

**PEMBUATAN BIOETANOL DARI BATANG RUMPUT
GAJAH (*Pennisetum purpureum* Schumach)
DENGAN SISTEM FERMENTASI SIMULTAN
MENGUNAKAN BAKTERI
*Clostridium acetobutylicum***

MAKING OF BIOETANOL FROM WIDE-LEAVED GRASS
(*Pennisetum purpureum* Schumach)
BY SIMULTANEOUS FERMENTATION SYSTEM
USING *Clostridium acetobutylicum* BACTERIA

SAKIUS RUSO



**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2011**

**PEMBUATAN BIOETANOL DARI BATANG RUMPUT GAJAH
(*Pennisetum purpureum* Schumach)
DENGAN SISTEM FERMENTASI SECARA SIMULTAN
MENGUNAKAN BAKTERI *Clostridium acetobutylicum***

**Tesis
Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh Gelar Magister**

**Program Studi
K i m i a**

Disusun dan diajukan oleh

SAKIUS RUSO

Kepada

**PROGRAM PASCASRAJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2011**

88
2011
19/1/2011

TESIS

**PEMBUATAN BIOETANOL DARI BATANG RUMPUT GAJAH
(*Pennisetum purpureum* Schumach)
DENGAN SISTEM FERMENTASI SIMULTAN
MENGUNAKAN BAKTERI *Clostridium acetobutylicum***

Disusun dan diajukan oleh

SAKIUS RUSO

Nomor Pokok P1100208017

Telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Tesis
Pada tanggal 27 Januari 2011
Dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui .

Komisi Penasihat,


Prof. Ahyar Ahmad, Ph.D
Ketua


Dr. Hj. Nursiah La Nafie, M.Sc
Anggota

Ketua Program Studi
Kimia,


Dr. Paulina Taba, M.Phil

Direktur Program Pascasarjana
Universitas Hasanuddin,


Prof. Dr. Ir. Mursalim

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan di bawah ini :

N a m a : Sakius Ruso
Nomor Pokok : P1100208017
Program Studi : Kimia

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa tesis yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, Januari 2011

Yang menyatakan,

Sakius Ruso

KATA PENGANTAR

Dengan segenap jiwaku aku menyerukan terima kasih kepadaMu ya Tuhan, karena atas segala rencana, berkat kasih dan pertolonganMulah sehingga hambaMu dapat melalui dan menyelesaikan perkuliahan serta tugas akhir tesis ini. Besar kasih dan kuasaMu Tuhan dan segala puji syukur kupanjatkan kehadiranMu.

Tesis ini merupakan laporan penelitian dengan judul “Pembuatan Bioetanol Dari Rumput Gajah (*Pennisetum purpureum* Schumach) Dengan Sistem Fermentasi Simultan Menggunakan Bakteri *Clostridium acetobutylicum*”. Penelitian ini dilakukan untuk memenuhi salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister pada Program Studi Kimia, Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin.

Dengan selesainya tesis ini, penulis dengan penuh kerendahan hati menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada pimpinan Politeknik Negeri Ujung Pandang yang telah memberikan rekomendasi untuk memperoleh beasiswa sehingga penulis berkesempatan untuk melanjutkan pendidikan ke tingkat strata dua. Tak lupa pula penulis menyampaikan terima kasih kepada Bapak Prof. Ahyar Ahmad, Ph.D sebagai Ketua Komisis Penasihat dan Ibu Dr. Hj. Nursiah La Nafie, M.Sc sebagai Anggota Komisis Penasihat yang telah banyak meluangkan waktunya dalam membimbing penulis mulai dari penulisan proposal hingga selesainya penulisan tesis ini. Penulis juga menyampaikan terima kasih kepada semua

pihak yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan studi, sebagai berikut :

1. Bapak Prof. Dr. dr. Idrus Paturusi sebagai Rektor Universitas Hasanuddin.
2. Bapak Prof. Dr. Ir. Mursalim sebagai Direktur Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin.,
3. Bapak Prof. Dr. H. Abd. Wahid Wahab, M.Sc sebagai Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin.
4. Ibu Dr. Paulina Taba, M.Phill sebagai Ketua Program Studi S2 Kimia Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin yang juga sebagai anggota tim penguji seminar usul penelitian, seminar hasil dan ujian tesis.
5. Bapak Prof. Dr. H. Abd. Rauf Patong dan Bapak Prof. Dr. Ir. Tjodi Harlim sebagai anggota tim penguji seminar usul, seminar hasil serta ujian tesis.
6. Bapak Dr. Firman, M.Si Sebagai Direktur Politeknik Negeri Ujung Pandang yang telah memberikan Surat Izin Belajar kepada penulis untuk melanjutkan studi ke Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin.
7. Ibu Ir. Swastanti Brotowati, M.Si Sebagai Ketua Jurusan Teknik Kimia Politeknik Negeri Ujung Pandang yang juga telah memberikan rekomendasi kepada penulis untuk memperoleh izin belajar dari Direktur Politeknik Negeri Ujung Pandang.
8. Seluruh rekan-rekan angkatan 2008 Program Studi Kimia (Adi, Agnes, Amma, Andis, Ansar, Arna, Chia, Echi, Hairun, Hilda, Mul, Mute, Rahmin, Tati, Titin, serta DJ) yang telah berbagi suka dan duka selama mengikuti kuliah dan penelitian.

9. Seluruh rekan-rekan Alumni SMAK Makassar yang bertugas di berbagai laboratorium di Jurusan Kimia Fakultas MIPA UNHAS yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan studi.
10. Seluruh rekan-rekan sejawat di Jurusan Teknik Kimia yang bertugas di berbagai di laboratorium yang telah membantu penulis selama melaksanakan penelitian di Jurusan Teknik Kimia Politeknik Negeri Ujung Pandang. Terima kasih buat dukungan dan semangat dari kalian semua.
11. Seluruh keluarga utamanya istri serta anak tercinta Ariel dan Asty, kalian merupakan motivator terbesar dalam hidup ayah. Terima kasih buat mama tercinta, tante Rifka serta kakak dan adik penulis atas dukungan doanya.

Penulis menyadari bahwa tesis ini masih jauh dari sempurna, karena itu penulis sangat mengharapkan kritik dan saran dari pembaca yang bermanfaat untuk perbaikan dimasa-masa mendatang. Semoga tesis ini dapat bermanfaat bagi penelitian dan ilmu pengetahuan. Tuhan memberkati kita semua. Amin.

Makassar, Januari 2011

Penulis

Sakius Ruso

ABSTRAK

SAKIUS RUSO. *Pembuatan Bioetanol Dari Batang Rumput Gajah (*Pennisetum purpureum* Schumach) Dengan Sistem Fermentasi Simultan Menggunakan Bakteri *Clostridium acetobutylicum* (dibimbing oleh **Ahyar Ahmad** dan **Nursiah La Nafie**)*

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui nilai konversi selulosa dari batang rumput gajah sebagai bahan untuk produksi bioetanol melalui proses Sakarifikasi dan Fermentasi secara Simultan dengan menggunakan bakteri *Clostridium acetobutylicum*. Optimasi fermentasi dilakukan dengan cara memvariasikan pH awal media dan waktu fermentasi.

Pada penelitian ini digunakan selulosa dari batang rumput gajah yang difermentasi dengan menggunakan metode Sakarifikasi dan Fermentasi Secara Simultan. Selama fermentasi, proses hidrolisis selulosa menjadi glukosa dan selanjutnya menjadi bioetanol berlangsung secara serempak dengan menggunakan bakteri *Clostridium acetobutylicum*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kondisi optimum fermentasi diperoleh pada pH 6,5 dengan waktu fermentasi 10 hari. Konversi selulosa batang rumput gajah adalah satu kilogram selulosa menghasilkan 33,30 gram bioetanol dengan kadar 96,24%.

ABSTRACT

SAKIUS RUSO. Making of Bioethanol from stem of Wide- Leaved Grass (*Pennisetum purpureum* Schumach) of the Simultaneous Fermentation System Using *Clostridium acetobutylicum* Bacteria (Supervised by **Ahyar Ahmad** and **Nursiah La Nafie**).

The objective of the research was to investigate a conversion value of cellulose of wide-leaved grass (*Pennisetum purpureum* Schumach) as the material for bioethanol production through the processes of the simultaneous Sakerification and fermentation by using *Clostridium acetobutylicum* bacteria.

In the research used cellulose from stem of Wide- Leaved Grass which fermented Sacharification method and simultaneously fermentation. As long as fermentation, hydrolisis cellulose process become glucose and them become bioetanol simultaneously use with *Clostridium acetobutylicum* bacteria.

The result of the research reveals that the optimal condition of the fermentation is obtained on the pH of 6.5 in 10 days of fermentation time. The conversion value of cellulose from stewide-leaved grass (*Pennisetum purpureum* Schumach), in every kilogram of its powder, can produce 33.30 grams of bioethanol with the level of 96.24%.

DAFTAR ISI

	halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGAJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN KEASLIAN	iv
KATA PENGANTAR	v
ABSTRAK	viii
<i>ABSTRACT</i>	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN	xix
I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang Masalah	1
B. Rumusan Masalah	6
C. Tujuan Penelitian	7
D. Manfaat Penelitian	7
II TINJAUAN PUSTAKA	8
A. Tinjauan tentang Rumput Gajah	8
B. Tinjauan Tentang Enzim	10
C. Enzim Selulase	13

D. Selulosa	15
E. Bakteri Selulolitik	17
1. Taksonomi	17
2. Degradasi dan signifikansi	19
F. Bioetanol	20
G. Perlakuan Pendahuluan	23
H. Proses Fermentasi	27
1. Tahap Persiapan Media	36
2. Tahap Sterilisasi	37
3. Tahap penyiapan Inokulum	39
4. Tahap Pelaksanaan Fermentasi	40
5. Penentuan <i>Growth Yield</i>	41
I. Distilasi	42
J. Produksi Bioetanol	42
K. Kerangka Pikir	45
L. Hipotesis	48
III METODE PENELITIAN	49
A. Waktu Dan Tempat Penelitian	49
B. Peralatan	49
C. Bahan	49
D. Prosedur Kerja	49
1. Persiapan Bahan Baku	50
2. Analisis Selulosa Dan Lignin	50

3. Perlakuan Pendahuluan	51
4. Penyiapan Media Untuk Penentuan Kondisi Optimum Fermentasi	52
5. Penyiapan Media Fermentasi Untuk Produksi Bioetanol	55
6. Penentuan Indeks Bias	57
7. Proses Destilasi Dan Dehidrasi Bioetanol	59
8. Penentuan Berat Jenis Bioetanol	59
9. Analisis Kadar Bioetanol Dengan Kromatografi Gas	59
IV HASIL DAN PEMBAHASAN	62
A. Penentuan Berat Kering Rumput Gajah	62
B. Penentuan Kadar Air, Selulosa Dan Lignin Rumput Gajah	63
C. Penentuan Kondisi Optimum Fermentasi	65
1. Produksi Bioetanol Dengan Metode SSF	65
2. Penentuan Waktu Optimum Fermentasi	66
3. Penentuan pH Optimum Fermentasi	73
D. Produksi Bioetanol	75
1. Konsentrasi Substrat	75
2. Fermentasi	76
3. Penentuan Kadar Bioetanol Dengan Alat Kromatografi Gas	76
V KESIMPULAN DAN SARAN	82
A. Kesimpulan	82
B. Saran	82
DAFTAR PUSTAKA	83
DAFTAR LAMPIRAN	90

DAFTAR TABEL

nomor		halaman
1.	Beberapa penelitian yang menggunakan <i>Clostridium acetobutylicum</i> untuk memproduksi pelarut dengan metode kontinyu	5
2.	Komposisi gizi rumput gajah	10
3.	Komposisi bahan untuk media agar miring	52
4.	Komposisi bahan untuk media inokulum	53
5.	Komposisi bahan untuk media fermentasi	54
6.	Komposisi bahan untuk media inokulum fermentasi	55
7.	Komposisi bahan media produksi	57
8.	Komposisi campuran larutan standar etanol untuk penentuan indeks bias	58
9.	Komposisi campuran standar etanol, standar internal dan mpelarut untuk larutan injeksi alat kromatografi gas	60
10.	Penentuan rendamen selulosa rumput gajah setelah perlakuan awal	62
11.	Komposisi kandungan tepung rumput gajah sebelum dan setelah perlakuan awal	63
12.	Pengaruh perlakuan waktu dan pH fermentasi terhadap kadar bioetanol.	68
13.	Pengaruh pH fermentasi terhadap kadar bioetanol kondisi 10 hari fermentasi.	73
14.	Data hasil analisis standar etanol dan sampel dengan menggunakan alat GC 2010 Shimadzu	80

DAFTAR GAMBAR

nomor	halaman
1. Tanaman rumput gajah	9
2. Struktur selulosa	16
3. Bakteri <i>Clostridiumacetobutylicum</i>	18
4. Stuktur Lignin	24
5. Proses delignifikasi pada lignoselulosa	25
6. Proses hidrolisis selulosa oleh enzima selulase	29
7. Tahap glikolisis (<i>Embden Meyerhof-Parnas Patway</i>).	30
8. Proses pembentukan etanol dari piruvat	33
9. Kurva pertumbuhan mikroba	34
10. Proses fermentasi bioetanol	41
11. Skema kerangka pikir penelitian	47
12. Skema proses penelitian	61
13. Grafik penentuan kondisi optimum fermentasi dengan perlakuan pH terhadap waktu fermentasi	69
14. Grafik pengaruh pH fermentasi terhadap produksi bioetanol pada kondisi 10 hari fermentasi	74
15. Data analisis sampel bioetanol (<i>unknown</i>) dengan GC 2010 Shimadzu setelah dehidrasi	77
16. Data analisis sampel bioetanol (<i>unknown</i>) dengan GC 2010 Shimadzu setelah pemurnian	78
17. Data analisis sampel bioetanol (<i>unknown</i>) dengan GC 2010 Shimadzu dengan penambahan standar internal pentan	79
18. Grafik gubungan konsentrasi standar etanol dengan nilai A_i/A_{IS}	81

DAFTAR LAMPIRAN

nomor	halaman
1. Data Penentuan Kadar Air Rumput Gajah Sebelum Perlakuan Awal	90
2. Data penentuan kadar air rumput gajah setelah perlakuan awal	90
3. Data penentuan kadar selulosa dan lignin rumput gajah sebelum perlakuan awal	91
4. Data penentuan kadar selulosa dan lignin rumput gajah setelah perlakuan awal	91
5. Data penentuan kondisi optimum fermentasi berdasarkan nilai indeks bias bioetanol hasil fermentasi dengan variasi pH dan waktu fermentasi	92
6. Data penentuan indeks bias etanol standar	93
7. Kurva kalibrasi larutan standar hubungan kadar etanol vs indeks bias dan contoh perhitungan	94
8. Data penentuan berat jenis sampel bioetanol setelah didehidrasi	95
9. Skema analisis kadar selulosa dan lignin (Metode Chesson)	96
10. Skema proses kerja perlakuan pendahuluan	97
11. Skema proses kerja peremajaan bakteri <i>Clostridium acetobutylicum</i>	98
12. Skema proses kerja pembuatan inokulum <i>Clostridium acetobutylicum</i>	99
13. Skema penentuan kondisi optimum fermentasi dengan variasi pH dan waktu fermentasi pada temperature kamar	100
14. Skema produksi bioetanol berdasarkan kondisi optimum fermentasi	101

15. Kondisi operasi alat koromatografi gas untuk analisis sampel bioetanol	102
16. Data hasil analisis standar etanol 20 % dalam aseton dan standar internal dengan alat GC 2010 Shimadzu	103
17. Data hasil analisis standar etanol 40 % dalam aseton dan standar internal dengan alat GC 2010 Shimadzu	104
18. Data hasil analisis standar etanol 60 % dalam aseton dan standar internal dengan alat GC 2010 Shimadzu	105
19. Data hasil analisis standar etanol 100 % dan standar internal dengan alat GC 2010 Shimadzu	106
20. Data hasil analisis standar sampel bioetanol (unknown) + standar internal pentan dengan alat GC 2010 Shimadzu setelah didehidrasi	107
21. Data hasil analisis standar sampel bioetanol (unknown) + standar internal pentan dengan alat GC 2010 Shimadzu setelah pemurnian (destilasi ulang)	108
22. Data hasil analisis sampel bioetanol alat GC 2010 Shimadzu	109
23. Data hasil analisis etanol absolut dengan alat GC 2010 Shimadzu	110
24. Data hasil analisis pentan dengan alat GC 2010 Shimadzu	111
25. Data hasil analisis aseton dengan alat GC 2010 Shimadzu	112
26. Komposisi campuran dan luas puncak etanol standar, pelarut aseton, standar internal pentan dan sampel bioetanol (<i>unknown</i>)	113
27. Data penggunaan bahan baku serta jumlah rendamen hasil fermentasi rumput gajah menjadi bioetanol dengan menggunakan bakteri <i>Clostridium acetobutylicum</i>	114
28. Pembuatan larutan buffer fospat	115
29. Dokumentasi penelitian	116

DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN

Lambang/singkatan	Arti dan keterangan
ABE	Acetone Buthanol Ethanol
A_i	Luas puncak larutan standar/sampel bioetanol
A_{IS}	Luas pancak standar internal
ATCC	American Type Culture Collection
CMC	Karboxylmethylcellulose
cm	Satuan panjang sentimeter
$^{\circ}\text{C}$	Derajad celcius
DO	Demand Oksigen
DSM	Diagnostic and Statistical Manual
dpl	Diatas permukaan laut
EC	Enzyme Commission
E-10	Gasoline plus etanol 10
et al	et alii, dan kawan-kawan
GC	Gas Chromatography
g	Satuan bobot gram
g/ml	Gram permililiter, satuan berat jenis
g/L	Gram perliter
g/Lh	Gram perliter perjam
mL	mililiter
mM	Milimol

Lambang/singkatan	Arti dan keterangan
mm	milimeter
pH	Derajad keasaman
Rpm	Kecepatan putaran setiap menit
SSF	<i>Simultaneous Sacharification and Fermentation</i>
μL	Mikroliter

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Bioetanol adalah cairan biokimia yang diperoleh dari proses fermentasi gula dari sumber karbohidrat dengan menggunakan bantuan mikroorganisme dilanjutkan dengan proses distilasi. Dalam perkembangannya produksi bioetanol yang paling banyak digunakan adalah metode fermentasi dan distilasi. Etanol yang diproduksi dengan cara fermentasi dengan bantuan mikroorganisme disebut sebagai bioetanol. Dalam perkembangannya produksi bioetanol, bahan baku yang paling banyak digunakan adalah tanaman yang banyak mengandung pati atau sukrosa namun tanaman ini lebih banyak dikonsumsi oleh manusia sehingga dikawatirkan akan terjadi krisis pangan.

Bioetanol dapat digunakan dalam minuman seperti bir, anggur, dalam farmasi, sebagai pelarut, larutan 70 % dipakai sebagai antiseptik karena mengkoagulasikan albumina dan menghentikan pertumbuhan dari organisme-organisme. Bioetanol dapat digunakan sebagai pengganti bahan bakar minyak (BBM) bergantung pada tingkat kemurniannya. Bioetanol dengan kadar 99,9 % dapat digunakan sebagai bahan campuran premium sedangkan bioetanol dengan kadar 40% dipakai sebagai bahan substitusi minyak tanah. Pencampuran bioetanol absolut sebanyak 10% dengan

premium 90% disebut Gasohol E—10. Gasohol merupakan singkatan dari *gasoline* (premium) *plus* etanol. Kebutuhan bensin nasional saat ini mencapai 17,5 miliar liter/tahun, kurang lebih 30% dari total kebutuhan, masih impor (Nurianti, 2007). Hal ini mengakibatkan permintaan bioetanol sangat tinggi.

Pengembangan bioenergi seperti bioetanol dari biomassa sebagai sumber bahan baku yang dapat diperbarui merupakan salah satu alternatif yang memiliki nilai yang positif dari aspek sosial dan lingkungan. Bioetanol yang mempunyai rumus kimia C_2H_5OH adalah zat organik dalam kelompok alkohol dan banyak digunakan untuk berbagai keperluan. Pada umumnya etanol diproduksi dengan cara fermentasi dengan bantuan mikroorganisme oleh karena itu sering disebut sebagai bioetanol. Penghasil bioetanol adalah bahan bergula (molases, aren, dan nira), bahan berpati (ubi kayu, jagung, sagu, ubi-ubian lain) dan bahan berserat.

Salah satu alternatif bahan baku pembuatan bioetanol adalah biomassa berselulosa. Biomassa berselulosa merupakan sumber daya alam yang berlimpah dan murah yang memiliki potensi mendukung produksi komersial industri bahan bakar seperti bioetanol dan butanol (Wymann, 2002). Biomassa berselulosa diantaranya diperoleh dari limbah pertanian, limbah perkebunan, limbah kehutanan, limbah padat kertas dan beberapa limbah industri. Limbah pada dasarnya adalah suatu bahan yang tidak dipergunakan kembali dari hasil aktivitas manusia, ataupun proses-proses alam yang belum mempunyai nilai ekonomi, bahkan mempunyai nilai ekonomi

yang sangat kecil. Dikatakan mempunyai nilai ekonomi yang sangat kecil karena limbah dapat mencemari lingkungan dan penanganannya memerlukan biaya yang cukup besar. Pemanfaatan limbah merupakan salah satu alternatif untuk menaikkan nilai ekonomi limbah tersebut. Pemanfaatan limbah pertanian diantaranya adalah batang rumput gajah, yang selama ini hanya dijadikan sebagai pakan ternak yang tidak diolah kembali menjadi sesuatu yang memiliki nilai ekonomi tinggi.

Indonesia mempunyai iklim yang mempermudah tumbuhnya rumput gajah, sehingga ketersediaan rumput gajah dapat secara kontinu melimpah. Rumput gajah merupakan salah satu tanaman yang kurang dimanfaatkan. Dewasa ini rumput gajah hanya digunakan sebagai makanan ternak sapi, bahkan kadang hanya dianggap sebagai tanaman pengganggu. Namun rumput gajah mempunyai kadar selulosa yang cukup tinggi untuk dimanfaatkan sebagai salah satu bahan penghasil bioetanol (Sari, 2009).

Berdasarkan kajian pendahuluan rumput gajah mengandung selulosa yang cukup besar (40,85 %) yang dapat diproduksi menjadi bioetanol. Oleh sebab itu dalam penelitian ini digunakan rumput gajah sebagai bahan baku pembuatan bioetanol. Bagian rumput gajah yang dipergunakan adalah bagian batang karena bagian ini hanya dibuang sebagai limbah yang mencemari lingkungan bila dibiarkan begitu saja (Sari, 2009).

Dalam penelitian ini dilakukan konversi selulosa menjadi glukosa dengan proses hidrolisis secara enzimatik. Enzim yang digunakan diperoleh dari bakteri *Clostridium acetobutylicum*.

Selulosa merupakan polisakarida melimpah di bumi yang dapat diubah menjadi glukosa dengan cara hidrolisis (Groggins dalam Sari 2009). Teknologi produksi bioetanol dalam proses hidrolisis biasanya dilakukan dengan metode konvensional yaitu dengan menggunakan asam sulfat (H_2SO_4) atau asam klorida (HCl). Namun metode ini tidak ramah lingkungan karena dapat menimbulkan korosif dan bahan kimia tersebut harganya relatif mahal.

Pengembangan teknologi bioproses dengan menggunakan enzim pada proses hidrolisisnya merupakan suatu proses yang lebih ramah lingkungan. Pada penelitian ini bakteri selulolitik digunakan untuk memproduksi enzim guna menghidrolisis selulosa menjadi glukosa. Bakteri yang digunakan adalah *Clostridium acetobutylicum* dimana bakteri ini merupakan jenis mikroba yang dapat menghasilkan enzim selulase untuk menghidrolisis selulosa menjadi glukosa (Balusu *et al*, 2004; Demain *et al*, 2005; Riyanti, 2009). Pemecahan selulosa pada suhu tinggi memberikan manfaat pada produksi bioetanol dari bahan baku berselulosa, seperti meningkatkan aktivitas selulase dan menurunkan risiko kontaminasi (Riyanti, 2009).

Beberapa penelitian telah dilakukan terhadap biomassa yang mengandung lignoselulosa dengan menggunakan bakteri Jenis *Clostridium* untuk produksi beberapa pelarut seperti Tabel 1 berikut ini:

Tabel 1. : Beberapa penelitian yang menggunakan *C.acetobutylicum* untuk memproduksi pelarut dengan metode kontinyu

Strain	Substrat	pH	Total Konsentrasi Pelarut (g/L)	Total Produksi pelarut (g/Lh)	Referensi
<i>Clostridium. acetobutylicum</i> DSM 1731.	Glukosa	5,2	4 – 5	0,95	Andersch <i>et al</i> , 1982.
<i>Clostridium acetobutylicum</i> DSM 1731	Glukosa	4,3	13,35	0,33	Bahl <i>et al</i> , 1982b.
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	Glukosa	4,8	12,00	0,40	Monot and Engasser, 1983b
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	Glukosa.	4,8	13,00	0,75	Fick <i>et al</i> 1985
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Glukosa.	4,4	7,25	2,08	Soni <i>et al</i> , 1987

Sumber : Liew, S.T., *et al*, 2006.

Gozan, *et al*, 2007 juga melakukan penelitian dengan mengkonversi selulosa dari bagas menjadi bioetanol menggunakan enzim selulase dan selobiase. Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa penggunaan enzim selulase dan selobiase dengan kondisi fermentasi optimum pH 5 menghasilkan konsentrasi tertinggi bioetanol 13,04 % dari bagas. Tamrin (2007) melakukan penelitian dengan mengkonversi selulosa dari jerami padi menjadi bioetanol dengan menggunakan enzim dari rumen sapi menghasilkan bioetanol sebesar 2,2 mL/L. Maisaroh (2009), menggunakan selulosa dari bagas untuk produksi etanol dengan menggunakan bakteri

Zymomonas mobilis. Hidrolisat bagas yang mengandung sekitar 5,2 % selulosa difermentasi pada suhu 30 °C, pH 4,5 selama 40 jam menghasilkan etanol sebesar 0,323 g bioetanol / g glukosa hidrolisat bagas dengan hasil 63,41% atau 0,0162 g etanol/g bagas atau 0,007 g bioetanol/g sampel dengan produktivitas 0,013 g/L/jam. Sari (2009), melakukan penelitian dengan mengkonversi selulosa dari rumput gajah menjadi bioetanol. Dalam penelitian Sari, selulosa dihidrolisis dengan HCl, glukosa yang dihasilkan selanjutnya dengan fermentasi dengan menggunakan *Saccharomyces cerevisiae*. Dari penelitian ini, diperoleh etanol sebesar 27,71% dihasilkan .

Beberapa penelitian juga telah dilakukan terhadap bakteri selulolitik dari spesies *Clostridium thermocellum* untuk produksi bioetanol dengan bahan baku lignoselulosa pada suhu tinggi : Weymer and Zeikus 1977; Lynd *et al.* 1989; Ulbrich, 1991; Demain *et al.*, 2005; Sparling *et al.*, 2006; Williams *et al.*, 2007; Carere *et al.*, 2008). Sato *et al.* (1992) melakukan penelitian pembuatan bioetanol dari selulosa menggunakan *Clostridium termocelum*. Bioetanol yang diperoleh pada kondisi optimum adalah 59,3 mM. Balusu *et al.* (2004), melakukan penelitian pembuatan bioetanol dari selulosa menggunakan *Clostridium termocelum*. Bioetanol yang diperoleh pada kondisi optimum adalah 3,20 g / L stok kultur.

B. Rumusan Masalah

Dari uraian di atas, maka masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Apakah kondisi optimum fermentasi dengan *Clostridium acetobutylicum* mempengaruhi produksi bioetanol dari selulosa batang rumput gajah?
2. Apakah selulosa dari rumput gajah dapat dikonversi menjadi bioetanol?.

C. Tujuan Penelitian

1. Menentukan kondisi optimum fermentasi secara simultan menggunakan bakteri *Clostridium acetobutylicum* untuk produksi bioetanol .
2. Mengetahui nilai konversi selulosa dari batang rumput gajah menjadi bioetanol melalui proses Sakarifikasi dan Fermentasi Simultan.

D. Manfaat Penelitian

1. Produksi bioetanol dari rumput gajah diharapkan mampu mengatasi ketergantungan akan bahan bakar premium.
2. Sebagai pengembangan ilmu pengetahuan bagi peneliti, khususnya dalam pemanfaatan rumput gajah sebagai bahan baku pembuatan bioetanol .
3. Sebagai bahan referensi dan informasi untuk selanjutnya.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tinjauan Tentang Rumput Gajah

Rerumputan sangat memungkinkan dikembangkan sebagai penghasil energi karena lebih tahan lama, tahan hama dan penyakit, serta tak mengerosi tanah dibanding tanaman semusim. Rumput Gajah atau disebut juga rumput napier atau rumput lembing merupakan salah satu jenis pakan ternak yang berkualitas dan disukai ternak. Rumput gajah dapat hidup di beberapa tempat (0 – 3000 dpl), tahan lindungan, respon terhadap pemupukan, serta menghendaki tingkat kesuburan tanah yang tinggi (Syarifuddin, 2007). Rumput gajah tumbuh merumpun dengan perakaran serabut yang kompak, dan terus menghasilkan anakan apabila dipangkas secara teratur. Rumput gajah dibudidayakan dengan potongan batang (stek) atau sobekan rumpun (pous) sebagai bibit. Bahan stek berasal dari batang yang sehat dan tua, dengan panjang stek 20 – 25 cm (2 – 3 ruas atau paling sedikit 2 buku atau mata). Pertumbuhannya yang relatif cepat dalam waktu yang pendek serta peranan daun-daun dan perakarannya tahan terhadap erosi, maka pembudidayaan rumput gajah dapat menjadi pilihan yang bijaksana dan menguntungkan.



Gambar 1 : Tanaman rumput gajah (Sumber : Brown and Valentine, 2007)

Adapun taksonomi dari rumput gajah adalah sebagai berikut :

- Kingdom : Plantae (Tumbuhan)
- Subkingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
- Super Divisi : Spermatophyta (Menghasilkan biji)
- Divisi : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
- Kelas : Liliopsida (berkeping satu / monokotil)
- Sub Kelas : Commelinidae
- Ordo : Poales
- Famili : Poaceae (suku rumput-rumputan)
- Genus : Pennisetum
- Spesies : *Pennisetum purpureum* Schumacher

(Sumber : Plantamor).

Komposisi Gizi Rumput Gajah (bahan kering) dapat dilihat pada Tabel 2 berikut :

Tabel 2 : Komposisi gizi bahan kering rumput gajah

Jenis kandungan	Kadar (%)	Referensi
Protein kasar	10,19	
Serat kasar	34,15	
Lemak	1,64	
Abu	11,73	Lubis, 1992
Lignin	13,77 - 16,80	Syarifuddin, 2007
Selulosa	40,85	Sari, 2009

Rumput gajah dimanfaatkan dalam bentuk segar, biasanya dipotong pada umur 40 sampai 60 hari. Kandungan lignin rumput gajah cenderung meningkat seiring dengan meningkatnya umur tanaman (Tillman, *et al* dalam Syarifuddin, 2007). Zat ini terutama terdapat pada batang dan akar (Siregar, dalam Syarifuddin, 2007).

B. Tinjauan Tentang Enzim

Enzim berasal dari bahasa Yunani yang artinya di dalam sel. Enzim adalah protein yang tersusun oleh untaian asam amino yang panjang, dimana antara yang satu dengan yang lainnya dihubungkan dengan ikatan peptida. Enzim terdapat dalam semua sel makhluk hidup dan mengerjakan proses yang vital, mengatur proses metabolisme. Enzim adalah protein yang merupakan katalisator untuk reaksi-reaksi kimia pada sistem biologi (sebagai biokatalis). Sifat biokatalis yang sangat penting ini dapat meningkatkan

kecepatan reaksi pada substrat yang sangat spesifik dan dapat dikontrol secara kinetik (Wirahadikusumah dan Madayanti, 1990).

Sifat-sifat umum enzim adalah:

- 1) Enzim berfungsi menggiatkan atau kadang-kadang memulakan suatu proses.
- 2) Enzim tertentu bekerja secara spesifik untuk perubahan suatu zat tertentu.
- 3) Enzim merupakan suatu protein, yaitu suatu susunan koloid.
- 4) Enzim dapat bekerja bolak-balik.

Aktivitas enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu :

a. Faktor pH

pH sangat mempengaruhi laju reaksi enzim. Enzim paling aktif dalam daerah tertentu dan sangat aktif pada nilai pH yang lebih rendah atau lebih tinggi dari nilai optimalnya. Tiap enzim mempunyai aktivitas maksimum pada satu harga pH yang disebut pH optimum.

b. Faktor Suhu

Reaksi-reaksi kimia, baik yang dikatalisis maupun yang tidak dikatalisis sangat dipengaruhi oleh suhu system dimana reaksi akan berlangsung. Kecepatan reaksi yang dikatalisis oleh enzim, seperti semua reaksi kimia akan meningkat sebanding dengan peningkatan suhu, tapi karena enzim adalah protein, ada batas suhu tertentu mengalami denaturasi sehingga aktifitas enzim semakin menurun.

c. Faktor Konsentrasi Enzim

Pada keadaan tertentu kecepatan reaksi enzimatik berbanding lurus dengan konsentrasi enzimnya, dimana aktivitas kerja enzim mula-mula meningkat dengan bertambahnya konsentrasi enzim. Tetapi setelah mencapai aktivitas maksimumnya maka penambahan konsentrasi enzim lebih lanjut tidak akan berpengaruh lagi terhadap aktivitas enzim.

d. Faktor Konsentrasi Substrat

Hasil eksperimen menunjukkan bahwa dengan konsentrasi enzim yang tetap maka penambahan konsentrasi substrat akan menaikkan kecepatan reaksi. Akan tetapi pada batas konsentrasi tertentu tidak terjadi kenaikan kecepatan reaksi walaupun konsentrasi substrat diperbesar (Poedjadi, 1994).

e. Faktor aktivator

Enzim akan bekerja dengan baik jika tersedia senyawa atau unsur lain yang dapat merangsang kerja enzim yang disebut aktivator. Aktivator dapat mengaktifkan enzim dengan beberapa cara :

- 1) Meningkatkan terbentuknya kompleks enzim-substrat dalam orientasi yang tepat.
- 2) Sebagai donor atau akseptor elektron selama katalisis.
- 3) Membentuk kompleks yang dapat meningkatkan laju reaksi awal.

f. Faktor inhibitor

Inhibitor adalah suatu zat yang dalam jumlah kecil dapat bekerja aktif menghambat jalannya suatu reaksi yang mengakibatkan berkurangnya laju

reaksi atau berhenti sama sekali. Berdasarkan cara kerjanya, ada tiga jenis utama inhibitor yaitu :

- 1) Inhibitor kompetitif adalah inhibitor yang bersaing dengan substrat untuk berikatan dengan pusat aktif yang sama pada molekul enzim.
- 2) Inhibitor non kompetitif adalah inhibitor yang mempengaruhi aktivitas enzim pada tempat pengikatan lain dari pusat aktifnya.
- 3) Inhibitor un-kompetitif adalah jenis inhibitor dimana pada mulanya zat inhibitor tidak serupa bentuknya pada pusat aktif enzim tetapi setelah terjadi pengikatan substrat oleh enzim, tempat yang semula untuk mengikat inhibitor, berubah sedemikian rupa sehingga inhibitor dapat berikatan dengan kompleks enzim-substrat (Page, 1985).

C. Enzim Selulase

Selulase adalah suatu enzim yang termasuk dalam kelompok hidrolase yang mengkatalisis reaksi pemutusan ikatan β -1,4-glukopiranosil dari senyawa selulosa, selobiosa dan turunan selulosa lainnya. Selulase merupakan nama umum atau trivial bagi enzim selulase sedang nama sistematiknya adalah β -1,4-glukan-4-glukahidrolase (EC.3.2.1.4) (Wirahadikusumah dan Madayanti, 1990).

Selulase sesungguhnya merupakan suatu kompleks enzim yang terdiri atas beberapa enzim yang bekerja, bertahap atau bersama-sama menguraikan selulosa menjadi glukosa. Ada empat kelompok enzim utama

yang menyusun selulase berdasarkan spesifitas substrat masing-masing yaitu:

a. Endoglukanase (β -1,4-D-glukan-4-glukanohidrolase (EC.3.2.1.4))

Enzim ini menghidrolisis ikatan glikosidik secara acak. Enzim ini tidak menyerang selobiosa tapi menghidrolisis selodekstrin, suatu selulosa yang sudah dilunakkan dengan asam fosfat dan selulosa yang sudah disubstitusi seperti CMC.

b. β -1,4-D-glukan selobiohidrolase (EC.3.2.1.91)

Enzim yang menyerang ujung rantai selulosa non pereduksi dan menghasilkan selobiosa. Enzim ini dapat menyerang selodekstrin tapi tidak dapat menghidrolisis selobiosa.

c. β -1,4-glukan glukohidrolase (EC.3.2.1.74)

Enzim ini menyerang ujung rantai selulosa non pereduksi dan menghasilkan glukosa. Enzim ini menyerang selulosa yang telah dilunakkan oleh asam fosfat, selo-oligosakarida dan CMC

d. β -1,4-D-glukosidase (EC.3.2.1.21)

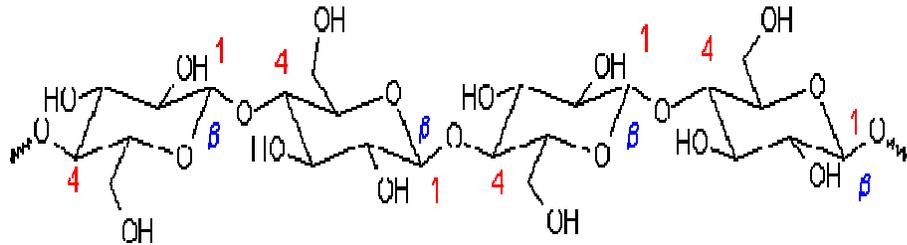
Enzim ini menghidrolisis selobiosa dan rantai pendek selo-oligosakarida dan menghasilkan glukosa. Enzim ini tidak menyerang selulosa atau selodekstrin (Fengel dan Wenger, 1995).

D. Selulosa

Selulosa merupakan struktur dasar sel-sel tanaman, oleh karena itu merupakan bahan alam yang paling penting yang dibuat oleh organisme hidup. Di dalam biosfer 27×10^{10} ton karbon terikat dalam organisme hidup, lebih 99% adalah tanaman. Dapat diperkirakan bahwa sekitar 90% karbon tanaman terikat dalam selulosa, yang berarti bahwa selulosa total di dunia nabati berjumlah sekitar $26,5 \times 10^{10}$ ton (Fengel dan Wegener, 1995). Selulosa adalah polimer linear yang terdiri dari 300 sampai 150000 unit D-glukosa saling berhubungan melalui ikatan glikosidik β -1,4 dan berat molekul diperkirakan mencapai 500.000 (Harjo, dkk, 1989; Kennedy and Philips, 1985).

Selulosa hampir tidak pernah ditemui dalam keadaan murni di alam, melainkan selalu berikatan dengan bahan lain yaitu lignin dan hemiselulosa. Serat selulose alami terdapat di dalam dinding sel tanaman dan material vegetatif lainnya. Selulose murni mengandung 44,4% C; 6,2% H dan 49,3% O. Rumus empiris selulose adalah $(C_6H_{10}O_5)_n$, dengan banyaknya satuan glukosa yang disebut dengan derajat polimerisasi (DP), dimana jumlahnya mencapai 1.200-10.000 dan panjang molekul sekurang-sekurangnya 5.000 nm. Berat molekul selulose rata-rata sekitar 400.000 Mikrofibril selulose terdiri atas bagian amorf (15%) dan bagian berkrystal (85%). Struktur berkrystal dan adanya lignin serta hemiselulose disekeliling selulose merupakan hambatan utama untuk menghidrolisa selulose (Sjostrom, 1995 dalam Soeprijanto, *et al* 2007). Pada proses hidrolisis yang sempurna akan menghasilkan glukosa,

sedangkan proses hidrolisis sebagian akan menghasilkan disakarida selobiosa.



Gambar 2. Struktur Selulosa (Cole dan Fort, 2007)

Secara alamiah molekul selulosa tersusun dalam bentuk “fibril” yang terdiri atas beberapa molekul selulosa paralel yang dihubungkan oleh ikatan hydrogen, fibril-fibril tersebut membentuk struktur kristalin pada kayu. Struktur kristalin tersebut dibungkus oleh lignin yang berperan sebagai pelindung selulosa terhadap serangan enzim pemecah selulosa (Fengel dan Wegener, 1995).

Dalam tubuh manusia, selulosa tidak dapat dicernakan karena manusia tidak mempunyai enzim yang dapat menguraikan selulosa (Poedjiadi, 1994). Ikatan glikosidik β -1,4 pada serat selulosa dapat dihidrolisis menjadi monomer glukosa. Proses perubahan selulosa menjadi glukosa dapat dilakukan dengan cara hidrolisis asam atau secara enzimatik (Kennedy dan Philips, 1985).

E. Bakteri Selulolitik

1. Taksonomi

Bakteri selulolitik adalah bakteri yang dapat memecah selulosa. Bakteri yang bersifat selulolitik mampu menghasilkan enzim selulase yang dapat memecah β -1,4 ikatan glikosida pada selulosa. Bakteri selulolitik misalnya *Ruminococcus albus* suatu jenis bakteri rumen yang banyak terdapat pada binatang ruminansia (Arora, 1989). Bakteri yang bersifat etanologenic yakni bakteri yang dapat mengubah glukosa menjadi bioetanol adalah *Escherechia coli* dan *Zymomonas mobilis* (Altertum dan Ingram, 1989 ; Dien *et al* 2003). Bakteri selulolitik yang lain adalah dari jenis Clostridia seperti *Clostridium thermocellum* dan *Clostridium aceobutylicum*. *Clostridium acetobutylicum* adalah bakteri yang bersifat anaerobik. Penelitian menunjukkan bahwa *Clostridium acetobutylicum* merupakan bakteri *cellulolytic ethanologenic*, karena sifat dan kemampuannya yang mampu secara langsung mengubah suatu substrat yang *cellulosic* menjadi bioetanol. Hal ini berguna dalam mengkonversi biomassa menjadi sumber energi yang dapat dimanfaatkan untuk beberapa keperluan baik dalam skala industri ataupun rumah tangga. Degradasi dilakukan oleh bakteri ini dalam sistem ekstraselular yang disebut cellulosome, yang berisi 20 sub unit katalitik.

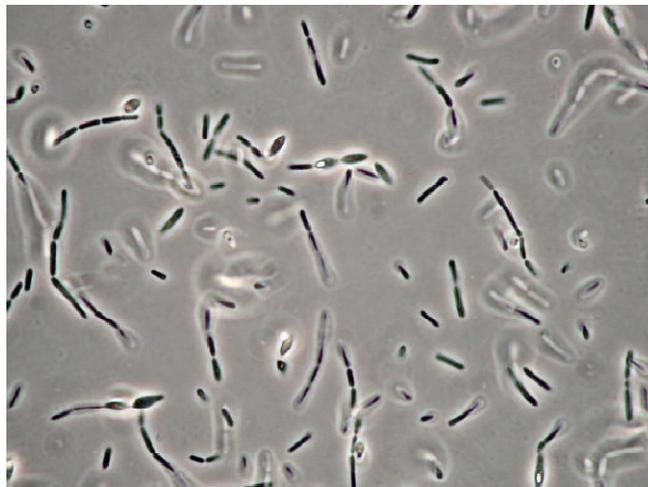
Adapun taksonomi dari bakteri ini adalah sebagai berikut :

Domain : Bacteria
Phylum : Firmicutes
Class : Clostridia

Ordo : Clostridiales
Family : Clostridiaceae
Genus : Clostridium
Species : *Clostridium acetobutylicum*

(Sumber Wikipedia)

Clostridium acetobutylicum adalah organisme anaerobik yang menghasilkan spora. Bakteri ini mengandung enzim ekstraselular yang unik dimana sistem ini mampu memecah selulosa menjadi gula dan bioetanol yang sangat penting untuk energi biomassa. Karena kemampuannya untuk memecah selulosa, sangat mungkin bahwa *Clostridium acetobutylicum* dapat diisolasi dari berbagai tanaman organisme.



Gambar 3. Bakteri *Clostridium* (Sumber : Contreras, A.L. *et al*, 2009)

Clostridium acetobutylicum terkenal karena kemampuannya untuk mendegradasi pati ataupun selulosa yang sangat kompleks. Namun, agar

terjadi degradasi selulosa, *Clostridium acetobutylicum* menghasilkan banyak enzim protein yang sangat vital bagi hidrolisis selulosa. Penelitian bioteknologi menunjukkan bahwa bakteri ini menghasilkan sistem selulase kompleks yang dikenal sebagai selulosome yang terdiri atas sekitar 20 katalisator protein yang terlibat dalam proses degradasi dan regulasi pemecahan selulosa dan transportasi gula monomer.

2. Deskripsi dan signifikansi

Clostridium acetobutylicum adalah bakteri gram-positif. sering terdapat pada tanah, meskipun ditemukan juga dalam sejumlah lingkungan yang berbeda. Merupakan bakteri mesophilic dengan suhu optimal 10-65 °C. Juga merupakan organisme sakarolitik (dapat mengkonversi gula) serta mampu menghasilkan sejumlah produk yang secara komersial seperti bioetanol, aseton dan butanol. *Clostridium. acetobutylicum* memerlukan kondisi anaerob untuk pertumbuhan dalam keadaan vegetatif di mana ia akan membentuk endospora yang membuat bakteri ini dapat hidup selama bertahun-tahun dalam kondisi anaerobik. *Clostridium acetobutylicum* adalah suatu bakteri bernilai komersial, bakteri ini juga kadang disebut "organisme Weizmann", dari nama seorang ilmuwan dan politisi Yahudi Chaim Weizmann, yang pada 1916 membantu menemukan bagaimana kultur *Clostridium acetobutylicum* dapat digunakan untuk memproduksi memproduksi aseton, bioetanol dan butanol dalam proses yang disebut metode ABE. Proses ini menjadi standar dalam industri hingga akhir 1940an,

saat harga minyak yang rendah menyebabkan proses berbasis *cracking* hidrokarbon dan distilasi minyak bumi menjadi lebih efisien. Selain memproduksi bioetanol, *Clostridium acetobutylicum* juga memproduksi asam asetat (cuka), asam butirat, karbon dioksida dan hidrogen. Fermentasi anaerobik menggunakan *Clostridium acetobutylicum* kembali diminati pasar karena dapat digunakan untuk memproduksi bahan bakar bio untuk menggantikan bensin dan minyak diesel. Yang paling sering digunakan adalah jenis strain ATCC 824. Jenis strain ini ditemukan dan terisolasi di tanah dari kebun Connecticut pada tahun 1924. Penelitian telah menunjukkan bahwa strain 824 ATCC dipelajari secara luas terkait erat dengan Weizmann, digunakan dalam produksi industri awal aseton. Sebagian besar spesies bakteri dalam genus *Clostridium* menghasilkan racun yang berbahaya dan jahat untuk sel inang lain. Tidak seperti jenis bakteri *Clostridium* lainnya, *Clostridium acetobutylicum* adalah bakteri non patogen yang tidak menghasilkan atau mengeluarkan jenis racun yang akan menimbulkan efek patologis apapun pada manusia, hewan, atau tanaman induknya.

F. Bioetanol

Bioetanol (disebut juga etil-alkohol atau alkohol saja), adalah yang paling sering digunakan dalam kehidupan sehari-hari. Karena sifatnya yang tidak beracun banyak dipakai sebagai pelarut dalam industri makanan dan minuman. Bioetanol tidak berwarna dan tidak berasa tapi memiliki bau yang khas. Bahan ini dapat memabukkan jika diminum. Rumus molekul bioetanol

adalah C_2H_5OH atau rumusempiris C_2H_6O . Bioetanol telah digunakan manusia sejak zaman prasejarah sebagai bahan pemabuk dalam minuman beralkohol. Residu yang ditemukan pada peninggalan keramik yang berumur 9000 tahun dari China bagian utara menunjukkan bahwa minuman beralkohol telah digunakan oleh manusia prasejarah dari masa neolitik. Bioetanol dan air membentuk larutan azeotrop. Karena itu pemurnian bioetanol yang mengandung air dengan cara penyulingan biasa hanya mampu menghasilkan bioetanol dengan kemurnian 96%.

Bioetanol murni (absolut) dihasilkan pertama kali pada tahun 1796 oleh Johan Tobias Lowitz yaitu dengan cara menyaring alkohol hasil distilasi melalui arang. Lavoisier menggambarkan bahwa bioetanol adalah senyawa yang terbentuk dari karbon, hidrogen dan oksigen. Pada tahun 1808 Saussure dapat menentukan rumus kimia bioetanol. Limapuluh tahun kemudian (1858), Couper menerbitkan rumus bangun bioetanol. Dengan demikian bioetanol adalah salah satu senyawa kimia yang pertama kali ditemukan rumus bangunnya.

Pada tahun 1815, Gay-Lussac memformulasikan konversi glukosa menjadi bioetanol dan karbondioksida. Bioetanol merupakan produk fermentasi yang dapat dibuat dari substrat yang mengandung karbohidrat (gula, pati atau selulosa). Nama trivial adalah etil alkohol. Rumus molekul CH_3CH_2OH atau C_2H_5OH ; Bobot molekul 46,07 g/mol

Bioetanol dapat dibuat dengan fermentasi dari bahan yang mengandung gula seperti minyak nira, legen, tetes (molase). Alkohol dapat

juga didapat dari tumbuhan yang mengandung pati (karbohidrat) seperti jagung, sorghum, kentang, dan singkong. Bisa juga dari bahan berserat seperti *sulphite liquor* bioetanol yang berbahan dasar tumbuhan biasa disebut bioetanol.

Dalam perkembangannya produksi bioetanol yang paling banyak digunakan adalah metode fermentasi yang dilanjutkan dengan destilasi. Mikroorganisme yang digunakan untuk fermentasi alkohol bisa dari bakteri seperti *Clostridium thermocellum*, *Clostridium acetobutylicum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Zymomonas mobilis*. atau jamur (fungi) seperti *Aspergillus oryzae*, *Endomyces fibugilera*, *Kloeckera sp.*, *Kluyveromyces fragilis*, *Mucor sp.*, *Neurospora crassa*, *Rhizopus sp.*, *Saccharomyces beticus*, *Sacharomyces cerevisiae*, *S.ellipsoideus*, *S. oviformis*, *S. saki*, *Torula sp.*, dan lain-lain.

Penggunaan

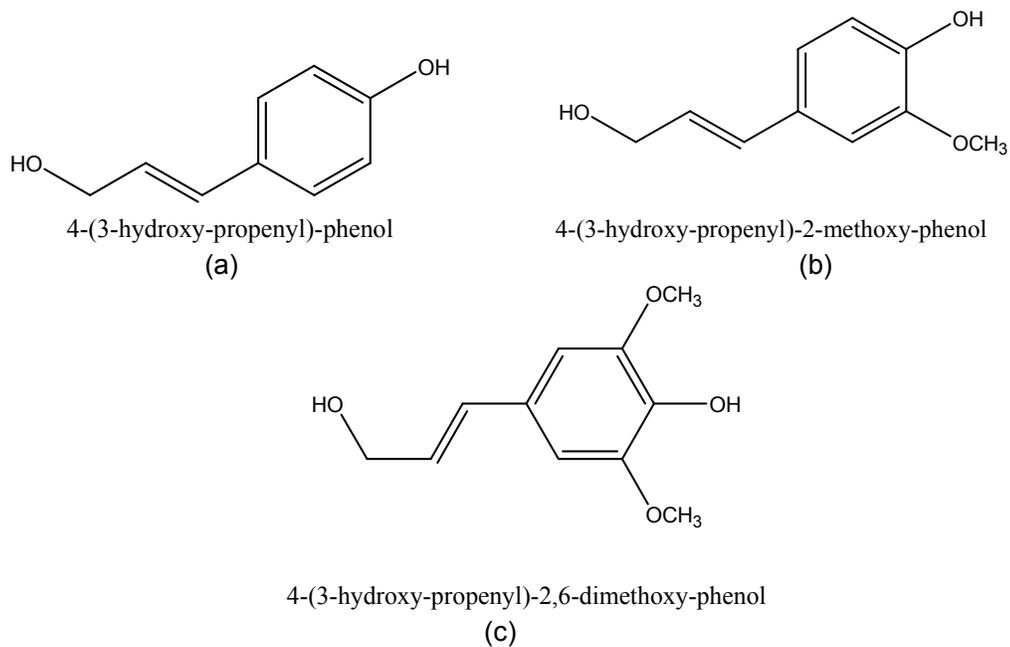
- a. Dalam minuman seperti bir, anggur dan lain-lain.
- b. Dalam farmasi : sebagai pelarut
- c. Untuk sintesis : misalnya eter, iodoform, kloroform, kloral dan sebagainya.
- d. Larutan 70 % dipakai sebagai antiseptik karena mengkoagulasikan albumina dan menghentikan pertumbuhan dari organisme-organisme yang mengakibatkan pembusukan. Konsentrasi lebih tinggi tidak efektif karena tidak mematikan spora.

- e. Dipakai sebagai pengawet contoh-contoh biologik (Riawan, 1990).
- f. Sebagai sumber energi untuk bahan bakar motor.

Pengembangan bioetanol dari biomassa yang banyak mengandung lignoselulosa seperti tanaman rumput merupakan salah satu energi alternatif yang cukup berpotensi untuk diterapkan di Indonesia. bioetanol dapat dimanfaatkan sebagai bahan bakar substitusi bensin dan sebagai bahan campuran premium. Bioetanol dapat dicampur secara langsung ke dalam bensin dengan campuran 10% bioetanol dan 90 % bensin yang biasa disebut gasohol. Sebagai bahan bakar, bioetanol memiliki beberapa kelebihan, seperti ramah lingkungan karena bersih dari emisi bahan pencemar. dan dapat diperbaharui (Sardjoko 1991).

G. Perlakuan Pendahuluan

Rumput gajah merupakan sumber sellulosa yang dapat diolah menjadi bahan baku bioetanol. Batang rumput gajah yang telah dikeringkan kelihatan berwarna coklat karena mengandung lignin. Lignin adalah senyawa organik polimer yang banyak dan penting dalam dunia tumbuhan selain selulosa. Struktur lignin sangat beraneka ragam tergantung dari jenis tanamannya.. Secara umum polimer lignin disusun oleh unit-unit fenil propana yaitu *p*-kumaril alkohol, koniferil alkohol, dan sinapil alkohol yang merupakan senyawa induk (prazat) dari lignin (Davin dan Lewis 2005).



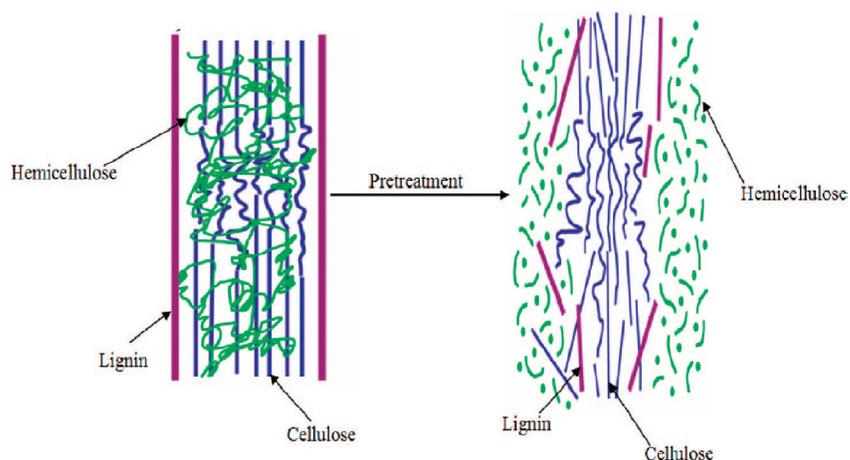
Gambar 4. Struktur Lignin : (a) unit p-hidroksifenil, (b) unit guaiasil, (c) unit siringil (Davin dan Lewis 2005).

Berdasarkan komposisi unit strukturalnya, lignin diklasifikasikan kedalam beberapa tipe. Lignin pada *softwood* (kayu daun jarum) atau disebut lignin guaiasil atau G lignin sebagian besar disusun oleh unit guaiasil (sekitar 90%) dan *p*-kumaril alkohol (sekitar 10%). Lignin pada *hardwood* (kayu daun lebar) atau disebut lignin guaiasil siringil atau G-S lignin disusun oleh unit guaiasil dan siringil dengan perbandingan tertentu, tergantung dari jenis kayu, umur kayu, tempat tumbuh dan iklim (Davin dan Lewis 2005).

Lignin adalah senyawa kompleks yang menyebabkan selulosa saling terikat dalam batang dan memberi warna coklat pada batang kering rumput gajah. Namun keberadaan lignin dalam biomassa menyebabkan enzim sukar berinteraksi dengan selulosa pada proses hidrolisis. Supaya proses hidrolisis berlangsung dengan baik maka perlu dilakukan proses delignifikasi sebelum

rumpun gajah diproses menjadi bioetanol. Delignifikasi dilakukan dengan menggunakan NaOH 2 – 8 % (Jalaluddin dan Rizal, S. 2003).

Untuk mendapatkan selulosa yang benar-benar murni maka setelah delignifikasi bahan tersebut diputihkan (*bleaching*) dengan bahan pemutih untuk membersihkan sisa-sisa lignin yang masih melekat pada selulosa. Bahan pemutih yang umum digunakan untuk keperluan rumah tangga, dan bahkan digunakan pada industri tekstil dan kertas adalah senyawa klorin, baik bentuk klorin dioksida (ClO_2) atau natrium hipoklorida (NaOCl). Pada pemutihan dengan menggunakan klorin, proses oksidasinya selalu melibatkan atom Cl. Jika sebuah oksidator melepaskan elektron, maka akan terjadi proses oksidasi dan merubah struktur kimia dari molekul tersebut, sehingga warnanya pun ikut berubah. Penggunaan senyawa klorin sebagai pemutih memungkinkan terjadinya produk samping yang berbahaya bagi lingkungan, seperti terbentuknya senyawa dioksin yang bersifat toksik.



Gambar 5. : Proses Delignifikasi Pada Lignoselulosa (Sumber : Kumar *et al*, 2009)

Salah satu bahan pemutih (*bleaching agent*) atau pengelantang yang relatif aman bagi lingkungan adalah H_2O_2 (Joedodibroto dan Pangalila 1977). Bahan pemutih ini sering digunakan untuk pemutihan biji-bijian, seperti gandum, kedelai, dan beras (Metzger, 2002).

Proses oksidasi pada pemutihan dengan hidrogen peroksida terjadi dengan menambahkan oksigen atau mengambil atom H dan hasil akhirnya adalah air dan oksigen. Hidrogen peroksida mengandung oksigen aktif yang tinggi, tetapi merupakan oksidator yang lambat, sehingga perlu diaktifkan lagi dengan penambahan katalisator. Pada penelitian ini, natrium bikarbonat digunakan sebagai katalisator. Sistem pemutihan dengan oksidasi H_2O_2 menggunakan katalisator bikarbonat adalah proses yang murah dan relatif aman bagi lingkungan (Richarson *et al*, 1999). Pada reaksi antara bikarbonat dan hidrogen peroksida, terbentuk ion peroksidmonokarbonat (HClO_4^-) yang merupakan oksidator yang lebih reaktif, disebut "*bicarbonate activated peroxide*" atau disingkat sistem BAP, dan mengikuti reaksi sebagai berikut (Bennet *et al*, 2001) :



Kecepatan oksidasi dengan menggunakan hidrogen peroksida dengan katalisator NaHCO_3 menjadi 300 kali lebih besar dibandingkan dengan oksidasi tanpa katalis (Bennet *et al*, 2001).

H. Proses Fermentasi

Kata fermentasi berasal dari bahasa latin dan secara sempit berarti transformasi sari anggur menjadi minuman anggur (wine). Kata Latin "*fervere*" sebenarnya berarti "mendidih" dan digunakan untuk menggambarkan penampakan menarik dari sari anggur yang terfermentasi. Dalam beberapa bahasa modern, kata yang sama dipakai untuk melukiskan mendidihnya air yang dipanaskan seperti pembentukan gas yang terjadi pada fermentasi gula.

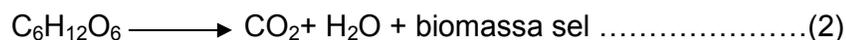
Fermentasi adalah suatu kegiatan penguraian bahan karbohidrat yang disebabkan oleh aktivitas mikroorganisme yang disimilasi anaerobik senyawa-senyawa organik (Said 1987). Penjelasan yang bersifat ilmiah, pertama kali diajukan oleh ahli kimia Perancis Louis Pasteur yaitu proses peruraian gula menjadi alkohol dan karbondioksida yang disebabkan oleh aktivitas sel-sel khamir (Natsir, 2005).

Seiring perkembangan teknologi, definisi fermentasi meluas, menjadi semua proses yang melibatkan mikroorganisme untuk menghasilkan suatu produk yang disebut metabolit primer dan sekunder dalam suatu lingkungan yang dikendalikan. Pada mulanya istilah fermentasi digunakan untuk menunjukkan proses pengubahan glukosa menjadi alkohol yang berlangsung secara anaerob. Namun, kemudian istilah fermentasi berkembang lagi menjadi seluruh perombakan senyawa organik yang dilakukan mikroorganisme yang melibatkan enzim yang dihasilkannya. Dengan kata lain, fermentasi adalah perubahan struktur kimia dari bahan-bahan organik

dengan memanfaatkan agen-agen biologis terutama enzim sebagai biokatalis. Produk fermentasi dapat digolongkan menjadi 4 jenis:

1. Produk biomassa
2. Produk enzim
3. Produk metabolit
4. Produk transformasi

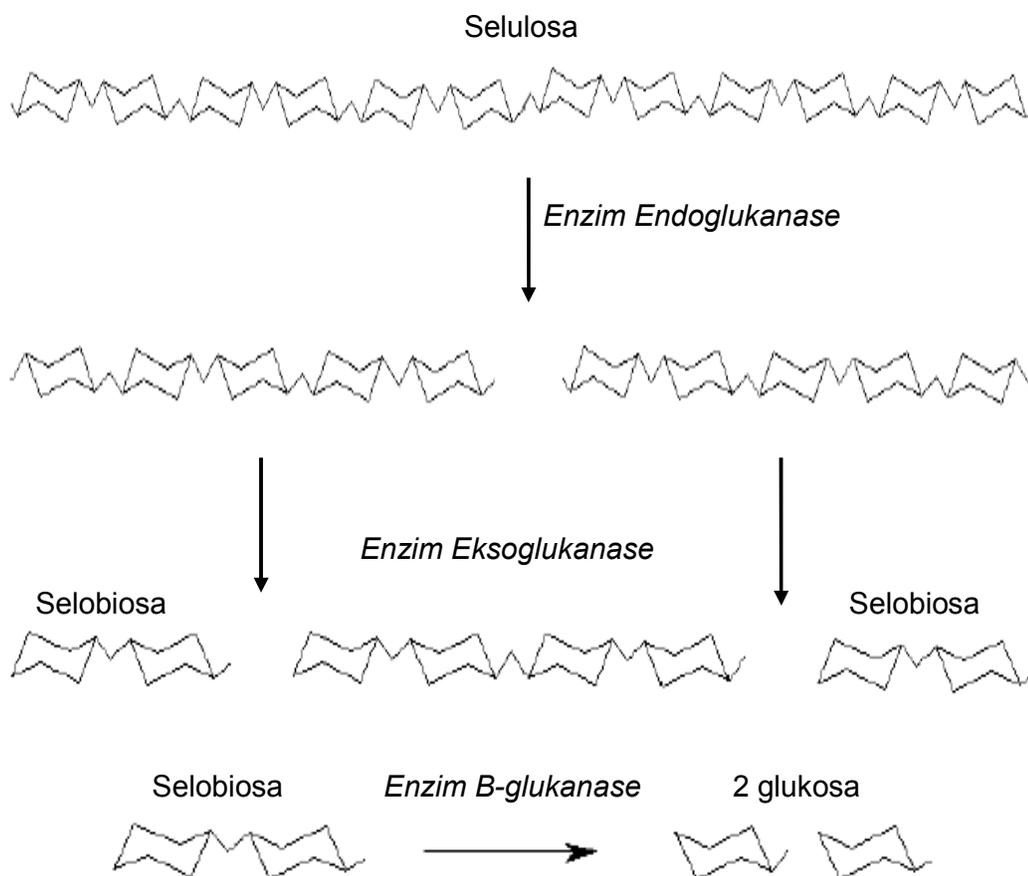
Menurut Judoamidjoyo, *et al* (1992), proses fermentasi pembentukan bioetanol membutuhkan bantuan mikroba. Untuk bahan yang mengandung gula dalam bentuk polisakarida atau oligosakarida, terlebih dahulu harus diubah dulu dalam bentuk yang lebih sederhana yaitu monosakarida (fruktosa atau glukosa). Mikroba tersebut akan menghasilkan enzim yang akan merubah gula-gula sederhana yaitu fruktosa atau glukosa ($C_6H_{12}O_6$) menjadi bioetanol (C_2H_5OH) dan karbondioksida (CO_2). Pada keadaan ini menghasilkan penambahan biomassa sel dengan persamaan reaksi sebagai berikut:



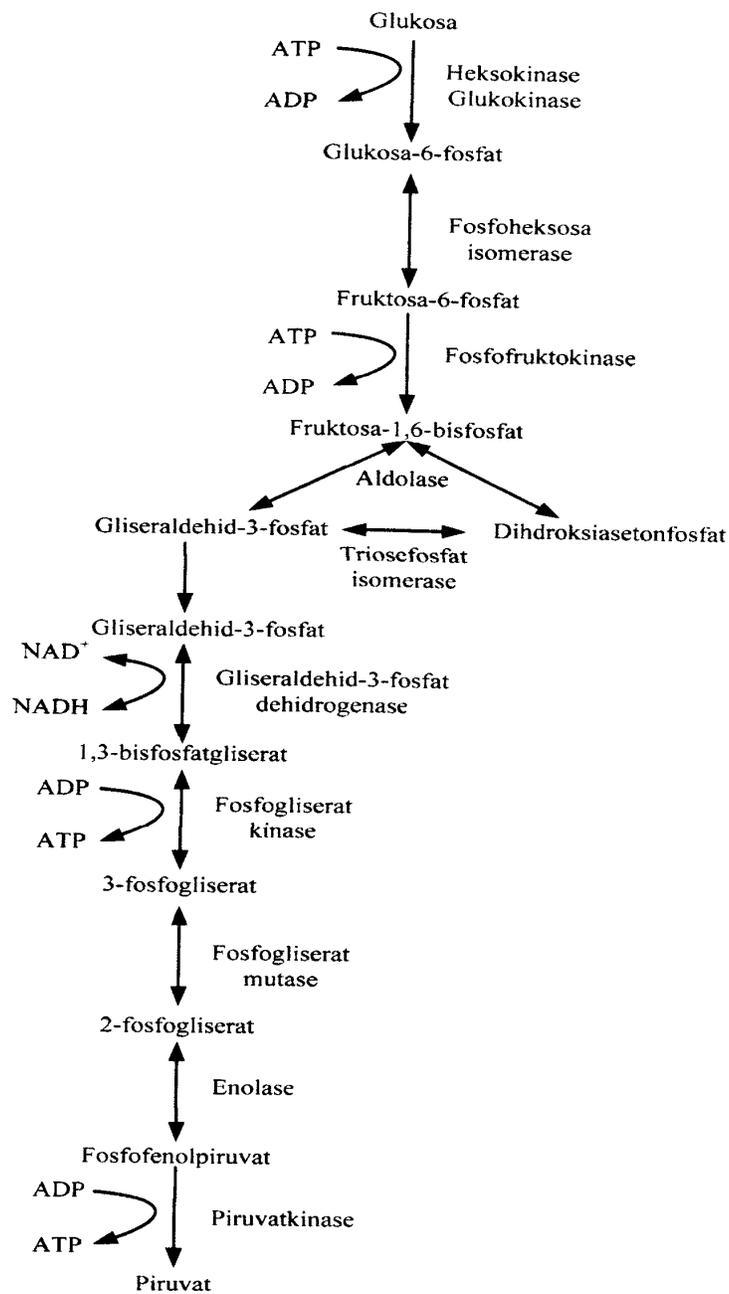
Bahan-bahan yang dihasilkan melalui fermentasi merupakan hasil-hasil metabolit sel mikroba, misalnya antibiotik, asam-asam organik, aldehid, alkohol, *fusel oil*, dan sebagainya. Di samping hasil-hasil metabolit tersebut, fermentasi juga dapat diterapkan untuk menghasilkan biomassa sel mikroba seperti ragi roti (*baker yeast*) yang digunakan dalam pembuatan roti. Untuk menghasilkan tiap-tiap produk fermentasi di atas dibutuhkan kondisi fermentasi yang berbeda-beda dan jenis mikroba yang bervariasi juga

karakteristiknya. Oleh karena itu, diperlukan keadaan lingkungan, substrat (media), serta perlakuan (*treatment*) yang sesuai sehingga produk yang dihasilkan maksimal.

Dalam penelitian ini digunakan selulosa sebagai sumber glukosa karena bakteri *Clostridium* dapat menggunakan selulosa sebagai substrat. Glukosa diperoleh dengan cara hidrólisis selulosa. Mekanisme pembentukan selulosa menjadi glukosa melalui proses hidrólisis secara enzimatik dapat dilihat pada Gambar 6 berikut :



Gambar 6. Proses Hidrólisis Selulosa Oleh Enzim Selulase
(Sumber : Show J., 2006)



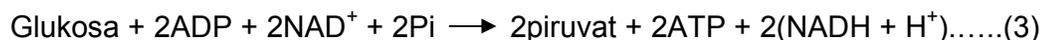
Gambar 7. Tahap Glikolisis (Embden Meyerhof-Parnas Pathway)
(Sumber : Didu, N., 2010)

Mekanisme pembentukan bioetanol oleh khamir atau mikroba adalah melalui jalur Embden-Meyerhof-Parnas atau lebih dikenal dengan jalur glikolisis. Hasil dari tahap glikolisis atau jalur EMP adalah memecah glukosa menjadi dua molekul asam piruvat. Proses yang terjadi dalam jalur glikolisis dapat dilihat pada Gambar 7.

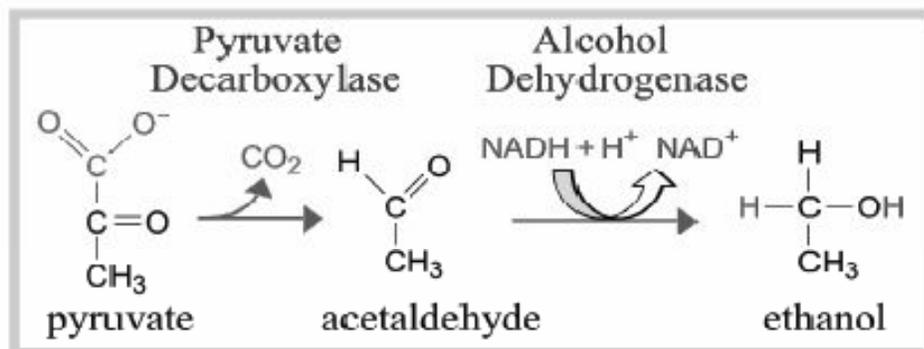
1. Glikolisis diawali dengan reaksi pembentukan senyawa glukosa-6-fosfat dari glukosa. Reaksi tersebut merupakan reaksi yang membutuhkan energi dari pemutusan ikatan fosfat dari ATP. Reaksi ini dikatalisis oleh enzim heksokinase atau glukokinase. Pada tahap ini, menggunakan satu mol ATP dan menghasilkan satu mol ADP;
2. Reaksi kedua adalah pembentukan isomer fruktosa-6-fosfat dari glukosa-6-fosfat. Reaksi ini dikatalisis oleh enzim fosfoheksosa isomerase;
3. Fruktosa-6-fosfat selanjutnya dikoversi menjadi fruktosa-1,6-bifosfat oleh enzim fosfofruktokinase. Reaksi ini berjalan spontan dan merupakan *rate limiting step* pada proses glikolisis. Pada tahap inipun satu molekul ATP digunakan dan satu molekul ADP dihasilkan;
4. Tahap selanjutnya adalah reaksi pemecahan fruktosa-1,6-bifosfat oleh enzim aldolase menjadi dihidroksiasetonfosfat (DHAP) dan gliseraldehid-3-fosfat (GA-3P). Tahap ini merupakan salah satu tahap penting dalam proses glikolisis (dimana C_6 dirubah menjadi $2C_3$); DHAP dan GA-3P merupakan senyawa yang memiliki susunan yang sama; GA-3P langsung digunakan dalam tahap glikolisis selanjutnya sedang DHAP dikonversi menjadi GA-3P oleh enzim triosefosfat isomerase;

5. Gliseraldehid-3-fosfat (GA-3P) dioksidasi dengan penambahan fosfat inorganis (Pi) menjadi 1,3-difosfo-gliserat (1,3-dP-GA) oleh enzim gliseraldehid-3-fosfat-dehidrogenase;
6. 1,3-difosfo-gliserat melepaskan satu grup fosfat untuk membentuk ATP dan ADP dan kemudian dikonversi menjadi 3-fosfogliserat (3P-GA) oleh enzim 3-fosfogliseratkinase;
7. 3-fosfogliserat (3P-GA) selanjutnya dikonversi menjadi 2-fosfogliserat (2P-GA) oleh enzim fosfogliserat mutase;
8. 2-fosfogliserat (2P-GA) selanjutnya didehidrasi menjadi fosfofenol piruvat oleh enzim enolase;
9. Tahap terakhir dari jalur glikolisis adalah defosforelasi fosfofenol piruvat (PEP) menjadi piruvat oleh enzim piruvat kinase; pada tahap ini dibentuk sebuah molekul ATP.

Setelah pembentukan DHAP dan GA-3P selama proses glikolisis, berlangsung sebanyak dua kali. Piruvat yang merupakan produk akhir dari tahap glikolisis ini merupakan kunci pada proses metabolisme. Secara keseluruhan, reaksi yang terjadi pada proses glikolisis adalah sebagai berikut (Didu, N., 2010) :



Setelah melalui tahapan glikolisis, piruvat yang terbentuk kemudian diubah menjadi asetaldehid dan CO₂ oleh enzim piruvate dekarboksilase, setelah itu enzim alkohol dehidrogenase mengubah asetaldehid menjadi bioetanol seperti yang ditunjukkan pada Gambar 8 :



Gambar 8. Proses pembentukan bioetanol dari piruvat (Didu, N., 2010).

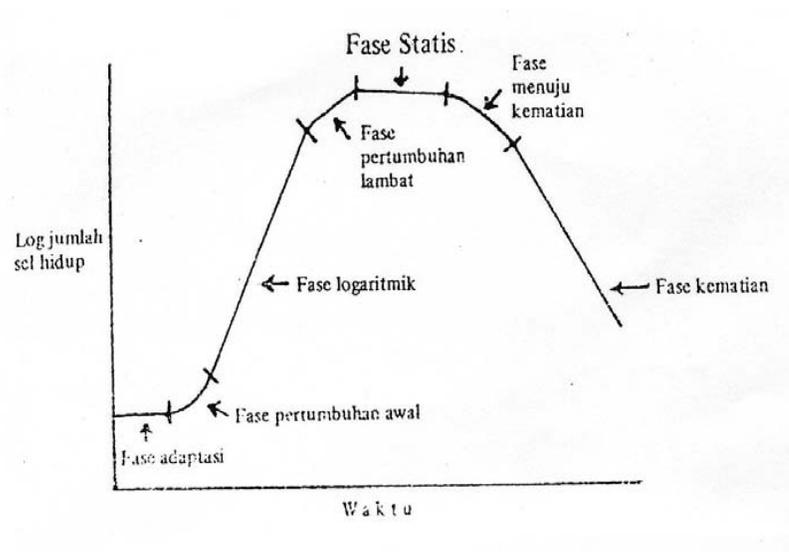
Faktor utama yang mempengaruhi pertumbuhan dan perilaku mikroba dapat digolongkan dalam faktor intraseluler dan faktor ekstraseluler. Faktor intraseluler meliputi struktur, mekanisme, metabolisme, dan genetika. Sedangkan faktor ekstraseluler meliputi kondisi lingkungan seperti pH, suhu, tekanan.

Proses pertumbuhan mikroba merupakan proses yang memiliki batas tertentu. Pada saat tertentu, setelah melewati tahap minimum, mikroba akan mengalami fasa kematian. Faktor-faktor yang dapat menyebabkan berhentinya pertumbuhan mikroba antara lain:

- 1) Penyusutan konsentrasi nutrisi yang dibutuhkan dalam pertumbuhan mikroba karena habis dikonsumsi.
- 2) Produk akhir metabolisme yang menghambat pertumbuhan mikroba karena terjadinya inhibisi dan represi.

Pertumbuhan kultur mikroba umumnya dapat digambarkan dalam suatu kurva pertumbuhan pada gambar 9. Dari Gambar dapat diketahui bahwa pertumbuhan mikroba dapat terbagi dalam beberapa tahap :

- 1) Fasa adaptasi atau *lag phase*. Pada saat ini mikroba lebih berusaha menyesuaikan diri dengan lingkungan dan medium baru daripada tumbuh ataupun berkembang biak. Pada saat ini mikroba berusaha merombak materi-materi dalam medium agar dapat digunakan sebagai nutrisi untuk pertumbuhannya. Bila dalam medium ada komponen yang tidak dikenal mikroba maka mikroba akan memproduksi enzim ekstraselular untuk merombak komponen tersebut.



Gambar 9. Kurva Pertumbuhan Mikroba (Fardiaz, 1989).

Fasa ini juga berlangsung seleksi. Hanya mikroba yang dapat mencerna nutrisi dalam medium untuk pertumbuhannya yang dapat bertahan hidup.

- 2) Fasa pertumbuhan dipercepat adalah fasa dimana mikroba sudah dapat menggunakan nutrisi dalam medium fermentasinya. Pada fasa ini mikroba banyak tumbuh dan membelah diri sehingga jumlahnya meningkat dengan cepat.

- 3) Fasa eksponensial adalah akhir fasa pertumbuhan dipercepat. Pada fasa ini laju pertumbuhan tetap pada laju pertumbuhan maksimum (μ maks). Nilai μ maks ini ditentukan oleh konstanta jenuh/ saturasi substrat. Nilai μ maks untuk setiap mikroba juga tertentu pada masing-masing substrat.
- 4) Fasa pertumbuhan diperlambat mulai pada akhir fasa eksponensial. Pertumbuhan mikroba yang begitu cepat tidak diimbangi tersedianya nutrisi yang cukup. Jika fermentasi dilakukan secara *batch*, dimana umpan nutrisi dimasukkan hanya pada awal proses fermentasi, pada waktu tertentu saat jumlah mikroba yang mengkonsumsi nutrisi tersebut melebihi daya dukung nutrisi akan terjadi kekurangan nutrisi. Hal lain yang memperlambat pertumbuhan mikroba adalah terjadinya inhibisi ataupun represi yang terjadi karena terakumulasinya produk metabolit sekunder hasil aktifitas fermentasi mikroorganisme.
- 5) Fasa kematian terjadi apabila nutrisi sudah benar-benar tidak dapat lagi mencukupi kebutuhan mikroorganisme. Keadaan ini diperparah oleh akumulasi produk metabolit primer dan sekunder yang tidak dipanen sehingga terus menginhibisi ataupun merepresi pertumbuhan sel mikroorganisme. Selain itu umur sel juga sudah tua, sehingga pertahanan sel terhadap lingkungan yang berbeda biasanya juga berkurang (Fardias, S., 1989).

Dalam proses fermentasi ragi tersebut melalui 4 tahapan:

1. Tahap persiapan medium fermentor.
2. Tahap sterilisasi.

3. Tahap pembuatan inokulum dan pengembangan starter.
4. Tahap pelaksanaan fermentasi.

1. Tahap Persiapan Medium Fermentasi

Medium yang digunakan adalah medium cair yang terdiri dari 2 macam larutan. Larutan pertama berisi garam-garam nutrisi untuk pertumbuhan ragi, sedangkan larutan kedua adalah substrat yang umumnya berupa larutan glukosa dalam air. Nutrisi yang diperlukan dalam medium pertumbuhan ragi antara lain unsur N, S, O, H, Mg, K dan Ca. Glukosa berfungsi sebagai sumber karbon dan sumber energi. Kadar senyawa-senyawa yang diperlukan supaya medium dapat mendukung pertumbuhan ragi secara optimal harus ditentukan berdasarkan komposisi masing-masing unsur dalam sel ragi yang telah banyak diteliti dan dibukukan. Adapun komponen dari media yang digunakan adalah sebagai berikut:

a. Substrat utama

Sebagai substrat utama digunakan larutan glukosa. Karena glukosa adalah substrat utama, maka pertumbuhan biomassa sel mikroba merupakan fungsi dari konsentrasi glukosa. Hasil perombakan glukosa oleh sel adalah berupa CO₂ dan H₂O.

b. Sumber makronutrien, mikronutrien, dan *growth factor*.

Bahan-bahan yang merupakan sumber makronutrien, mikronutrien, dan *growth factor* sebagai berikut:

- 1) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sebagai sumber nitrogen yang berguna bagi pembentukan asam nukleat dan asam-asam amino.
- 2) K_2SO_4 sebagai sumber K^+ yang merupakan kofaktor enzim
- 3) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sebagai sumber Na dan P. Na berfungsi sebagai kofaktor dan P berguna untuk sintesis asam nukleat, ATP, fosfolipid, dan senyawa yang mengandung fosfor lainnya.
- 4) MgSO_4 sebagai sumber Mg yang berperan di dalam stabilisasi ribosom, stabilisasi membran dan dinding sel, serta berfungsi sebagai kofaktor enzim.
- 5) CaCl_2 sebagai sumber Ca untuk stabilisasi dinding sel.
- 6) ZnSO_4 sebagai sumber Zn yang berfungsi sebagai regulator enzim.
- 7) $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ sebagai sumber Fe, makronutrien pembentuk sitokrom pembawa elektron dalam jalur transportasi elektron.
- 8) CuSO_4 sebagai sumber Cu yang berperan penting dalam reaksi redoks metabolisme.
- 9) Ekstrak ragi sebagai penyedia asam-asam amino tunggal, *growth factor* dan berbagai vitamin yang dibutuhkan sel.
- 10) Akuades sebagai media pelarut dan pengaduk dalam transportasi senyawa.

2. Tahap Sterilisasi

Sterilisasi dilakukan terhadap bahan dan alat sehingga terbebas dari kontaminasi mikroorganisme lain. Sterilisasi perlu dilakukan karena

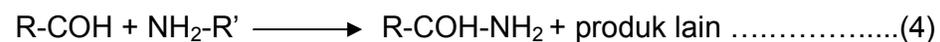
kontaminasi mikroba lain akan memberikan dampak yang tidak menguntungkan sebagai berikut:

- a. Kontaminan meningkatkan persaingan di dalam mengkonsumsi substrat sehingga akan mengurangi perolehan.
- b. Kontaminan dapat menghambat proses metabolisme sel sehingga akan mengurangi perolehan kontaminan.
- c. Meningkatkan turbiditas sehingga dapat mengacaukan pengukuran terhadap jumlah sel setiap saat.

Pada percobaan ini proses sterilisasi dilakukan di laboratorium dengan menggunakan otoklaf. Otoklaf melakukan sterilisasi dengan menggunakan panas lembab. Keuntungan penggunaan panas lembab dalam proses sterilisasi adalah kelembaban mempermudah proses denaturasi protein sel kontaminan. Otoklaf dioperasikan pada tekanan 15 psi dan temperatur 121 °C selama 15 menit. Pada saat sterilisasi beberapa lubang pada fermentor ditutup dengan kapas. Tujuannya adalah untuk mengalirkan udara panas dari dalam fermentor sehingga tidak terjadi tekanan yang terlalu tinggi di dalam fermentor selama sterilisasi. Sedangkan tujuan lain penggunaan kapas adalah agar kehilangan uap air selama sterilisasi minimal. Hal yang perlu ditekankan pada sterilisasi medium ini adalah larutan nutrisi tidak boleh disterilisasi bersamaan dengan larutan glukosa agar tidak terjadi proses karamelisasi. Karamelisasi disebut juga proses reduksi Maillard. Proses ini terjadi karena gugus karbonil pada glukosa bereaksi dengan gugus amonium atau protein dari medium sehingga membentuk nitrogen hitam.

Senyawa ini tidak dapat dioksidasi mikroba dan disebut *unfermented substrate*. Akibat reaksi ini glukosa tidak dapat diuraikan oleh sel ragi, bahkan menjadi inhibitor terhadap sel ragi tersebut. Karena itu, proses sterilisasi terhadap nutrisi dan larutan glukosa dilakukan terpisah.

Reaksi karamelisasi glukosa ini berlangsung sebagai berikut:



3. Tahap Penyiapan Inokulum

Setelah seluruh alat dan bahan steril, dilakukan inokulasi *Saccharomyces cereviceae* dari biakan murni. Yang digunakan sebagai inokulum adalah biakan ragi pada agar miring. Komposisi medium starter adalah sama dengan komposisi media fermentasi dengan penambahan *growth factor*. Inokulum tersebut dimasukkan dalam campuran larutan nutrisi dan substrat yang diambil sebagian dari fermentor dan dimasukkan dalam labu erlenmeyer 150 mL. Tujuan dibiakkannya ragi dalam starter adalah mengadaptasikan sel terhadap media fermentasi. Dengan adanya adaptasi pada starter ini diharapkan *lag phase* sebagai tahap awal fermentasi dilewati. Biakan diusahakan tepat berada pada akhir fasa logaritmik. Dengan demikian pertumbuhan sel ragi akan maksimum dalam waktu yang relatif singkat. Inokulasi *Sacchromycess cereviceae* dilakukan secara aseptis untuk menjaga kemurnian biakan. Setelah dimasukkan dalam medium, inokulum tersebut diletakkan dalam alat *shaker* paling cepat 16 jam. Fungsi *shaker* adalah mempermudah difusi oksigen ke dalam medium sehingga kontak antara dan inokulum makin banyak dan homogen. Hal ini penting dilakukan untuk

menjaga kondisi biakan tetap aerobik. Jika difusi oksigen dalam medium lancar, kadar DO (oksigen terlarut) dalam medium akan cukup mendukung pertumbuhan sel secara aerobik. Jika sel hidup secara aerobik, biomassa baru akan lebih banyak terbentuk daripada bioetanol. Dengan demikian pada akhir masa inkubasi *shaker* ini diharapkan juga sel sudah berada pada akhir fasa logaritmik.

4. Tahap Pelaksanaan Fermentasi

Tahap ini dimulai saat inokulum yang telah beradaptasi dalam medium dimasukkan dalam medium di fermentor. Fermentor adalah suatu reaktor yang dipersiapkan untuk melakukan reaksi fermentasi yang dilengkapi dengan pengaduk, saluran aerasi, dan perlengkapan lainnya. Pelaksanaan fermentasi dilakukan seperti Gambar 10. Aerasi berfungsi sebagai penyuplai oksigen untuk sel ragi dalam bentuk gelembung gas.. Laju oksigen yang disuplai ke dalam fermentor dijaga stabil. Fluktuasi laju alir oksigen ini dapat menurunkan unjuk kerja fermentor karena laju transfer O_2 tidak tetap sehingga metabolisme sel ragi terganggu karena kadar DO yang tidak stabil. Agitasi berfungsi sebagai alat penghomogen larutan fermentasi. Pengadukan dilakukan oleh impeller. Semakin banyak impeller di dalam fermentor semakin homogen larutan tersebut.



Gambar 10. Proses Fermentasi bioetanol
(Sumber : Bon, E.P.S., 2008)

Laju alir udara dan pengadukan saling terkait satu sama lain. Pengaliran udara berfungsi untuk menjaga suplai oksigen agar tetap sedangkan pengadukan akan meningkatkan laju dispersi oksigen ke dalam larutan dan meratakan kadar oksigen diseluruh medium fermentasi. Di pinggiran fermentor juga terdapat *baffle* yang berfungsi mencegah terjadinya *vortex* (pusaran air) sehingga dapat meningkatkan efisiensi aerator. Pengaturan udara keluar dan masuk fermentor dilakukan sedemikian rupa sehingga kontaminasi dapat diminimalkan, yaitu dengan cara menggunakan filter mikroba kapas pada aliran masuk dan menggunakan larutan CuSO_4 yang bersifat oligodinamik dan mampu membunuh mikroba kontaminan.

5. Penentuan *Growth Yield*

Perolehan biomassa yang menunjukkan produktivitas proses fermentasi dinyatakan sebagai nilai konversi.

I. Destilasi

Distilasi atau penyulingan adalah suatu metode pemisahan bahan kimia berdasarkan perbedaan kecepatan atau kemudahan menguap (volatilitas) bahan. Dalam penyulingan, campuran zat dididihkan sehingga menguap, dan uap ini kemudian didinginkan kembali ke dalam bentuk cairan. Zat yang memiliki titik didih lebih rendah akan menguap lebih dulu. Metode ini merupakan unit operasi kimia jenis perpindahan massa. Penerapan proses ini didasarkan pada teori bahwa pada suatu larutan, masing-masing komponen akan menguap pada titik didihnya. Distilasi dilakukan untuk memisahkan bioetanol dari cairan.

J. Produksi Bioetanol

Produksi bioetanol dari lignoselulosa seperti tanaman rumput dapat dilakukan dengan teknologi hidrolisis menggunakan asam sulfat (H_2SO_4) atau asam klorida (HCl). Namun dengan cara ini dihasilkan bioetanol yang kecil. Selain itu, biaya produksinya besar karena menggunakan bahan kimia yang relatif mahal, menimbulkan masalah korosi serta kurang ramah lingkungan karena penggunaan asam pada proses hidrolisisnya. Prinsip dari hidrolisis pada dasarnya adalah pemutusan rantai polimer menjadi unit-unit dekstrosa ($C_6H_{12}O_6$). Pemutusan rantai polimer tersebut dapat dilakukan dengan berbagai metode, misalnya secara enzimatik, kimiawi ataupun kombinasi keduanya. Hidrolisis secara enzimatik memiliki perbedaan mendasar dibandingkan hidrolisis secara kimiawi dan fisik dalam hal spesifitas

pemutusan rantai polimer pati. Hidrolisis secara kimiawi dan fisik akan memutus rantai polimer secara acak, sedangkan hidrolisis enzimatik akan memutus rantai polimer secara spesifik pada percabangan tertentu. Sedangkan untuk pembuatan bioetanol dengan bahan baku selulosa, hidrolisisnya meliputi proses pemecahan polisakarida di dalam biomassa lignoselulosa, yaitu: selulosa dan hemiselulosa menjadi monomer gula penyusunnya.

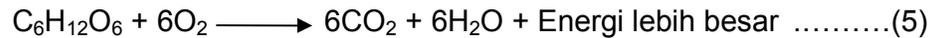
Hidrolisis sempurna selulosa menghasilkan glukosa, sedangkan hemiselulosa menghasilkan beberapa monomer gula pentose (C_5) dan heksosa (C_6). Hidrolisis dapat dilakukan secara kimia (asam) atau enzimatik. Meskipun demikian, produk akhir bioetanol yang dimaksudkan merupakan konversi dari glukosa yang didapat baik dari pati maupun selulosa. Di dalam metode hidrolisis asam, biomassa lignoselulosa dipaparkan dengan asam pada suhu dan tekanan tertentu selama waktu tertentu, dan menghasilkan monomer gula dari polimer selulosa dan hemiselulosa. Beberapa asam yang umum digunakan untuk hidrolisis asam antara lain adalah asam sulfat (H_2SO_4), asam perklorat, dan HCl. Asam sulfat merupakan asam yang paling banyak diteliti dan dimanfaatkan untuk hidrolisis asam (Taherzadeh, 2009). Cara yang lebih baik untuk produksi bioetanol yaitu dengan pengembangan teknologi bioproses dengan pendekatan enzimatik. Bioproses dengan menggunakan mikroba untuk menghasilkan enzim memiliki efisiensi sakarifikasi yang tinggi sehingga bioetanol yang dihasilkan besar. Teknologi ini juga diyakini sebagai suatu proses yang lebih ramah lingkungan karena

menggunakan enzim yang dihasilkan oleh mikroba pada proses hidrolisis maupun fermentasi yang dilakukan pada satu tempat. Proses sakarifikasi dan fermentasi yang dilakukan pada satu tempat dengan menggunakan mikroorganisme disebut sistem sakarifikasi dan fermentasi simultan atau SSF (*Simultaneous Sacharification and Fermentation*).

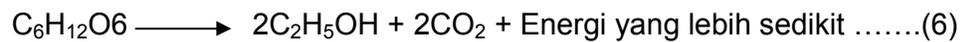
Pada proses produksi bioetanol dari rumput gajah, sebelum dilakukan fermentasi terlebih dahulu dilakukan perlakuan awal dengan menggunakan hidrogen peroksida, klorin atau asam sulfat encer dengan pemanasan pada suhu tinggi (*steaming*). Proses ini bertujuan untuk meningkatkan konversi bioetanol dari tanaman rumput gajah agar lebih optimal. Hal ini dikarenakan *pretreatment* dengan hidrogen peroksida atau asam sulfat encer serta *steaming* dapat menghancurkan kandungan lignin pada tanaman rumput sehingga mempermudah kerja enzim dalam mengakses keberadaan selulosa.

Pada penelitian ini dilakukan konversi tanaman rumput gajah menjadi bioetanol dengan menggunakan bakteri *Clostridium acetobutylicum* dimana bakteri ini dapat menghasilkan enzim selulase. Selobiosa adalah dua molekul glukosa yang saling berikatan. Jadi, selobiosa merupakan disakarida dari selulosa. Enzim selulase akan memecah selulosa menjadi glukosa. Selanjutnya hasil sakarifikasi tersebut difermentasi menjadi bioetanol. Pada proses ini akan dihasilkan energi tersebut. Energi dari proses respirasi akan digunakan oleh mikroba untuk melakukan aktivitas kehidupannya.

Secara umum, reaksinya adalah sebagai berikut :



Berdasarkan pada reaksi diatas terlihat bahwa proses respirasi memerlukan oksigen sampai kadar tertentu. Oleh karena wadah fermentasi yang ditutup rapat dan suplai oksigen di dalam sistem berkurang maka kondisi untuk terjadi reaksi diatas tidak terpenuhi, sehingga terjadilah proses fermentasi yakni perubahan glukosa menjadi bioetanol oleh mikroba. Reaksi pembentukan bioetanol dari glukosa yakni sebagai berikut :



K. Kerangka Pikir

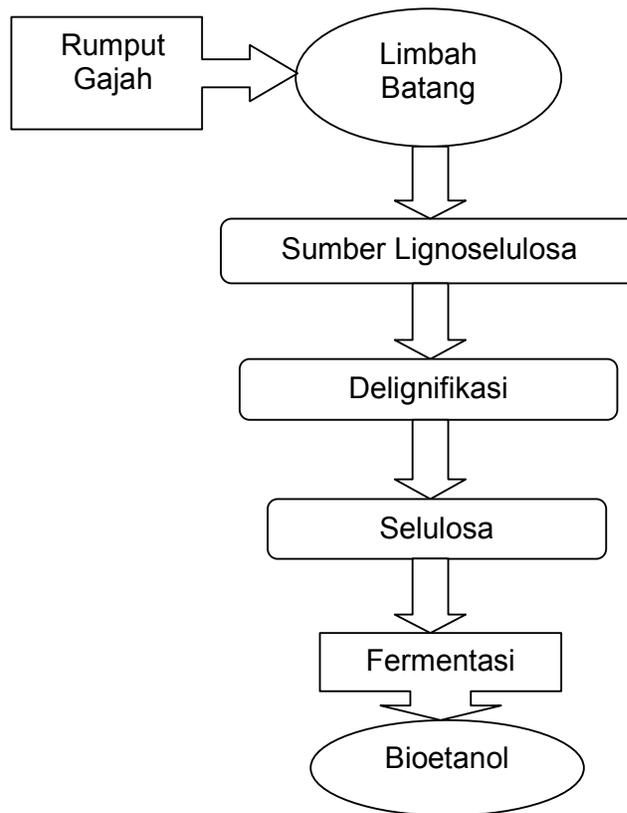
Biomassa berselulosa merupakan sumber daya alam yang berlimpah dan murah yang memiliki potensi mendukung produksi komersial industri bahan bakar seperti bioetanol dan butanol (Wyman, 1999). Biomassa berselulosa diantaranya diperoleh dari limbah pertanian, limbah perkebunan, limbah kehutanan, limbah padat kertas dan beberapa limbah industri.

Salah satu limbah pertanian yang tidak dimanfaatkan adalah batang rumput gajah. Dewasa ini rumput gajah hanya digunakan sebagai makanan ternak sapi, bahkan kadang hanya dianggap sebagai tanaman pengganggu. Batang rumput gajah hanya dibuang sebagai sampah yang mengganggu lingkungan atau dibakar. Namun batang rumput gajah merupakan biomassa yang mengandung lignoselulosa mempunyai kadar selulosa yang cukup tinggi untuk dimanfaatkan sebagai salah satu bahan penghasil bioetanol. Selulosa dapat dihidrolisis menjadi glukosa dengan menggunakan asam atau enzim. Selanjutnya glukosa yang dihasilkan dapat difermentasi menjadi bioetanol.

Itulah sebabnya maka dalam penelitian ini menggunakan batang rumput gajah sebagai sumber selulosa untuk menghasilkan bioetanol.

Pembuatan bioetanol dari biomassa lignoselulosa lebih sulit daripada gula atau pati-patian. Proses yang harus dilewati juga lebih panjang. Salah satu tantangannya adalah bahwa secara alami lignoselulosa sulit untuk dihidrolisis. Selulosa secara alami diikat oleh hemiselulosa dan dilindungi oleh lignin, ini yang menyebabkan selulosa sulit untuk dihidrolisis. Menghilangkan atau merusak pelindung lignin ini tidak mudah dan ini yang menjadi tantangan penelitian dan pengembangan teknologi produksi bioetanol dari lignoselulosa. Untuk itu diperlukan usaha untuk menghilangkan lignin dari lignoselulosa yang disebut dengan delignifikasi. Salah satu langkah yang dilakukan adalah melakukan perlakuan pendahuluan dengan menggunakan natrium hidroksida.

Tantangan berikutnya adalah menghidrolisis selulosa. Selulosa terdiri atas rantai panjang glukosa yang membentuk rantai dengan pola ikatan tertentu. Untuk memotong-motong ikatan ini bukan juga hal yang mudah. Banyak cara yang sudah dikembangkan untuk melakukan hidrolisis, yaitu berbasis asam dan berbasis enzim. Penelitian hidrolisis selulosa dengan asam sudah berkembang cukup lama. Permasalahannya adalah hidrolisis ini menggunakan bahan yang sangat korosif dan produknya pun bisa menghasilkan limbah yang berbahaya.



Gambar 11. Skema Kerangka Pikir Penelitian

Peralatan yang dibutuhkan untuk proses ini mahal demikian pula untuk mengolah hasil hidrolisis (hidrolisat) agar aman untuk fermentasi juga tidak mudah. Di sisi lain hidrolisis ini membutuhkan energi yang besar. Hidrolisis dengan enzim lebih aman (*environmental friendly*) dan lebih efisien. Namun di sisi lain, biaya untuk memproduksi enzim tidak murah. Untuk mengatasi persoalan ini maka dalam penelitian ini menggunakan bakteri *Clostridium acetobutylicum* sebagai sumber enzim selulase untuk menguraikan selulosa menjadi glukosa dan selanjutnya mengubah glukosa menjadi bioetanol. Sebuah teknologi produksi bioetanol dari lignoselulosa yang efisien dan ekonomis karena proses hidrolisis selulosa menjadi glukosa

dan selanjutnya mengubah glukosa menjadi bioetanol itu dilakukan secara serempak atau simultan.. Targetnya adalah merakit sebuah teknologi yang efisien dalam menghidrolisis selulosa dengan biaya yang rendah.

L. Hipotesis

1. Selulosa dapat diperoleh dengan cara delignifikasi batang rumput gajah sebagai substrat untuk menghasilkan bioetanol.
2. Bakteri *Clostridium acetobutylicum* menghasilkan sejumlah enzim yang dapat menghidrolisis selulosa menjadi glukosa kemudian diubah menjadi bioetanol.