P) pada konsentrasi substrat 5 ; 7,5 ; dan 10% (bk/v) yang difermentasi oleh khamir *S. cerevisiae* sebesar 7,5%, 10%, dan 12,5% pada suhu 38⁰C dengan kecepatan goyangan 150 rpm selama 72 jam.

1.4. Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini adalah terdapat kondisi optimum konsentrasi substrat, konsentrasi enzim selulase dan konsentrasi starter untuk memproduksi bioetanol dari holoselulosa TKKS dengan metode SSF.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS)

TKKS merupakan limbah padat terbesar dari tandan buah segar (TBS) dalam industri minyak sawit yang jumlahnya cukup melimpah dan sifatnya terbarukan. Menurut Fauzi *et al.* (2005), dari 1 ton tandan buah segar (TBS) yang diolah akan dihasilkan 23-25% TKKS, 13-15% serat, 6,5% cangkang, 5,5-6% biji dan 16-20% *crude palm oil* (CPO). Indonesia memproduksi minyak sawit sekitar 29,34 juta ton pada tahun 2014 (Direktorat Jenderal Perkebunan, 2014). Diperkirakan jumlah limbah TKKS di Indonesia pada tahun 2014 yaitu 29,34 juta ton CPO/16% x 23% = ± 42,17 juta ton TKKS. TKKS dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. TKKS yang telah dihancurkan.

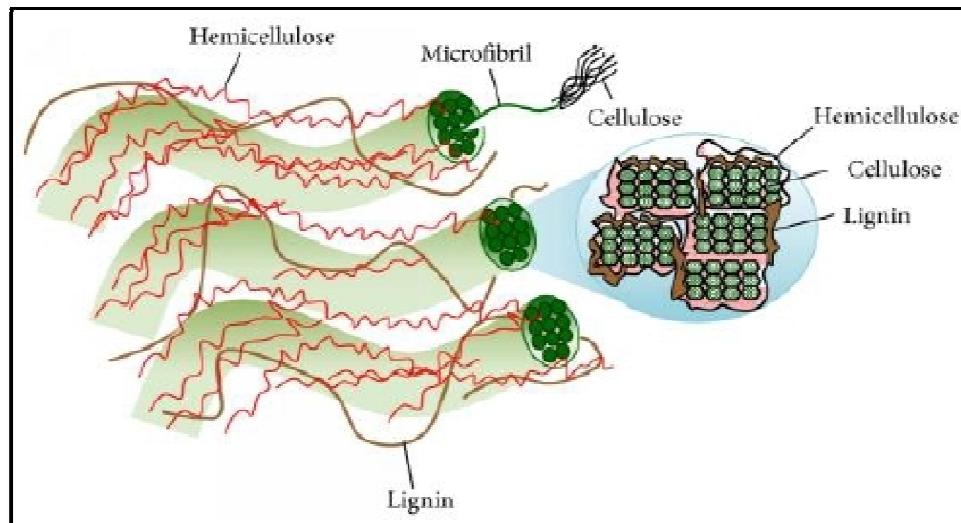
TKKS termasuk biomassa lignoselulosa yang memiliki banyak potensi untuk diolah menjadi bermacam-macam produk, namun pemanfaatannya masih terbatas. Selama ini, TKKS hanya dibakar dan sebagian ditebarkan di lapangan

sebagai mulsa. TKKS berpotensi diolah menjadi kompos, pakan ternak, briket, bahan bakar boiler, *pulp*, kertas, bioetanol, dan serat (Yanti, 2013). Kandungan utama TKKS yaitu lignoselulosa. Lignoselulosa merupakan karbohidrat kompleks yang berasal dari tanaman dan tersusun dari lignin, hemiselulosa dan selulosa. Komponen selulosa, hemiselulosa, dan lignin TKKS secara terperinci disajikan pada Tabel 1. Karena kandungan holoselulosa TKKS yang tinggi, TKKS berpotensi sebagai bahan baku produksi bioetanol dengan metode SSF. Metode SSF secara spesifik diuraikan pada subbab 2.2.

Tabel 1. Komponen Lignoselulosa TKKS

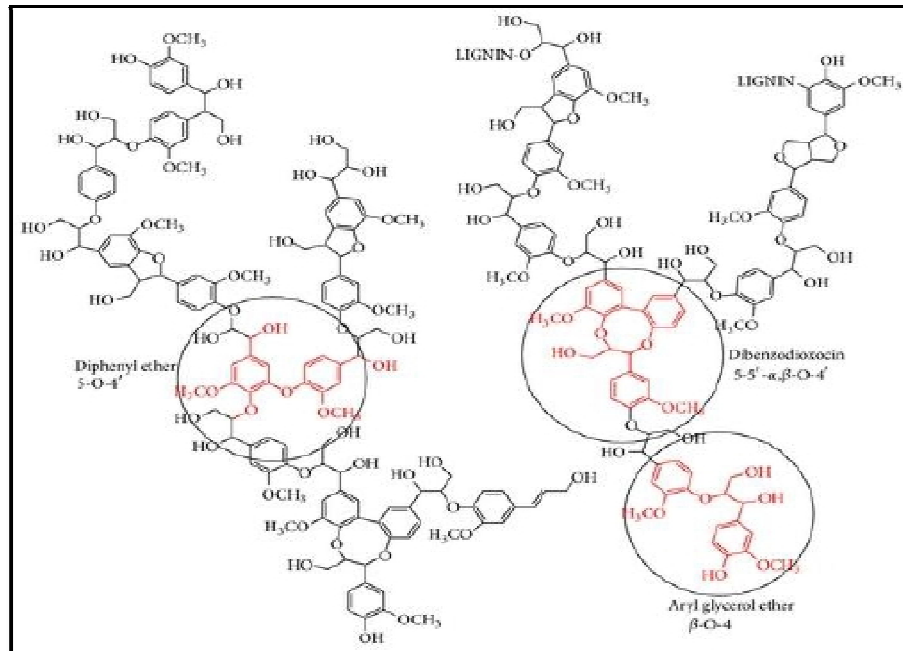
Selulosa	Hemiselulosa	Lignin	Pustaka
45,92%	22,84%	16,49%	Darnoko, 1992
42,24%	22,39%	28,24%	Wibowo, 1994
45,95%	22,84%	16,49%	Arytafatta, 2008
42,30%	28,56%	22,42%	Widyasari, 2011
49,76%	28,92%	22,42%	Feriandi, 2011 dan Yanti, 2013
50,13%	24,32%	24,15%	Caecilia, 2015

Lignin, hemiselulosa dan selulosa membentuk suatu ikatan kimia kompleks yang menjadi bahan dasar dinding sel tanaman. Susunan struktur lignoselulosa terdiri dari mikrofibril-mikrofibril selulosa yang membentuk kluster-kluster, dengan ruang antar mikrofibril terisi dengan hemiselulosa, dan kluster-kluster tersebut terikat kuat oleh lignin menjadi satu kesatuan (Soerawidjaja, 2009). Struktur ikatan lignoselulosa yang kuat dan kokoh tersebut dikarenakan mikrofibril-mikrofibril selulosa dikelilingi oleh hemiselulosa yang dihubungkan oleh ikatan kovalen dengan lignin (Gambar 2).



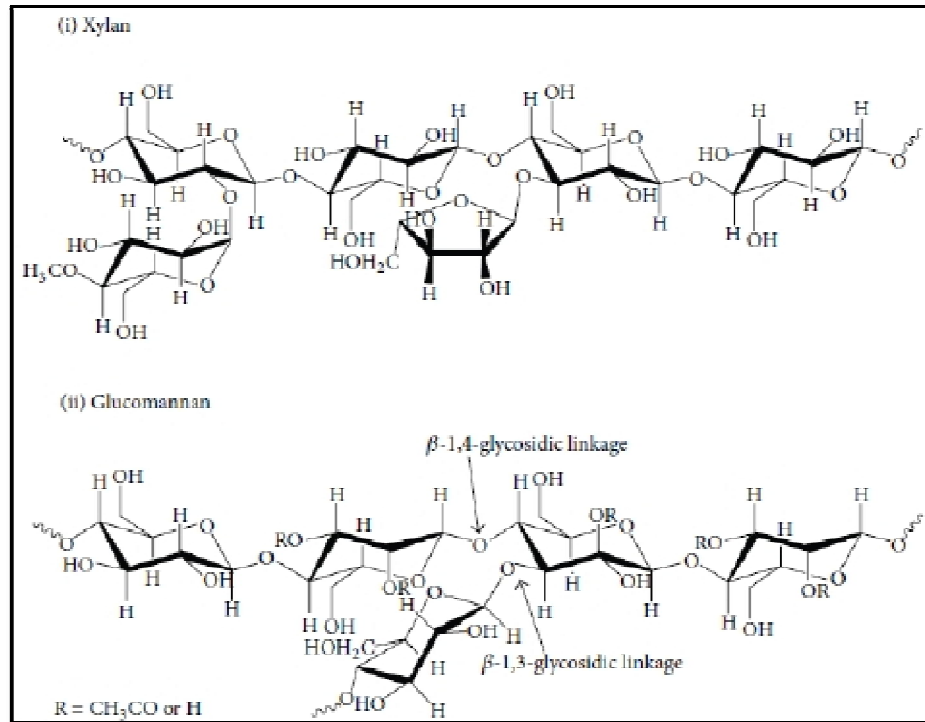
Gambar 2. Susunan struktur lignoselulosa pada dinding sel tanaman (Lee *et al.*, 2014).

Lignin adalah zat organik yang terdiri atas sistem aromatik dengan penyusun molekul utamanya ialah unit-unit fenil propana (Simanjuntak, 2007). Lignin merupakan senyawa yang keras karena lignin tersusun atas jaringan polimer 3 dimensi fenolik atau fenilpropanoid bercabang banyak yang berfungsi sebagai perekat serat selulosa dan hemiselulosa sehingga dinding sel tanaman mengeras sangat kuat (Sun dan Cheng, 2002). Adanya lignin sebagai pelindung holoselulosa tidak diinginkan dalam produksi bioetanol. Hal ini dikarenakan struktur lignin (Gambar 3) sangat kompleks dan tidak berpola sama sehingga holoselulosa sulit ditembus oleh enzim maupun mikroorganisme. Oleh karena itu, biomassa lignoselulosa harus diberi perlakuan awal untuk menghilangkan komponen lignin yang melindungi serat holoselulosa (Hermiati *et al.*, 2010).



Gambar 3. Struktur lignin (Crestini *et al.*, 2010).

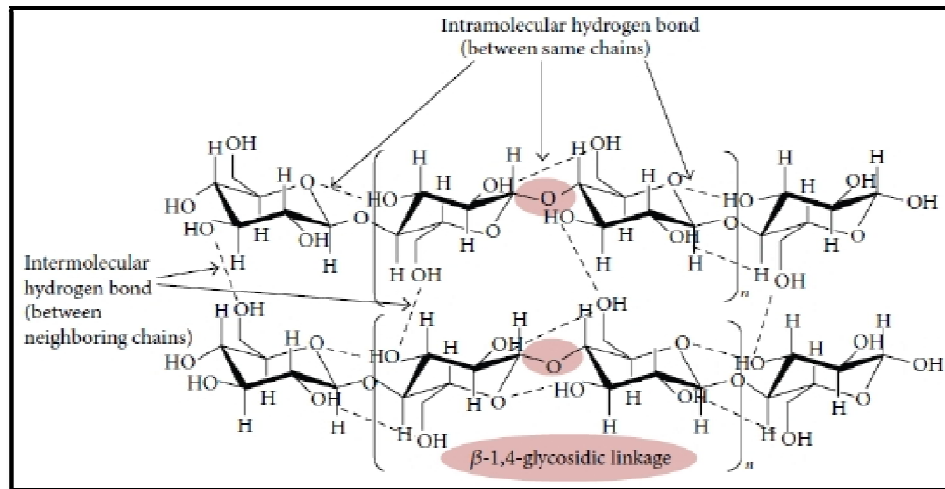
Hemiselulosa merupakan polimer polisakarida heterogen yang larut dalam alkali. Penyusun utama polimer hemiselulosa adalah unit D-glukosa, D-manosa, D-galaktosa (heksosan), L-arabiosa (pentosan) dan D-xilosa (Fengel dan Wegener, 1984). Rantai utama hemiselulosa dapat terdiri atas hanya satu jenis monomer (homopolimer), seperti xilan, atau terdiri atas dua jenis atau lebih monomer (heteropolimer), seperti glukomannan. Rantai molekul hemiselulosa pun lebih pendek daripada selulosa. Struktur hemiselulosa dapat dilihat pada Gambar 4. Hemiselulosa memiliki sifat non-kristalin dan tidak bersifat serat, mudah mengembang, lebih mudah larut dalam pelarut alkali dan lebih mudah dihidrolisis dengan asam. Hemiselulosa dapat dihidrolisis dengan asam atau enzim. Salah satu enzim yang dapat menghidrolisis hemiselulosa adalah enzim xilanase. Hasil hidrolisis hemiselulosa adalah produk monomer D-xilosa dan monosakarida lainnya.



Gambar 4. Struktur hemiselulosa (Lee *et al.*, 2014).

Selulosa adalah komponen utama dari lignoselulosa. Selulosa merupakan homopolisakarida dengan monomer glukosa dan derajat polimerisasi yang tinggi (10.000–14.000 unit). Selulosa terdiri dari monomer D-glukosa atau unit-unit anhidroglukopiranososa yang terikat pada ikatan β -1,4 glikosidik membentuk rantai molekul linear. Oleh karena itu, selulosa bisa dinyatakan sebagai polimer glukosa dengan struktur rantai yang seragam yaitu glukosa. Mikro fibril selulosa (Gambar 5) mengandung sekitar 50-90% bagian kristal dan sisanya bagian amorf. Ikatan β -1,4 glukosida pada selulosa dapat diputus dengan cara dihidrolisis oleh asam dan enzim. Hidrolisis selulosa yang sempurna dapat menghasilkan monomer selulosa yaitu glukosa, dan hidrolisis yang tidak sempurna akan menghasilkan produk disakarida yaitu selobiosa (Lee *et al.*, 2014). Glukosa tersebut dapat difermentasi dan menghasilkan etanol. Hal itulah yang menjadi alasan bahwa bahan

berlignoselulosa terutama yang mengandung selulosa cukup tinggi berpotensi menjadi bahan baku bioetanol.



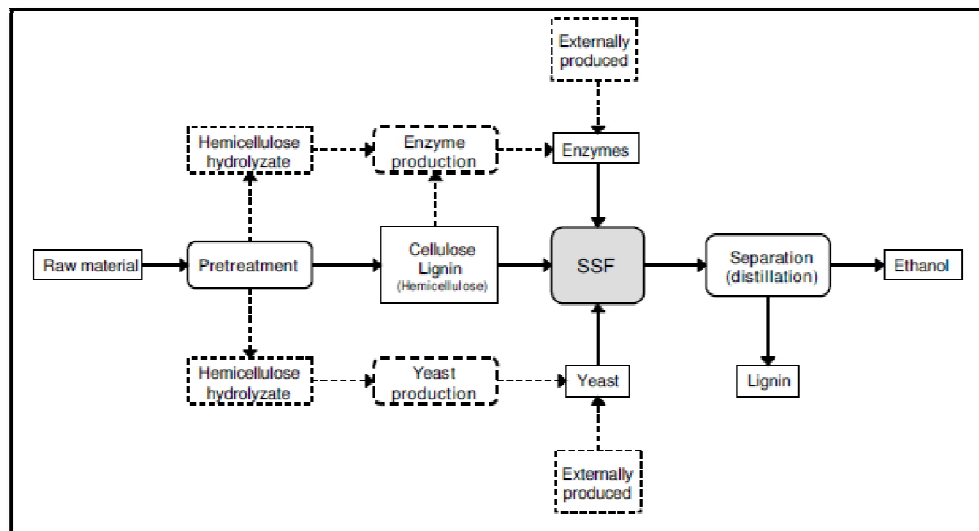
Gambar 5. Struktur selulosa (Lee *et al.*, 2014).

2.2. Metode *Simultaneous Saccharification and Fermentation* (SSF)

Metode SSF lebih dikenal di Indonesia dengan sebutan Hidrolisis dan Fermentasi Serentak. Metode SSF merupakan kombinasi proses hidrolisis selulosa dengan menggunakan enzim selulase dan khamir *S. cerevisiae* untuk fermentasi gula menjadi etanol secara simultan atau serentak (Novia *et al.*, 2014). Metode SSF dianggap solusi untuk memecahkan masalah yang terdapat pada metode SHF yaitu dengan mencegah adanya inhibisi kerja enzim hidrolisis oleh produk glukosa dan selubiosa.

Metode SSF (Gambar 6) ini lebih efisien dan efektif dibandingkan dengan metode SHF (Oloffson *et al.*, 2008). Penggunaan SSF juga menghasilkan produktivitas etanol yang lebih tinggi dibandingkan metode SHF. Saat kondisi substrat dan enzim selulase yang sama, metode SHF menghasilkan derajat konversi glukosa menjadi etanol sekitar 40% sedangkan SSF dapat mencapai 60%

(Stenberg *et al.*, 2000). Studi menunjukkan bahwa laju hidrolisis dapat meningkat oleh konversi gula, volume bioreaktor yang lebih rendah (Buruiana, 2013), rendemen bioetanol yang lebih tinggi dengan penggunaan enzim lebih sedikit (Chandel *et al.*, 2007) dari yang dibutuhkan dalam hidrolisis enzimatik biasa. Hal tersebut dikarenakan proses fermentasi simultan dapat memperpendek lamanya waktu yang dibutuhkan ragi untuk mengkonversi glukosa menjadi etanol sehingga waktu reaksi keseluruhan untuk mengkonversi biomassa menjadi etanol dipersingkat (Gauss *et al.*, 1976). Manfaat lainnya dari penggunaan metode SSF ialah efisiensi penggunaan peralatan dan investasi biaya produksi dapat ditekan sebesar 20% (Wingren, 2003).



Gambar 6. Tahapan proses pembuatan etanol dengan metode SSF (Olofsson *et al.*, 2008)

Metode SSF juga memiliki kelemahan yaitu proses hidrolisis dan fermentasi masing-masing memiliki rentang suhu optimum yang berbeda. Kondisi optimum aktivitas enzim selulase terjadi pada pH 4,8 dan suhu 50⁰C (Samsuri *et al.*, 2009), sedangkan mikroorganisme fermentasi etanol seperti *S. cerevisiae* memiliki kondisi optimumnya pada suhu sekitar 30⁰C dan pH 4-5

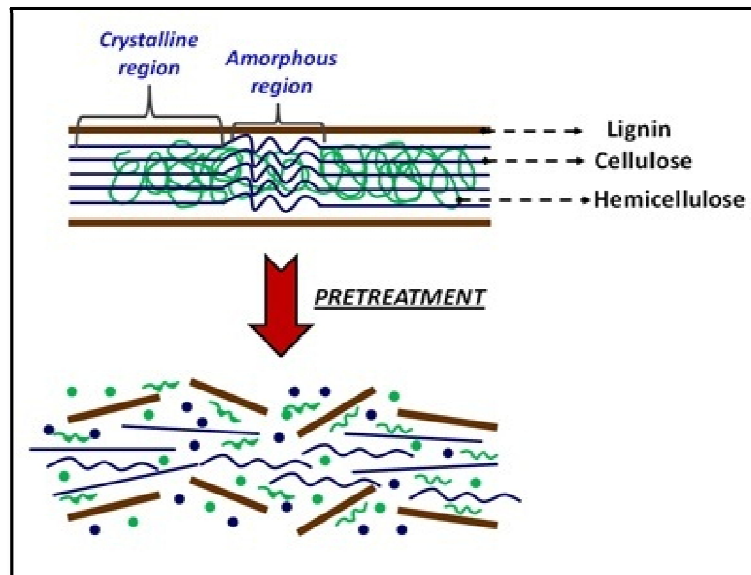
(Wasungu, 1982) serta membutuhkan sedikit oksigen terutama pada awal pertumbuhan (Hidayat *et al.*, 2006). Hal ini dikarenakan sebagian ragi hanya dapat tumbuh baik pada kondisi suhu $20^{\circ}\text{C} \leq T \leq 40^{\circ}\text{C}$. Oleh karena itu, kondisi optimum enzim dan mikroorganisme seharusnya berdekatan agar proses SSF dapat berjalan secara maksimal.

Menurut Tengborg (2001), suhu optimum teknik ini terjadi pada suhu 38°C jika menggunakan enzim selulase sebagai penghidrolisis dan *S. cerevisiae* mikroorganisme penghasil etanol. Faktor yang mempengaruhi kinerja *S. cerevisiae* dalam proses SSF adalah kondisi selama proses seperti jumlah padatan tidak larut dan konsentrasi komponen penghambat pada media SSF (Hoyer *et al.*, 2010). Konsentrasi substrat untuk metode SSF biasanya sekitar 10% (padatan tidak larut air), dosis enzim 10–20 FPU/g selulosa, dan konsentrasi khamir 1,50–3 g/L selama 72 jam (Sun dan Cheng, 2002). Sebelum proses sakarifikasi dan fermentasi, TKKS harus diberi perlakuan awal terlebih dahulu. Perlakuan awal, proses sakarifikasi dan proses fermentasi diuraikan di bawah ini.

2.2.1. Perlakuan Awal TKKS

Biomassa berbasis lignoselulosa memerlukan perlakuan awal atau yang dikenal dengan *pretreatment* (proses delignifikasi) sebelum biomassa dihidrolisis dan difermentasi. Proses delignifikasi dibutuhkan untuk memutus rantai polimer yang panjang menjadi rantai polimer yang lebih pendek, meningkatkan daerah amorf (menurunkan derajat kristalinitas) dan memisahkan bagian lignin dari holoselulosa. Proses *pretreatment* yang tepat (Gambar 7) akan meningkatkan efisiensi proses hidrolisis dengan cara memperluas permukaan kontak substrat

dengan enzim (Mergner *et al.*, 2013). Akan tetapi, pemilihan metode untuk *pretreatment* akan mempengaruhi proses selanjutnya. Kondisi yang tidak diinginkan selama proses *pretreatment* akan membuat terbentuknya produk parsial hemiselulosa dan lignin serta senyawa toksik atau inhibitor yang dapat mengurangi kinerja enzim maupun mikroorganisme.



Gambar 7. Skema *Pretreatment* Bahan Berlignoselulosa (Mosier *et al.*, 2005)

Pretreatment dapat dilakukan secara fisik, kimia, biologis, ataupun kombinasi dari metode-metode itu. Penggunaan metode *pretreatment* telah dilakukan pada biomassa yang berbeda-beda, dan hasilnya bervariasi untuk setiap metode maupun jenis bahan yang digunakan (Isroi *et al.*, 2011). Setiap metode *pretreatment* tersebut memiliki kelebihan dan kekurangan masing-masing sehingga perlu dipertimbangkan untuk memilih metode *pretreatment* yang tepat agar proses konversinya dapat berjalan optimal.

Jenis *pretreatment* yang sering digunakan pada substrat TKKS ialah *pretreatment* secara kimia ataupun *pretreatment* dengan kombinasi bahan kimia

(asam atau basa) dan steam (tipe fisik-kimia). Menurut Remli *et al.* (2014), metode *pretreatment* menggunakan larutan basa akan meningkatkan efektifitas proses hidrolisis enzimatik dengan cara meningkatkan aksesibilitas enzim pada permukaan selulosa. Penggunaan senyawa basa yang sering digunakan untuk *pretreatment* TKKS adalah NaOH. Menurut Sutikno *et.al.* (2010), penggunaan NaOH pada limbah agroindustri dapat mendegradasi lignin lebih dari 99% setelah perendaman dalam larutan NaOH 1 M pada suhu ruang selama 48 jam atau pada suhu 121°C selama 15 menit atau lebih. NaOH bekerja dengan menyerang dan merusak struktur lignin, bagian kristalin dan amorf, memisahkan sebagian lignin dan hemiselulosa serta menyebabkan pengembangan struktur selulosa. Konsentrasi basa yang semakin tinggi, maka gugus-gugus –OH akan lebih mudah dimasuki air, sehingga antar ruang molekul-molekul selulosa akan mengandung air (Achmadi, 1990). Hal ini menunjukkan bahwa *pretreatment* secara basa lebih efektif digunakan untuk proses biokonversi TKKS.

2.2.2. Sakarifikasi Enzimatis

Proses hidrolisis pada biokonversi TKKS berfungsi untuk memecah rantai panjang polimer karbohidrat yaitu holoselulosa (hemiselulosa dan selulosa) menjadi monomer-monomer gula reduksi. Hidrolisis sempurna selulosa menghasilkan glukosa, sedangkan hemiselulosa menghasilkan beberapa monomer gula pentosa (C₅) dan heksosa (C₆) (Septiyani, 2011). Hal ini berdasarkan perbedaan dari senyawa-senyawa penyusun selulosa dan hemiselulosa (Mergner *et al.*, 2013).

Proses hidrolisis dalam produksi bioetanol dapat dilakukan secara kimia (menggunakan senyawa asam) dan enzimatik. Prinsip kedua metode hidrolisis tersebut sama-sama memecah holoselulosa menjadi gula sederhana tetapi secara mekanisme reaksinya berbeda-beda. Mekanisme hidrolisis asam bersifat memecah ikatan selulosa secara acak, sehingga dapat menghasilkan produk selain glukosa, yaitu furfural, 5-hydroxymethylfurfural (HMF), asam levulinik (levulinic acid), asam asetat (acetic acid), furan, fenolik dan beberapa senyawa lain yang tidak diharapkan. Kelemahan lain dari penggunaan asam ialah dapat menimbulkan degradasi gula selama reaksi hidrolisis sehingga rendemen glukosa dan etanol menurun (Howard *et al.*, 2003), dan terhambatnya proses fermentasi oleh senyawa inhibitor tersebut serta senyawa asam dapat menimbulkan korosi pada lingkungan (Taherzadeh dan Karimi, 2007).

Hidrolisis secara enzimatik yaitu proses hidrolisis menggunakan jamur penghasil enzim atau menggunakan enzim murni yang bekerja lebih spesifik dengan memecah ikatan β -glikosidik pada substrat tertentu sehingga tidak terbentuk produk atau senyawa yang tidak diharapkan. Oleh karena itu, proses hidrolisis secara enzimatik dinilai lebih menguntungkan dan aman dibandingkan dengan penggunaan asam. Proses hidrolisis secara enzimatik ini memerlukan kondisi yang khusus, biasanya kondisi optimum proses hidrolisis terdapat pada pH 5,0 dan suhu 45-55⁰C (Tengborg, 2001). Proses ini tidak menimbulkan korosi maupun pembentukan senyawa inhibitor tetapi kelemahannya adalah reaksi proses yang sedikit lebih lambat dan mahal harganya enzim murni yang digunakan.

Enzim selulase merupakan enzim yang kompleks dan termasuk salah satu enzim jenis hidrolisis. Hal itu dikarenakan aktivitas selulase dapat memutus

ikatan β (1-4) pada selulosa menjadi monomernya (Poedjiadi, 1994). Satuan untuk konsentrasi enzim selulase dinyatakan dalam *Filter Paper Unit* (FPU). FPU menyatakan jumlah unit enzim yang ada pada 1 mL enzim untuk menghidrolisis 50 mg selulosa menjadi 2 mg glukosa/mL dalam waktu satu menit (Mandels *et al.*, 1976).

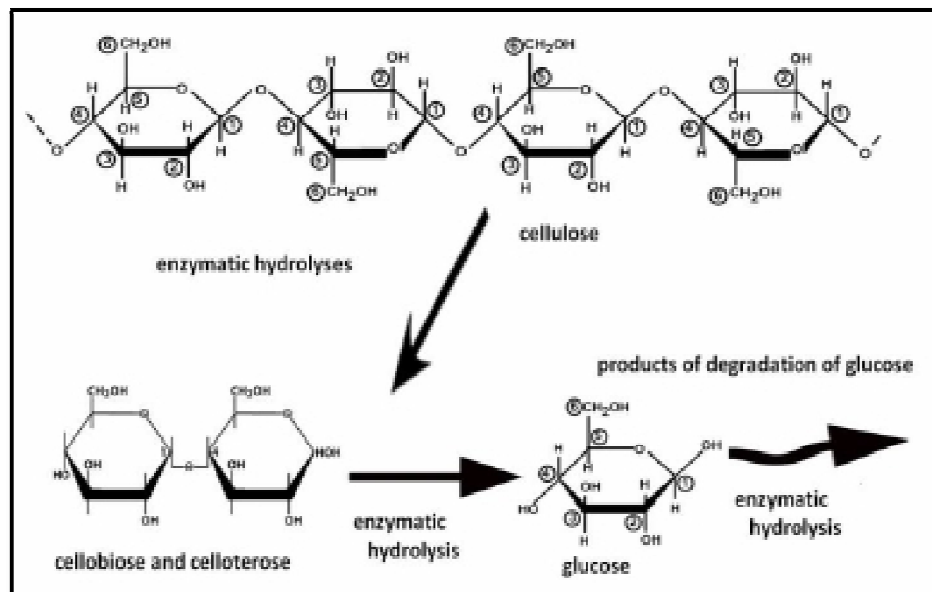
Prinsip kerja enzim selulase dalam menghidrolisis selulosa yaitu penetrasi substrat sehingga substrat terikat ke enzim secara *reversible*, kemudian membentuk suatu enzim-substrat yang kompleks. Kompleks ini disebut sebagai kompleks Michaelis. Setelah itu, enzim akan mengatalisis reaksi kimia dan melepaskan produk monomer glukosa. Reaksi kerja enzim dapat dipercepat hingga 10^8 sampai 10^{11} kali reaksi dengan cara menurunkan energi aktivasi reaksi kimia yaitu dengan kondisi proses pada suhu dan tekanan yang rendah (Poedjiadi, 1994). Struktur selulosa yang *rigid* dan resisten terhadap aksi individual selulase dapat dikonversi oleh subgrup enzim selulase yang bekerja secara sinergis.

Ada tiga jenis enzim yang tersusun dalam *group* enzim selulase yang bekerja secara sinergis tersebut yaitu :

1. Endo- β -1,4-D-glukanase (endoselulase, carboxymethylcellulase atau CMCase) penyusun utama enzim yang bertugas memecah ikatan internal glikosidik yang berada diantara rantai glukosa yang runtuh atau struktur kristalin selulosa dan membuka rantai polisakarida.
2. Ekso- β -1,4-D-glukanase atau Ekso- β -1,4-D-selebiohidrase yang juga merupakan penyusun utama enzim yang bertugas memecah dimer selobiosa dari rantai glukosa lalu melepaskannya kedalam larutan dan bertugas membelah 2-4 unit dari akhir rantai yang diproduksi oleh endoselulase dan

menghasilkan tetrasakarida atau disakarida serta menghasilkan monosakarida berupa glukosa.

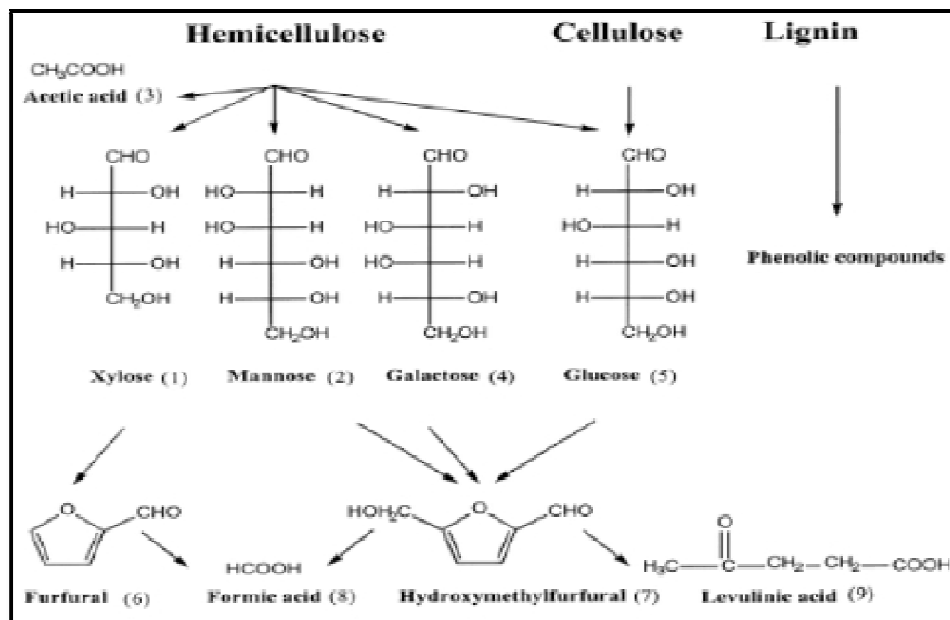
3. β -glukosidase (cellobiase) yang bertugas menyempurnakan proses yaitu menghidrolisis produk dari enzim eksoselulase menjadi monosakarida seperti selulosa menjadi glukosa dan memecah selobiosa menjadi monomer glukosa (Gambar 8).



Gambar 8. Mekanisme kerja *subgroup* enzim selulase dalam menghidrolisis selulosa (Markulak *et al.*, 2010).

Mekanisme kerja enzim tersebut bergantung dengan faktor-faktor yang mempengaruhinya. Menurut Taherzadeh dan Karimi (2008), faktor-faktor yang mempengaruhi proses hidrolisis enzimatis adalah metode perlakuan awal yang digunakan, aktivitas dan konsentrasi enzim dan kondisi proses hidrolisis seperti suhu, pH dan adanya inhibitor, kualitas dan konsentrasi substrat. Sedangkan menurut Poedjiadi (1994), ada beberapa faktor yang dapat mempengaruhi kinerja enzim yang meliputi :

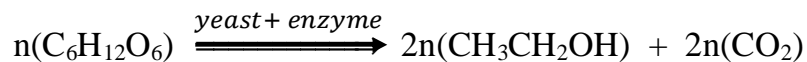
1. Peningkatan konsentrasi substrat dan konsentrasi enzim akan meningkatkan kecepatan reaksi.
2. Penurunan konsentrasi substrat dan konsentrasi enzim yang tetap akan menambah kecepatan reaksi.
3. Peningkatan suhu pada kondisi proses hidrolisis dapat menyebabkan denaturasi pada enzim, sehingga bagian sisi aktifnya terganggu yang mengakibatkan konsentrasi spesifik enzim berkurang dan kecepatan reaksinya menurun.
4. Tingkat keasaman (pH) yang tinggi dapat menyebabkan proses denaturasi yang dapat mengakibatkan penurunan aktivitas enzim.
5. Adanya inhibitor *irreversibel* maupun inhibitor *reversibel* yang dapat menurunkan kerja enzim (Gambar 9).



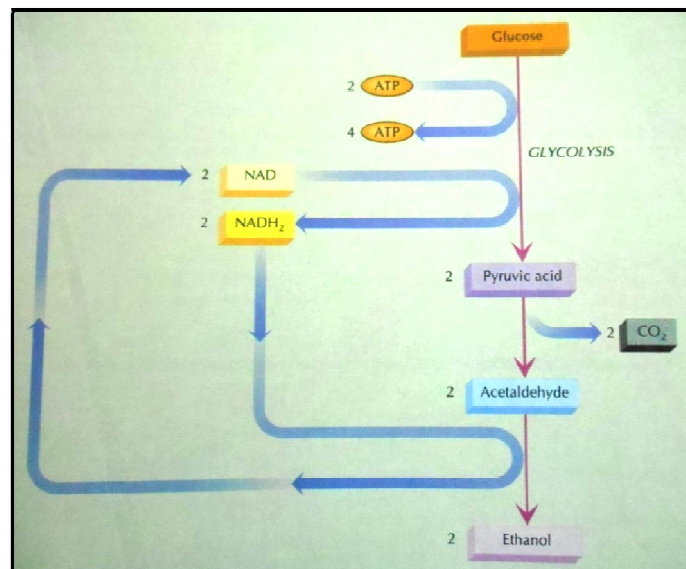
Gambar 9. Senyawa-senyawa inhibitor yang dapat terbentuk selama proses hidrolisis lignoselulosa (Santi, 2012).

2.2.3. Fermentasi Holoselulosa

Proses fermentasi adalah proses konversi gula reduksi hasil hidrolisis menjadi etanol yang secara biologis dilakukan oleh mikroorganisme (Gambar 10). Proses konversi gula heksosa seperti glukosa umumnya memerlukan kondisi anaerobik untuk memaksimalkan pembentukan etanol. Sedangkan dengan kondisi aerobik, proses fermentasi akan menghasilkan gas CO₂, H₂O dan energi. Persamaan reaksi proses fermentasi anaerobik dapat dilihat pada persamaan berikut.



Etanol dan CO₂ yang terbentuk dari proses fermentasi ini dapat menghambat proses fermentasi (*end-product inhibition*). Diperlukan teknik fermentasi yang dapat meminimalisasi peran inhibitor tersebut karena mikroorganisme yang mengkonversi glukosa menjadi etanol tidak tahan terhadap senyawa alkohol pada konsentrasi tertentu.



Gambar 10. Proses konversi glukosa menjadi etanol (Pelczar *et al.*, 1993).

Berbagai macam mikroorganisme seperti khamir dapat digunakan pada fermentasi dengan produk hasil berupa etanol. Salah satu khamir yang berpotensi untuk menghasilkan etanol adalah *Saccharomyces cerevisiae*. Secara umum khamir dapat tumbuh dan memproduksi etanol secara optimal pada pH 3,5-6,0 dan suhu 30-37⁰C (Frazier dan Westhoff, 1978). *S. cerevisiae* yang termasuk golongan eukariot yang mudah didapatkan dan dibiakkan dengan ciri-ciri umumnya yaitu tidak mempunyai hifa dan tubuh buah (Haetami *et al.*, 2008). Khamir ini berbentuk bulat atau oval seperti telur, lonjong, memanjang dengan diameter 5-20 mikrometer dan menghasilkan pseudomiselium (Pelczar dan Chan, 2008). *S. cerevisiae* berkembang biak secara seksual dengan pembentukan askospora (Volk dan Wheeler, 1993). Strukturnya mempunyai dinding polisakarida kompleks yang menutup protoplasma dan di bawahnya terletak membran sel. *S. cerevisiae* merupakan organisme fakultatif anaerob yang dapat hidup baik sistem aerob maupun anaerob atau semi anaerob yaitu sedikit kandungan oksigen yang terlarut untuk mencerna glukosa dan menghasilkan karbon dioksida dan energi (Buckle *et al.*, 2007).

S. cerevisiae memiliki daya konversi menjadi etanol yang tinggi dan mempunyai toleransi terhadap kadar etanol yang tinggi. Metabolit utamanya berupa etanol, CO₂ dan air, juga sedikit menghasilkan metabolit lainnya (Frazier dan Westhoff, 1978). Setiap 1 mol glukosa terfermentasi menghasilkan 2 mol etanol, CO₂ dan ATP. Oleh karena itu, secara teoritis setiap 1 g glukosa yang difermentasi menghasilkan 0,51 g etanol (Wahyudi *et al.*, 2010). Namun kenyataannya, biasanya etanol yang dihasilkan tidak melebihi 90-95% dari hasil teoritis. Hal ini dikarenakan sebagian nutrisi digunakan untuk sintesa biomassa

dan memelihara reaksi. Reaksi samping juga dapat terjadi, yaitu terbentuknya gliserol dan suksinat yang dapat mengkonsumsi 4-5% substrat (Ojokoh dan Uzeh, 2005).

Ada 2 jenis metode fermentasi untuk memproduksi etanol. Metode pertama ialah hidrolisis dan fermentasi terpisah yang lebih dikenal *Separated Hydrolysis And Fermentation* (SHF) dan metode kedua adalah sakarifikasi dan fermentasi simultan yang lebih dikenal *Simultaneous Saccharification and Fermentation* (SSF) (Rana *et al.*, 2014). SHF ialah metode produksi bioetanol dimana proses hidrolisis substrat dan proses fermentasi berlangsung secara terpisah. Keuntungan dari SHF adalah hidrolisis oleh enzim selulase dan fermentasi oleh mikroorganisme dapat dilakukan pada masing-masing kondisi optimum (Taherzadeh and Karimi, 2007). Namun, Etanol dan CO₂ yang terbentuk dari proses fermentasi ini dapat menghambat proses fermentasi (*end-product inhibition*). Oleh karena itu, diperlukan metode fermentasi yang dapat meminimalisasi peran inhibitor tersebut. Metode SSF adalah metode produksi bioetanol yang menggabungkan tahapan hidrolisis enzimatik dengan tahap fermentasi berlangsung dalam satu bioreaktor dan waktu yang bersamaan (Olofsson *et al.*, 2008).

2.3. Bioetanol

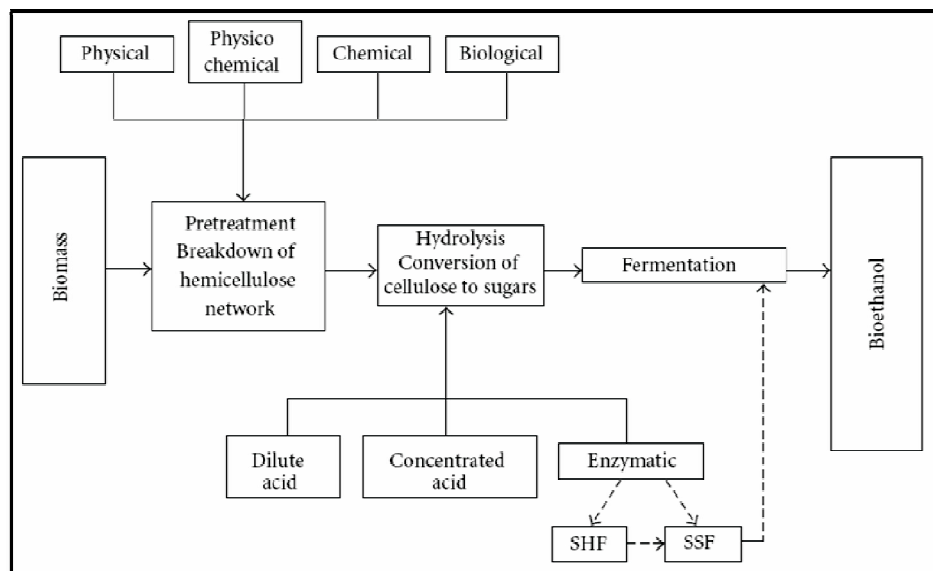
Bioetanol dari hasil SSF yang telah dimurnikan menjadi etanol dapat dimanfaatkan sebagai pengganti BBM untuk mengatasi cadangan minyak bumi yang semakin menipis. Penggunaan etanol dapat menggantikan premium. Kelebihan etanol adalah bahan bakar tersebut ramah lingkungan dan dapat

diperbaharui. Bioetanol atau etil alkohol (C_2H_5OH atau CH_3CH_2OH) adalah cairan tidak berwarna hasil proses fermentasi gula dari sumber karbohidrat (pati) menggunakan bantuan mikroorganisme untuk menjadi etanol (Samah *et al.*, 2011). Bioetanol memiliki kandungan oksigen yang lebih tinggi yaitu sekitar 35% yang membantu proses pembakaran lebih sempurna, bernilai oktan lebih tinggi (118) dan lebih ramah lingkungan karena mengandung emisi gas CO yang lebih rendah sekitar 19-25% (Indarto, 2005).

Berdasarkan bahan bakunya, ada tiga generasi biomassa bioetanol yaitu bioetanol generasi pertama, kedua, dan ketiga. Bioetanol generasi pertama adalah bioetanol yang diproduksi dari bahan baku yang mengandung pati seperti ubi kayu, ubi jalar, nira tebu, jagung, gula beet, sorgum, kentang, gandum dan sebagainya. Proses pengolahannya dengan bahan berpati digiling lalu dihidrolisis menggunakan asam atau enzim α -amilase untuk mengubah pati menjadi dextrin (proses liquifikasi) kemudian dextrin diubah lagi oleh *gluko-amylase* menjadi monomer glukosa (proses sakarifikasi) yang dapat difermentasi menjadi etanol (Hapsari dan Pramashinta, 2013). Namun, bioetanol generasi tersebut masih banyak dimanfaatkan sebagai bahan pangan dan pakan dibandingkan untuk energi terbarukan sehingga dikembangkan bahan berbasis non pangan (generasi kedua) untuk produksi bioetanol.

Bioetanol generasi kedua adalah bioetanol yang diproduksi dari limbah biomassa yang mengandung lignoselulosa. Bahan berlignoselulosa adalah bahan yang mengandung selulosa dan hemiselulosa (holoselulosa) tinggi yang terdapat dalam limbah padat agroindustri seperti bagas tebu, jerami padi, batang sawit, tongkol dan batang jagung, kulit cokelat, dan tandan kosong kelapa sawit (TKKS)

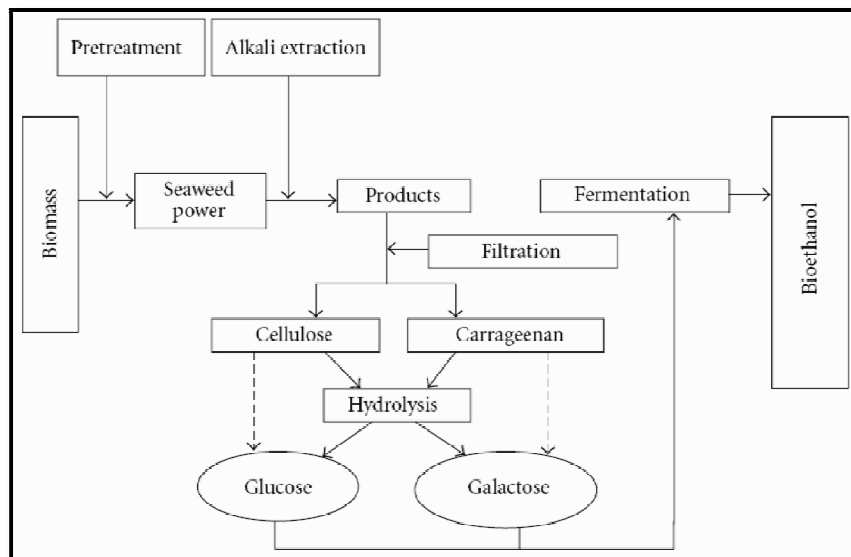
(Sutikno dan Nawansih, 2014). Proses pembuatan bioetanol berbasis lignoselulosa terdiri dari tiga tahapan utama, yaitu perlakuan awal untuk menghilangkan lignin, hidrolisis dan fermentasi (Gambar 11). Produksi dari generasi kedua ini juga memiliki kendala yaitu tingginya kandungan lignin, memerlukan teknologi mahal dan tidak ekonomis dalam produksi skala besar (Brennan dan Owende, 2010). Oleh karena itu, beberapa tahun ini dikembangkan biomassa (generasi ketiga) yang tidak bertentangan dengan produksi pangan, pakan ternak dan produknya lainnya yang berasal dari tanaman (Chisti, 2007).



Gambar 11. Tahapan proses produksi bioetanol generasi kedua dari biomassa lignoselulosa (Walker, 2011).

Bioetanol generasi ketiga merupakan bioetanol yang menggunakan bahan baku dari kelompok *algae* yaitu mikroalga dan makroalga (rumput laut) (Dragon *et al.*, 2010). Tahapan proses produksi bioetanol dari generasi ketiga dapat dilihat pada Gambar 12. Kelompok *algae* yang dapat dijadikan biomassa bioetanol adalah mikroalga (*Anabena*, *Botryococcus*, *Chlamydomonas*, *Dunaliella*, *Chlorella*, *Euglena*, *Porphyridium*, *Prymnesium*, *Scenedesmus*, *Spirogyra sp.*

Spirulina, *Synechococcus*, *Tertselmis*), dan makroalga (rumput laut) (Dragon *et al.*, 2010). Produksi bioetanol dari *algae* dengan memanfaatkan lemak dan holoselulosanya. Kelompok *algae* dipilih karena terbukti dapat tumbuh dan tahan pada berbagai lingkungan, persediaannya cukup dan aman, sedikit mengandung lignin atau tidak ada lignin sama sekali, pertumbuhannya cepat, dan berperan dalam pengurangan efek rumah kaca. Selain itu, *algae* mampu tumbuh pada air limbah dan mengkonversi CO₂ menjadi biomassa yang berguna serta mampu menghasilkan *biofuel* tanpa mengganggu persediaan pangan, biodiversiti mikroorganisme, dan tanaman pertanian (Chaudhary *et al.*, 2014). Salah satu limbah rumput laut yang dapat dimanfaatkan dalam produksi bioetanol adalah *Eucheuma cottonii* dalam bentuk bubuk. Namun, bioetanol generasi ketiga ini membutuhkan metode khusus agar biomassa tersebut dapat digunakan dalam kondisi kering (Mauliana, 2015). Oleh karena itu, saat ini masih banyak mengembangkan metode yang tepat untuk produksi bioetanol berbasis lignoselulosa.



Gambar 12. Tahapan proses produksi bioetanol generasi ketiga (Goh dan Lee, 2010).

III. BAHAN DAN METODE

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Analisis Hasil Pertanian, Laboratorium Mikrobiologi Hasil Pertanian Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian, Laboratorium Ekologi Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung dan Laboratorium Terpadu Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta pada bulan Oktober sampai November 2015.

3.2. Bahan dan Alat

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah biomassa limbah agroindustri TKKS yang diperoleh dari perkebunan kelapa sawit PTPN VII di Bekri, Lampung Tengah. Enzim yang digunakan untuk hidrolisis adalah enzim selulase (*SQzyme CS P-acid cellulose*) CSP-B yang diperoleh dari *Suntag International Limited di Shenzhen, China*. Ragi yang digunakan untuk starter *Sacharomyces ceriviceae* adalah ragi roti (Fermipan, produksi PT. Sangra Ratu Boga). Bahan kimia lain yang digunakan antara lain : natrium hidroksida (NaOH), air suling, media YPD agar (*yeast*, pepton, dextrose), *yeast* ekstrak agar (Oxoid), natrium klorida (Merck), pereaksi Nelson A, Nelson B, arsenomolibdat

(Medica), alkohol 70%, asam sitrat, dan natrium sitrat yang didapatkan dari Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung.

Alat-alat yang digunakan antara lain shaker water bath (Polyscience), *Gas Chromatography*, grinder, oven (Philip Harris Ltd), spektrofotometer (Thermo Scientific Genesys 20), inkubator (Heraeus D-6450 Hanau), autoklaf (WiseclaveTM), *colony counter* (Stuart Scientific, made in The UK), timbangan 4 digit (AY220 Shimadzu), ayakan (40 mesh), hot plate (Cimerec3), blender (Miyako tipe BL-152 GF), vortex (Termolyne Maxi Mix plusTM), mikropipet 1000 μ L (Thermo Scientific, Finnpiette F3), erlenmeyer 500 mL (Pyrex), *beaker glass* 500 mL (Pyrex), gelas ukur 500 mL (Pyrex), botol sampel ulir 30 mL, jerigen, loyang, cawan petri (Normax), tabung reaksi, rak tabung, corong, kertas saring, aluminium foil, kapas, dan pipet tetes.

3.3. Metode dan Pengumpulan Data Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui rancangan percobaan metode permukaan respon (*Response Surface Method*) untuk menemukan kondisi optimum dalam memproduksi bioetanol dari TKKS. Metode RSM adalah suatu metode yang menggabungkan teknik matematika dengan teknik statistika yang digunakan untuk membuat model dan menganalisa suatu respon (hasil) yang dipengaruhi oleh beberapa variabel bebas atau faktor, dengan tujuan mengoptimalkan respon tersebut (Montgomery, 2005). Desain percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *two level factorial design* atau secara faktorial 2^3 yang terdiri dari 3 variabel bebas yang dicobakan yaitu konsentrasi substrat (X_1), konsentrasi enzim selulase (X_2) dan konsentrasi starter (X_3) dengan variabel responnya adalah

kadar etanol, kadar gula reduksi akhir dan total koloni. Satuan percobaan penelitian ini dengan desain percobaan faktorial 2^3 terdiri atas 8 unit percobaan faktorial, 6 ulangan *center point* dan 6 pengaruh kuadrat (Iriawan dan Astuti, 2006). Optimasi kondisi sakarifikasi dan fermentasi serentak dilakukan dengan berbagai konsentrasi substrat (5%; 7,5% ; 10%) dan konsentrasi enzim (20, 25, 30 FPU) dan konsentrasi starter (7,5% ; 10% ; 12,5%). Faktor, kode dan taraf perlakuan metode RSM faktorial 2^3 dengan 3 variabel bebas dapat dilihat pada Tabel 2 dan rancangan percobaan RSM pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 2. Faktor, kode dan taraf perlakuan metode RSM secara faktorial 2^3 dengan 3 variabel bebas pada proses pembuatan bioetanol dari TKKS.

No.	Faktor	Kode	Taraf Kode				
			$-\alpha$ -1,68	Rendah -1	Tengah 0	Tinggi +1	$+\alpha$ +1,68
1	Konsentrasi substrat (%)	X ₁	3,3	5	7,5	10	11,7
2	Konsentrasi enzim selulase (FPU)	X ₂	16,6	20	25	30	33,4
3	Konsentrasi starter (%)	X ₃	5,8	7,5	10	12,5	14,2

Keterangan :

$$\alpha = \sqrt[4]{2^k}$$

k = jumlah faktor atau variabel bebas

$$\text{jadi } \alpha = \sqrt[4]{2^3} = 1,682$$

3.4. Pelaksanaan penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui dua tahapan, yaitu tahap pertama adalah perlakuan *pretreatment* TKKS secara basa, dan optimasi tahap sakarifikasi dan fermentasi serentak. Parameter yang diamati adalah kadar etanol, kadar gula reduksi akhir dan total koloni *S. cerevisiae*. Data hasil analisis kadar etanol dan

gula reduksi dianalisis dengan program Minitab 17 dan disajikan dalam bentuk grafik. Data total koloni *S. cereviciae* disajikan dalam bentuk tabel dan grafik serta dianalisis secara deskriptif.

Tabel 3. Rancangan percobaan menggunakan metode RSM secara faktorial 2^3 dengan 3 variabel bebas (Iriawan dan Astuti, 2006)

(Run)	Konsentrasi Substrat (X ₁)		Konsentrasi Enzim (X ₂)		Konsentrasi Starter (X ₃)	
	Taraf Kode	(%)	Taraf Kode	(FPU)	Taraf Kode	(%)
1	-1	5	-1	20	-1	7,5
2	1	10	-1	20	-1	7,5
3	-1	5	1	30	-1	7,5
4	1	10	1	30	-1	7,5
5	-1	5	-1	20	1	12,5
6	1	10	-1	20	1	12,5
7	-1	5	1	30	1	12,5
8	1	10	1	30	1	12,5
9	-1,682	3,3	0	25	0	10
10	1,682	11,7	0	25	0	10
11	0	7,5	-1,682	16,6	0	10
12	0	7,5	1,682	33,4	0	10
13	0	7,5	0	25	-1,682	5,8
14	0	7,5	0	25	1,682	14,2
15	0	7,5	0	25	0	10
16	0	7,5	0	25	0	10
17	0	7,5	0	25	0	10
18	0	7,5	0	25	0	10
19	0	7,5	0	25	0	10
20	0	7,5	0	25	0	10

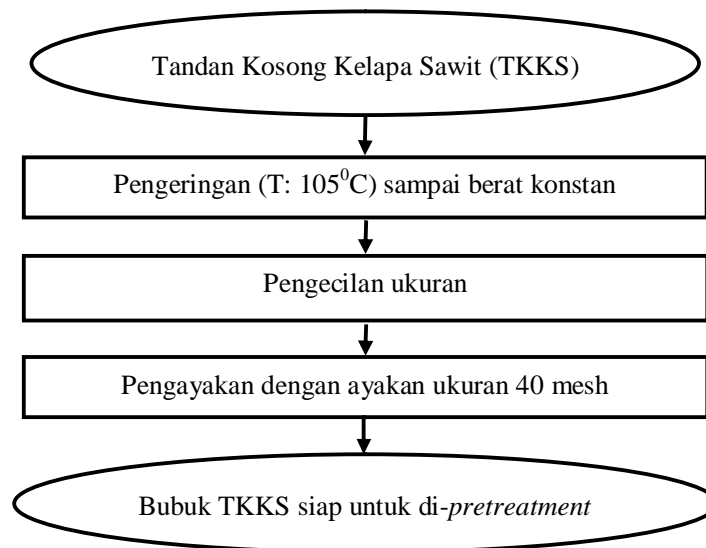
Keterangan :

- 1,682 = titik terendah perlakuan
- 1 = titik rendah perlakuan
- 0 = titik tengah perlakuan
- +1 = titik tinggi perlakuan
- 1,682 = titik tertinggi perlakuan

3.4.1. Persiapan Bahan Baku

TKKS dipotong kecil-kecil dan dikeringkan dengan oven pada suhu 105⁰C sampai berat konstan (3-5 jam). Kemudian, TKKS digrinder dan disaring dengan

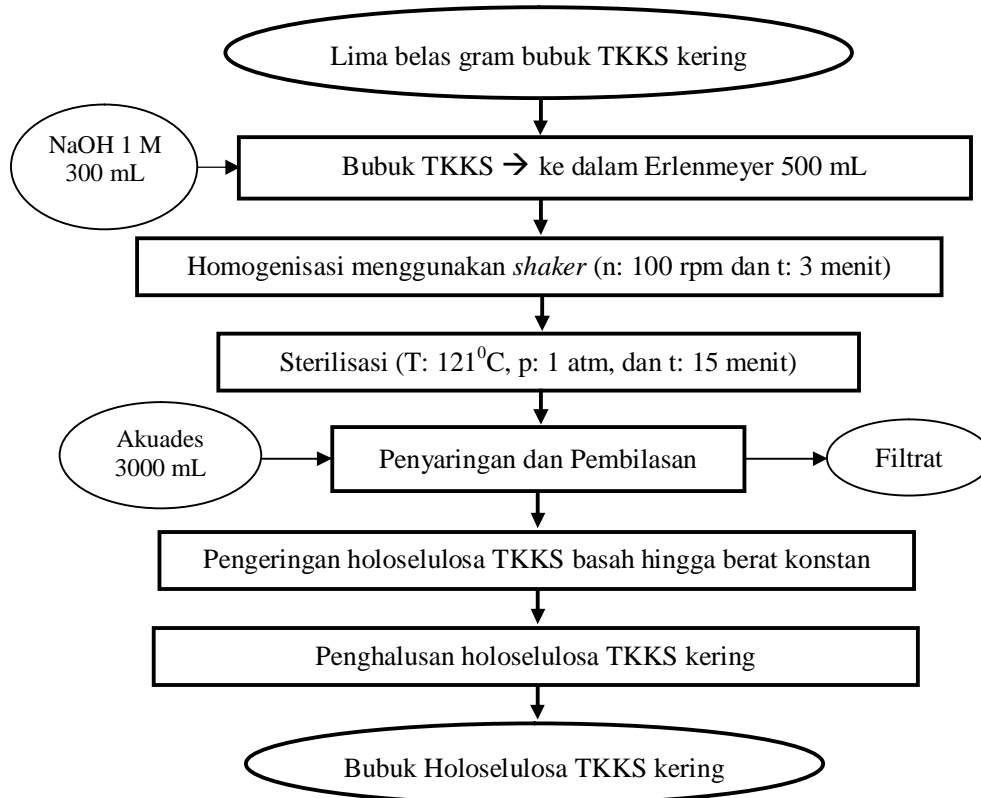
ukuran 40 mesh (Samsuri *et al.*, 2007). Sampel dengan ukuran 40 mesh lebih baik digunakan agar selulosa yang dikonversi menjadi etanol lebih optimal. Proses persiapan bahan baku dapat dilihat pada Gambar 13.



Gambar 13. Persiapan bahan baku (Samsuri *et al.*, 2007 yang dimodifikasi)

3.4.2. Pretreatment Menggunakan Basa

Pretreatment TKKS menggunakan basa dilakukan dengan menggunakan metode Sutikno *et al.* (2013) (Gambar 14). Lima belas gram bubuk TKKS kering dimasukkan dalam Erlenmeyer ukuran 500 mL dan ditambah 300 mL larutan NaOH 1 M. Setelah itu, sampel dihomogenisasi menggunakan *shaker* dengan kecepatan 100 rpm selama 3 (tiga) menit dan dipanaskan dalam *autoclave* pada suhu 121⁰C selama 15 menit. Setelah itu, sampel disaring dan dibilas dengan 3000 mL akuades untuk menghilangkan lignin dan larutan NaOH. Bagian padat (holoselulosa) TKKS dikeringkan dalam oven sampai berat konstan.



Gambar 14. Proses *pretreatment* menggunakan basa (Sutikno *et al.*, 2013)

3.4.3. Penentuan Aktivitas Enzim

Penentuan aktivitas enzim selulase diuji dengan metode Mandels (1987) yang dimodifikasi. Sebanyak 0,5 mL enzim selulase dengan pengenceran $10^1 - 10^{14}$ dicampur dengan 1 mL natrium sitrat (0,05 M, pH 4,8) dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, serta dimasukkan kertas saring Whatman No.1 dengan ukuran 1x6 cm (50 mg). Tabung reaksi yang sudah berisi selulosa (kertas saring), enzim selulase, dan buffer sitrat diinkubasi pada suhu 50°C selama 60 menit. Setelah didinginkan, filtrat diukur kadar gula reduksi dengan metode Nelson-Somogyi dalam Sudarmadji *et al.*, (1984) pada panjang gelombang 540 nm. Hasil pengukuran diplotkan pada kurva standar. Konsentrasi pengenceran enzim yang

menghasilkan kadar gula reduksi sebanyak 2 mg dihitung aktivitasnya dengan persamaan Mandels (1987) sebagai berikut.

Satuan FPU berdasarkan pada International Unit (IU) :

$$\begin{aligned} 1 \text{ IU} &= 1 \mu\text{mol}.\text{menit}^{-1} \text{ dari substrat yang dikonversi} \\ &= 1 \mu\text{mol}.\text{menit}^{-1} \text{ dari glukosa (gula reduksi) yang terbentuk selama hidrolisis} \\ &= 0,18 \text{ mg}.\text{menit}^{-1} \text{ glukosa yang diproduksi} \end{aligned}$$

Jumlah glukosa yang dilepaskan dalam pengujian aktivitas (FPU) pada pengenceran adalah 2 mg :

$$2 \text{ mg glukosa} = 2/0,18 \mu\text{mol}$$

Jumlah glukosa ini telah dihasilkan oleh 0,5 mL enzim selama 60 menit, dalam FPU:

$$\begin{aligned} 2 \text{ mg glukosa} &= 2/0,18 \times 0,5 \times 60 \mu\text{mol}.\text{menit}^{-1}.\text{mL}^{-1} \\ 2 \text{ mg glukosa} &= 0,37 \mu\text{mol}.\text{menit}^{-1}.\text{mL}^{-1} (\text{IU}.\text{mL}^{-1}) \end{aligned}$$

Oleh karena itu, perkiraan jumlah enzim (*critical enzym concentration* = mL.mL¹) yang melepaskan 2 mg glukosa dalam FPU mengandung 0,37 unit, dan

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi enzim} &= \frac{1}{\text{pengenceran}} \\ \text{FPU} &= \frac{0,37}{\text{konsentrasi enzim yang melepaskan 2 mg glukosa}} \text{ unit/ml} \end{aligned}$$

3.4.4. Produksi Etanol dengan Metode SSF

3.4.4.1. Persiapan Kultur *Saccaromyces ceriviceae*

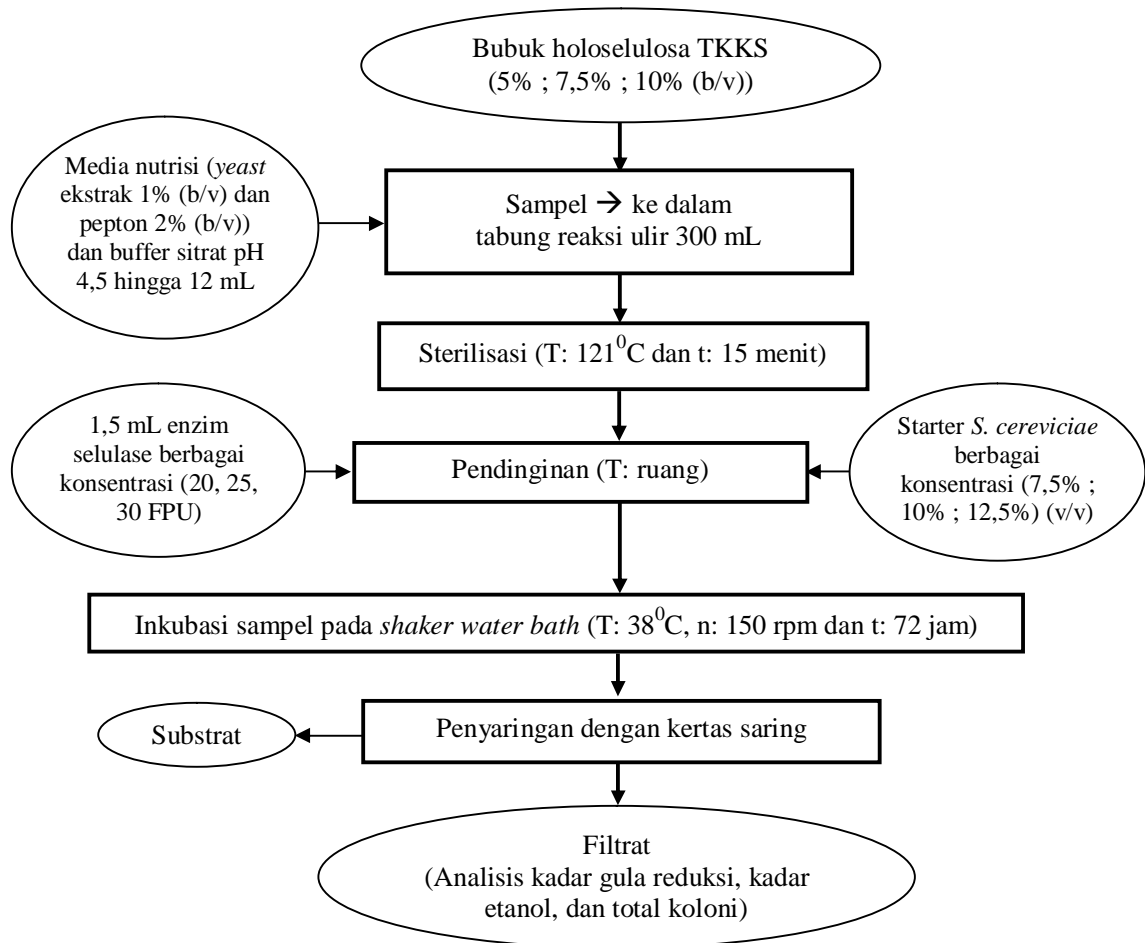
Sebanyak 7,0 gram media agar YPD dilarutkan dalam 100 mL aquadest dan dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* hingga larutan menjadi bening. Larutan media agar YPD tersebut disterilisasi pada suhu 121⁰C selama 15 menit. Sepuluh mL media YPD agar yang telah disterilisasi dituang kedalam tabung reaksi ukuran 20 mL lalu didinginkan dalam keadaan miring hingga memadat pada kondisi steril.

Satu gram ragi roti (*S. ceriviceae*) dilarutkan dalam 10 mL air suling dan dihomogenkan menggunakan vortex. Sebanyak 1 loop larutan ragi diinokulasikan pada media agar miring dan diinkubasi pada suhu 30⁰C selama 48 jam. Sebanyak 3 loop ragi dari media agar miring diinokulasikan pada larutan media YDP broth 5% steril kemudian diinkubasi pada suhu 30⁰C selama 48 jam (Suh *et al.*, 2007). Larutan tersebut disebut kultur *S. cerevisiae* dan akan diinokulasikan pada hasil hidrolisis TKKS.

3.4.4.2. Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak (SSF)

Proses sakarifikasi dan fermentasi serentak atau simultan (SSF) dengan metode Vintila *et al.* (2011) yang telah dimodifikasi. Substrat bubuk holoselulosa TKKS dengan berbagai konsentrasi (5% ; 7,5% ; 10% (b/v)) dimasukkan dalam tabung reaksi ukur 30 mL dan ditambahkan media nutrisi (*yeast* ekstrak 1% (b/v) dan pepton 2% (b/v)) dan buffer sitrat hingga 12 mL pH 4,5 kemudian disterilisasi pada suhu 121⁰C selama 15 menit. Setelah sampel didinginkan dalam suhu

kamar, lalu ditambahkan enzim selulase sebanyak 1,5 mL dengan berbagai konsentrasi yaitu 20, 25, 30 FPU (v/v) dan starter *S. cerevisiae* dengan berbagai konsentrasi (7,5% ; 10% ; 12,5% (v/v)) hingga total filtrat 15 mL. Sampel tersebut diinkubasi di dalam *shaker water bath* pada suhu 38⁰C dengan kecepatan goyangan *reciprocating shaker* 150 rpm selama 72 jam. Filtrat dari hasil inkubasi tersebut dianalisis kadar gula reduksinya menggunakan Metode Nelson-Somogyi.



Gambar 15. Metode SSF (Vintila *et al.*, 2011 yang telah dimodifikasi)

3.5. Pengamatan

Filtrat hasil SSF tersebut diukur kadar etanol, kadar gula reduksinya (akhir), dan dihitung total koloni *S. cerevisiae*. Pengukuran parameter yang diamati dapat dilihat berikut ini.

3.5.1. Analisis Gula Reduksi (Metode Nelson – Somogyi)

Filtrat dari hasil hidrolisis dan fermentasi TKKS yang mempunyai kadar gula reduksi disiapkan. Sampel tersebut diambil sebanyak 1 mL dan diencerkan dengan menambahkan aquades sebanyak 2,4 mL kedalam tabung reaksi. Reagensia Nelson sebanyak 1 mL ditambahkan ke dalam tabung tersebut dan selanjutnya diperlakukan seperti pada penyiapan kurva standar di bawah. Jumlah gula reduksi ditentukan dengan mengukur adsorbansi sampel pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm. Data adsorbansi tersebut dikonversi ke konsentrasi gula reduksi dengan memasukkan data adsorbansi ke persamaan kurva standar ($Y = ax + b$) dengan Y adalah adsorbansi sampel dan x adalah kadar gula reduksinya.

3.5.1.1. Pembuatan Reagensia

1. Reagensia Nelson

Reagensia Nelson A terdiri dari 12,5 g natrium karbonat anhidrat, 12,5 g garam *Rochelle*, 10 g natrium bikarbonat dan 100 g natrium sulfat anhidrat dalam 350 ml air suling, diencerkan sampai 500 ml. Reagensia Nelson B terdiri dari 7,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dalam 50 ml air suling dan ditambahkan 1 tetes

asam sulfat pekat. Kemudian larutan nelson A dan B dicampurkan dengan perbandingan 1 : 25.

2. Reagensia Arsenomolybdat

Ammonium molybdat sebanyak 25 g dilarutkan dalam 450 ml air suling dan ditambah 25 ml asam sulfat pekat, dilarutkan pada tempat yang lain 3 g $\text{Na}_2\text{HASO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dalam 25 ml air suling, kemudian larutan ini dituangkan ke dalam larutan yang pertama. Lalu disimpan dalam botol gelap dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Reagensia ini baru bisa digunakan setelah masa inkubasi tersebut, reagensia ini berwarna kuning.

3.5.1.2. Pembuatan Kurva Standar

Sepuluh mg glukosa anhidrat dilarutkan dalam 100 mL aquadest dan dilakukan 5 pengenceran hingga diperoleh larutan glukosa : 2, 4, 6, 8, dan 10 mg/mL. Lima tabung reaksi disiapkan, masing-masing diisi dengan 1 mL larutan glukosa standar tersebut di atas dan 1 tabung diisi 1 mL air suling sebagai blanko. Lima pengenceran tersebut masing-masing ditambahkan 1 mL reagensia Nelson dan dipanaskan pada penangas air mendidih selama 20 menit hingga terbentuk larutan merah bata. Setelah semua tabung didinginkan hingga suhu tabung mencapai 25°C , tiap larutan ditambahkan 1 mL reagensia arsenomolybdat dan divorteks hingga semua endapan Cu_2O yang ada larut kembali. Setelah itu tiap larutan ditambahkan 7 mL aquadest dan divorteks sampai homogen. Larutan yang telah encer siap diukur absorbansinya dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm. Hasil absorbansi kemudian diregresi sesuai dengan konsentrasi glukosa hingga terbentuk kurva standar (Sudarmadji *et al.*, 1984).

3.5.2. Kadar Etanol

Analisis kadar etanol dilakukan dengan menggunakan *Gas Chromatography*. Kolom yang digunakan adalah Carbowax Chromosorb W.HP 80/100 mesh dengan kondisi operasi suhu mula-mula 55⁰C kemudian dinaikkan 4⁰C per menit selama 3 menit. Selanjutnya dinaikkan lagi 32⁰C per menit sehingga suhu kolom menjadi 120⁰C. Tekanan gas pembawa (N₂) 1,7 kg/cm², tekanan gas pembawa (H₂) 1,6 kg/cm² dan tekanan udara 0,19 kg/cm². Injektor Hawlett Packard syringe 10 mL dengan volume injeksi 1 mL. Analisis kadar etanol membutuhkan larutan standar etanol yang dibuat pada konsentrasi 0,02; 0,03; 0,05 dan 0,10% yang masing-masing diinjeksi secara duplo (Masykuri, 2001).

3.5.3. Total Koloni

Total koloni diukur dengan metode cawan tuang (Fardiaz, 1993), yaitu sebanyak 1 mL sampel dimasukkan ke dalam 9 mL larutan garam fisiologis steril. Larutan sampel tersebut sebagai pengenceran 10⁻¹. Pengenceran 10⁻¹ dihomogenkan dan diambil 1 mL dari larutan tersebut dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi berikutnya yang berisi 9 mL larutan garam fisiologis sehingga diperoleh pengenceran 10⁻² dan seterusnya sampai diperoleh pengenceran yang sesuai (10⁻⁴ sampai dengan 10⁻⁸). Satu mL sampel diambil dari pengenceran yang dikehendaki dengan pipet lalu dimasukkan ke dalam cawan petri steril, kemudian ditambahkan 10-15 mL media *yeast* ekstrak agar steril. Kemudian sampel diinkubasi pada suhu 30⁰C selama 48 jam dan dihitung koloni *S. cereviciae* yang

tumbuh menggunakan “*Quebec Colony Counter*”. Total koloni yang terhitung harus memenuhi standar *International Commission Microbiology Food (ICMF)* yaitu antara 30 sampai 300 koloni per cawan petri.

$$\text{Total Koloni (koloni/mL)} = \text{jumlah koloni} \times \frac{1}{\text{faktor pengenceran}}$$

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan yang telah dilakukan maka dapat diambil kesimpulan yaitu kondisi optimum konsentrasi substrat, konsentrasi enzim, dan konsentrasi starter untuk memproduksi etanol dari holoselulosa TKKS belum ditemukan; dan kondisi SSF terbaik terjadi pada konsentrasi substrat 10%, konsentrasi enzim 30 FPU dan konsentrasi starter *S. cerevisiae* 12,5%. Kondisi tersebut menghasilkan kadar etanol tertinggi (0,812% (v/v)) dengan sisa gula reduksi sebanyak 18,164 g/L dan total koloni *S. cerevisiae* sebanyak 5,58 log (koloni/mL).

5.2. Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini, disarankan untuk melakukan optimasi konsentrasi substrat, konsentrasi enzim dan waktu fermentasi secara SSF dengan menggunakan Erlenmeyer 250 – 350 mL sebagai bioreaktor dan setiap hari filtrat hasil SSF diambil untuk menentukan kadar etanol, gula reduksi, dan total *S. cerevisiae* yang dihasilkan.

DAFTAR PUSTAKA

- Afriani, M. 2011. Pengaruh Lama Fermentasi dan Konsentrasi Ragi Roti Terhadap Kadar Bioetanol dari Fermentasi Glukosa Hasil Hidrolisis Selulosa Tandan Kosong Kelapa Sawit. Skripsi. Univeristas Sumatera Utara. Medan.
- Anonim, 2015. Peta Cadangan Minyak Bumi Indonesia. <http://statistik.migas.esdm.go.id/> Diakses pada tanggal 15 Juni 2015.
- Anonim, 2013. Statistik Minyak Bumi. <http://prokum.esdm.go.id/Publikasi/Statistik/Statistik%20Minyak%20Bumi.pdf> Diakses pada tanggal 14 Juni 2015.
- Aryafatta, 2008. Komponen Lignoselulosa TKKS. <http://www.aryafatta.com/2008/08.06/01/mengolah-limbah-sawit-jadi-bioetanol>. Diakses 11 Oktober 2015.
- Brennan, L., dan P. Owende. 2010. Biofuels From Microalgae-A Review of Technologies For Production, Processing, And Extractions Of Biofuels And Co-Products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 14:557-577.
- Buckle, K. A., R. A. Edwards., G. H. Fleet., dan M. Wotton. 1987. *Ilmu Pangan*. UI – Press : Jakarta.
- Buruiana, T.C., G. Garrote., C. Vizireanu. 2013. Bioethanol Production From Residual Lignocellulosic Materials: A Review – Part 1. *The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati Fascicle VI – Food Technology* 37(1) : 9-24.
- Caecilia, N. 2015. Pengaruh Perlakuan Awal Basa dan Hidrolisis Enzimatis Terhadap Kadar Gula Reduksi Tandan Kosong Kelapa Sawit. Skripsi. Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Chandel, A.K., E.S. Chan., R. Rudravaram., M. L.Narasu, L.V. Rao., dan P. Ravindra. 2007. Economics and Environmental Impact of Bioethanol Production Technologies : An Appraisal. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 2 (1) : 14-32.

- Chaudhary, L., P. Pradhan., N. Soni., P. Singh., dan A. Tiwari. 2014. Algae as A Feedstock For Bioethanol Production: New Entrance In Biofuel World. *Int. Journal Chemistry Technology Res.* 6, 1381–1389.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel From Microalgae. *Biotechnology Advances.* 25:294-306.
- Crestini, C., M. Crucianelli., M. Orlandi., R. Saladino. 2010. Oxidative Strategies In Lignin Chemistry: A New Environmental Friendly Approach For The Functionalisation Of Lignin And Lignocellulosic Fibers. *Catalysis Today.* 156: 8–22.
- Darnoko, 1992. Potensi Pemanfaatan Limbah Lignoselulosa Kelapa Sawit Melalui Biokonversi. *Berita Penelitian Perkebunan*, 2 (2): 85 – 87.
- Direktorat Jenderal Perkebunan, 2014. *Statistik Perkebunan Indonesia Komoditas kelapa Sawit 2013-2015*. Direktorat Jenderal Perkebunan : Jakarta.
- Dragon, G., B. Fernandes., A.A. Vicente., dan J.A. Teixeira. 2010. Third Generation Biofuels From Microalgae. In *Current Research, Technology and Education Topicsin Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, ed.A.Mendez-Vilas (Madrid:Formatex),1355–1366.
- Fardiaz, S. 1993. *Analisis Mikrobiologi Pangan*. Penerbit Raja Grafindo Persada. Jakarta.
- Fauzi, Y., E.W. Yustina., S. Iman., dan R. Hartono. 2005. *Kelapa Sawit : Budidaya, Pemanfaatan Hasil dan Limbah, Analisis Usaha dan Pemasaran*. Penebar Swadaya. Jakarta
- Fengel, D., and G. Wegener. 1984. *Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions*. Walter de Gruyter & Co. Berlin.
- Feriandi, 2011. Kajian Perlakuan Awal secara Kimiawi dan Enzimatik Limbah Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS) menjadi Gula Reduksi sebagai Bahan Baku Bioetanol. Tesis. Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Frazier, W.C., dan D.C. Westhoff. 1978. *Food Microbiology 4th Edition*. McGraw-Hill Book. New York.
- Gauss, W.F., S. Suzuki., dan M, Takagi. 1976. Manufacture of Alcohol from Celulosic Materials Using Plural Ferments. *BioResearch Center Company Limited*.
- Goh C.S., dan K.T. Lee. 2010. A Visionary And Conceptual Macroalgae Based Third-Generation Bioethanol (TGB) Biorefinery in Sabah, Malaysia as An Underlay For Renewable And Sustainable Development. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14 (2) : 842–848.

- Haetami, K., Abun., Y. Mulyani. 2008. Studi Pembuatan Probiotik^{BAS} (Bacillus licheniformis, Aspergillus niger, dan Saccharomyces cerevisiae) Sebagai Feed Supplement serta Implikasinya Terhadap Pertumbuhan Ikan Nila Merah. Laporan Penelitian. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Padjajaran. Bandung.
- Hermiati, E., D. Mangunwidjaja., T. Sunarti., O. Suparno., dan B. Prasetya. 2010. Pemanfaatan Biomassa Lignoselulosa Ampas Tebu Untuk Produksi Bioetanol. UPT BPP Biomaterial – LIPI. Bogor. *Jurnal Litbang Pertanian*. 29 (4) : 121-130.
- Hidayat, N., M. C. Pradaga dan S. Suhartini. 2006. *Mikrobiologi Industri*. Andi: Yogyakarta.
- Horn, S.J. 2000. Bioenergy from Brown Seaweeds. Thesis. Department of Biotechnology. Thesis. Department of Biotechnology. Norwegian University of Science and Technology. Trondheim.
- Howard R.L., E. Abotsi., E.L. Jansen van Rensburg., dan S. Howard. 2003. Lignocellulose Biotechnology: Issues Of Bioconversion And Enzyme Production. *African Journal of Biotechnol.* 2(12) : 602–619.
- Hoyer, K., M. Galbe., G. Zacchi. 2010. Effects of enzyme feeding strategy on ethanol yield in fed-batch simultaneous saccharification and fermentation of spruce at high dry matter. *Biotechnology for biofuels*. 3 : 14 – 25.
- Indartono, Y. 2005. Bioetanol, Alternatif Energi Terbarukan : Kajian Prestasi Mesin dan Implementasi di Lapangan. Fisika. LIPI.
- Iriawan, N., dan S.P. Astuti. 2006. *Mengolah Data Statistik dengan Mudah Menggunakan Minitab 14*. CV. Andi Offset. Yogyakarta.
- Isroi, R. Millati., S. Syamsiah., C. Niklasson., M.N. Cahyanto., K. Lundquist., M.J. Taherzadeh. 2011. Biological pretreatment of lignocelluloses with white-rot fungi and its applications: A review. *BioResources*. 6 : 5224–5259.
- Lee, H. V., S. B. A. Hamid., dan S. K. Zain. 2014. Conversion of Lignocellulosic Biomass to Nanocellulose: Structure and Chemical Process. *The Scientific World Journal* 2014.
- Mandels, M., R. Andreotti., dan C. Roche. 1976. Measurement of Saccharifying Cellulase. *Biotechnol Bioeng Symp.* 6 : 21-23.
- Mandels, M., Andreotti R.E., and Roche C. 1987. Measurement of Cellulose Activities. Applied Chemistry Division Commission on Biotechnology. *J. Pure & Appl. Chem.*, 59 (2) : 257—268.

- Markulak, T., J. Prouse., P. Olejnikova., I. Bodik. 2010. The Using Of Enzymes For Degradation Of Cellulose Substrate For The Production Of Biogas. Proceedings 37th International Conference of SSCHE. 1407-1412.
- Masykuri, 2001. Identifikasi Mikroorganisme yang Memfermentasikan Susu Kerbau lumpur Menjadi Didih. Journal Pengembangan Peternakan Tropis. Edisi Khusus Seminar Nasional Ruminansia : 297 - 306.
- Mauliana, R.M., Sutikno, Marniza. 2015. Effects Of Seaweed (*Eucheuma Cottonii*) Extraction And Hydrolysis On Reducing Sugar For Bioethanol Production. Prosiding Seminar Nasional Sains & Teknologi VI. Lembaga Penelitian dan Pengabdian Universitas Lampung. Bandar Lampung. 447-458.
- Mergner, R., R. Janssen., D. Rutz., I. de Bari., F. Sissot., D. Chiaramonti., A. Giovannini., S. Pescarolo., dan R. Nistri. 2013. Lignocellulosic Ethanol Process and Demonstration. A Handbook Part I. WIP Renewable Energies. Munich.
- Montgomery, C. D. 2005. *Design and Analysis of Experiments 6th edition*. John Wiley and Sons : New York.
- Mosier, N., C. Wyman., B. Dale., R. Elander., Y.Y. Lee., M. Holtzaple., dan M. Ladisch. 2005. Features Of Promising Technologies For Pretreatment Of Lignocellulosic Biomass. Bioresource Technol. 96 : 673-686.
- Nagodawithana, T.W., C. Castellano., dan K.H. Steinkraus. 1974. Effect of Dissolved Oxygen, Temperature, Initial Cell Count, and Sugar Concentration on The Viability of *Saccharomyces cerevisiae* in Rapid Fermentations. Applied Microbiology. 28 (3) : 383-391.
- Novia, A. Windarti., dan Rosmawati. 2014. Pembuatan Bioetanol dari Jerami Padi dengan Metode Ozonolisis – Simultaneous *Saccharomyces* and Fermentation (SSF). J. Teknik Kimia. 20 (3) : 38-48
- Ohgren, K., R. Bura., J. Saddler., dan G. Zacchi. 2007. Effect Of Hemicellulose And Lignin Removal On Enzymatic Hydrolysis Of Steam Pretreated Corn Stover. Bioresource Technology. 98 : 2503-2510.
- Ojokoh, A.O. and R.E. Uzeh. 2005. Production of *Saccharomyces cerevisiae* Biomass in Papaya Extract Medium. African Journal of Biotechnology. 4 (11) : 1281-1284.
- Olofsson *et al.*, 2008. A Short Review on SSF- An Interesting Process Option For Ethanol Production From Lignocellulosic Feedstock. *BioMed Central Ltd.*
- Olsson L, and B. Hahn-Hägerdal. 1993. Fermentative Performance of Bacteria and Yeasts in Lignocellulose Hydrolysates. Process Biochem 28(4) : 249–257.

- Orihara, O., I. Sakauchi., and Y. Nakazawa. 1992. Types and Standard for Fermented milk. Challenges For Health Sciences. Y. Nakazawa and Hasono (sd). *Elsavier Applied Science*. London.
- Ouyang, J., Z. Li., Xin Li., H. Ying., dan Q. Yong. 2009. Enhanced Enzymatic Conversion And Glucose Production Via Two Step Enzymatic Hydrolysis Of Corn Cob Residue From Xylooligosaccharides Producer's Waste. *BioResources*. 4 : 1586–1599.
- Peraturan Presiden No.5 Tahun 2006. Kebijakan Energi Nasional. Republik Indonesia.
- Poedjiadi, A. 1994. *Dasar-Dasar Biokimia*. UI Press : Jakarta.
- Quain, D.E., dan C.A. Boulton. 1987. Growth and Metabolism of Mannitol by Strains of *S. cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 133: 1675–1684.
- Rana, V., A. D. Eckard., dan B. K. Ahring. 2014. Comparison of SHF and SSF of Wet Exploded Corn Stover And Loblolly Pine Using In-House Enzymes Produced From *T. reesei* RUT C30 and *A. saccharolyticus*. SpringerPlus 2014, 3 (1) : 516.
- Remli, N.A.M., U. K. Md Shah., R. Mohamad., dan S. Abd Aziz. 2014. Effect Of Chemical And Thermal Pretreatments On The Enzymatic Saccharification Of Rice Straw For Sugar Production. *BioResources*. 9 (1) : 510–522.
- Samsuri, M., M. Gozan., R. Mardias., M. Baiquni., H. Hermansyah., A. Wijanarko., B. Prasetya., dan M. Nasikin. 2007. Pemanfaatan Sellulosa Bagas Untuk Produksi Etanol Melalui Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak Dengan Enzim Xylanase. *Makara, Teknologi*, 11 (1) : 17-24.
- Samsuri, M., M. Gozan., B. Prasetya., dan M. Nasikin. 2009. Hydrolysis Of Bagassae By Cellulose And Xylanase For Bioethanol Production In Simultaneous Saccharification And Fermentation. *Jurnal of Appl and Industrial Biotech at Tropical Region 2*.
- Santi, G. 2012. Second Generation Bioethanol Production From Orange Peel Waste. (Disertasi). University Of Tuscia. Viterbo. Italia.
- Septiyani, R. 2011. Pengaruh Konsentrasi dan Lama Inkubasi Enzim Selulase terhadap Kadar Gula Reduksi Ampas Tebu. Skripsi. Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Simanjuntak, H. 2007. Analisa Logam Berat Timbal, Besi, Kadmium dan Zinkum dalam Lindi Hitam (Black Liquor) pada Industri Pulp Proses Kraft dengan Menggunakan Metode Spektrofotometri Serapan Atom (SSA). Universitas Sumatera Utara. Medan.

- Soerawidjaja, H.T. 2009. Bioetanol Generasi Kedua. <http://www.majarimagazine.com/2009/02/bioetanol-generasi-kedua/>. Diakses pada tanggal 22 November 2015.
- Stenberg, K., M. Bollok., K. Reczey., M. Galbe., and G. Zacchi. 2000. Effect of Substrate and Cellulase Concentration on Simultaneous Saccharification and Fermentation of Steam-Pretreated Softwood for Ethanol Production. *Biotechnol Bioeng.* 68 : 204–210.
- Sudarmadji, S., Bambang, H., dan Suhardi. 1984. *Prosedur Analisa Untuk Bahan Makanan dan Pertanian. Edisi Ketiga.* Penerbit Liberty: Yogyakarta.
- Sugiyono, A., Anindhita., M. S. Boedoyo., Adiarso. 2014. Outlook Energi Indonesia 2014 : Pengembangan Energi Untuk Mendukung Program Subsitusi BBM, Hlm 1-113. Pusat Teknologi Pengembangan Sumberdaya Energi. Badan Pengkajian Dan Penerapan Teknologi. ISBN 978-602-1328-02-6. Jakarta, September 2014.
- Sukowati, A., Sutikno., dan S. Rizal. 2014. Produksi Bioetanol dari Kulit Pisang Melalui Hidrolisis Asam Sulfat. *J. Teknologi dan Industri Hasil Pertanian.* 19 (3) : 274-288.
- Sun, Y., dan Cheng, J. 2002. Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for Ethanol Production: A Review. *BioResource Technology Journal.* 83 (1) : 1-11.
- Surati, 2015. Konsentrasi *S. cerevisiae* dan Lam Fermentasi Terhadap Kadar Etanol Limbah Jerami. *J. Fikratuna.* 7 (2) : 350-361.
- Suri, A., Y. Yusak., R. Bulan. 2013. Pengaruh Lama Terhadap Kadar bioetanol dari Fermentasi Glukosa Hasil Hidrolisis Selulosa Tandan Kosong Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jack) dengan HCl 30% Menggunakan Ragi Roti. *J. Saintia Kimia.* 1 (2).
- Sutikno, S. Hidayati., O. Nawansih., F. Nurainy., S. Rizal., Marniza., dan R. Arion. 2010. Tingkat Degradasi Lignin Bagas Tebu Akibat Perlakuan Basa Pada Berbagai Kondisi. <http://blog.unila.ac.id/sutiknounila/category/research-activities>. Diakses pada tanggal 23 Oktober 2015.
- Sutikno, Marniza., dan O. Nawansih. 2013. Teknik Pengolahan Limbah Agroindustri menjadi Bioetanol sebagai Pengganti Bahan Bakar Minyak. Laporan Akhir Penelitian Unggulan Unila (Tahun Kedua). Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Sutikno dan O. Nawansih. 2014. Optimasi Sakarifikasi dan Fermentasi Holoselulosa TKKS Untuk Memproduksi Bioetanol Sebagai Pengganti Bahan Bakar Minyak. Usulan Hibah Penelitian. Teknologi Hasil Pertanian. Universitas Lampung. Bandar Lampung.

- Taherzadeh, M.J., dan K. Karimi. 2007. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials : A review. *BioResources*. 2 (3) : 472-499.
- Tengborg, C., M. Galbe., dan G. Zacchi. 2001. Influence Of Enzyme Loading And Physical Parameters On The Enzymatic Hydrolysis Of Steam-Pretreated Softwood. *Biotechnol*. 17(1) : 110-117.
- Triwahyuni, E., Muryanto., Y. Sudiyani., dan H. Abimanyu. 2015. The Effect of Substrate Loading on Simultaneous Saccharification and Fermentation Process for Bioethanol Production From Oil Palm Empty Fruit Bunches. *Energy Procedia*. 68 : 138-146.
- Vintila, T., D. Vintila., S. Neo., C. Tulcan., N. Hadaruga. 2011. Simultaneous Hydrolysis and Fermentation of Lignocellulose Versus Separated Hydrolysis and fermentation for Ethanol Production. *J. Romanian Biotechnological Letters*. 6 (1):106 -112.
- Volk., dan A. Wesley. 1993. *Mikrobiologi Dasar*. Edisi ke-5, Erlangga : Jakarta.
- Wahyudi, T. Supriyanto., Abdullah, Widayat, Hadiyanto. 2010. Proses Produksi Etanol oleh *Saccharomyces cerevisiae* dengan Operasi Kontinyu pada Kondisi Vakum. Seminar Rekayas Kimia dan Proses 2010. Fakultas Teknik. Universitas Diponegoro. Semarang. 15 : 1-6.
- Walker, G.M. 2011. Fuel alcohol : Current Production And Future Challenges. *Journal of the Institute of Brewing*, 117 (1) : 3–22.
- Wardani, A.K., dan F.N.E. Pertiwi. 2013. Produksi Etanol dari Tetes Tebu oleh *Saccharomyces cerevisiae* pembentuk Flok (NRRL-Y 265). *J. Agritech*. 33(2) : 131-139.
- Wasungu, K. 1982. Growth Characteristics Of Baker's Yeast In Ethanol. *Biotechnol Bioeng*. 24 : 1125–1134.
- Wibowo, E. 1994. Kajian Awal Produksi Aseton-Butanol-Etanol dari Substrat Hidrolisat Tandan Kosong Kelapa Sawit (*Elais guinensis* JACQ) Menggunakan Bioreaktor Unggun Diam. Skripsi. FATETA IPB. Bogor.
- Wingren, A., M. Galbe., dan G. Zacchi. 2003. Techno-Economic Evaluation of Producing Ethanol From Softwood: Comparison of SSF and SHF and Identification of Bottlenecks. *Biotechnol*. 19 (4) : 1109-1117.
- Widyasari, R. 2011 .Pengaruh Konsentrasi dan Lama Inkubasi Enzim Selulase untuk Menghidrolisis Selulosa dan Hemiselulosa TKKS menjadi Gula Reduksi sebagai Bahan Baku Bioetanol. Skripsi. Universitas Lampung. Bandar Lampung.

- Wyman C.E., D. D. Spindler., dan K. Grohmann. 1992. Simultaneous Saccharification and Fermentation of Several Lignocellulosic Feedstocks to Fuel Ethanol. *Biomass Bioenergy*, 3(5) : 301–7.
- Xiao, Z., X. Zhang., D.J. Gregg., and J.N. Saddler. 2004. Effects of Sugar Inhibition on Cellulases and Beta-Glucosidase During Enzymatic Hydrolysis of Softwood Substrates. *Biochemical Biotechnology*. 26 : 113-116.
- Yanti, M. 2013. Pengaruh Konsentrasi Asam Sulfat (H_2SO_4) dan Waktu Hidrolisis Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS) terhadap Kadar Gula Reduksi sebagai Bahan Baku Bioetanol. Skripsi. Universitas Lampung. Bandar Lampung.