

**PENGARUH PREHIDROLISIS DAN LAMA INKUBASI *SIMULTANEOUS*  
*SACCHARIFICATION AND FERMENTATION* TERHADAP KADAR  
ETANOL DARI TANDAN KOSONG KELAPA SAWIT**

**(Skripsi)**

**Oleh**

**ANDIKA EKO PRAYOGA**



**FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2017**

## **ABSTRACT**

### **EFFECT OF PREHYDROLYSIS AND INCUBATION PERIOD OF *SIMULTANEOUS SACCHARIFICATION AND FERMENTATION* ON ETHANOL CONCENTRATION FROM EMPTY OIL PALM BUNCHES**

**By**

**ANDIKA EKO PRAYOGA**

When producing bioethanol from oil palm empty fruit bunches (EFB) using *simultaneous saccharification and fermentation* (SSF) method, enzymatic hydrolysis runs slowly because SSF incubation occurs at 38°C. To solve the problem, EFB needs to be pre-hydrolyzed at the optimum temperature of cellulase (50°C) prior to SSF. The objectives of this study were to find out the effect of pre-hydrolysis and incubation period of SSF EFB for producing bioethanol on bioethanol concentration as well as the remaining cellulose and reducing sugar concentrations. After drying and milling, EFB was pre-treated with 1.0 M NaOH solution at 121°C for 15 minutes. After filtering the solution, the residue (EFB holo-cellulose) was analysed to determine its cellulose content (as the initial cellulose content). The holocellulose was then prehydrolysed with cellulase at 50°C, pH 4.8, and at 150 rpm for 0 hours (with out pre-hydrolysis) and 24 hours. After prehydrolysis, 1 mL filtrate was taken to determine its reducing sugar

concentration; and the solution was added with cellulose and incubated at 38°C, pH 4.8, and 150 rpm for 24, 48, 72, and 96 hours. After SSF incubation, the solution was centrifuged; the residue was analysed to determine its cellulose content (as final cellulose); and the filtrate was analysed to determine its ethanol and reducing sugar contents as final reducing sugar. The results showed that prehydrolysis for 24 hours resulted in higher ethanol content, lower cellulose content, and higher reducing sugar content than that without prehydrolysis (prehydrolysis for 0 hours). The longer SSF incubation yielded the higher bioethanol content as well as the lower cellulose content the lower reducing sugar. The highest ethanol concentration (0,916% v/v) was obtained from a combination treatment of prehydrolysis for 24 hours and SSF incubation of 96 hours.

Keywords: bioethanol, oil palm empty bunches, prehydrolysis, SSF.

## **ABSTRAK**

### **PENGARUH PREHIDROLISIS DAN LAMA INKUBASI *SIMULTANEOUS SACCHARIFICATION AND FERMENTATION* TERHADAP KADAR ETANOL DARI TANDAN KOSONG KELAPA SAWIT**

**Oleh**

**ANDIKA EKO PRAYOGA**

Proses hidrolisis secara enzimatik pada pembuatan bioetanol secara *simultaneous saccharification and fermentation* (SSF) dari TKKS berjalan lambat karena suhu inkubasi SSF dilakukan pada suhu 38°C. Untuk mempercepat proses hidrolisis tersebut, TKKS perlu diberi perlakuan prehidrolisis pada suhu optimum enzim selulase, yaitu 50°C. Tujuan penelitian ini yaitu untuk mengetahui pengaruh prehidrolisis dan lama inkubasi SSF terhadap kadar bioetanol, kadar selulosa, dan gula reduksi pada pembuatan bioetanol dari tandan kosong kelapa sawit (TKKS). TKKS diberi perlakuan awal dengan cara direndam dalam larutan NaOH 1 M pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah disaring, ampas (holoselulosa) TKKS dianalisis untuk menentukan kadar selulosanya (sebagai kadar selulosa awal). Holoselulosa TKKS kemudian diberi perlakuan prehidrolisis dengan menambahkan enzim selulase pada suhu 50°C, pH 4,8, dan goyangan 150 rpm selama 0 jam dan 24 jam. Setelah proses prehidrolisis tersebut,

filtrat diambil sebanyak 1 ml untuk ditentukan kadar gula reduksi. Setelah prehidrolisis selama 0 jam (tanpa prehidrolisis) dan 24 jam, larutan ditambah *Saccharomyces cerevisiae* sebagai starter dan inkubasi SSF dilakukan pada suhu 38°C, pH 4,8, dan goyangan 150 rpm selama 24, 48, 72, dan 96 jam. Setelah inkubasi, larutan dipusingkan, ampas dianalisis kadar selulosanya (sebagai selulosa akhir), dan filtratnya dianalisis kadar etanol dan gula reduksinya sebagai kadar gula reduksi akhir. Hasil penelitian menunjukkan bahwa prehidrolisis selama 24 jam menghasilkan kadar etanol yang lebih tinggi dan menyisakan kadar selulosa yang lebih rendah, serta kadar gula reduksi lebih tinggi, dibandingkan dengan tanpa prehidrolisis (prehidrolisis selama 0 jam). Semakin lama inkubasi SSF semakin tinggi kadar etanol, dan menyisakan kadar selulosa dan kadar gula reduksi yang semakin rendah. Kadar etanol tertinggi (0,916 %v/v) diperoleh pada kombinasi perlakuan prehidrolisis selama 24 jam dan inkubasi SSF selama 96 jam.

Kata kunci : Tandan kosong kelapa sawit, bioetanol, SSF, prehidrolisis.

**PENGARUH PREHIDROLISIS DAN LAMA INKUBASI *SIMULTANEOUS*  
*SACCHARIFICATION AND FERMENTATION* TERHADAP KADAR  
ETANOL DARI TANDAN KOSONG KELAPA SAWIT**

Oleh

**ANDIKA EKO PRAYOGA**

Skripsi

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

Pada

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



**FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2017**

Judul Skripsi

**: PENGARUH PREHIDROLISIS DAN LAMA  
INKUBASI *SIMULTANEOUS*  
*SACCHARIFICATION AND FERMENTATION*  
TERHADAP KADAR ETANOL DARI TANDAN  
KOSONG KELAPA SAWIT**

Nama Mahasiswa

: Andika Eko Prayoga

Nomor Pokok Mahasiswa

: 1314051006

Program Studi

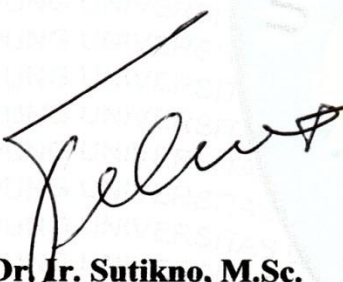
: Teknologi Hasil Pertanian

Fakultas


: Pertanian

**MENYETUJUI**

1. Komisi Pembimbing



**Dr. Ir. Sutikno, M.Sc.**  
NIP 19560114 198603 1 002



**Ir. Otik Nawansih, M.P.**  
NIP 19650503 199010 2 001

2. Ketua Jurusan

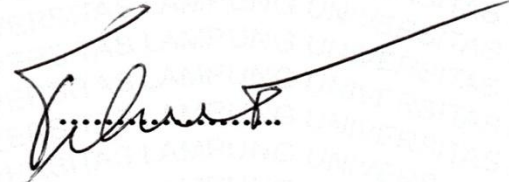


**Ir. Susilawati, M.Si.**  
NIP 19610806 198702 2 001

**MENGESAHKAN**

**1. Tim Penguji**

**Ketua : Dr. Ir. Sutikno, M.Sc.**



.....

**Sekretaris : Ir. Otik Nawansih, M.P.**



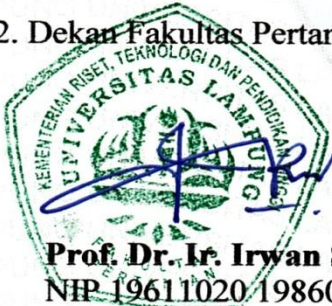
.....

**Penguji  
Bukan Pembimbing : Dr. Sri Hidayati, S.T.P., M.P.**



.....

**2. Dekan Fakultas Pertanian**



**Prof. Dr. Ir. Irwan Sukri Banuwa, M.Si.**  
NIP. 196110201986031002

**Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 24 Mei 2017**



## PERNYATAAN KEASLIAN HASIL KARYA

Saya Andika Eko Prayoga NPM 1314051006 menyatakan bahwa 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 plagiat karya orang lain.

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

Bandarlampung, 24 Mei 2017  
Yang Membuat Pernyataan



Andika Eko Prayoga  
NPM. 1314051006

## **RIWAYAT HIDUP**

Penulis dilahirkan di desa Banyuwangi, Kabupaten Lampung Tengah pada tanggal 10 bulan Mei tahun 1994, merupakan anak pertama dari tiga bersaudara, pasangan Bapak Sugiyono dan Ibu Mistati. Penulis mengawali pendidikan formal di Taman Kanak-Kanak Dharma Wanita Gunung Agung pada tahun 2000 dan lulus pada Tahun 2001. Pada tahun yang sama, penulis melanjutkan sekolah dasar di Sekolah Dasar Negeri (SDN) 2 Gunung Agung Kecamatan Terusan Nunyai, dan menyelesaikannya pada tahun 2007. Penulis langsung melanjutkan pendidikannya ke Sekolah Menengah Pertama Negeri (SMPN) 3 Terusan Nunyai dan lulus pada tahun 2010. Pendidikan penulis dilanjutkan lagi di Sekolah Menengah Kejuruan Negeri (SMKN) 2 Terbanggi Besar dengan mengambil Jurusan Teknik Komputer Jaringan (TKJ) dan menyelesaikannya pada tahun 2013. Setelah penulis menyelesaikan pendidikannya di SMK, pada tahun 2013 penulis diterima sebagai mahasiswa Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Nasional (SBMPTN), dan selama kuliah penulis mendapat bantuan biaya pendidikan Bidik Misi dari Pemerintah.

Selama berada di bangku perkuliahan, penulis aktif di beberapa Unit Kegiatan Mahasiswa (UKM) Tingkat Universitas. Penulis aktif di UKM Tapak Suci Universitas Lampung sebagai anggota bidang Kaderisasi periode 2013-2015,

UKM Birohmah sebagai anggota bidang Hubungan Masyarakat periode 2014-2015, UKM Koperasi Mahasiswa Universitas Lampung sebagai Kepala Bidang Penelitian dan Pengembangan periode 2015-2016 dan sebagai Badan Pengawas periode 2016-2017. Penulis juga pernah ikut terlibat dalam Panitia Khusus (PANSUS) Pemilihan Raya (PEMIRA) Gubernur Fakultas Pertanian periode 2015-2016 sebagai bendahara. Penulis melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) Tematik di Desa Rawa Ragil, Kecamatan Rawa Pitu, Kabupaten Tulang Bawang selama 60 hari pada bulan Januari- Maret 2016. Pada tahun yang sama, penulis melaksanakan Praktik Umum di Balai Besar Teknologi Pati (B2PT) BPPT di desa Bumi Aji, Kecamatan Anak Tuha, Kabupaten Lampung Tengah selama 30 hari pada bulan Juli-Agustus 2016.

## SANWACANA

Puji syukur penulis ucapkan kehadiran Allah SWT, berkat rahmat serta karunia-Nya penulis mampu menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi ini. Pada kesempatan ini, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Bapak Prof. Dr. Ir. Irwan Sukri Banuwa, M.Si., selaku Dekan Fakultas Pertanian Universitas Lampung atas bantuan dalam memperlancar proses penyusunan skripsi ini.
2. Ibu Ir. Susilawati, M.Si., selaku Ketua Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Universitas Lampung atas bantuan dalam memperlancar proses penyusunan skripsi ini.
3. Bapak Dr. Ir. Sutikno, M.Sc., selaku Dosen Pembimbing Utama dan Dosen Pembimbing Akademik atas segala bantuan, pengarahan, nasihat, masukan, saran selama penulis menjadi mahasiswa THP, dan penyusunan skripsi ini.
4. Ibu Ir. Otik Nawansih, M. P., selaku Dosen Pembimbing Kedua atas segala bantuan, pengarahan, masukan, dan saran selama penyusunan skripsi ini.
5. Ibu Dr. Sri Hidayati, S.T.P., M.P., selaku Pembahas atas segala pengarahan, nasihat, masukan, dan saran selama penyusunan skripsi ini.
6. Kedua orangtua tercinta Bapak Sugiyono dan Ibu Mistati, Adik Riska Dwi Cahyani dan Endang Tri Wahyuni terimakasih banyak atas segala doa, kasih sayang, motivasi, dukungan, dan semangat yang diberikan untuk ku.

7. Keluargaku yang selalu memberikan bantuan dan motivasi selama kuliah sampai penyusunan skripsi.
8. Seluruh Bapak dan Ibu dosen pengajar, staff administrasi dan laboratorium di Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Lampung atas ilmu dan bantuan yang telah diberikan kepada penulis selama menjadi mahasiswa THP.
9. Keluarga THP 2013, kakak–kakak, mba–mba 2012, 2011, 2010 dan adik-adik 2014, 2015 terima kasih atas segala kebersamaan, semangat, dan motivasi serta dukungan yang diberikan selama ini.

Penulis berharap semoga Allah SWT membalas semua kebaikan mereka dan penulis berharap skripsi ini dapat bermanfaat bagi pembaca dan bangsa Indonesia.

Bandar Lampung, Mei 2017

Penulis

Andika Eko Prayoga

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	v
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	vii
<b>I. PENDAHULUAN</b>	
1.1. LatarBelakang .....	1
1.2. Tujuan Penelitian .....	4
1.3. Kerangka Pemikiran.....	4
1.4. Hipotesis .....	8
<b>II. TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1. Tandan kosong kelapa sawit (TKKS) .....	9
2.2. Bioetanol .....	15
2.3. Metode <i>Simultaneous Saccharification and Fermentation</i> .....	16
2.4. Sakarifikasi .....	19
2.5. Inkubasi.....	20
<b>III. BAHAN DAN METODE</b>	
3.1. Tempat dan Waktu Penelitian.....	23
3.2. Bahan dan Alat.....	23
3.3. Metode Penelitian .....	24
3.4. Pelaksanaan Penelitian.....	25

3.4.1. Persiapan Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS) .....	25
3.4.2. <i>Pretreatment</i> Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS) .....	26
3.4.3. Persiapan Kultur <i>Saccaromyces ceriviceae</i> .....	27
3.4.4. Tahap SSF dengan dan tanpaPrehidrolisis .....	27
3.5. Pengamatan .....	29
3.5.1. Analisis Lignin, Selulosa dan Hemiselulosa TKKS .....	29
3.5.2. Analisis Kadar Gula Reduksi .....	30
3.5.2.1. Persiapan Kurva Standar .....	30
3.5.2.2. Penentuan Kadar Gula Reduksi pada Sampel .....	31
3.5.3. Analisis Kadar Etanol dengan <i>Gas Chromatography</i> .....	31
<b>IV. HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	
4.1. Komposisi lignoselulosa TKKS sebelum dan setelah <i>pretreatment</i>	33
4.2. Kadar gula reduksi setelah prehidrolisis .....	37
4.3. Pengaruh prehidrolisis dan lama inkubasi SSF terhadap kadar Selulosa TKKS .....	39
4.4. Pengaruh prehidrolisis dan lama inkubasi terhadap kadar gula reduksi setelah SSF .....	42
4.5. Pengaruh prehidrolisis dan lama inkubasi terhadap kadar etanol setelah SSF .....	44
<b>V. KESIMPULAN DAN SARAN</b>	
5.1. Kesimpulan .....	48
5.2. Saran .....	48
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	49
<b>LAMPIRAN</b> .....	56

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Hasil analisis lignoselulosa sebelum <i>pretreatment</i> .....	57
2. Hasil analisis lignoselulosa setelah <i>pretreatment</i> .....	57
3. Hasil absorbansi kurva standar gula reduksi .....	58
4. Hasil analisis gula reduksi sampel prehidrolisis 24 jam (ulangan ke-1) .....	58
5. Hasil analisis gula reduksi sampel prehidrolisis 24 jam (ulangan ke-2) .....	59
6. Hasil analisis gula reduksi sampel prehidrolisis 24 jam (ulangan ke-3) .....	59
7. Hasil analisis gula reduksi sampel prehidrolisis 24 jam (ulangan ke-4) .....	60
8. Rekapitulasi data kadar gula reduksi sampel prehidrolisis 24 jam .....	60
9. Data selulosa (%) .....	61
10. Uji Kehomogenan (Kesamaan) Ragam (Bartlett's test) Selulosa (%)..	61
11. Analisis sidik ragam Selulosa (%). .....	62
12. Uji Ortogonal Polinomial terhadap kadar selulosa setelah SSF. ....	63
13. Data gula reduksi (g/L). .....	64
14. Uji Kehomogenan (Kesamaan) Ragam (Bartlett's test) gula reduksi (g/L) .....	64
15. Analisis sidik ragam gula reduksi (g/L). .....	65
16. Uji Ortogonal Polinomial terhadap kadar gula reduksi setelah SSF....	66



17. Data etanol (%) .....	67
18. Uji Kehomogenan (Kesamaan) Ragam (Bartlett's test) etanol (%) .....	68
19. Analisis sidik ragam etanol (%). .....	68
20. Uji Ortogonal Polinomial terhadap kadar etanol setelah SSF.....	69
21. Perhitungan rendemen ( <i>yield</i> ) kadar etanol.....	70

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur selulosa.....	10
2. Struktur hemiselulosa.....	11
3. Komponen berbagai gula pada hemiselulosa.....	12
4. Struktur penyusun lignin.....	13
5. Tiga jenis monoligol.....	14
6. Diagram alir persiapan bahan baku.....	25
7. Diagram alir proses <i>pretreatment</i> menggunakan basa.....	26
8. Diagram alir SSF dengan dan tanpa prehidrolisis.....	28
9. Kadar selulosa, hemiselulosa dan lignin TKKS sebelum dan setelah <i>pretreatment</i> dengan NaOH 1 M menggunakan temperatur 121°C selama 15 menit.....	34
10. Kadar gula reduksi (g/L) TKKS setelah prehidrolisis dengan suhu 50°C selama 0 jam dan 24 jam.....	37
11. Pengaruh prehidrolisis dan lama inkubasi SSF terhadap penurunan kadar selulosa TKKS.....	41
12. Pengaruh prehidrolisis dan lama inkubasi SSF terhadap kadar gula reduksi.....	43
13. Pengaruh prehidrolisis dan lama inkubasi SSF terhadap kadar etanol.....	46
14. Grafik hubungan kadar gula reduksi dengan kadar etanol.....	48
15. Kurva standar gula reduksi/glukosa.....	58

16. Grafik pengaruh prehidrolisis dan lama inkubasi terhadap kadar selulosa TKKS .....	64
17. Grafik pengaruh prehidrolisis dan lama inkubasi terhadap kadar gula reduksi setelah SSF. ....	67
18. Grafik pengaruh prehidrolisis dan lama inkubasi terhadap kadar etanol setelah SSF.....	70
19. TKKS belum mengalami pengecilan ukuran. ....	71
20. TKKS setelah mengalami pengecilan ukuran. ....	71
21. TKKS setelah mengalami <i>pretreatment</i> . ....	71
22. Pembuatan media agar miring.....	71
23. Pemasakan media agar miring. ....	71
24. Inokulasi <i>yeast</i> pada media agar miring. ....	71
25. Inkubasi Kultur antara.....	72
26. Suhu inkubasi kultur antara. ....	72
27. Kultur antara yang telah ditumbuhi <i>yeast</i> .....	72
28. Inkubasi kultur kerja .....	72
29. Kultur Kerja yang telah jadi.....	72
30. Proses prehidrolisis 24 jam .....	72
31. Pembuatan kurva standar 0, 2, 4, 6, dan 8 mg/100 mL.....	73
32. Proses pemanasan 15 menit pada larutan kurva standar .....	73
33. Warna larutan kurva standar setelah dipanaskan .....	73
34. Pengenceran 1000 kali sampel gula reduksi prehidrolisis .....	73
35. Spektrofotometri UV-Vis.....	73
36. Inkubasi pada proses SSF .....	73
37. Pengambilan 1 mL sampel untuk analisis etanol.....	74

38. <i>Gas Chromatography</i> untuk analisis etanol.....	74
39. Tampilan Hasil analisis etanol menggunakan G.C .....	74
40. Penyaringan residu untuk analisis selulosa akhir.....	74
41. Penimbangan sampel untuk analisis selulosa akhir.....	74
42. Proses pemanasan pada analisis selulosa akhir .....	74
43. Proses pengovenan pada analisis selulosa akhir .....	75
44. Cawan porselen yang digunakan pada analisis selulosa akhir .....	75

## **I. PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang**

Produksi bahan bakar minyak (BBM) Indonesia setiap tahun semakin menurun. Berdasarkan data Badan Pusat Statistik (2016) diketahui bahwa jumlah produksi minyak bumi pada tahun 1996 adalah sebesar 548.648.300 barel. Lalu 18 tahun kemudian, pada tahun 2014 jumlah produksi minyak bumi Indonesia turun menjadi 287.902.200 barel atau mengalami penurunan sebesar 47,52 persen. Sementara itu, jumlah konsumsi BBM di Indonesia setiap tahun semakin meningkat. Pada tahun 2010, jumlah konsumsi BBM adalah sebesar 62.187.080,37 KL, dan pada tahun 2014 meningkat menjadi 70.744.977,00 KL. Sementara itu cadangan minyak bumi Indonesia diperkirakan hanya cukup sampai tahun 2025 (Kementrian ESDM, 2016). Hal tersebut mendorong Pemerintah untuk mencari alternatif bahan bakar terbarukan yang dapat digunakan, berdasarkan Peraturan Menteri Energi dan Sumber Daya Mineral No. 32 Tahun 2008 tentang Pentahapan Kewajiban Pemakaian BBN. Maka untuk menanggulangi krisis energi di Indonesia adalah dengan cara penggunaan bahan bakar nabati (BBN).

Salah satu bahan bakar nabati (BBN) yang berpotensi untuk dikembangkan di Indonesia adalah bioetanol. Bioetanol dapat dihasilkan dari

setiap bahan baku biologis yang mengandung gula dalam jumlah yang cukup besar atau bahan-bahan yang dapat dikonversi ke gula seperti pati atau selulosa. Pada generasi pertama produksi bioetanol, bahan baku yang digunakan adalah tanaman yang mengandung pati. Bahan baku yang umum digunakan pada produksi bioetanol generasi pertama adalah padi, jagung, dan umbi-umbian (Rutz dan Janssen, 2008). Namun hal ini memicu masalah lain dalam bidang pangan, apabila produksi bioetanol masih menggunakan bahan baku berpati karena dapat menyebabkan krisis pangan bagi Indonesia.

Akibat penggunaan bahan baku berpati yang menimbulkan masalah dalam bidang pangan, maka pada generasi kedua pembuatan bioetanol menggunakan bahan baku yang mengandung selulosa (Baskar *et al*, 2012). Salah satu bahan baku yang mengandung selulosa yang melimpah di Indonesia adalah tandan kosong kelapa sawit (TKKS). TKKS adalah hasil samping pengolahan minyak kelapa sawit. TKKS mengandung Selulosa 41,3%-46,5%, Hemi Selulosa 25,3%-32,5% dan mengandung lignin 27,6%-32,5% (Kamal, 2014). Terlebih lagi ketersediaan TKKS yang melimpah, pada tahun 2015 diketahui jumlah TKKS adalah sebesar 9.356.706,36 ton (Kamal, 2014; Dirjen Perkebunan, 2015).

Terdapat dua metode umum yang digunakan dalam pembuatan bioetanol dari bahan baku lignoselulosa seperti TKKS. Metode pertama adalah dengan cara hidrolisis dan inkubasi secara terpisah (*Separate Hydrolysis And Fermentation*, SHF) dan metode kedua adalah dengan cara hidrolisis dan inkubasi serentak (*Simultaneous Saccharification And Fermentation*, SSF) (Galbe dan Zacchi, 2005). SSF biasanya lebih disukai dalam proses industri pembuatan bioetanol karena biaya yang rendah, risiko kontaminasi berkurang, dan efek penghambatan

gula reduksi terhadap enzim yang lebih rendah (Lu *et al*, 2013 ; Taherzadeh dan Karimi, 2007). Selain itu pada metode SSF waktu hidrolisis enzimatis lebih lama dibandingkan SHF. Pada metode SHF hidrolisis enzimatis berakhir ketika substrat dipisahkan dari hidrolisat setelah hidrolisis (Shen *et al*, 2011).

Namun demikian masih ada beberapa kekhawatiran tentang proses SSF, seperti perbedaan suhu optimum antara enzim dan inkubasi mikroba mikroba (Taherzadeh dan Karimi, 2007). Selain itu, salah satu hambatan untuk komersialisasi adalah rendahnya konsentrasi gula setelah hidrolisis enzimatis sehingga konsentrasi etanol yang dihasilkan rendah (Koppram *et al*, 2014 ; Modenbach *et al*, 2013). Berbeda dengan SSF, keuntungan dari SHF adalah tingkat hidrolisis yang cepat pada kondisi suhu operasi yang optimal dibandingkan SSF. Jika prehidrolisis diterapkan sebelum SSF pada kondisi yang optimal, maka proses ini memiliki keunggulan dari kedua metode SSF dan SHF. Prehidrolisis akan meningkatkan kadar gula reduksi untuk meningkatkan kadar etanol pada proses inkubasi (Shen *et al*, 2011). Sementara itu lama inkubasi juga berpengaruh nyata dalam peningkatan kadar bioetanol (Irvan *et al*, 2016). Oleh sebab itu perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh prehidrolisis dan lama inkubasi pada pembuatan bioetanol dari TKKS secara SSF.

## **1.2 Tujuan**

Penelitian ini bertujuan untuk :

1. Mengetahui pengaruh prehidrolisis terhadap kadar bioetanol, kadar selulosa dan gula reduksi pada pembuatan bioetanol dari tandan kosong kelapa

sawit (TKKS) secara *Simultaneous Saccharification And Fermentation* (SSF).

2. Mengetahui pengaruh lama inkubasi terhadap kadar bioetanol, kadar selulosa dan gula reduksi dan pada pembuatan bioetanol dari tandan kosong kelapa sawit (TKKS) secara *Simultaneous Saccharification And Fermentation* (SSF).
3. Mengetahui interaksi prehidrolisis dan lama inkubasi terhadap kadar bioetanol, kadar selulosa dan gula reduksi pada pembuatan bioetanol dari tandan kosong kelapa sawit (TKKS) secara *Simultaneous Saccharification And Fermentation* (SSF).

### **1.3 Kerangka Pemikiran**

Pada pembuatan bioetanol secara SSF menggunakan TKKS, kadar etanol yang dihasilkan relatif rendah. Hal ini menyebabkan terjadinya hambatan dalam komersialisasi pembuatan bioetanol secara SSF menggunakan TKKS. Rendahnya etanol yang dihasilkan disebabkan konsentrasi gula hasil hidrolisis yang akan diinkubasi menjadi etanol rendah. Salah satu solusi yang dapat ditawarkan untuk meningkatkan kadar etanol adalah dengan melakukan proses prehidrolisis sebelum SSF dilakukan. Diketahui prehidrolisis mampu meningkatkan kadar etanol pada proses SSF dengan cara menyediakan kadar gula lebih banyak sehingga menyebabkan kadar etanol yang dihasilkan meningkat (Jin *et al*, 2012). Kadar gula lebih banyak pada proses hidrolisis disebabkan padatan substrat dihidrolisis dengan cepat pada suhu optimum sehingga substrat lebih homogen



dan konsentrasi hidrolisat glukosa lebih tinggi dan dapat dibentuk menjadi etanol pada proses SSF (Liu *et al*, 2014). Shen *et al* (2011) mengatakan bahwa pembuatan bioetanol dari campuran limbah pemisahan kapas dan bubur kertas daur ulang, dengan menggunakan waktu prehidrolisis selama 24 jam pada suhu 50° C menggunakan pH 4,8 , dilanjutkan dengan SSF selama 48 jam pada suhu 36°C memberikan hasil kadar etanol tertinggi dibandingkan dengan SSF dan SHF dengan kondisi waktu yang sama. Waktu prehidrolisis selama 24 jam menghasilkan kadar etanol sebesar 6,75 g/L, sementara kadar etanol yang dihasilkan secara SSF dan SHF berturut-turut adalah 6,02 g/L dan 6,17 g/L. Penelitian lain juga menunjukkan bahwa waktu prehidrolisis berpengaruh terhadap kadar etanol yang dihasilkan, dan etanol yang dihasilkan akan lebih tinggi bila dibandingkan dengan SHF dan SSF (tanpa hidrolisis) (Liu *et al*, 2014 ; Barcelos *et al*, 2016; Xie *et al*, 2014; Li *et al*, 2014; Hoyer *et al.*, 2013).

Cara lain yang dapat digunakan untuk meningkatkan kadar etanol adalah dengan melakukan inkubasi SSF pada waktu yang optimum. Diketahui semakin lama waktu inkubasi dilakukan, maka semakin tinggi pula kadar etanol yang dihasilkan sampai waktu tertentu kadar etanol akan mengalami stagnasi. Diketahui pula bahwa peningkatan kadar etanol akan terhenti disebabkan kadar etanol tidak dapat ditolerir lagi oleh sel-sel *yeast* (Budiarni dan Gulton, 2013; Irvan *et al*, 2016; Suri *et al*, 2013). Purba dan Gulton (2013) melaporkan bahwa pada pembuatan bioetanol menggunakan biji alpukat semakin lama waktu inkubasi dilakukan maka kadar etanol akan semakin meningkat, dan kadar etanol optimum didapat pada lama inkubasi 96 jam yaitu sebesar 1,519%. Hasil penelitian Purba dan Gulton (2013) senada dengan hasil penelitian Nasrun *et al*

(2015) yang menyatakan bahwa pada pembuatan bioetanol dari kulit pepaya semakin lama waktu inkubasi dilakukan maka kadar etanol akan semakin meningkat, dan kadar etanol optimum didapat pada lama inkubasi 96 jam dengan kadar etanol sebesar 6,23%. Hasil kedua penelitian diatas yang menyatakan bahwa kondisi optimum pembuatan bioetanol adalah dengan menggunakan lama inkubasi selama 96 jam diperkuat dengan hasil penelitian Manurung (2011) yang melaporkan bahwa kondisi optimum SSF dari limbah ekstraksi alginat yaitu pada suhu 38<sup>0</sup>C dengan pH 4,8 selama 96 jam menghasilkan kadar etanol sebesar 0,22%. Begitu pula pernyataan Adrados *et al* (2005) yang menyatakan pembuatan bioetanol menggunakan bagas, kondisi operasi SSF yang dapat menghasilkan etanol tertinggi yaitu inkubasi selama 96 jam menggunakan substrat bagas 50 g/L menghasilkan konsentrasi etanol sebesar 5,98 g/L.

Shen *et al* (2011) mengatakan bahwa lama waktu inkubasi akan mempengaruhi kadar etanol yang dihasilkan dalam proses pembuatan bioetanol secara SSF menggunakan prehidrolisis. Semakin lama waktu inkubasi dilakukan, maka kadar etanol semakin meningkat. Begitu pula pernyataan Liu *et al* (2016) yang mengatakan bahwa lama waktu inkubasi berpengaruh terhadap peningkatan kadar bioetanol pada pembuatan bioetanol secara SSF menggunakan perlakuan prehidrolisis. Liu *et al* (2016) mengatakan bahwa perlakuan terbaik dalam pembuatan bioetanol secara SSF dengan prehidrolisis adalah menggunakan lama waktu inkubasi selama 96 jam dengan kadar etanol yang dihasilkan sebesar 66,915 g/L. Apabila prehidrolisis diterapkan pada pembuatan bioetanol dari TKKS secara SSF dengan lama inkubasi yang optimum, maka hal tersebut

diperkirakan mampu meningkatkan kadar etanol yang dihasilkan dan lama inkubasi yang digunakan dapat dipercepat.

Dalam pembuatan bioetanol dari TKKS secara SSF belum diketahui kondisi optimum untuk menghasilkan kadar etanol secara maksimal. Namun telah diketahui kondisi optimum pembuatan bioetanol dari TKKS secara SHF. Kondisi optimum pembuatan bioetanol dari TKKS secara SHF adalah dengan menggunakan 25 FPU enzim selulase dan 7,5% konsentrasi substrat holoselulosa dengan suhu 50°C pada proses hidrolisis, dan menggunakan *S. cereviceae* sebanyak 15 % dengan kecepatan goyangan sebesar 150 rpm pada proses inkubasi (Sutikno dan Nawansih, 2015). Berdasarkan penelitian di atas, maka penelitian ini akan dilakukan dengan waktu prehidrolisis selama 0 dan 24 jam, dengan menggunakan substrat sebanyak 7,5%, pH 4,8, enzim 25 FPU, dengan suhu prehidrolisis 50° C serta suhu pada tahap SSF 38<sup>0</sup>C , dan *S. cerevisiae* sebanyak 15%, dengan waktu inkubasi selama 24, 48, 72, dan 96 jam.

#### **1.4 Hipotesis**

Hipotesis dari penelitian ini adalah :

1. Prehidrolisis berpengaruh terhadap kadar selulosa, gula reduksi dan kadar bioetanol pada pembuatan bioetanol dari tandan kosong kelapa sawit (TKKS) secara *Simultaneous Saccharification And Fermentation* (SSF).
2. Lama inkubasi berpengaruh terhadap kadar holoselulosa, gula reduksi dan kadar bioetanol pada pembuatan bioetanol dari tandan kosong kelapa sawit (TKKS) secara *Simultaneous Saccharification And Fermentation* (SSF).

3. Terdapat interaksi antara prehidrolisis dan lama inkubasi terhadap kadar selulosa, gula reduksi dan kadar bioetanol pada pembuatan bioetanol dari tandan kosong kelapa sawit (TKKS) secara *Simultaneous Saccharification And Fermentation (SSF)*.

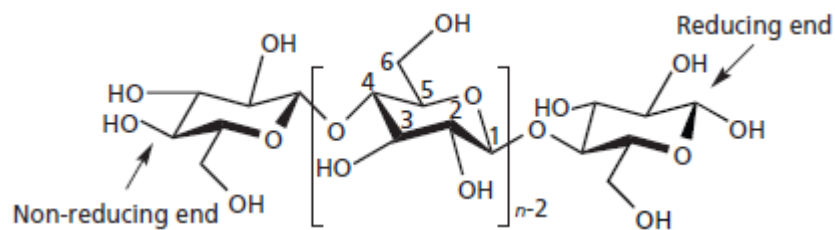
## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS)

Tandan kosong kelapa sawit (TKKS) merupakan salah satu limbah utama dari industri kelapa sawit. (Sajab *et al.* 2013). Diketahui bahwa satu ton kelapa sawit menimbulkan limbah berupa tandan kosong kelapa sawit (TKKS) sebanyak 23% atau 230 kg (Kamal, 2014). Sementara luas lahan perkebunan kelapa sawit di Indonesia pada tahun 2015 mencapai 11.300.370 Ha, dengan total produktivitas 3,6 ton/Ha (Dirjen Perkebunan, 2015). Dengan luas lahan tersebut, maka Indonesia mempunyai potensi limbah TKKS sebesar 9.356.706,36 ton.

Pemanfaatan TKKS terbilang masih terbatas, sementara ini hanya dibakar dan sebagian dihamparkan pada lahan kosong sebagai mulsa/pupuk, di kawasan sekitar pabrik (Kamal, 2014). Dalam perkembangannya, TKKS dapat dijadikan sebagai bahan baku pembuatan pulp dan kertas, fiberboard, dan bahan bangunan (Nasrin *et al.*, 2008). Selain itu, TKKS berpotensi dijadikan sebagai bahan baku pembuatan bioetanol. TKKS mengandung Selulosa 41,3%-46,5%, Hemi Selulosa 25,3%-32,5% dan mengandung lignin 27,6%-32,5% (Kamal, 2014). Sementara Caecilia (2015) mengatakan bahwa TKKS mengandung selulosa 50,13%, hemiselulosa 24,32%, dan lignin 24,15%. Dengan melimpahnya TKKS di Indonesia dan tingginya kandungan holoseulosa yang dimiliki, maka TKKS dapat menjadi bahan baku pembuatan bioetanol generasi kedua yang menjanjikan.

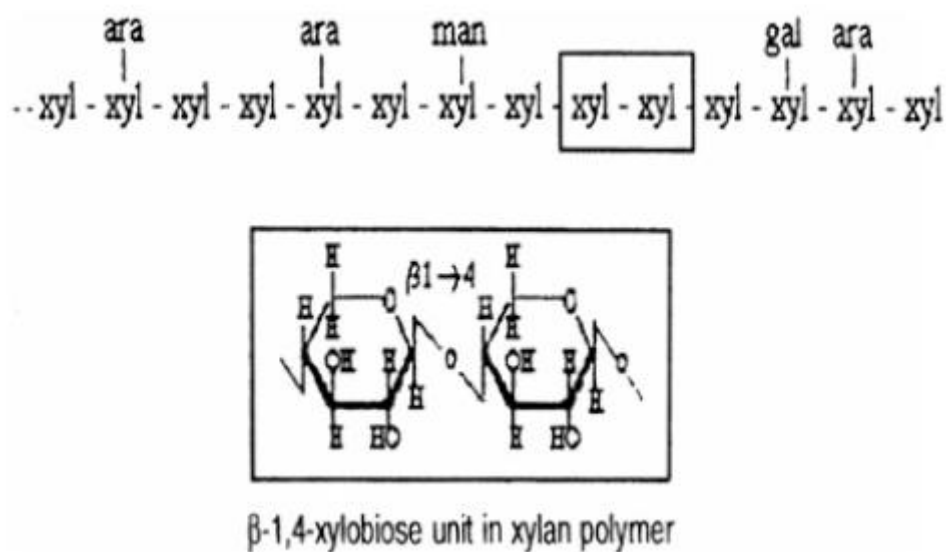
Selulosa merupakan komponen penyusun terbesar yang dimiliki TKKS. Selulosa adalah polimer linear dari unit D-anhidroglukopiranososa yang dihubungkan oleh ikatan  $\beta$ -1,4-glukosidik (Gambar 1). Selulosa juga dapat disebut  $\beta$ -1,4-D-glukan (Wertz *et al*, 2013). Selulosa tidak larut dalam air dan tidak memberikan karakteristik warna dengan yodium. Karena sifat selulosa yang tidak larut air dan *impermeability* untuk dinding sel, maka hidrolisis/degradasi selulosa terjadi melalui ekstraseluler sekresi enzim (Baskar *et al*, 2012). Selulosa merupakan polimer yang dapat membengkak. Selulosa bersifat higroskopis, dapat menyerap air 8-14% pada 20 ° C dan kelembaban relatif 60% (Krassig *et al*, 2004).



Gambar 1. Struktur selulosa (Wertz *et al*, 2013).

Hemiselulosa merupakan komponen penyusun TKKS terbesar kedua. Hemiselulosa merupakan komponen dari dinding sel yang terikat dengan selulosa dan merupakan sumber daya terbarukan terbesar kedua yang tersedia di alam (Dekker, 1985). Hemiselulosa terdiri dari xyloglucans dengan rantai D-xylose terhubung melalui ikatan glycosidic  $\beta$ -1-4 (gambar 2). Polimer xylose umumnya mengandung jaringan  $\alpha$ -1-3 yang terikat dengan D-mannose dan  $\beta$ -1-2 yang terikat dengan D-galaktosa,  $\beta$ -1-4 terhubung dengan D-mannose dan  $\alpha$ -1-2 terikat dengan D-glukosa. Hemiselulosa juga didefinisikan sebagai bahan yang larut

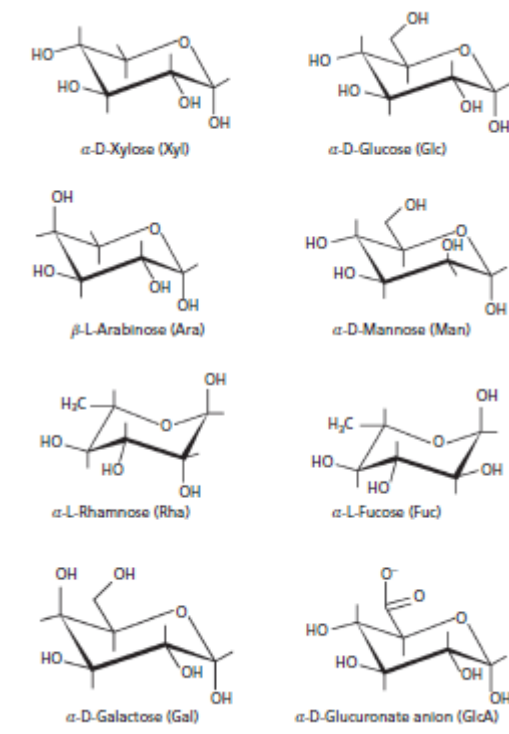
dalam larutan alkali tetapi tidak larut dalam air ( Complex Carbohydrate Research Center, 2007). Hemiselulosa mengikat erat pada permukaan mikrofibril selulosa dan satu sama lain oleh ikatan hidrogen. Hemiselulosa mengandung berbagai gula seperti xilosa dan arabinosa, glukosa, manosa, galaktosa, asam galacturonic dan asam glukuronat (gambar 3) (Wertz *et al*, 2013).



Gambar 2. Struktur hemiselulosa (Dekker, 1985).

Hemiselulosa dapat dibagi menjadi empat kelompok utama: (1) *Xyloglucan*, hemiselulosa dominan pada dinding sel primer tanaman. (2) *Xylan*; termasuk didalamnya *glucuronoxylan*, *arabinoxylan* serta *glucuronoarabinoxylan* ditemukan di dinding sel sekunder. *Xylan* dianggap sebagai biopolymer terbanyak kedua pada tanaman (MetaCyc, 2008). (3) *Mannan* termasuk didalamnya *glucomannan*, juga *galactomannan* ditemukan pada benih di beberapa tanaman seperti jenis *legume*, dan *galactoglucomannan* ditemukan di dinding sel sekunder. Kemudian kelompok yang terakhir adalah (4)  $\beta$ -1,3; 1,4-glucan yang sangat lazim

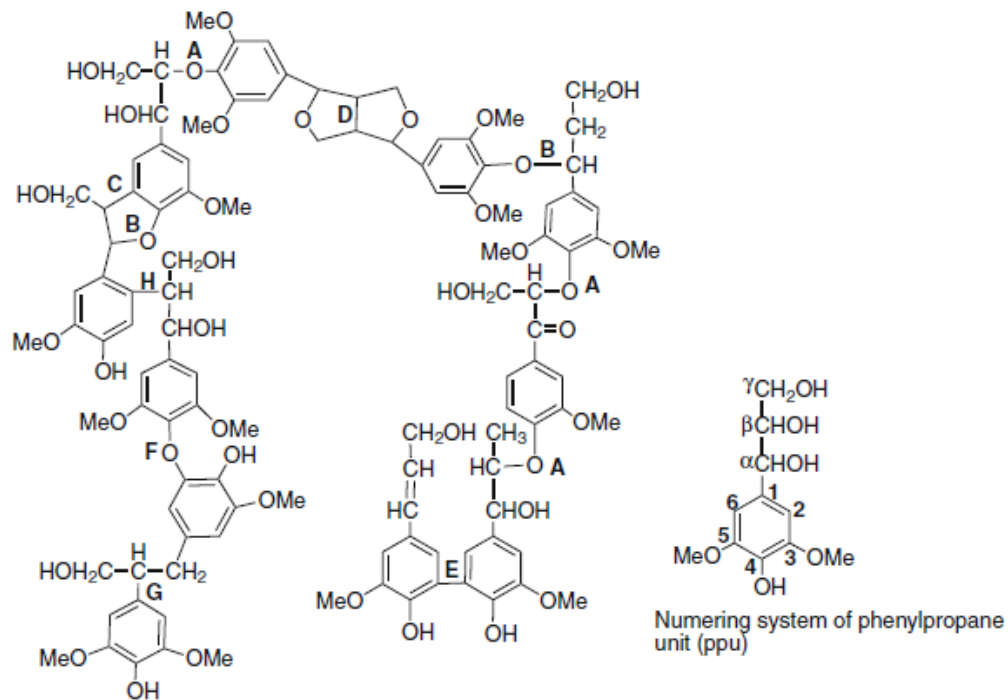
dalam rumput (Atalla *et al*, 1993 ; Handford *et al*, 2003). Peranan biologis paling penting hemiselulosa adalah untuk memperkuat dinding sel bersama dengan selulosa dan, di beberapa bagian dinding dengan lignin (Schell *et al*, 2010 ; Ordaz-Ortiz *et al*, 2009).



Gambar 3. Komponen berbagai gula pada hemiselulosa (Wertz *et al*, 2013).

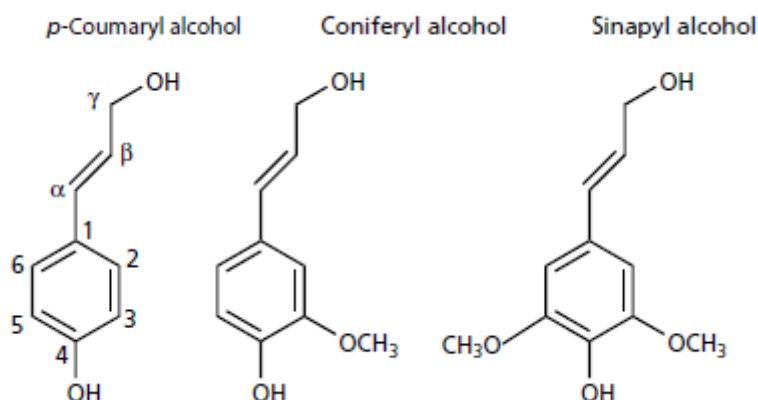
Selain selulosa dan hemiselulosa, TKKS juga memiliki komponen penyusun berupa lignin. Lignin adalah polimer fenolik kompleks yang berperan terhadap kekuatan, kekakuan, dan sifat hidrofobik pada dinding sel sekunder tanaman. Lignin ditemukan pada semua tanaman berpembuluh, terutama di dalam jaringan kayu, lignin membentuk sebagian besar karbon organik total di alam (Bonawitz *et al*, 2010). Unit struktur penyusun lignin disebut *phenylpropane unit* atau disingkat dengan ppu (Gambar 4) (Baskar *et al*, 2012).





Gambar 4. Struktur penyusun lignin (Baskar *et al*, 2012).

Lignin sangat tahan terhadap gangguan mekanis dan degradasi enzimatik. Polimer lignin membuat dinding sel kaku dan kokoh, memungkinkan transportasi air dan nutrisi melalui sistem vaskular dan melindungi tanaman dari invasi mikroba. Lignin membatasi hasil dan meningkatkan biaya dalam upaya produksi bioetanol (Van Parijs *et al*, 2010). Lignin adalah istilah generik untuk kelompok besar polimer aromatik *4-hydroxyphenylpropanoid*. (Vanholme *et al*, 2010; Ralph *et al*, 2004; Ralph, 1999). Tiga komponen monomer atau monolignol utama lignin adalah *p-coumaryl* (*4-hydroxycinnamyl*), *coniferyl* (*3-methoxy 4-hydroxycinnamyl*) dan alkohol *sinapyl* (*3,5-dimethoxy 4-hydroxycinnamyl*) (Gambar 5) (Vanholme *et al*, 2010).



Gambar 5. 3 jenis monolignol (Vanholme *et al*, 2010).

Dalam pembuatan bioetanol, keberadaan lignin pada substrat berlignoselulosa tidak diinginkan. Hal ini dikarenakan struktur kimia lignin yang kompleks dan menyelimuti selulosa serta hemiselulosa yang membuat enzim sulit untuk mengkonversikan selulosa dan hemiselulosa menjadi gula reduksi. Oleh karena itu, lignin harus dihilangkan pada proses pembuatan bioetanol sebelum proses hidrolisis dilakukan (Djuardi, 2015). Cara untuk menghilangkan lignin pada substrat TKKS adalah dengan perlakuan *pretreatment*. *Pretreatment* merupakan perlakuan pendahuluan terhadap bahan lignoselulosa sehingga mempermudah pelepasan hemiselulosa dan selulosa yang terikat kuat dengan lignin. *Pretreatment* dapat dilakukan secara fisik, kimia, biologis, ataupun kombinasi dari metode-metode itu (Isroi, 2011). Pada substrat TKKS, jenis *pretreatment* yang sering digunakan adalah *pretreatment* secara kimia (asam atau basa). Namun jenis *pretreatment* yang sering digunakan adalah menggunakan larutan basa, karena akan meningkatkan efektifitas proses hidrolisis enzimatik dengan cara meningkatkan aksesibilitas enzim pada permukaan selulosa tanpa menghasilkan senyawa inhibitor (Remli *et al*, 2014).

## 2.2 Bioetanol

Bioetanol merupakan etil alkohol dengan rumus kimianya  $C_2H_5OH$  atau  $CH_3CH_2OH$  mempunyai sifat fisika kimia tertentu. Bioetanol mempunyai titik didih  $78^\circ C$ , tidak berwarna, mudah menguap (*volatile*), dapat bercampur dengan air, mudah terbakar, dan berbau tajam (menyengat). Bioetanol termasuk bahan berbahaya dan beracun (B3) dan memiliki spesifik gravity 0,7851 pada suhu  $200^\circ C$ . Bioetanol secara sifat kimia akan dapat bereaksi secara dehidrasi, dehidrogenasi, oksidasi, esterifikasi (Dea, 2009).

Berdasarkan jenis bahan bakunya, bioetanol dibagi menjadi dua kelompok yaitu bioetanol generasi pertama dan bioetanol generasi kedua. Bioetanol generasi pertama adalah etanol yang diproduksi dari sumber bahan nabati bergula dan berpati. Sedangkan bioetanol yang diproduksi dari bahan berlignoselulosa seperti limbah padat agroindustri merupakan bioetanol generasi kedua (Odling-Smee, 2007). Tahapan pembuatan bioetanol generasi kedua terdiri dari proses penghalusan, perlakuan awal (delignifikasi), hidrolisis (sakarifikasi), inkubasi, dan dilanjutkan proses destilasi (pemurnian) (Anindyawati, 2009).

Ada dua metode umum dalam memproduksi bioetanol berbahan lignoselulosa seperti TKKS, metode yang digunakan yaitu *Separated Hidrolysis Fermentation* (SHF) dan *Simultaneous Sacharification Fermentation* (SSF) (Galbe dan Zacchi, 2005). Selain kedua metode diatas, terdapat metode lain dalam pembuatan bioetanol. Diantaranya adalah *nonisothermal simultaneous saccharification and fermentation* (NSSF), *simultaneous saccharification and cofermentation* (SSCF) and *consolidated bioprocessing* (CBP) (Taherzadeh dan

Karimi, 2007). Namun SSF biasanya lebih disukai dalam proses industri pembuatan bioetanol karena biaya yang rendah, risiko kontaminasi berkurang, dan efek penghambatan gula reduksi terhadap enzim yang lebih rendah (Lu *et al*, 2013 ; Taherzadeh dan Karimi, 2007).

### **2.3 Metode *Simultaneous Saccharification and Fermentation* (SSF)**

Salah satu metode yang paling efektif untuk produksi etanol dari biomassa lignoselulosa adalah kombinasi dari hidrolisis enzimatik biomassa dan inkubasi dalam satu langkah (Taherzadeh dan Karimi, 2007). SSF telah ditetapkan sebagai pilihan yang menjanjikan untuk produksi etanol sejak yield etanol SSF secara keseluruhan lebih tinggi dibandingkan hidrolisis enzimatik dan inkubasi dilakukan secara terpisah (SHF) (Olofsson *et al*, 2008).

Dalam proses ini, glukosa yang dihasilkan oleh hidrolisis enzim akan langsung diinkubasi oleh mikroorganisme (Taherzadeh dan Karimi, 2007). Ini adalah keuntungan besar bagi SSF dibandingkan dengan SHF, karena efek penghambatan glukosa dan selobiosa untuk enzim diminimalkan dengan menjaga konsentrasi gula pada media rendah. SSF memberikan hasil etanol lebih tinggi dari substrat selulosa dibandingkan SHF dan membutuhkan jumlah enzim yang lebih rendah. Risiko kontaminasi di SSF lebih rendah daripada di SHF, karena etanol akan mengurangi kemungkinan kontaminasi. Selanjutnya, jumlah bioreaktor yang dibutuhkan untuk SSF lebih sedikit dibandingkan dengan SHF, sehingga biaya modal akan lebih rendah (Wertz *et al*, 2013).

Namun demikian, SSF memiliki kelemahan pada kondisi suhu dan pH yang tidak optimum untuk aktivitas enzim dan pertumbuhan organisme (Vertes et

al, 2009). Suhu yang digunakan untuk SSF umumnya kisaran 37 ° C, yang merupakan titik optimum antara suhu optimal untuk hidrolisis dan inkubasi (Olfsson *et al*, 2001). Berbeda dengan SSF, SHF memiliki keunggulan yaitu dua proses (hidrolisis dan inkubasi) dapat dilakukan pada kondisi yang optimal. Selulase telah terbukti paling efisien pada suhu antara 45-50°C, sedangkan inkubasi umumnya menggunakan organisme yang memiliki suhu optimum 30-37°C (Tahezadeh dan Karimi, 2007).

Oleh sebab itu, untuk menangani kekurangan dari SHF dan SSF, perlu dilakukan proses prehidrolisis untuk meningkatkan kadar etanol pada proses inkubasi secara SSF. Shen (2011) mengatakan bahwa pembuatan bioetanol dari campuran limbah pemisahan kapas dan bubur kertas daur ulang, dengan menggunakan waktu prehidrolisis selama 24 jam pada suhu 50° C menggunakan pH 4,8 , dilanjutkan dengan SSF selama 48 jam pada suhu 36°C memberikan hasil kadar etanol tertinggi dibandingkan dengan SSF dan SHF dengan kondisi waktu yang sama. Waktu prehidrolisis selama 24 jam menghasilkan kadar etanol sebesar 6,75 g/L, sementara kadar etanol yang dihasilkan secara SSF dan SHF berturut-turut adalah 6,02 g/L dan 6,17 g/L. Penelitian lain juga menunjukkan bahwa waktu prehidrolisis berpengaruh terhadap kadar etanol yang dihasilkan, dan etanol yang dihasilkan akan lebih tinggi bila dibandingkan dengan SHF dan SSF (tanpa hidrolisis) (Liu *et al*, 2014 ; Barcelos *et al*, 2016; Xie *et al*, 2014; Li *et al*, 2014; Hoyer *et al.*, 2013).

Shen (2011) mengatakan jika prehidrolisis diterapkan sebelum SSF selama tingkat hidrolisis lebih cepat di bawah kondisi yang optimal, dan substrat hidrolisat setelah hidrolisis tidak dipisahkan untuk memulai SSF, proses tersebut

memiliki keunggulan dari kedua metode SSF dan SHF. Ada waktu yang optimal untuk memulai SSF dan cukup tersedianya gula reduksi untuk diinkubasi oleh *yeast* sehingga akan meningkatkan kadar etanol yang dihasilkan.

Waktu prehidrolisis secara jelas mempengaruhi kandungan dan komposisi padatan substrat, serta komposisi hidrolisat di SSF, karena suhu yang berbeda antara hidrolisis dan inkubasi (Jin, 2012; Wilkins, 2007). Liu *et al* (2016) mengatakan tujuan dari prehidrolisis di SSF adalah untuk menghidrolisis padatan substrat dengan cepat pada suhu tinggi sehingga menyebabkan substrat lebih homogen dan konsentrasi hidrolisat glukosa lebih tinggi dan dapat dibentuk untuk menghasilkan etanol pada proses SSF. Liu *et al* (2016) juga mengatakan bahwa pembuatan bioetanol dari bagas tebu dengan metode SSF dan waktu prehidrolisis selama 24 jam meningkatkan kadar etanol dari 25,725 g/L menjadi 55,916 g/L. Dari hasil penelitian tersebut Liu *et al* (2016) menyimpulkan bahwa prehidrolisis menjadi solusi untuk mengeliminasi masalah yang ada pada SSF.

Penelitian lain juga menyebutkan bahwa prehidrolisis akan meningkatkan kadar etanol yang dihasilkan. Hoyer *et al* (2013) melaporkan bahwa pembuatan bioetanol dari selulosa cemara menggunakan prehidrolisis selama 22 jam dengan suhu 48°C sebelum SSF akan meningkatkan kadar etanol yang dihasilkan dari 3.9 menjadi 62.1%. Li *et al* (2014) mengatakan bahwa kadar etanol pada waktu prehidrolisis selama 18 jam lebih tinggi bila dibandingkan dengan SSF tanpa prehidrolisis dengan kondisi waktu inkubasi yang sama pada pembuatan bioetanol dari brangkas jagung. Dalam pembuatan bioetanol secara SSF terdapat dua proses yang berlangsung secara bersama. Kedua proses tersebut adalah sakarifikasi dan inkubasi yang akan dibahas pada subbab berikutnya.

## 2.4 Sakarifikasi

Sakarifikasi atau hidrolisis merupakan proses konversi selulosa menjadi glukosa atau gula sederhana menggunakan bahan kimia (asam) maupun menggunakan enzim. Dalam mengkonversi selulosa menjadi glukosa, metode hidrolisis secara asam akan 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. Hidrolisis secara kimia memiliki beberapa kelemahan. Kelemahan hidrolisis secara kimia menggunakan asam terletak pada produk samping yang dihasilkan karena akan senyawa-senyawa tersebut akan menjadi inhibitor atau penghambat dalam proses inkubasi. Selain itu, hidrolisis menggunakan asam akan menyebabkan korosi pada bejana fermentor (Howard *et. al.*, 2003). Sementara itu hidrolisis menggunakan enzim atau secara enzimatik akan mengkonversi selulosa menjadi glukosa dengan cara memecah ikatan  $\beta$ -glikosidik tanpa menghasilkan produk samping yang dapat menghambat proses inkubasi (Tengborg, 2001). Namun hidrolisis secara enzimatik membutuhkan kondisi khusus, yaitu dengan menggunakan suhu 45-50°C dan pH 4-5 (Taherzadeh dan Karimi, 2007).

Dalam menghidrolisis selulosa menjadi glukosa menggunakan enzim, ada beberapa faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim. Substrat yang digunakan dalam proses inkubasi berpengaruh terhadap aktivitas dan produktivitas enzim. Adanya substrat tertentu di dalam medium produksi dapat memacu mikroorganisme untuk mensekresi metabolit selnya (Boing, 1982). Selain

substrat, suhu juga berpengaruh nyata terhadap aktivitas enzim dalam menghidrolisis selulosa menjadi glukosa. Pada suhu rendah reaksi kimia berlangsung lambat, sedangkan pada suhu yang lebih tinggi reaksi berlangsung lebih cepat. Kemudian faktor pH juga mempengaruhi aktivitas enzim. Enzim selulase pada umumnya stabil pada kisaran pH 5,0-8,0. (Poedjiadi, 1994).

## 2.5 Inkubasi

Inkubasi etanol, disebut juga sebagai inkubasi alkohol, merupakan proses biologis di mana gula seperti glukosa, fruktosa dan sukrosa diubah menjadi energi seluler berupa etanol dan karbon dioksida ( $\text{CO}_2$ ) sebagai produk limbah metabolik. Karena *yeast* melakukan proses inkubasi dalam keadaan tanpa oksigen, inkubasi etanol diklasifikasikan sebagai inkubasi anaerobik. Dalam keadaan anaerob, asam piruvat yang dihasilkan pada proses glikolisis oleh *yeast* akan diubah menjadi acetaldehid dan  $\text{CO}_2$ . Selanjutnya, acetaldehid diubah menjadi alkohol. Proses perubahan asam asetat menjadi alkohol tersebut diikuti pula dengan perubahan NADH menjadi  $\text{NAD}^+$ . Dengan terbentuknya  $\text{NAD}^+$ , peristiwa glikolisis dapat terjadi lagi. Dalam inkubasi alkohol ini, dari satu mol glukosa hanya dapat dihasilkan 2 molekul ATP (Usmana *et al.*, 2012).

Umumnya, gula diambil dari bahan baku biomassa dengan cara menghancurkan dan hidrolisis. Sirup gula kemudian dicampur dengan *yeast* dan dalam keadaan hangat (suhu ruang), sehingga *yeast* akan merubah gula menjadi etanol. Namun, produk akhir inkubasi berupa etanol hanya sekitar 10%, sehingga tahap lebih lanjut seperti penyulingan diperlukan untuk meningkatkan konsentrasi



etanol hingga 95%. Jika etanol dimaksudkan untuk pencampuran dengan bensin, hal yang perlu diperlukan adalah membuat etanol murni menjadi 100%. Bioetanol juga dapat diproduksi menggunakan selulosa. Bahan baku selulosa berlimpah dan murah juga tersedia dari berbagai bahan baku biomassa, seperti tanaman pertanian dan hasil hutan (Gunasekaran dan Chandra, 1999).

Dalam pembuatan bioetanol, umumnya *yeast* yang digunakan adalah *Saccharomyces cerevisiae*. Secara umum *S. cerevisiae* dapat tumbuh dan memproduksi etanol secara optimal pada pH 3,5-6,0 dan suhu 28-35°C. Selain itu, *S. cerevisiae* juga toleran terhadap kadar etanol yang tinggi, mampu bertahan hidup pada suhu tinggi hingga 47°C dan kondisi asam hingga pH 3 dan stabil selama proses inkubasi berlangsung (Frazier dan Westhoff, 1978). Kemampuan *Saccharomyces cerevisiae* akan menguntungkan dalam pembuatan bioetanol secara SSF. Karena proses pembuatan bioetanol secara SSF menggunakan suhu kisaran 37 ° C, yang merupakan titik optimum antara suhu optimal untuk hidrolisis dan inkubasi (Olfsson *et al*, 2001). *Saccharomyces cerevisiae* mengandung beberapa enzim dalam proses pembuatan bioetanol yaitu amilase, maltase, invertase, dan zimase. Amilase mengubah pati/amilosa menjadi maltosa, maltase mengubah maltosa menjadi glukosa, invertase mengubah sukrosa menjadi fruktosa dan glukosa, dan zimase mengubah fruktosa dan glukosa menjadi etanol dan CO<sub>2</sub> (Bamforth, 2005 ; Judoamidjojo *et al*, 1989 ; Widyaningrum, 2009). *S. cerevisiae* digunakan karena memiliki daya fermentasi tinggi, tahan dan toleran terhadap kadar etanol dan kadar gula tinggi, mudah dalam penggunaan, selektivitas tinggi dalam penghasilan produk, dan kemampuan dalam menggunakan berbagai jenis gula (Bamforth, 2005 ; Stewart dan Russell, 1985).

Selain penggunaan *yeast* yang tepat dalam inkubasi bioetanol, ada beberapa faktor lain yang mempengaruhi proses inkubasi dalam pembuatan bioetanol. Faktor-faktor tersebut diantaranya konsentrasi substrat, suhu, ketersediaan oksigen, keasaman, pH, waktu, dan nutrisi yang terkandung selama proses inkubasi. Semakin tinggi konsentrasi substrat saat inkubasi maka akan semakin tinggi laju etanol yang dihasilkan. Suhu selama proses inkubasi sangat menentukan jenis mikroorganisme dominan yang akan tumbuh. Umumnya diperlukan suhu 30 °C untuk pertumbuhan mikroorganisme. *S. cerevisiae* dapat melakukan aktivitasnya pada suhu 4 – 32 °C. Sumber karbon atau nutrisi bagi *S. cerevisiae* biasanya sukrosa, glukosa, fruktosa, galaktosa, manosa dan maltosa (Azizah *et al*, 2012). Derajat keasaman (pH) merupakan salah satu dari beberapa faktor penting yang mempengaruhi inkubasi alkohol. Derajat keasaman optimum untuk proses inkubasi adalah antara 4 - 5. Pada pH di bawah 3, proses inkubasi alkohol akan berkurang kecepatannya (Retnowati dan Sutanti, 2009). Kemudian, *S. cerevisiae* merupakan organisme fakultatif anaerob yang dapat menggunakan baik sistem aerob maupun anaerob untuk memperoleh energi. (Buckle *et.al*, 1987).

### **III. BAHAN DAN METODE**

#### **3.1 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Analisis Hasil Pertanian dan Laboratorium Mikrobiologi Hasil Pertanian Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Laboratorium Daya Alat Mesin Pertanian Jurusan Teknik Pertanian, Laboratorium Ilmu Tanah Jurusan Agroteknologi, Fakultas Pertanian, dan Laboratorium Biomassa Universitas Lampung pada bulan Desember 2016 sampai Januari 2017.

#### **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 cereviceae* 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), CaCO<sub>3</sub> (Merck), Pb Asetat (Merck), Na Oksalat (Merck), asam sulfat (Merck), Fenol, asam sitrat, dan natrium sitrat yang didapatkan dari Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung.

Alat-alat yang digunakan adalah shaker water bath (Polyscience), *Gas Chromatography*, grinder, oven (Philip Harris Ltd), spektrofotometer (Cary Series UV-Vis Type 100), inkubator (Heraeus D-6450 Hanau), autoklaf (Wiseclave™), timbangan 4 digit (AY220 Shimadzu), ayakan (40 mesh), hot plate (Cimerec3), vortex (Termolyne Maxi Mix plus™), mikropipet 1000 $\mu$ L (Thermo Scientific, Finnpiette F3), erlenmeyer 100 mL (Pyrex), *beaker glass* 500 mL (Pyrex), gelas ukur 500 mL (Pyrex), jerigen, loyang, tabung reaksi, rak tabung, corong, kertas saring, aluminium foil, kapas, dan pipet tetes.

### 3.3 Metode

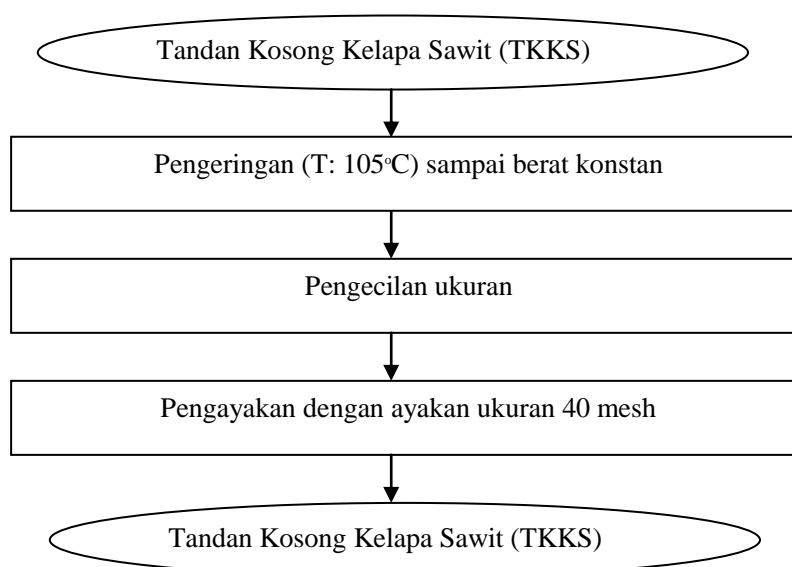
Rancangan percobaan dilakukan secara faktorial dengan menggunakan Rancangan Acak Kelompok Lengkap (RAKL). Faktor pertama adalah prehidrolisis (P) terdiri dari tanpa prehidrolisis (P1) dan prehidrolisis (P2), faktor kedua yaitu lama inkubasi (F) yang terdiri dari lama inkubasi 24 jam (F1), 48 jam (F2), 72 jam (F3), dan 96 jam (F4). Setiap satuan percobaan dilakukan pengulangan sebanyak empat kali untuk selanjutnya dilakukan pengamatan berupa analisis kadar lignoselulosa (sebelum dan setelah *pretreatment*), kadar selulosa akhir, kadar gula reduksi awal dan akhir, serta analisis kadar etanol. Analisis data kadar selulosa akhir, gula reduksi akhir dan kadar etanol diuji kesamaan ragamnya dengan uji Barlet. Kementambahan data diuji dengan uji Tuckey. Analisis sidik ragam digunakan untuk mendapatkan ragam galat dan uji signifikansi untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan antar perlakuan. Seluruh data diolah lebih lanjut dengan uji Ortogonal Polinomial. Sementara untuk data lignoselulosa (sebelum dan setelah *pretreatment*) dan data gula reduksi awal akan dibahas secara deskriptif.

### 3.4 Pelaksanaan Penelitian

Sebelum melaksanakan penelitian di atas, TKKS diperkecil ukuran hingga 40 mesh, kemudian TKKS di-*pretreatment* untuk menghilangkan lignin pada serat selulosa. Selanjutnya selulosa TKKS hasil *pretreatment* tersebut akan dijadikan bahan baku pada tahap prehidrolisis, dan tahap lama inkubasi SSF. Tahapan-tahapan pada penelitian ini diuraikan pada subbab berikut.

#### 3.4.1 Persiapan Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS)

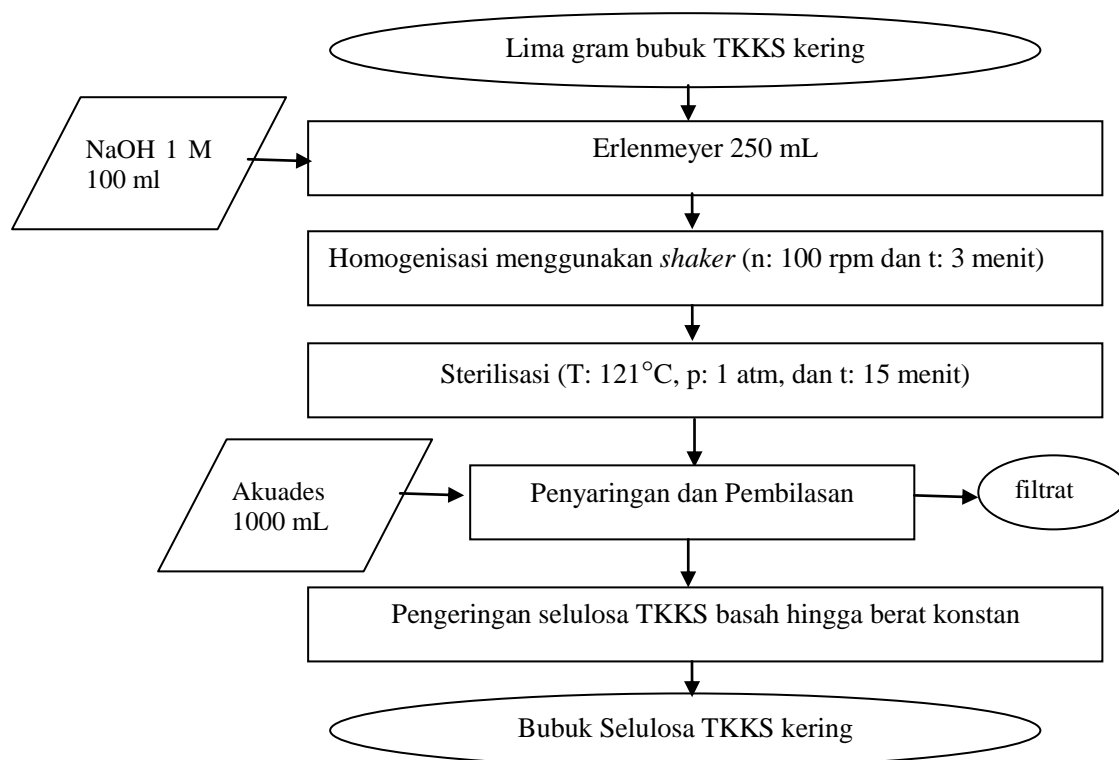
Proses persiapan TKKS dilakukan menurut metode Samsuri *et al.* (2007). TKKS dikeringkan hingga kadar air 0% (berat konstan) menggunakan oven pada suhu 105°C. TKKS kemudian dibuat menjadi bubuk menggunakan grinder dan diayak dengan ayakan ukuran 40 mesh. TKKS yang sudah kering dengan ukuran 40 mesh selanjutnya disimpan pada kondisi kering dan wadah tertutup sebelum digunakan untuk tahap selanjutnya. Proses persiapan bahan baku dapat dilihat Gambar 6.



Gambar 6. Diagram alir persiapan bahan baku (Samsuri *et al.*, 2007 yang dimodifikasi).

### 3.4.2 Pretreatment Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS)

*Pretreatment* menggunakan basa dilakukan dengan menggunakan metode Sutikno *et al.* (2010). *Pretreatment* bertujuan untuk menghilangkan lignin pada struktur lignoselulosa sehingga selulosa mudah didegradasi oleh enzim selulase menjadi glukosa dan kemudian diinkubasi oleh khamir menjadi etanol. Lima gram TKKS dengan ukuran 40 mesh dimasukkan dalam Erlenmeyer ukuran 250 mL dan kemudian ditambah 100 mL larutan NaOH 1 M. Setelah itu, sampel dihomogenisasi menggunakan *shaker* dengan kecepatan 100 rpm selama 3 menit dan dipanaskan dalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah selesai dipanaskan, sampel disaring dan dibilas dengan 1000 mL akuades untuk menghilangkan lignin. Bagian padat selulosa TKKS dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C sampai berat konstan. Proses *Pretreatment* dapat dilihat Gambar 7.



Gambar 7. Diagram alir proses *pretreatment* menggunakan basa (Sutikno *et al.*, 2010).

### 3.4.3. Persiapan Kultur *Saccaromyces ceriviceae*

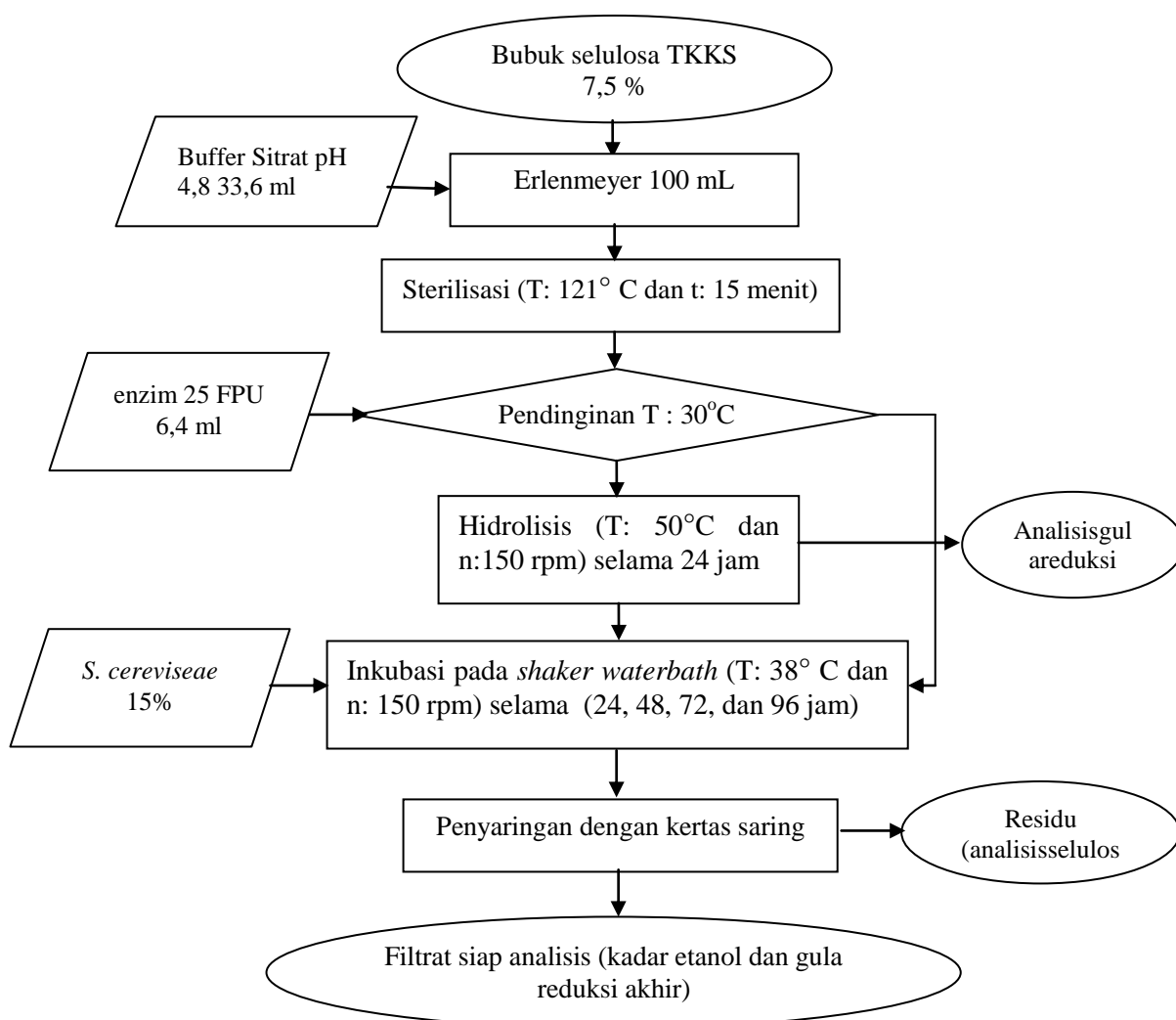
Sebanyak 7,0 gram media agar YPD (*Yeast, pepton, dextrose*) dilarutkan dalam 100 mL aquadest dan dihomogenkan menggunakan *magnetic stirer* hingga larutan menjadi bening. Larutan media agar YPD tersebut disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit. Sepuluh mL media YPD agar yang telah disterilisasi dituang ke dalam 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 30°C selama 48 jam. Sebanyak 3 loop ragi dari media agar miring diinokulasikan pada larutan media YDP broth 5% steril kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama 48 jam (Suh *et al.*, 2007). Larutan tersebut disebut kultur *S. cerevisiae* dan akan diinokulasikan pada hasil hidrolisis TKKS.

### 3.4.4. SSF dengan prehidrolisis dan tanpa prehidrolisis

Tahap SSF dengan prehidrolisis dan tanpa prehidrolisis dilakukan berdasarkan metode Sutikno (2010) yang dimodifikasi (Gambar 9). Selulosa TKKS dengan konsentrasi substrat 7,5% dimasukkan ke dalam tabung Erlenmeyer 100 mL. Sebanyak 33,6 mL buffer sitrat 1 M dengan pH 4,8 ditambahkan ke dalam erlenmeyer yang kemudian ditutup sumbat dan disterilisasi dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit. Larutan steril kemudian didinginkan hingga suhu ruang dan ditambahkan enzim selulase 25 FPU sebanyak 6,4 mL, kemudian dihidrolisis pada suhu 50°C selama 0 jam untuk perlakuan tanpa prehidrolisis dan

24 jam untuk perlakuan dengan prehidrolisis. Setelah hidrolisis dilakukan, sampel kemudian diamati kadar gula reduksi awal menggunakan metode phenol (Briffaut *et al*, 2004). Setelah itu sampel ditambahkan kultur kerja sebanyak 6 mL (15% v/v).SelanjutnyaSSF dilakukan pada suhu 38°C, goyangan 150 rpm selama 24, 48,72, dan 96 jam. Filtrat hasil inkubasi tersebut dianalisis kadar selulosa secara gravimetri (Chesson, 1981), gula reduksi akhir menggunakan metode phenol (Briffaut *et al*, 2004), dan kadar etanol menggunakan *gas chromatography* (GC).



Gambar 8. Diagram alir SSF dengan dan tanpa prehidrolisis (Sutikno, 2010 yang dimodifikasi)



### 3.5. Pengamatan

Setelah prehidrolisis, sampel diukur kadar gula reduksi awal yang terbentuk, kemudian filtrat hasil SSF juga diukur kadar gula reduksi akhir dan kadar etanol. Pengukuran parameter yang diamati dapat dilihat berikut ini.

#### 3.5.1 Analisis Lignin, Selulosa dan Hemiselulosa TKKS

Pengukuran kadar lignoselulosa ini dilakukan mengacu pada metode Chesson (1981). Penentuan kadar selulosa, hemiselulosa dan lignin menggunakan sampel tandan kosong kelapa sawit sebelum dan sesudah perlakuan awal dengan NaOH. Kemudian juga dilakukan pengukuran kadar selulosa akhir setelah proses SSF. Pengamatan kadar lignoselulosa dengan metode Chesson terdapat dalam 4 tahap. Tahap pertama, sampel TKKS dikeringkan dengan oven pada suhu 105°C sampai berat konstan. Sebanyak 1 gram TKKS dimasukkan dalam erlenmayer 250 mL dan ditambahkan aquades sebanyak 150 mL lalu dipanaskan dengan menggunakan *hot plate* pada suhu 100°C selama 2 jam. Kemudian sampel disaring dengan kertas saring dan dibilas dengan aquades sampai volume filtrat 300 mL. Residu di oven pada suhu 105°C sampai berat konstan, dan dianggap berat a.

Tahap kedua yaitu residu dari berat a dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 mL lalu ditambahkan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N sebanyak 150 mL. Kemudian residu dipanaskan dengan *hot plate* pada suhu 100°C selama 60 menit. Setelah pemanasan, sampel disaring dan dibilas dengan aquades sampai volume filtrat 300 mL dan dikeringkan sampai berat konstan, dan dianggap sebagai berat b.

Tahap ketiga yaitu residu dari berat b dimasukkan kembali ke dalam Erlenmeyer 250 mL lalu ditambahkan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% sebanyak 10 mL dan selanjutnya direndam selama 4 jam pada suhu ruang. Selanjutnya larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N ditambahkan sebanyak 150 mL dan dipanaskan pada suhu 100°C selama 2 jam. Setelah pemanasan, sampel disaring dan dibilas dengan aquades sampai volume filtrat 400 mL dan dikeringkan sampai berat konstan, dan dianggap berat c.

Selanjutnya tahap keempat yaitu residu dari berat c dilakukan pengabuan dengan menggunakan furnace pada suhu 600°C selama 4 jam lalu ditimbang dan dianggap sebagai berat d. Kadar Hemiselulosa, selulosa, dan lignin dapat dihitung dengan rumus :

$$\text{Hemiselulosa} = \frac{\text{berat A}-\text{berat B}}{1} \times 100$$

$$\text{Selulosa} = \frac{\text{berat B}-\text{berat C}}{1} \times 100$$

$$\text{Lignin} = \frac{\text{berat C}-\text{berat D}}{1} \times 100$$

### **3.5.2 Analisis Kadar Gula Reduksi**

#### **3.5.2.1. Penyiapan Kurva Standar**

Analisis kadar gula reduksi dilakukan menggunakan metode phenol berdasarkan Briffaut (2004). Larutan glukosa standar dibuat dengan melarutkan 10 mg glukosa anhidrat dalam 100 mL air suling, dan dilakukan 6 pengenceran sehingga diperoleh larutan glukosa dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10 mg/100 mL. Lima tabung reaksi disiapkan, masing-masing diisi dengan 1 mL larutan glukosa standar tersebut. Satu tabung diisi 1 mL air suling sebagai blanko. Kemudian masing-masing tabung ditambahkan 1 mL larutan fenol 5 %. Selanjutnya ditambahkan dengan cepat

5 ml larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat dengan cara menuangkan secara tegak lurus ke permukaan larutan. Biarkan selama 10 menit, lalu ditempatkan pada penangas air selama 15 menit. Absorbansi masing-masing larutan tersebut diukur pada panjang gelombang 540 nm. Kemudian kurva standar dibuat untuk menunjukkan hubungan antara konsentrasi glukosa dan absorbansi.

### **3.5.2.2 Penentuan Kadar Gula Reduksi pada Sampel**

Sampel hasil inkubasi secara SSF dilakukan penyaringan menggunakan kertas whatman nomor 1. Kemudian diambil 1 ml filtrat hasil penyaringan, dilakukan pengenceran 10 kali. Ditambahkan Pb Asetat jenuh sebanyak 1 ml untuk menghilangkan senyawa berwarna dan senyawa koloid. Dilakukan penyaringan kembali, kemudian ditambahkan 0,25 gram Na Oksalat untuk menghilangkan Pb Asetat. Dikocok kemudian didiamkan selama 10 menit untuk mengendapkan Pb Asetat, disaring kembali. Lalu ditambahkan 1 ml larutan fenol 5%, dan 5 ml larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat dengan cara menuangkan secara tegak lurus ke permukaan larutan. Biarkan selama 10 menit, lalu ditempatkan pada penangas air selama 15 menit.. Kemudian sampel siap diukur kadar gula reduksi menggunakan spektrofotometer.

### **3.5.3 Analisis Kadar Etanol dengan *Gas Chromatography***

Analisis kadar etanol dilakukan dengan menggunakan alat *Gas Chromatography*. Kolom yang digunakan pada alat ini ialah Carbowax Chromosorb TR-5CMS 30 m x 0,32 mmID x 0,25 µm dengan kondisi operasi suhu mula-mula 70° C kemudian dinaikan 4° C per menit selama 3 menit. Selanjutnya suhu dinaikan lagi 32 ° C per menit sehingga suhu kolom menjadi 150° C. Tekanan gas pembawa (N<sub>2</sub>) 1,7 kg/cm<sup>2</sup>, tekanan gas pembawa (H<sub>2</sub>) 16 kg/cm<sup>2</sup> dan tekanan udara 0,19 kg/cm<sup>2</sup>.

Injektor Hewlett Packard syringe 5  $\mu$ l dengan volume injeksi 1  $\mu$ l. Analisis kadar etanol membutuhkan larutan standar etanol pada konsentrasi 0,02, 0,03, 0,05 dan 0,10 % yang masing-masing diinjeksi secara duplo (Masykuri, 2001).

## V. KESIMPULAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian dan pembahasan yang telah dilakukan maka dapat diambil kesimpulan bahwa:

1. Prehidrolisis menghasilkan kadar etanol lebih tinggi, menghasilkan kadar selulosa yang lebih rendah dan kadar gula reduksi lebih tinggi dibandingkan tanpa prehidrolisis
2. Lama inkubasi SSF 24 sampai 96 jam meningkatkan kadar etanol, menurunkan kadar selulosa dan kadar gula reduksi pada pembuatan bioetanol dari TKKS secara SSF
3. Terdapat interaksi antara faktor prehidrolisis dan lama inkubasi terhadap kadar etanol, kadar selulosa dan kadar gula reduksi pada pembuatan bioetanol dari TKKS secara SSF. Kadar etanol tertinggi (0,916 %v/v) diperoleh pada kombinasi perlakuan prehidrolisis selama 24 jam dan inkubasi SSF selama 96 jam.

### 5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, saran untuk penelitian selanjutnya ialah melakukan optimasi lama waktu prehidrolisis dan lama inkubasi untuk mendapatkan kadar etanol yang optimum pada pembuatan bioetanol menggunakan metode SSF.

## DAFTAR PUSTAKA

- Achmadi. 1990. *Kimia Kayu*. Bahan Pengajaran Ilmu Hayati. Institut Pertanian Bogor. 120 hlm.
- Adrados, B.P., Choteborska, M. Galbe, dan G. Zacchi. 2005. Etanol Production from Non—strach Carbohydrates of Wheat Bran. *Bioresource Technology*. 96: 843-850.
- Alfani, F., A. Gallifuoco, A. Saporosi, A. Spera, and M. Cantarella. 2000. Comparison of SHF and SSF processes for the bioconversion of steam-exploded wheat straw. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 25 (2000) 184-192.
- Anindyawati, T. 2009. Prospek Enzim dan Limbah Lignoselulosa untuk Produksi Bioetanol. *Jurnal Bioteknologi* 44(1) : 49-56. LIPI. Bogor.
- Asnag, Aminah, dan Suparti . 2011. Lama Fermentasi dan Dosis Ragi yang Berbeda pada Fermentasi Gaplek Keteloh Pohon (*Manihot utilissima*, *Pohl*) Varietal Mulabat Terhadap Kadar Glukosa dan Bioetanol. UMS. Surakarta. Skripsi
- Astuty, E.D. 1991. *Fermentasi Etanol Kulit Buah Pisang*. UGM. Yogyakarta.
- Atalla, R.H. and J.M. Hackney. 1993. Hemicelluloses as structure regulators in the aggregation of native Cellulose. *J. Biol. Macromol.*, 1993, Vol. 15, April
- Azizah, N., A. N. Al-Baari, S. Mulyani. 2012. Pengaruh Lama Fermentasi terhadap Kadar Alkohol, pH, dan Produksi Gas pada Proses Fermentasi Bioetanol dari Whey dengan Substitusi Kulit Nanas. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*. 1(2): 72-77.
- Badan Pusat Statistik. 2016. Produksi Minyak Bumi dan Gas Alam, 1996-2014. <https://www.bps.go.id/linkTabelStatis/view/id/1092> diakses pada 12 Desember 2016.
- Bamforth. 2005. *Fermentation and Microorganisms*. Blackwell Publishing. USA.
- Barcelos, C., R. Maeda, N. Pereira. 2016. Sweet Sorghum as a whole-crop feedstock for ethanol production. *Biomass and Bioenergy* 94 (2016) 46-56

- Baskar, C., S. Baskar, R.S. Dhillon. 2012. *Biomass Conversion*. Springer Heidelberg. New York.
- Boing J.T.P. 1982. Enzyme production. Di dalam Reed G, editor. *Prescott & Dunns Industrial Microbiology* 4th Ed. West Port: AVI.
- Bonawitz and Chapple. 2010. Annual Review Genetic. <http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev-genet-102209-163508> diakses pada tanggal 15 Oktober 2016.
- Briffaut, J. M. 2004. *Determination of Free Sugar (Glukose, Fructose, Sucrose, Maltose, Lactose)*. Content of Processed Food Products. Belgia
- Buckle, K. A., R. A. Edwards, G. H. Fleet, dan M. Wotton. 1987. *Ilmu Pangan*. Penerjemah H Purnomo dan Adiono. UI – Press, Jakarta.
- Budiarni, M. Dan T. Gulton. 2013. Pengaruh Variasi Waktu Fermentasi dan Berat Ragi terhadap Kadar Alkohol pada Pembuatan Limbah Padat Tapioka (Onggok). Skripsi. UNY. Yogyakarta.
- Caecilia, N. 2015. Pengaruh Perlakuan Awal Basa dan Hidrolisis Enzimatis Terhadap Kadar Gula Reduksi Tandan Kosong Kelapa Sawit. Skripsi. Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Complex Carbohydrate Research Center. 2007. *Plant Cell Walls, Hemicelluloses*. The University of Georgia. Georgia
- Dea, I.A. 2009. Kajian Awal Biokonversi Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS) Menjadi Etanol Melalui Sakarifikasi dan fermentasi Alkoholik. [http://indoplasma.or.id/publikasi/skripsi\\_pn/pdf/buletin-IPB-bandung\\_pn\\_9\\_2\\_2003\\_38-44\\_alina.pdf](http://indoplasma.or.id/publikasi/skripsi_pn/pdf/buletin-IPB-bandung_pn_9_2_2003_38-44_alina.pdf). Diakses 5 Desember 2016.
- Dekker, R.F.H. 1985. *Biodegradation of the hemicelluloses In: Higuchi T (ed) Biosynthesis and biodegradation of wood components*. Academic Press. Orlando.
- Dirjen Perkebunan. 2015. Statistik Perkebunan Indonesia 2014-2016. Direktorat Jenderal Perkebunan. Jakarta.
- Djuardi, A. 2015. Optimasi Hidrolisis Jerami Padi Untuk Produksi Bioetanol Dengan Metode *Simultaneous Saccharification And Fermentation*. Skripsi. Universitas Lampung, Lampung.
- Eklund, R., M. Galbe, G. Zacchi. 1995. The influence of SO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> impregnation of willow prior to steam pretreatment. *Bioresour. Enginering*. 52, 225-229.
- 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*. New York: McGraw -Hill Book. Publishing. Co. Ltd.

- Galbe, M., G. Lidén, and G. Zacchi. 2005. Production of ethanol from biomass - Research in Sweden. *Journal of Scientific & Industrial Research* 64 (2005) 905-919.
- Gunasekaran, G., R.K. Chandra. 1999. Ethanol Fermentation technology *Zymomonas mobilis*. *Curr. Sci.* 77(1): 56-68.
- Hames, D., dan N. Hoopet. 2005. *Biochemistry*. Edisi keempat. Taylor and Francis Group. New York.
- Handford, M.G., T.C. Baldwin, F. Goubet, T.A. Prime, J. Miles, X. Yu, P. Dupree. 2003. Localisation and characterisation of cell wall mannan polysaccharides in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 218: 27–36
- Heradewi. 2007. Isolasi Lignin dari Lindi Hitam Proses Pemasakan Organosolv Serat Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS). Skripsi. Fakultas Teknolgi Pertanian. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Howard R.L., E.L. J.R. Abotsi, Rensburg, dan S. Howard. 2003. Lignocellulose Biotechnology: Issues Of Bioconversion And Enzyme Production. *African Journal of Biotechnol.* 2(12) : 602–619.
- Hoyer, Kerstin., Galbe, Mats., Zacchi, Guido. 2013. Influence of fiber degradation and concentration of fermentable sugars on simultaneous saccharification and fermentation of high-solids spruce slurry to ethanol. *Biotechnology for Biofuels.* 6:145 Page 2 of 9.
- Ichsan, M. 2015. Analisa Pengaruh Lama Fermentasi Terhadap Kadar Bioetanol Pada Mesin Destilator Model Reflux. *Jurnal Simetris*, Vol 6 No 2 November 2015. Issn: 2252-4983
- Irvan, A.W. putri, S.U. Surbakti, B. Trisakti. 2016. Pengaruh konsentrasi Ragi dan Waktu Fermentasi pada Pembuatan Bioetanol dari Biji Cempedak (*Artocarpus champeden sprem*). *Jurnal Kimia Usu*, Vol 5 No. 2.
- Isroi, R. M., 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.
- Jin, M, C. Gunawan, V. Balan, B.E. Dale. 2012. Consolidated bioprocessing (CBP) of AFEXTM-pretreated corn stover for ethanol production using clostridium phytofermentans at a high solids loading. *Biotechnol Bioeng* 2012. 109:1929–1936.
- Judoamidjojo, R. M., E.G. Said, L. Hartono. 1989. *Biokonversi*. IPB. Bogor.
- Kamal, N. 2014. *Karakterisasi Dan Potensi Pemanfaatan Limbah Sawit*. ITENAS. Bandung.
- Kementrian ESDM. 2016. Konsumsi/Penjualan BBM. <http://statistik.migas.esdm.go.id/index.php?r=konsumsiBbm/index>. diakses pada 12 Desember 2016



- Koppram R, E. Tomas-Pejo, C. Xiros, L. Olsson. 2014. Lignocellulosic ethanol production at high-gravity: challenges and perspectives. *Trend Biotechnol* 2014, 32:46–53
- Krassig, J., R.G. Schurz, K. Steadman, W. Schliefer, M. Albrecht, Mohring and Schlosser. 2004. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry—Cellulose*. VCH Verlag GmbH & Co. Kga. Wiley.
- Li, X., J. Lu, J. Zhao, Y. Qu. 2014. Characteristics of Corn Stover Pretreated with Liquid Hot Water and Fed-Batch Semi-Simultaneous Saccharification and Fermentation for Bioethanol Production. Thesis. University of Nottingham, United Kingdom.
- Liu R., J. Li, and F. Shen. 2008. Refining bioethanol from stalk juice of sweet sorghum by immobilized yeast fermentation. *Renewable Energy*. 33: 1130-1135.
- Liu, Y., J. Xu, Y. Zhang, M. He. 2016. Improved Ethanol Production Based on High Solids Fed-Batch Simultaneous Saccharification and Fermentation with alkali-pretreated Sugarcane Bagasse. *Bioresources*. 11(1) 2548-2556
- Liu, Z., L. Qin, J. Zhu, B. Li, Y. Yuan. 2014. Simultaneous saccharification and fermentation of steam-exploded corn stover at high glucan loading and high temperature. *Biotechnology for Biofuels* 2014, 7:167
- Lu, J., X.Z. Li, R.F. Yang, J. Zhao, Y.B. Qu. 2013. Tween 40 pretreatment of unwashed water-insoluble solids of reed straw and corn stover pretreated with liquid hot water to obtain high concentrations of bioethanol. *Biotechnol Biofuels* 2013, 6:159.
- Mandels, M., R. Andreotti., dan C. Roche. 1976. Measurement of Saccharifying Cellulase. *Biotechnol Bioeng Symp*. 6 : 21-23.
- Manurung, M. 2011. Sakarifikasi dan Fermentasi Simultan (SFS) dari Limbah Ekstraksi Alginat untuk Pembuatan Bioetanol. Skripsi. Institut Pertanian Bogor.
- Masykuri. 2001. Identifikasi Mikroorganisme yang Memfermentasikan Susu Kerbau Lumpur Menjadi Dadih. *Pengembangan Peternakan Tropis Edisi Khusus Seminar Nasional Ruminansia*. 297-306.
- Mergner, R., R. Janssen, D. Rutz, I. 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.
- MetaCyc. 2008. xylan biosynthesis.  
<http://metacyc.org/META/newimage?type=PATHWAY&object=PWY-5800> diakses pada tanggal 5 September 2016
- Modenbach, A.A., S.E. Nokes. 2013. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings—a review. *Biomass Bioenergy* 2013, 56:526–544.
- Nasrin, A.B., A.N. Ma, Y.M. Choo, S. Mohamad, M .H. Rohaya, A. Azali and Z. Zainal. 2008. Oil Palm Biomass As Potential Substitution Raw

- Materials For Commercial Biomass Briquettes Production. *American Journal of Applied Science*. Vol.5. No.3. 179-183. ISSN 1554-3641.
- Nasrun, Jalaluddin, Mahfuddhah. 2015. Pengaruh Jumlah Ragi dan Waktu Fermentasi Terhadap Kadar Bioetanol yang Dihasilkan dari Fermentasi Kulit Pepaya. *Jurnal Tekno Kimia Unimal* 4;2 (1-10)
- Nata, I.F., J.H. Prayogo, Arianto, Toni. 2014. Produksi Bioetanol Dari *Alkali-Pretreatment* Jerami Padi Dengan Proses *Simultaneous Sacharification And Fermentation* (Ssf). Skripsi. Universitas Lambung Mangkurat.
- Odling-Smee, L. 2007. Biofuel. *Nature*. 446:483.
- Olofsson, K., M. Bertilsson, G. A. Liden. 2008. *Biotechnology Biofuels 1*. <http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/1/1/7> diakses pada tanggal 2 September 2016.
- Ordaz-Ortiz, J.J., S.E. Marcus, J.P. Knox. 2009. Cell wall microstructure analysis implicates hemicellulose polysaccharides in cell adhesion in tomato fruit pericarp parenchyma. *Molecule Plant*, 2 (2009), pp. 910–921
- Poedjiadi, A. 1994. *Dasar-Dasar Biokimia*. UI Press. Jakarta.
- Purba, E.S. dan T. Gulton. 2013. Pengaruh Lama Fermentasi terhadap Kadar Etanol dari Biji Alpukat (*Persea americana* Mill). Skripsi. UNY. Yogyakarta.
- Ralph, J., J.M. Marita, S.A. Ralph, R.D. Hatfield, F. Lu, R.M. Ede, J. Peng, S. Quideau, R.F. Helm, J.H. Grabber. 1999. Solution-state NMR of lignins. In Argyropoulos DS, ed, *Advances in Lignocellulosic Characterization*. TAPPI Press, Atlanta, pp 55–108
- Ralph, J., K. Lundquist, G. Brunow, F. Lu, H. Kim, P. Schatz, J.M. Marita, R.D. Hatfield. 2004. *Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl-propanoids*. *Phytochem. Rev.* 3, 29, 2004
- Rebeca, A.S., Ye, Ratna, Michael, and Jason. 2007. A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks; *Bioresources Technology* 98:3000-3011.
- Remli, N.A.M., U.K. Shah, R. Mohamad dan S. Aziz. 2014. Effect Of Chemical And Thermal Pretreatments On The Enzymatic Saccharification Of Rice Straw For Sugar Production. *BioResources*. 9 (1) : 510–522.
- Retnowati, D dan Sutanti. 2009. Pemanfaatan Limbah Padat Ampas Sinkong Dan Lindur Sebagai Bahan Baku Pembuatan Bioetanol. Makalah Penelitian. Universitas Diponegoro. Semarang
- Rutz, D. and R. Janssen. 2008. *Biofuel Technology Handbook* WIP Renewable energies. Germany.
- Safaria, S., N. Idiawati, dan T.A. Zaharah. 2013. Efektivitas Campuran Enzim Selulase Dari *Aspergillus niger* dan *Trichoderma reesei* dalam Menghidrolisis Substrat Sabut Kelapa. *JKK*. 2(1) : 46-51.

- Sajab, M.S., C.H. Chia, S.Zakaria & P. S. Khiew. 2013. Cationic and anionic modifications of oil palm empty fruit bunch fibers for the removal of dyes from aqueous solutions. *Bioresource Technology*. 128, 571–577.
- Samsuri, M., M. Gozanl, R. Mardias, M. Baiquni, Hermansyah, B. Prasetya, M. Nasikin and T. Watanabe. 2007. Ethanol Production From Bagasse With Combination Of Cellulose-Cellubiase In Simultaneous Saccharification And Fermentation (SSF) Using White Rot Fungi Pre-Treatment. *Journal of Chem and Nat Resources Engineering*. 3 : 20-32.
- Sari, R.M. 2015. Optimasi Produksi Bioetanol Dari Tandan Kosong Kelapa Sawit Menggunakan Metode Sakarifikasi Dan Fermentasi Serentak. Skripsi. Universitas Lampung
- Saropah, A., A. Jannah, A. Maunatin. 2012. Kinetika Reaksi Enzimatik Ekstrak Kasar Enzim Bakteri Selulolitik Hasil Isolasi dari Beaktul. *Alchemy*, 2 (1) : 34-35
- Scheller, H.V., P. Ulvskov. 2010. Review Plant Biology. <http://arjournals.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev-arplant-042809-112315?amp;searchHistoryKey=%24%7BsearchHistoryKey%7D> diakses pada tanggal 15 September 2016.
- Septiyani, R. 2011. Pengaruh Konsentrasi dan Lama Inkubasi Enzim Selulase terhadap Kadar Gula Reduksi Ampas Tebu. Skripsi. Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Shen, J., Foster, A. Agblevor . 2011. Ethanol production of semi-simultaneous saccharification and fermentation from mixture of cotton gin waste and recycled paper sludge. *Bioprocess Biosyst Eng* (2011) 34:33–43.
- Stewart, G.G., I. Russell. 1985. Valuable Techniques in The Genetic Manipulation of Industrial Yeast Strains. *Soc. Brew Chemical*. No 43.
- Suh, S., N. Zhang, N. Nguyen, S. Gross, M. Blackwell. 2007. *Lab manual for yeast study*. Mycology lab. Louisiana state university.
- Sun, Y., J. Cheng. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technol*. 83, 1-11.
- Suri, A., Y. Yusak, R. Bulan. 2013. Pengaruh Lama Fermentasi terhadap Kadar Bioetanol dari Fermentasi Glukosa Hasil Hidrolisis Selulosa TKKS (*Elaeis guinensis jack*) dengan HCl 30% menggunakan Ragi Roti. *Jurnal Saintia Kimia Vol 1 No 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>. Universitas Lampung. Bandar Lampung. diakses pada tanggal 2 September 2016.
- Sutikno dan O. Nawansih. 2015. Optimasi Sakarifikasi Dan Fermentasi Holoselulosa TKKS Untuk Memproduksi Bioetanol Sebagai Pengganti

- Bahan Bakar Minyak. Laporan Hibah Bersaing. Universitas Lampung. Lampung.
- Syam, K. A. 2008. Optimasi Produksi Dan Aktivitas Enzim Selulase Dari Mikrob Selulolitik Asal Rayap. Skripsi. IPB. Bogor.
- Taherzadeh, M.J., and K. Karimi. 2007. Acid-Based Hydrolysis Process For Ethanol From Lignocellulosic Materials: A Review. *BioResources* 2 (2007) 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., Y. Muryanto, 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.
- Usmana, A.S., Rianda, Sapt., Novia. 2012. Pengaruh Volume Enzim dan Waktu Fermentasi Terhadap Kadar Etanol (Bahan Baku Tandan Kosong Kelapa Sawit Dengan Pretreatment Alkali). *Jurnal Teknik Kimia* No. 2, Vol. 18
- Van Parijs, F.R D., K. Morreel, J. Ralph, W. Boerjan, R.M.H. Merks. 2010. Modeling lignin polymerization. I. Simulation model of dehydrogenation polymers. *Plant Physiol* 153: 1332–1344
- Vanholme, Ruben, Demedts, Brecht, Morreel, Kris, Ralph, John, Boerjan, Wout. 2010. Plant Physiology. <http://www.plantphysiol.org/cgi/content/full/153/3/895> diakses pada tanggal 15 September 2016.
- Vertes, A.A., N. Qureshi, H.P. Blaschek, Yukawa, Hideaki. 2009. *Biomass to biofuels: strategies for global industries*. John Wiley & Sons. Chichester.
- Wertz, J.L, and O. Bedue. 2013. *Lignocellulosic Biorefineries*. EPFL P ress. Swiss
- 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.
- Wilkins, M.R., W.W. Widmer, K. Grohmann. 2007. Simultaneous saccharification and fermentation of citrus peel waste by *Saccharomyces cerevisiae* to produce ethanol. *Process Biochem* 2007. 42:1614–1619.
- Xie, N., N. Jiang, M. Zhang, W. Qi. 2014. Effect Of Different Pretreatment Methods Of Corncob On Bioethanol Production And Enzyme Recovery. *Cellulose Chem. Technol.* 48 (3-4), 313-319 (2014)