

PENGARUH KONSENTRASI H₂SO₄ PADA PERLAKUAN AWAL DAN WAKTU FERMENTASI TERHADAP KADAR BIOETANOL YANG DIHASILKAN

Euis Kusniawati¹

¹⁾Program Studi Teknik Eksplorasi Produksi Migas, Politeknik Akamigas Palembang

Abstrak

Jerami padi sebagai limbah hasil pertanian memiliki potensi untuk digunakan sebagai bahan baku energi alternatif, yaitu bioetanol atau bahan bakar alternatif lainnya. Jerami padi mengandung selulosa dan hemiselulosa yang dapat digunakan untuk memproduksi etanol dengan metode hidrolisis dan fermentasi. Jerami padi diberi perlakuan awal dengan alkali dan asam encer dengan variasi konsentrasi 1%, 2%, 3%, 4% dan 5%. selanjutnya jerami padi dihidrolisis secara enzimatik dan difermentasi untuk menghasilkan bioetanol. Hasil penelitian menunjukkan bahwa etanol terbesar yang diperoleh adalah 2,699% pada 3 hari waktu fermentasi dengan konsentrasi asam sebesar 5% pada proses perlakuan awal.

Kata kunci: *Bioetanol, jerami padi, perlakuan awal, hidrolisis dan fermentasi.*

Abstract

Rice straw as agriculture waste has the potential to be used as raw material for alternative energy, namely bioethanol or other alternative fuels. Rice straw contains cellulose and hemicellulose that can be used to produce ethanol by hydrolysis and fermentation. The rice straw was pretreated by alkaline and acid pretreatment. Then, pretreated rice straw was hydrolyzed enzymatically and fermented to produce bioethanol. The results showed that the biggest ethanol obtained was 2,699% at 3 days of fermentation time and acid concentrations pretreatment of 5%.

Keywords: *bioethanol, rice straw, pretreatment, hydrolysis, fermentation*

I. Pendahuluan

Seiring bertambahnya jumlah penduduk, maka semakin banyak pula tuntutan kebutuhan energi yang harus dipenuhi demi kesejahteraan sosialnya. Indonesia sebagai negara berkembang, maka penyediaan energi merupakan salah satu faktor pendukung demi kelancaran program-program pembangunan. Sampai saat ini, minyak bumi masih menjadi prioritas utama dalam pemenuhan kebutuhan energi. Permintaan bahan bakar minyak terus mengalami peningkatan, sedangkan persediaan energi semakin menipis. Usaha yang dapat dilakukan untuk mengatasi hal tersebut yaitu dengan cara menghasilkan cadangan energi BBM lewat energi alternatif diantaranya pembuatan bioetanol (bahan pencampur BBM), biodiesel (bahan pencampur solar) dan biogas yang merupakan energi alternatif pengganti elpiji. Usaha ini bertujuan untuk membantu rakyat yang terhimpit kenaikan harga BBM juga dapat menghemat biaya dan devisa negara.

Bioetanol yang diproduksi saat ini umumnya berasal dari etanol generasi pertama, yaitu etanol yang dibuat dari gula (tebu, molases) atau pati-patian (jagung, singkong, dll). Bahan-bahan tersebut merupakan bahan pangan dan bahan pakan. Namun, banyak negara di Amerika menyebutkan bahwa konversi bahan pangan dan bahan pakan menjadi bioetanol merupakan salah satu penyebab naiknya harga-harga pangan dan pakan.

Oleh karena itu arah pengembangan bioetanol mulai berubah ke arah pengembangan bioetanol generasi kedua, yaitu bioetanol dari biomassa lignoselulosa. Beberapa penelitian dibelahan dunia sedang gencar mencari dan mengembangkan bioetanol generasi kedua ini.

Jerami padi merupakan salah satu limbah biomassa lignoselulosa yang mempunyai kadar selulosa yang cukup tinggi dan tersusun lebih dari 70% karbohidrat, yang terbentuk dari kumpulan monosakarida yang berbeda-beda. Selulosa ini dapat digunakan untuk

pembuatan bioetanol dengan cara hidrolisa dan fermentasi.

Proses pemanfaatan biomassa lignoselulosa khususnya jerami padi menjadi materi yang lebih bernilai ekonomis, seperti glukosa dan xilitol harus melalui tahap perlakuan awal (*pretreatment*). Proses perlakuan awal bertujuan untuk meningkatkan pembentukan gula (baik dari hemiselulosa maupun selulosa), menghindari degradasi atau kehilangan karbohidrat, menghindari pembentukan produk hambat terhadap hidrolisis berikutnya dan proses fermentasi sehingga jika dipandang dari sudut ekonomi, proses perlakuan awal lebih menghemat biaya (Sun and Cheng, 2002).

Metode perlakuan awal dapat dilakukan dengan salah satu atau kombinasi dari tiga cara, yaitu: fisika, kimia dan biologi. Penggabungan dua atau lebih perlakuan awal dari jenis yang sama atau berbeda juga umum dilakukan. Berbagai metode perlakuan awal telah dipelajari agar memperoleh biomassa sebagai sumber produksi etanol. Perlakuan awal yang efektif memiliki kriteria: mempertahankan fraksi selulosa, menahan laju pembentukan inhibitor akibat dari degradasi produk, energi yang sedikit dan efektif.

II. Dasar Teori

2.1 Bioetanol

Bioetanol adalah etanol yang dihasilkan dari proses fermentasi gula dari bahan nabati (Nur, 2009). Bioetanol bersumber dari karbohidrat yang potensial sebagai bahan baku seperti tebu, nira sorgum, ubi kayu, garut, ubi jalar, sagu, jagung, jerami, bonggol jagung dan kayu. Setelah melalui proses fermentasi, dihasilkan etanol.

Bahan baku bioetanol berasal dari:

1. Nira bergula (sukrosa): nira tebu, nira nipah, nira sorgum manis, nira kelapa, nira aren, nira siwalan, sari-buah mete.
2. Bahan berpati: tepung-tepung sorgum biji (jagung cantel), sagu, singkong/gaplek, ubi jalar, ganyong, garut, umbi dahlia.
3. Bahan berselulosa (lignoselulosa) yang sekarang belum ekonomis, teknologi proses yang efektif diperkirakan akan komersial pada dekade ini.

Sumber biomassa lignoselulosa dapat dikelompokkan sebagai berikut :

1. Limbah pertanian atau industri pertanian : jerami, sekam padi, tongkol jagung, sisa pangkasan jagung, onggok, dll.
2. Limbah perkebunan : TKKS, bagase, sisa paaangkasan tebu, kulit kakao, kulit buah kopi, dll.
3. Limbah kayu dan kehutanan : sisa gergajian, limbah sludge pabrik kertas, dll.
4. Sampah organik : sampah rumah tangga, sampah pasar, dll.

2.2 Jerami Padi

Jerami padi merupakan salah satu limbah pertanian yang paling besar di Indonesia. Pemanfaatan limbah jerami padi sebagai salah satu bahan baku alternatif produksi glukosa dalam proses pembuatan bioetanol mulai dikembangkan di beberapa negara termasuk di Indonesia. Hal ini disebabkan karena selain harganya murah jerami padi juga memiliki kandungan selulosa yang cukup tinggi yaitu 32,1%.

Tabel 1. Komposisi Jerami Padi

| Komposisi | Persentase (%) |
|--------------------------|----------------|
| Selulosa sebagai glukosa | 41,06 |
| Gula Hemiselulosa | 13,88 |
| Xylose | 12,38 |
| Arabinose | 1,02 |
| Galaktosa | 0,48 |
| Mannose | 0,00 |
| Lignin | 25,33 |
| Moisture | 9,26 |
| Ash, dan lainnya | 10,46 |

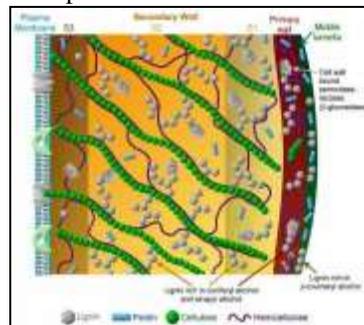
Sumber : Chang, *et al.*, 2011

Jerami padi mengandung kurang lebih 41% selulosa dan 13,88% hemiselulosa. Kedua bahan polysakarida ini dapat dihidrolisis menjadi gula sederhana yang selanjutnya difermentasi menjadi etanol.

2.3.1 Lignoselulosa

Bahan lignoselulosa merupakan biomassa yang berasal dari tanaman, yang terbentuk dari tiga komponen utama, yaitu selulosa, hemiselulosa, dan lignin. Ketersediaannya yang cukup melimpah, terutama sebagai limbah pertanian, perkebunan, dan kehutanan, menjadikan bahan ini berpotensi sebagai salah satu sumber energi melalui proses konversi, baik proses fisika, kimia maupun biologis.

Pada sel kayu, selulosa membentuk rangka, hemiselulosa membentuk matriks, dan lignin membentuk kerak. Lignin berikatan kovalen dengan polisakarida, bersifat hidrofobia. Dengan proses hidrolisis, bakteri dan enzim mampu memecah lignoselulosa. Selulosa dan hemiselulosa dapat dihidrolisis menjadi gula sederhana seperti heksosa dan *xylan*. Karena struktur kristalnya, lignoselulosa lebih susah untuk dipecahkan.

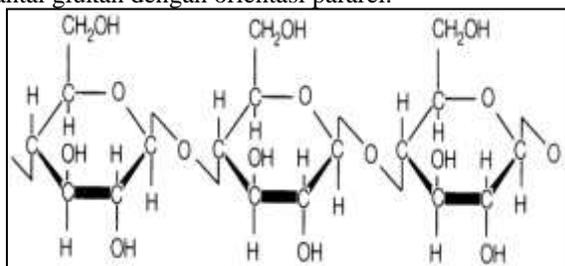


Gambar 1. Lignoselulosa (Mauricio, 2012)

2.3.2 Selulosa

Selulosa adalah suatu polimer yang tidak bercabang dari glukosa yang dihubungkan melalui ikatan 1-4 *glikosida* dan merupakan penyusun utama dinding sel tanaman yang berbentuk serat dan berwarna putih dengan rumus molekul $(C_6H_{10}O_5)_n$.

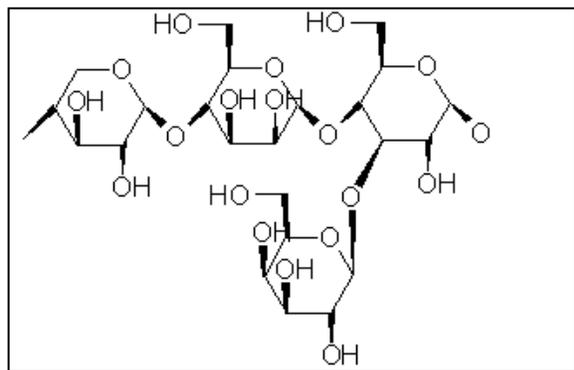
Di dalam selulosa alami dari tanaman, rantai selulosa diikat bersama-sama membentuk mikrofibril yang sangat terkristal (*highly crystalline*) dimana setiap rantai selulosa diikat bersama-sama dengan ikatan hidrogen. Sebuah kristal selulosa mengandung sepuluh rantai glukuan dengan orientasi paralel.



Gambar 2. Struktur Selulosa

2.3.3 Hemiselulosa

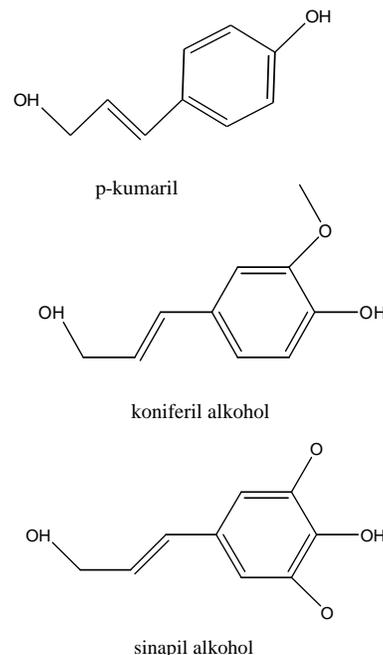
Hemiselulosa adalah polisakarida yang mempunyai berat molekul lebih kecil daripada selulosa. Molekul hemiselulosa lebih mudah menyerap air, bersifat plastis, dan mempunyai permukaan kontak antar molekul yang lebih luas dari selulosa (Oshima, 1965). Hemiselulosa umumnya dikelompokkan berdasarkan residu gula utama yang menyusun rangkanya, seperti: *xylan*, mannan, galaktan, dan *glucan*, dengan *xylan* dan mannan adalah gugus utama dari hemiselulosa. Hemiselulosa mirip dengan selulosa yang merupakan polimer gula. Namun, berbeda dengan selulosa yang hanya tersusun atas glukosa, hemiselulosa tersusun dari bermacam-macam jenis gula. Hemiselulosa lebih mudah dihidrolisis daripada selulosa, tetapi lebih sulit difermentasi menjadi etanol (Perez *et al.*, 2005).



Gambar 3. Struktur Hemiselulosa

2.3.4 Lignin

Lignin bersifat tidak larut dalam kebanyakan pelarut organik. Lignin yang melindungi selulosa bersifat tahan terhadap hidrolisis karena adanya ikatan eter. Susunan utama lignin adalah *p*-kumaril alkohol, koniferil alkohol dan sinapil alkohol.

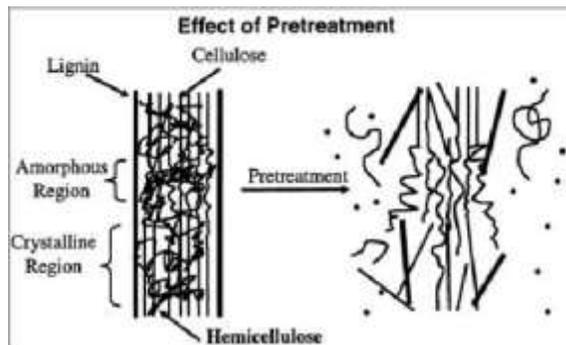


Gambar 4. Susunan Utama Lignin (Deacon, 1997)

2.4. Perlakuan awal (Pretreatment) Lignoselulosa

Perlakuan awal biomassa lignoselulosa harus dilakukan untuk mendapatkan hasil yang tinggi, dimana penting untuk pengembangan teknologi biokonversi dalam skala komersial (Mosier, *et al.*, 2005).

Perlakuan awal merupakan tahapan yang banyak memakan biaya dan berpengaruh besar terhadap biaya keseluruhan proses. Sebagai contoh perlakuan awal yang baik dapat mengurangi jumlah enzim yang digunakan dalam proses hidrolisis. Perlakuan awal dapat meningkatkan hasil gula yang diperoleh. Gula yang diperoleh tanpa perlakuan awal kurang dari 20%, sedangkan dengan pretreatment dapat meningkat menjadi 90% dari hasil teoritis. Tujuan dari perlakuan awal adalah untuk membuka struktur lignoselulosa agar selulosa menjadi lebih mudah diakses oleh enzim yang memecah polimer polisakarida menjadi monomer gula. Tujuan secara skematis ditunjukkan pada gambar 5



Gambar 5. Skema tujuan pretreatment biomassa lignoselulosa (Mosier, et.al, 2005)

Selama beberapa tahun terakhir berbagai teknik perlakuan awal telah dipelajari melalui pendekatan biologi, fisika, kimia. Menurut (Sun & Cheng, 2002) perlakuan awal seharusnya memenuhi kebutuhan berikut ini:

- 1) Meningkatkan pembentukan gula atau kemampuan menghasilkan gula pada proses berikutnya melalui hidrolisis enzimatik
- 2) Menghindari degradasi atau kehilangan karbohidrat
- 3) Menghindari pembentukan produk samping yang dapat menghambat proses hidrolisis dan fermentasi
- 4) Biaya yang dibutuhkan ekonomis

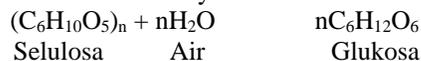
2.4.1 Delignifikasi

Limbah lignoselulosik merupakan bahan yang mengandung lignin, hemiselulosa dan selulosa. Limbah lignoselulosa dapat dimanfaatkan kembali dengan menurunkan kadar ligninnya semaksimal mungkin

Dalam pembuatan etanol dari kayu (jerami) yang digunakan adalah selulosanya sehingga lignin dalam kayu harus dihilangkan. Proses pemisahan atau penghilangan lignin dari serat - serat selulosa disebut delignifikasi atau pulping.

2.5 Hidrolisa

Hidrolisa adalah proses antara reaktan dengan menggunakan air supaya suatu persenyawaan pecah atau terurai. Reaksi hidrolisa yaitu :



Zat - zat penghidrolisa ada beberapa macam, antara lain

1. Air
2. Asam
3. Basa
4. Enzim

Beberapa cara hidrolisa selulosa yaitu hidrolisa enzimatik, hidrolisa asam encer dan hidrolisa asam pekat. Hidrolisa enzimatik adalah hidrolisa yang menggunakan bantuan enzim.

Proses hidrolisis yang umum digunakan pada industri etanol adalah hidrolisis dengan asam (*acid hydrolysis*) menggunakan asam sulfat (H_2SO_4) atau dengan menggunakan asam klorida (HCl). Proses hidrolisis dapat dilakukan dengan menggunakan enzim yang sering disebut dengan *enzymatic hydrolysis* yaitu hidrolisis dengan menggunakan enzim jenis selulase atau jenis yang lain. Keuntungan dari hidrolisis dengan enzim dapat mengurangi penggunaan asam sehingga dapat mengurangi efek negatif terhadap lingkungan. Kemudian setelah proses hidrolisis dilakukan fermentasi menggunakan *yeast* seperti *S. cerevisiae* untuk mengkonversi menjadi etanol.

Salah satu bakteri penghasil selulase adalah *Aspergillus niger*. *Aspergillus niger* adalah kapang genus *Aspergillus*, famili *Eurotiaceae*, ordo *Eurotiales*, sub klas *Plectomycetidae*, klas *Ascomycetes*, sub divisi *Ascomycotina* dan divisi *Amastigmocota* (Peleazar dkk, 1986). *Aspergillus niger* mempunyai kepala pembawa konidia yang besar, dipak secara padat, bulat dan berwarna hitam coklat atau ungu coklat. Kapang ini mempunyai bagian yang khas yaitu hifanya berseptata, spora yang bersifat seksual dan tumbuh memanjang di alas stigma, mempunyai sifat aerobik, sehingga dalam pertumbuhannya memerlukan oksigen yang cukup. *Aspergillus niger* termasuk mikroba mesofilik dengan pertumbuhan maksimum pada suhu $35^\circ\text{C} - 37^\circ\text{C}$.

Derajat keasaman untuk pertumbuhannya adalah 2 - 8,5 tetapi pertumbuhan akan lebih baik pada kondisi keasaman atau pH yang rendah (Fardiaz, 1989). Keuntungan fermentasi substrat menggunakan kapang adalah pertumbuhan kapang dapat toleran terhadap keadaan pH. *Aspergillus niger* dapat tumbuh dengan cepat, diantaranya digunakan secara komersial dalam produksi asam sitrat, asam glukonat dan pembuatan beberapa enzim seperti amilase, pektinase, amilglukosidase dan selulase.

Hidrolisa selulosa secara enzimatik memiliki beberapa keuntungan, yaitu konversi lebih tinggi, menghasilkan produk samping yang minimal, kebutuhan energi lebih rendah dan kondisi operasi yang relatif lebih rendah. Proses enzimatik merupakan proses bersih lingkungan (Gozan, 2007).

Faktor-faktor yang berpengaruh pada hidrolisis selulosa antara lain :

1. Suhu

Semakin tinggi suhu reaksi semakin cepat pula laju reaksinya. Tetapi kalau proses berlangsung pada suhu yang tinggi, konversi akan menurun. Hal ini disebabkan adanya glukosa yang pecah menjadi arang. (Radley, 1954)

2. Waktu.

Semakin lama waktu hidrolisis, konversi yang dicapai semakin besar dan pada batas waktu tertentu akan diperoleh konversi yang relatif baik. dan apabila

konversi diperpanjang pertambahan konversi kecil sekali.

3. Konsentrasi katalisator.

Penambahan katalisator bertujuan memperbesar kecepatan reaksi.

4. Kadar suspensi selulosa

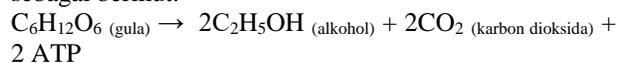
Perbandingan antara air dan selulosa yang tepat akan membuat reaksi hidrolisis berjalan lebih cepat. Bila air berlebihan, maka tumbukan antara air dan selulosa akan berkurang dan ini akan memperlambat jalannya reaksi.

2.7. Fermentasi

Menurut Saono (1974) fermentasi adalah segala macam proses metabolik dengan bantuan enzim dari mikroba (jasad renik) untuk melakukan oksidasi, reduksi, hidrolisa dan reaksi kimia lainnya, sehingga terjadi perubahan kimia pada suatu substrat organik dengan menghasilkan produk tertentu dan menyebabkan terjadinya perubahan kimia pada suatu substrat organik dengan menghdari mikroba (jasad renik) untuk melakukan oksidasi, reduksi, hidrolisa dan reaksi kimia lainnya, sehingga terjadi perubahan kimia pada suatu substrat organik dengan menghasilkan produk tertentu dan menyebabkan terjadinya perubahan sifat bahan tersebut (Winarno dkk, 1980)

Fermentasi dapat terjadi karena adanya aktifitas mikroba penyebab fermentasi pada substrat organik yang sesuai (Winarno,dkk,1980). Menurut Sungguh (1993) fermentasi adalah proses penguraian unsur organik kompleks terutama karbohidrat untuk menghasilkan energi melalui reaksi enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme, yang biasanya terjadi dalam keadaan anaerob dan diiringi dengan pembebasan gas. Bahan baku energi yang paling banyak digunakan oleh mikroorganisme ialah glukosa.

Persamaan reaksi kimia dari fermentasi adalah sebagai berikut:



Reaksi ini merupakan dasar dari pembuatan tape, brem, anggur minuman lain-lain. (Fessenden and fessenden, 1982).

Pada proses ini glukosa difermentasikan dengan enzim zimase invertase yang dihasilkan oleh *sacharomyces cereviseae*. Fungsi enzim zimase adalah untuk memecah polisakarida (pati) yang maish terdapat dalam proses hidrolisis untuk diubah menjadi monosakarida (glukosa). Sedangkan enzim invertase selanjutnya mengubah monosakarida menjadi alkohol dengan proses fermentasi. Pada awal fermentasi masih diperlukan oksigen untuk pertumbuhan dan perkembangan *sacharomyces cereviceae*, tetapi tidak dibutuhkan lagi karena kondisi proses yang diperlukan adalah anaerob.

2.7.1 Yeast *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae adalah khamir yang dapat menghasilkan alkohol. Bentuk selnya oval dan bulat, ukuran selnya pada malt agar dapat dilihat setelah 3 hari pada 25 °C. Dalam proses fermentasi, *Saccharomyces cerevisiae* bereaksi positif terhadap glukosa, galaktosa, sukrosa, maltosa dan raffinosa. Dengan Suhu minuman untuk *S. cerevisiae* adalah 9 °C dan maksimumnya 37 °C. Pada awal fermentasi udara tidak diperlukan jadi prosesnya an aerob. Dengan adanya udara dapat menyebabkan tumbuhnya bakteri yang tidak diinginkan, sehingga mengakibatkan berkurangnya alkohol hasil fermentasi.

Saccharomyces cerevisiae sangat tahan dan toleran terhadap kadar etanol yang tinggi. Akan tetapi adanya kandungan fulradehid, asam organik dan komponen fenolik (hasil samping hidrolisis asam selulosa) dapat menghambat pertumbuhan *S. cerevisiae*, bahkan kandungan yang tinggi dan furfural dan 5-hidroksimetil-furfural dapat bersifat meracuni (Brandberg *et al.* 2004). Hasil penelitian Samsuri *et al.* (2005) pada fermentasi bagase yang diberi perlakuan awal steam dan penjamuran dengan menggunakan *S. cerevisiae* dapat menghasilkan etanol sebanyak 15,4 g/L.

Rendemen alkohol dari hexosa dalam fermentasi menggunakan yeast dari genus *Saccharomyces* (pada kondisi yang optimal) dapat mencapai 90% (Boyles, 1984). Efisiensi pengubahan energi tersebut dapat mencapai 97% (Campbell, 1983). Selain yeast *S. cerevisiae*, bakteri *Zymomonas mobilis* juga merupakan salah satu bakteri yang efektif dalam fermentasi etanol, akan tetapi rendemen etanol yang dihasilkan masih lebih sedikit dibanding yeast karena bakteri tersebut juga menghasilkan sejumlah produk lain seperti asetat, laktat dan gliserol.

III. Metode Penelitian

3.1. Bahan dan Alat

Bahan utama untuk penelitian ini berupa jerami padi dan bahan-bahan kimia untuk keperluan analisa antara lain : 6 % NaOH, enzim aspergillus niger yang digunakan pada proses hidrolisa enzimatis, H₂SO₄, buffer acetate, methanol teknis.

Beberapa alat yang digunakan untuk percobaan dan sebagai pendukung terutama untuk keperluan analisa adalah : reaktor, buret, Erlenmeyer, beaker gelas, oven, gelas ukur dan autoclave.

3.2. Cara kerja

1. Persiapan Bahan Baku

Persiapan dilakukan untuk memperoleh sampel jerami padi yang siap dianalisis dan siap digunakan untuk penelitian.

- a. Sampel diambil dari sawah di daerah Jirak sekayu. Jerami padi yang diambil adalah yang baru dipanen.
- b. Jerami padi dibersihkan dan dicuci, kemudian dicacah hingga berukuran kurang lebih 2 cm, lalu dikeringkan dengan bantuan sinar matahari selama 7 hari, lalu dikeringkan dalam oven dengan suhu 80°C selama ± 1 jam, atau hingga kering. Kemudian digiling dan diayak dengan ayakan berukuran 100 mesh.
- c. Sampel jerami padi dianalisa kandungan lignin dengan menggunakan metode ZnCl₂-CH₃COOH.

2. Proses Perlakuan Awal

Jerami padi dipotong lalu dikeringkan di panas matahari. Haluskan jerami padi hingga ukuran 100 mesh. Kemudian menimbang 300 gram jerami padi, lalu dimasukkan kedalam erlenmeyer 2000 ml dan 1000 ml. Tambahkan 2000 ml NaOH 6 % dan 1000 ml NaOH 6%, tutup rapat lalu dipanasi kembali pada suhu 121 °C selama 15 menit. Kemudian cuci fase solidnya dengan air beberapa kali hingga pH netral kemudian dikeringkan. Menimbang jerami yang telah dilignifikasi menggunakan NaOH sebesar 30 gram. Masukkan ke dalam erlenmeyer 500 ml kemudian tambahkan 100 ml H₂SO₄ 1 % dan tutup rapat erlenmeyer dengan gabus kemudian dipanaskan dalam autoclave pada suhu 121 °C selama 15 menit. Pisahkan fase airnya sehingga tersisa fase seluligninnya. ulangi hal yang sama untuk konsentrasi asam sulfat. 2,3,4 dan 5%. Sampel disaring dan dicuci hingga pH netral kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C. jumlah lignin yang hilang dihitung menggunakan Metode ZnCl₂-CH₃COOH.

3. Isolasi Enzim Selulase

a. Peremajaan jamur *Aspergillus niger*

Mikroba yang digunakan adalah *Aspergillus niger*. Pembenuhan dilakukan pada media PDA (*Potato Dextrose Agar*) secara zig-zag dengan menggunakan kawat inokulasi di dalam cawan petri secara aseptik. Mikroba diinkubasi pada suhu ± 30°C selama 120 jam.

b. Pembuatan Inokulum

Media cair disiapkan sebanyak 100 mL yang terdiri dari sukrosa 12,5%, (NH₄)₂SO₄ 0,25 %, KH₂PO₄ 0,2 %, selanjutnya pH media cair diatur dengan menggunakan HCl 1 M hingga pH 3. Kemudian ujung kawat ose dicelupkan ke dalam etanol 96 % lalu dipanaskan pada api bunsen sampai berwarna merah. Biakan *Aspergillus niger* dari media PDA diambil dengan menggunakan kawat ose lalu dicelupkan beberapa saat pada media cair hingga tampak keruh. Pekerjaan ini dilakukan di ruang aseptik. Media cair kemudian ditutup dengan kapas dan diinkubasi pada suhu ± 30°C selama 24 jam.

c. Produksi Enzim selulase dalam media cair padat

Kapas ditimbang sebanyak 2% dari media yang digunakan, kemudian dimasukkan ke dalam beaker glass 250 mL dan menambahkan nutrisi urea 0,03 g, MgSO₄.7H₂O, 0,005 g, KH₂PO₄ 0,0023 g. Kemudian ditambahkan 80 mL aquadest ke dalam media tersebut. pH diatur hingga pH 5 lalu media disterilkan di dalam autoclave pada suhu 120 °C selama 15 menit. Media yang telah disterilkan kemudian didinginkan. Selanjutnya ditambahkan suspensi spora *Aspergillus niger* sebanyak 10 mL pada media tersebut. Media diinkubasi pada suhu ± 30 °C dengan waktu fermentasi 96 jam.

d. Pemisahan Enzim selulase

Hasil fermentasi diekstrak dengan aquadest sebanyak 100 mL lalu di letakkan pada rotary shaker 150 rpm selama 1 jam. Cairan hasil fermentasi dipisahkan dengan menggunakan kertas saring. Enzim yang diperoleh kemudian disimpan di lemari pendingin pada suhu 4°C dan siap digunakan.

4. Proses Hidrolisa

Hasil pretreatment dimasukkan kedalam erlenmeyer 500 ml lalu ditambahkan 100 ml aquadest dan atur pH 4 – 5. Kemudian panaskan dalam autoclave pada suhu 121 °C selama 15 menit. Bubur jerami dibiarkan menjadi dingin. Tambahkan enzim selulase sebanyak 10 ml kedalam bubur jerami tersebut lalu tutup rapat erlenmeyer dengan gabus. letakkan erlenmeyer pada rotary shaker selama 24 jam. Setelah 24 jam pisahkan fase padat dan cairnya. Analisa glukosa menggunakan metode glukosa kit.

5. Proses Fermentasi

Masukkan cairan hasil hidrolisa sebanyak 50 ml ke dalam Erlenmeyer 100 ml. Tambahkan 4 gr *Saccaromyces Cerevisiae* dan diaduk pada 150 rpm sampai homogen. Selanjutnya larutan difermentasikan selama 1 hari, 2 hari, 3 hari, 4 hari dan 5 hari (sesuai dengan perlakuan). Etanol yang terbentuk dianalisa dengan menggunakan GC.

3.5. Analisa Data

3.5.1. Kadar lignin

Delignifikasi kandungan lignin dalam sampel jerami padi sesudah proses pretreatment dianalisa dengan Metode ZnCl₂-CH₃COOH. Hal ini bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh variabel-variabel proses terhadap laju delignifikasi.

Perhitungan

Massa lignin ditentukan dengan adanya perbedaan antara massa pada filter yang kosong dan filter dengan lignin setelah ekstraksi. Kadar lignin dihitung dengan rumus (Obolenskaya, 1991) :

$$L = \frac{m_2 - m_1}{m} \times 100 \%$$

Keterangan :

L = kadar lignin

m = massa sampel kering (g)

m₁ = massa filter kosong (g)

m₂ = massa filter dengan lignin setelah ekstraksi (g)

3.5.2. Kadar Glukosa

Untuk menganalisa kadar glukosa hasil hidrolisa digunakan Spektrofotometer menggunakan glukosa kit

Rumus penentuan kadar glukosa

$$\text{kadar glukosa} = \frac{\text{sampel}}{\text{standar}} \times \frac{2}{1} \text{ gr}$$

3.5.3. Kadar Bioetanol

Menganalisa bioetanol yang dihasilkan menggunakan *Gas Chromatography* (GC) untuk melihat fraksi-fraksi dan komposisi kimia yang dihasilkan.

Perhitungan

Kromatogram yang didapat setiap sampel kemudian dihitung kadar etanol yang dalam sampel dengan menggunakan rumus (GC-2010 *Plus Series Instruction Manual*, 2010) :

$$\text{Konsentrasi etanol} = \frac{\text{luas area sampel}}{\text{luas area etanol standar}} \times 100 \%$$

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Kadar Lignin Sebelum dan Setelah *Pretreatment*

Pada penelitian ini, proses konversi biomassa menjadi bioetanol diawali dengan proses delignifikasi menggunakan kombinasi proses alkali dan asam konsentrasi rendah. Adapun hasil *pretreatment* dapat dilihat pada tabel 3

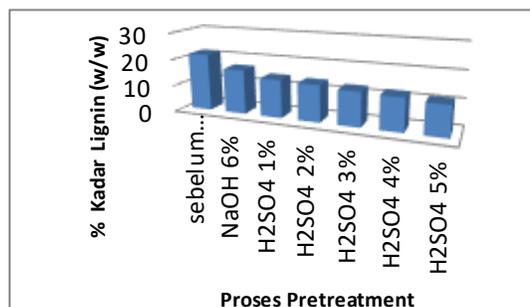
Tabel 3 Kadar Lignin Sebelum dan Setelah Fermentasi

| Proses | % Kadar lignin (w/w) |
|-----------------------------------|----------------------|
| Sebelum <i>Pretreatment</i> | 21,428 |
| NaOH 6% | 16,667 |
| H ₂ SO ₄ 1% | 14,286 |
| H ₂ SO ₄ 2% | 13,809 |
| H ₂ SO ₄ 3% | 12,857 |
| H ₂ SO ₄ 4% | 12,381 |
| H ₂ SO ₄ 5% | 11,429 |

Sebagai bahan utama penelitian ini, jerami padi mengalami beberapa perlakuan terlebih dahulu sebelum proses *pretreatment*, yaitu penjemuran di bawah sinar matahari yang dimaksudkan untuk mengurangi kandungan air dalam jerami padi, dan pengecilan ukuran dengan cara menghancurkan jerami padi menggunakan alat penggiling hingga lolos ayakan 80 mesh. Setelah itu dilakukan penentuan terhadap kadar lignin.

Delignifikasi jerami padi dimaksudkan untuk mengurangi atau menghilangkan kandungan lignin yang terdapat dalam jerami, karena lignin merupakan komponen yang tidak diinginkan dalam proses dan

secara umum dapat dihilangkan dengan proses kimia. Pada penelitian ini, jerami padi mengalami dua tahap *pretreatment* yaitu tahap pertama dengan menggunakan larutan alkali berupa NaOH dengan konsentrasi 6% dan tahap kedua *pretreatment* dengan menggunakan asam sulfat konsentrasi rendah dengan variasi konsentrasi 1%, 2%, 3%, 4% dan 5%.



Gambar 6 Grafik kadar lignin sebelum dan setelah *pretreatment*

Dari grafik diatas dapat dilihat bahwa kadar lignin cenderung mengalami penurunan dengan dilakukannya proses *pretreatment*.

Penelitian yang dilakukan oleh Marsday *and* Gray (2006) menyebutkan bahwa penggunaan larutan NaOH pada *pretreatment* jerami padi mampu memutuskan ikatan hidrogen terutama ikatan inter molekuler selulosa sehingga selulosa berada dalam keadaan tidak terikat. Keadaan ini menyebabkan selulosa menjadi longgar baik terhadap ikatan dengan komponen non-selulosa maupun pada selulosanya sendiri sehingga enzim selulase dapat lebih mudah kontak dengan selulosa yang akhirnya proses hidrolisis selulosa menjadi gula-gula sederhana dapat berjalan lebih sempurna. Semakin tinggi konsentarsi larutan NaOH, kemampuan untuk melarutkan lignin dan merusak struktur selulosa akan semakin bertambah, yang mengakibatkan serat-serat selulosa akan semakin longgar sehingga semakin mudah dihidrolisis oleh mikroorganism (Gunam, 1997; Gunam et al., 2004; Lee et al., 2009).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan Jahar, *et al.* (2006) dengan menggunakan H₂SO₄ 50% pada proses *pretreatment* hanya mampu menurunkan kadar lignin sebesar 48,8%. Sementara itu Zhang *and* Cai (2008) melakukan *pretreatment* pada jerami padi menggunakan larutan NaOH 2% mampu menurunkan kadar lignin sebesar 36%, pada penelitian ini penggunaan larutan NaOH 6% dapat menurunkan kadar lignin sebesar 23,10% dan dengan memvariasikan proses *pretreatment* menggunakan asam dengan konsentrasi rendah, pada konsentrasi asam 5% mampu menurunkan kadar lignin sebesar 46.35 %. Sehingga dengan dilakukannya dua tahap *pretreatment* terjadi penurunan jumlah lignin yang lebih besar jika dibandingkan dengan perlakuan satu kali *pretreatment* saja.

Penurunan kadar lignin setelah proses *acid pretreatment* disebabkan adanya reaksi pemutusan ikatan ester antara selulosa, hemiselulosa dan lignin sehingga mampu menghasilkan gula yang tinggi pada proses selanjutnya. Dengan adanya dua tahapan proses pretreatment dimaksudkan untuk meminimalisasikan kadar lignin yang ada pada serbuk jerami padi sehingga pada proses fermentasi mampu menghasilkan etanol tinggi. Namun dari hasil penelitian didapatkan bahwa meskipun proses *pretreatment* dilakukan secara bertahap masih belum mampu menghilangkan kadar lignin pada lignoselulosa sepenuhnya.

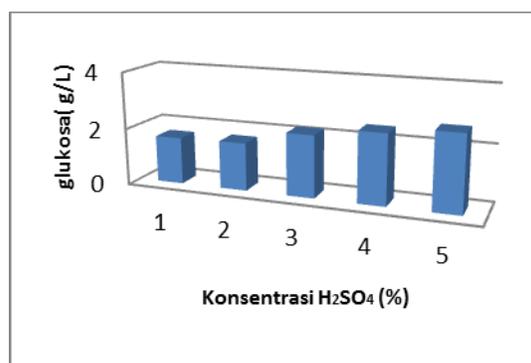
4.2. Kadar Glukosa Hasil Hidrolisis

Glukosa hasil hidrolisis dengan ekstrak enzim selulase sebanyak 10 ml dari kapang *Aspergillus niger* dengan waktu inkubasi selama 24 jam diperlihatkan pada tabel 4.

Tabel 4. Glukosa hasil Hidrolisis

| Konsentrasi H ₂ SO ₄ | Glukosa (g/L) |
|--|---------------|
| 1 % | 1,648 |
| 2 % | 1,684 |
| 3 % | 2,186 |
| 4 % | 2,473 |
| 5 % | 2,688 |

Sakarifikasi enzimatis memiliki beberapa keuntungan dibandingkan sakarifikasi asam, antara lain: tidak terjadi degradasi gula hasil hidrolisis, kondisi proses yang lebih lunak (suhu rendah), berpotensi memberikan hasil yang tinggi, dan biaya pemeliharaan peralatan relatif rendah karena tidak ada bahan yang korosif (Hamelinck, *et al.*, 2005; Taherzadeh and Karimi, 2007).



Gambar 7. Grafik glukosa hasil hidrolisis

Pada gambar 7 terlihat bahwa kadar glukosa yang dihasilkan menunjukkan peningkatan. Sampel dengan *acid pretreatment* 1 % menghasilkan jumlah glukosa yang paling sedikit yaitu 1,648 g/l, kadar glukosa paling tinggi diperoleh dari sampel dengan acid pretreatment 5% yaitu 2,688 g/l. Peningkatan kadar glukosa pada sampel bertambah seiring dengan semakin besarnya

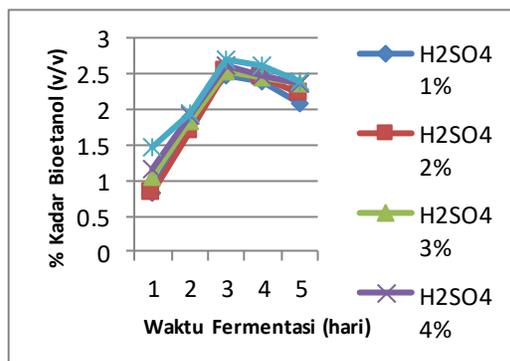
konsentrasi acid pretreatment yang digunakan. Hal ini disebabkan semakin besarnya konsentrasi asam yang digunakan, semakin kecil pula lignin yang dihasilkan sehingga kemampuan enzim untuk menghidrolisa selulosa menjadi glukosa semakin besar.

4.3. Etanol Hasil Fermentasi

Hasil analisis etanol menggunakan kromatografi gas dari perlakuan delignifikasi jerami padi menggunakan NaOH 6% dikombinasikan dengan H₂SO₄ konsentrasi 1%, 2%, 3%, 4% dan 5%. Dilanjutkan dengan hidrolisis menggunakan *Aspergillus niger* dan fermentasi dengan *Saccharomyces cereviceae* diperlihatkan pada tabel 5.

Tabel 5. Etanol hasil Fermentasi

| Konsentrasi H ₂ SO ₄ (%) | Waktu Fermentasi (hari) | % Bioetanol (v/v) | Volume bioetanol (ml) |
|--|-------------------------|-------------------|-----------------------|
| 1 | 1 | 0,831 | 0,291 |
| | 2 | 1,879 | 0,658 |
| | 3 | 2,479 | 0,868 |
| | 4 | 2,386 | 0,835 |
| | 5 | 2,097 | 0,734 |
| 2 | 1 | 0,835 | 0,292 |
| | 2 | 1,686 | 0,591 |
| | 3 | 2,527 | 0,884 |
| | 4 | 2,449 | 0,857 |
| | 5 | 2,214 | 0,775 |
| 3 | 1 | 1,055 | 0,369 |
| | 2 | 1,839 | 0,644 |
| | 3 | 2,546 | 0,891 |
| | 4 | 2,452 | 0,858 |
| | 5 | 2,359 | 0,826 |
| 4 | 1 | 1,149 | 0,402 |
| | 2 | 1,919 | 0,672 |
| | 3 | 2,626 | 0,919 |
| | 4 | 2,469 | 0,864 |
| | 5 | 2,374 | 0,831 |
| 5 | 1 | 1,455 | 0,509 |
| | 2 | 1,937 | 0,678 |
| | 3 | 2,699 | 0,945 |
| | 4 | 2,617 | 0,915 |
| | 5 | 2,382 | 0,834 |



Gambar 8. Grafik etanol

Pada gambar 8 menunjukkan kadar etanol pada sampel dengan perlakuan *pretreatment* NaOH 6% dan H₂SO₄ 1% menghasilkan kadar etanol yang paling rendah yaitu sebesar 0.381%. Hal ini disebabkan pada sampel ini masih mengandung lignin dengan konsentrasi tertinggi dibanding sampel yang lainnya.

Kadar etanol tertinggi dihasilkan oleh sampel dengan perlakuan *pretreatment* H₂SO₄ 5% dengan waktu fermentasi selama 3 hari, yaitu sebesar 2,699 %. Hasil *pretreatment* menunjukkan sampel dengan proses H₂SO₄ sebesar 5% mengandung jumlah lignin paling sedikit dibandingkan sampel lainnya. Ini menunjukkan bahwa proses delignifikasi mempunyai pengaruh penting terhadap proses terbentuknya etanol. Kandungan lignin yang ada pada sampel sangat mempengaruhi proses terbentuknya etanol, karena lignin akan mengganggu kinerja dari enzim (Mansfield, 1999). Selain itu lignin juga menyebabkan ikatan balik pada selulosa yang mengakibatkan meningkatnya jumlah kebutuhan enzim yang digunakan untuk hidrolisis (Lu *et al.*, 2002).

Dari gambar 4.2, waktu fermentasi selama 1, 2, 3, 4 dan 5 hari berpengaruh terhadap kadar bioetanol yang dihasilkan, bahwa semakin lama waktu fermentasi kadar bioetanol akan mengalami kenaikan, namun pada hari keempat kadar bioetanol pada masing-masing sampel mengalami penurunan. Hal ini disebabkan karena proses fermentasi telah mencapai optimum pada waktu 3 hari dengan konsentrasi etanol sebesar 2,699 %. Kadar bioetanol mengalami penurunan setelah melewati waktu optimalnya. Hal ini disebabkan pada waktu fermentasi 3 hari, *Saccharomyces Cerevisiae* memiliki aktivitas paling besar yang biasanya berada pada fase eksponensial. Fase eksponensial merupakan fase untuk pembentukan produk etanol yang terbesar (Hapsari) dan Pramashinta, 2013).

V. Kesimpulan dan Saran

5.1. Kesimpulan

1. Semakin besar konsentrasi asam yang digunakan pada proses *pretreatment*, maka semakin banyak

kadar lignin yang hilang. Nilai kadar lignin terkecil didapatkan pada sampel dengan proses *pretreatment* H₂SO₄ 5% sebesar 11,429%.

2. Semakin lama waktu fermentasi, kadar bioetanol yang dihasilkan semakin besar. Setelah waktu fermentasi optimum tercapai, bioetanol yang dihasilkan akan menurun. Pada penelitian ini waktu optimum fermentasi adalah 3 hari dengan kadar bioetanol 2,699%.

5.2. Saran

Pada penelitian ini proses delignifikasi menggunakan asam dilakukan pada kondisi operasi yang sama. Disarankan pada penelitian selanjutnya untuk memvariasikan kondisi operasi asam yang digunakan, sehingga proses delignifikasi dapat mendekati nol dan kerja enzim pada proses hidrolisa dalam mengkonversi glukosa menjadi etanol akan lebih maksimal.

DAFTAR PUSTAKA

- Boyles D., 1984. Bio Energy- Technology, Thermodynamics and Costs. Ellis Horwood Limited. West Sussex.
- Brandberg T., C.J. Franzen and L. Gustafsson, 2004. The Fermentation Performance on Nine Strains of *Saccharomyces cerevisiae* in Batch and Fed-Batch Cultures in Dilute-Acid Wood Hydrolysate. *J.Bioscience and Bioengineering*. Vol 98 (2) : 122-125
- Campbell, I. M. 1983. Biomass, Catalysts and Liquid Fuel. Pennsylvania: Technomic Publishing Co. Inc.
- Deacon, T, W. 1997. Karakteristik Lignoselulosa sebagai Bahan Baku Bioetanol Bagian 2.
- Fessenden, R.J., dan Fessenden, J.S., 1992, *Kimia Organik*, Jilid 2, Edisi ke-3, 353, Erlangga, Jakarta
- Mosier, N ., Wyman, C.E., B, Dale., R, Elander., YY, Lee., M, Holtzapple., M, Ladisch (2005), "Features of Promising Technologies for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass", *Bioresource Technology* 96, pp 673 – 686.
- Ooshima, H, K. Aso, Y. Harano, T. Yamamoto. 1965. Microwave Treatment of a Cellulosic Material for Their Enzymatic Hydrolysis *Biotechnol. Let* 6(5): 289 – 294
- Pelezar M.J. dan E.C.S. Chan, 1986. Dasar-dasar Mikrobiologi. Terjemahan R.S.

- Radley, J. A. 1954. Starch and it's Derivatives. New York.
- Samsuri M., *at al* 2005. Pretreatment for Etanol Production from Bagase by Simultaneous Saccharification and fermentation. *Prosiding 6th International Wood Science Symposium*. Denpasar 29-31 Agustus 2005.
- Samsuri, M. Gozan, M. Mardiaz, R dan baiquni, M. 2007. Pemanfaatan dari Selulosa vBagas untuk Produksi Etanol Melalui Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak dengan Enzim Xylanase. *Jurnal Makara Teknologi*. Vol 11. Hal 17 - 24
- Saono, S. 1974. Pemanfaatan Jasad Renik dalam Pengolahan Hasil Sampingan/ Sisa Produksi Pertanian. *Berita LIPI*. 18(4): 1 – 11
- Sun, Y. and Cheng, J. 2002. *Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review*. *Bioresour. Technol.* 83: 1–11.
- Sun, Y, and Cheng, J. 2005. *Bioresource technology*. Vol. 96, pp
- Winarno. 1980. *Kimia Pangan*. Jakarta: Gramedia
- Yoswathana, N., Phuriphapat, P., Treyawutthiwat, P. dan Eshtiaghi, N.M. (2010), “*Production Bioethanol from Rice Straw*”, *Energy Research Journal* 1 (1) pp.26 – 31.
- Yulianto, M, E. Diyono, I. Indah, H. Rustan, S, N. Fiqih, P, J. 2009. Pengembangan Hydrolisis Enzymatis Biomassa Jerami Padi untuk Produksi Bioetanol. *Simposium Nasional RAPI VIII*. ISSN: 1442 – 9612: K-66-K-73.
- Zhang, B. Shahbazi, A. Wang, L. 2010. Alakali Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Cattalist from Constructed Wetlands. *Am J Eng Sci* 3: 328 – 330