



**SKRIPSI – TK141581**

**STUDI TEKNIK PRODUKSI GULA REDUKSI  
DARI LIMBAH KULIT BUAH KOPI  
(*Parchment hull / endocarp*)**

**Oleh :**

**Christa Bella R Hutapea**

**NRP. 2313 100 047**

**Romida Evannita Sitorus**

**NRP. 2313 100 056**

**Dosen Pembimbing :**

**Prof. Dr. Ir. Tri Widjaja, M.Eng.**

**NIP. 1961 10 21 1986 03 1001**

**JURUSAN TEKNIK KIMIA  
FAKULTAS TEKNOLOGI INDUSTRI  
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER  
SURABAYA  
2017**



**FINAL PROJECT – TK141581**

**STUDY OF REDUCING SUGAR  
PRODUCTION TECHNIQUE FROM  
COFFEE PULP WASTE (*Parchment Hull /  
Endocarp*)**

**By :**  
**Christa Bella R Hutapea**  
**NRP. 2313 100 047**  
**Romida Evannita Sitorus**  
**NRP. 2313 100 056**

**Advisor Lecturer :**  
**Prof. Dr. Ir. Tri Widjaja, M.Eng.**  
**NIP. 1961 10 21 1986 03 1001**

**CHEMICAL ENGINEERING DEPARTMENT  
FACULTY OF INDUSTRIAL TECHNOLOGY  
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER  
SURABAYA  
2017**

## LEMBAR PENGESAHAN

### STUDI TEKNIK PRODUKSI GULA REDUKSI DARI LIMBAH KULIT BUAH KOPI (*Parchment hull / endocarp*)

Diajukan Untuk Memenuhi Salah Satu Syarat Memperoleh Gelar  
Sarjana Teknik pada Program Studi S-1 Jurusan Teknik Kimia  
Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya

Oleh:

**Christa Bella Rotua Hutapea** (2313100047)  
**Romida Evannita Sitorus** (2313100056)

Disetujui oleh Tim Penguji Tugas Akhir:

1. Prof. Dr. Ir. Tri Widjaja, M.Eng

(.....) (Pembimbing)

2. Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M.Eng

(.....) (Penguji 1)

3. Setiyo Gunawan, S.T., Ph.D

(.....) (Penguji 2)

4. Hakun Wirawasista Aparamarta, S.T., M.MT, Ph.D

(.....) (Penguji 3)



# **STUDI TEKNIK PRODUKSI GULA REDUKSI DARI LIMBAH KULIT BUAH KOPI (*Parchment hull / endocarp*)**

**Nama Mahasiswa** : Christa Bella R H (2313100047)  
Romida E Sitorus (2313100056)  
**Jurusan** : Teknik Kimia  
**Dosen Pembimbing** : Prof. Dr. Ir. Tri Widjaja, M.Eng.

## **ABSTRAK**

Produksi gula reduksi dari lignoselulosa telah banyak menarik perhatian para peneliti dalam kurun beberapa tahun ini. Lignoselulosa dapat diperoleh dari banyak sumber seperti dari kulit kopi namun pemanfaatan kulit kopi belum optimal karena pada umumnya petani menjual limbah tersebut dengan harga murah untuk pakan ternak. Hal ini sangat disayangkan karena lahan pertanian kopi di Indonesia sangat luas dan menghasilkan limbah kulit kopi yang juga melimpah. Oleh karena itu pengolahan limbah kulit kopi menjadi gula reduksi dapat menjadi salah satu alternatif untuk mengoptimalkan pemanfaatan limbah tersebut. Limbah kulit kopi mengandung selulosa 63%, hemiselulosa 2,3%, lignin 17%, protein 11,5%, tanin 1,8-8,56% dan pektin 6,5%. Limbah yang kaya akan selulosa dan hemiselulosa tersebut sangat berpotensi untuk dimanfaatkan menjadi gula reduksi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui penurunan kadar lignin dan pektin dari hasil *pretreatment* limbah kulit kopi secara biologis menggunakan campuran mikroorganisme *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis*, dan *Trichoderma reesei* dengan variabel *Aspergillus niger* : *Trichoderma reesei* = 1:1 dan *Aspergillus niger* : *Bacillus subtilis* = 1:1. Proses *pretreatment* ini dibutuhkan karena limbah kulit kopi mengandung lignin yang cukup tinggi, sehingga perlu dilakukan degradasi lignin sebelum proses hidrolisis. Kemudian limbah kulit kopi yang telah melewati

proses *pretreatment* dihidrolisa secara enzimatik menggunakan campuran enzim selulase dan xilanase murni dengan penambahan surfaktan PEG 4000 dan Tween 80 dan biologis menggunakan mikroorganisme *Aspergillus niger* dan *Trichoderma viride* dengan penambahan surfaktan PEG 4000. Penggunaan surfaktan dapat meningkatkan konversi hidrolisa enzimatik maupun biologis, maka akan dibahas juga pengaruh konsentrasi surfaktan PEG 4000 dan Tween 80 pada proses hidrolisa enzimatik. Setelah itu dilakukan pengujian kadar glukosa, xilosa, selulosa dan hemiselulosa pada hasil hidrolisa tersebut

***Kata Kunci*** : *Hidrolisa Enzim, Limbah kulit buah kopi, PEG 4000, Tween 80.*

**STUDY OF REDUCING SUGAR PRODUCTION  
TECHNIQUE FROM COFFEE PULP WASTE  
(Parchment Hull / Endocarp)**

**Writers** : Christa Bella R H (2313100047)  
Romida E Sitorus (2313100056)  
**Department** : Teknik Kimia  
**Advisor Lecturer** : Prof. Dr. Ir. Tri Widjaja, M.Eng.

**ABSTRACT**

Production of reducing sugar from lignocellulose has attracted many researchers in the past few years. Lignocellulose can be obtained from many sources for instance coffee pulp waste. However its utilization is not optimal yet because farmers commonly sell it for animal wool at a low price. Whereas coffee farm in Indonesia is very vast and produce lots of coffee pulp waste. Therefore, the processing of coffee pulp waste into reducing sugar could be an alternative to optimize its utilization. Coffee pulp waste contains 63% of cellulose, 2,3% of hemicellulose, 17% of lignin, 11,5% of protein, 1,8-8,56% of tannin and 6,5% of pectin. It has potential to be utilized as a reducing sugar because it contains much of cellulose and hemicellulose. This study aims to determine the reduced of lignin and pectin after pretreatment of coffee pulp waste biologically using a mixture of *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis*, and *Trichoderma reesei* with variable *Aspergillus niger* : *Trichoderma reesei* = 1:1 and *Aspergillus niger* : *Bacillus subtilis* = 1:1. This pretreatment process is required because the coffee pulp waste contains lots of lignin, thus lignin has to be degrade before hydrolysis process. Then the coffee pulp waste that has been pretreated enzymatically hydrolyzed using a mixture of pure cellulase and xylanase with the addition of PEG 4000 and Tween 80 surfactant and

biologically hydrolyzed using *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride* with the addition of PEG 4000 surfactant. After that the glucose, xylose, cellulose and hemicellulose contents is examined. The use of surfactant can improve the enzymatic and biological hydrolysis conversion, therefore this study will also discuss the concentration effect of PEG 4000 and Tween 80 on enzymatic hydrolysis process.

**Keywords** : *Coffee pulp waste, Enzymatic hydrolysis, PEG 4000, Tween 80.*

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kami ucapkan kepada Tuhan YMK, atas berkat dan kasih karunia-Nya, kami dapat menyelesaikan skripsi ini dengan judul :

### **“STUDI TEKNIK PRODUKSI GULA REDUKSI DARI LIMBAH KULIT BUAH KOPI (*Parchment hull / endocarp*)”**

Penulis menyadari dalam penyusunan skripsi ini tidak akan selesai tanpa bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada :

1. Juwari, S.T., M.Eng., Ph.D selaku ketua jurusan Teknik Kimia FTI-ITS.
2. Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M.Eng selaku kepala Laboratorium Teknologi Biokimia jurusan Teknik Kimia FTI-ITS.
3. Prof. Dr. Ir. Tri Widjaja, M.Eng. selaku dosen pembimbing.
4. Bapak/Ibu dosen penguji dalam seminar proposal kami.
5. Orang tua dan keluarga atas segala kasih sayang, kesabaran, doa dan pengorbanan dalam mendidik dan membesarkan kami.
6. Teman-teman Angkatan 2013 Teknik Kimia FTI-ITS dan semua rekan-rekan Lab. Biokimia yang terus saling mendukung dan memberi semangat.
7. Seluruh civitas akademika Jurusan Teknik Kimia FTI-ITS yang telah memberikan dukungan moril kepada penulis.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini tidak luput dari berbagai kekurangan, sehingga saran dan kritik yang membangun dari pembaca sangat kami perlukan.

Surabaya, 05 Juli 2017  
Penulis

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	
LEMBAR PENGESAHAN	
ABSTRAK.....	i
ABSTRACT.....	ii
KATA PENGANTAR.....	iii
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR GAMBAR .....	vii
DAFTAR TABEL.....	ix
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	
I.1 Judul.....	I-1
I.2 Latar Belakang.....	I-1
I.3 Rumusan Masalah.....	I-5
I.4 Batasan Masalah.....	I-5
I.5 Tujuan Penelitian .....	I-6
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b>	
II.1 Limbah Kulit Kopi .....	II-1
II.2 Gula Reduksi.....	II-4
II.3 Lignoselulosa .....	II-4
II.4 Proses Pretreatment Bahan yang Mengandung Lignoselulosa .....	II-11
II.5 Proses Hidrolisis.....	II-25
II.6 Penelitian Terdahulu .....	II-32
<b>BAB III METODOLOGI PENELITIAN</b>	
III.1 Kondisi Operasi .....	III-1
III.2 Variabel yang Digunakan .....	III-1
III.3 Parameter yang Dianalisa.....	III-2
III.4 Dimensi Alat .....	III-2
III.5 Bahan yang Digunakan .....	III-3
III.6 Metode Penelitian .....	III-3
III.7 Diagram Alir .....	III-15
<b>BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN</b>	
IV.1 <i>Pretreatment</i> Kulit Buah Kopi .....	IV-1
IV.2 Produksi Enzim Selulase dan Xilanase	

Murni .....	IV-11
IV.3 Hidrolisa Enzimatis.....	IV-15
IV.4 Hidrolisa Biologis.....	IV-26
<b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN</b>	
V.1 Kesimpulan .....	V-1
V.2 Saran .....	V-1
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>x</b>

## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar II.1</b>	Struktur Buah Kopi.....	II-2
<b>Gambar II.2</b>	Contoh gula reduksi.....	II-4
<b>Gambar II.3</b>	Struktur unit penyusun hemiselulosa.....	II-6
<b>Gambar II.4</b>	Struktur Polimer Selulosa.....	II-8
<b>Gambar II.5</b>	Struktur lignin pada <i>softwood</i> .....	II-9
<b>Gambar II.6</b>	Struktur Pektin.....	II-10
<b>Gambar II.6</b>	Struktur Pektin.....	II-17
<b>Gambar II.8</b>	Rumus bangun Tween 80.....	II-30
<b>Gambar IV.1</b>	Kurva Pertumbuhan Fungi (a) <i>Trichoderma ressei</i> , (b) <i>Aspergillus niger</i> dan (c) <i>Trichoderma viride</i> .....	IV-4
<b>Gambar IV.2</b>	Kurva Pertumbuhan Bakteri <i>Bacillus subtilis</i> .....	IV-5
<b>Gambar IV.3a</b>	Grafik Hasil Analisa X-Ray Diffraction kulit buah kopi sebelum <i>pretreatment</i> .....	IV-8
<b>Gambar IV.3b</b>	Grafik Hasil Analisa X-Ray Diffraction kulit buah kopi sesudah <i>pretreatment</i> variabel BS:TR = 2:1.....	IV-8
<b>Gambar IV.3c</b>	Grafik Hasil Analisa X-Ray Diffraction kulit buah kopi sesudah <i>pretreatment</i> variabel AN:TR = 1:1.....	IV-9
<b>Gambar IV.4</b>	Kurva Standar Glukosa (dengan CMC) untuk Menguji Keaktifan Enzim Selulase.....	IV-13
<b>Gambar IV.5</b>	Kurva Standar Xilosa (dengan xilan) untuk Menguji Keaktifan Enzim Xilanase.....	IV-13
<b>Gambar IV.6</b>	Kurva Standar Glukosa (tanpa CMC) untuk Menguji Keaktifan Enzim Selulase.....	IV-16
<b>Gambar IV.7</b>	Yield Hasil Hidrolisis Enzimatik pada Berbagai Variabel.....	IV-21

<b>Gambar IV.8</b> Proses pembentukan glukosa dari selulosa pada hidrolisa enzimatis.....	IV-23
<b>Gambar IV.9</b> Yield Hasil Hidrolisis Biologis pada Berbagai Variabel .....	IV-31
<b>Gambar IV.10</b> Grafik Hasil Analisa HPLC Hidrolisa Biologis.....	IV-36
<b>Gambar IV.11</b> Grafik Hasil Analisa HPLC Hidrolisa Enzimatis.....	IV-37

## DAFTAR TABEL

<b>Tabel II.1</b> Kandungan kulit buah kopi berdasarkan metode pengolahan.....	II-2
<b>Tabel II.2</b> Komposisi kimia beberapa bahan lignoselulosa.....	II-5
<b>Tabel II.3</b> Perbandingan berbagai Jenis Proses <i>Pretreatment</i> .....	II-19
<b>Tabel Error! No text of specified style in document..1</b> Hasil Analisa Kandungan Selulosa Sebelum dan Sesudah <i>Pretreatment</i> .....	IV-6
<b>Tabel IV.2</b> CrI kulit kopi pada berbagai variabel.....	IV-10
<b>Tabel IV.3</b> Perhitungan Kurva Standar Glukosa (dengan CMC) untuk Menguji Keaktifan Enzim Selulase.....	IV-11
<b>Tabel IV.4</b> Perhitungan Kurva Standar Xilosa (dengan Xilan) untuk Menguji Keaktifan Enzim Xilanase.....	IV-12
<b>Tabel IV.5</b> Pengukuran Aktivitas Enzim Selulase dan Enzim Xilanase Murni.....	IV-14
<b>Tabel IV.6</b> Perhitungan Kurva Standar Glukosa (dengan CMC) untuk Uji Konsentrasi Gula Reduksi Hasil Hidrolisa Kulit Buah Kopi.....	IV-15
<b>Tabel IV.7</b> Hasil Analisa Gula Reduksi Hidrolisis Enzimatis pada Berbagai Variabel Surfaktan.....	IV-19
<b>Tabel IV.8</b> Hasil Analisa Gula Reduksi Hidrolisis Biologis pada Berbagai Variabel .....	IV-30
<b>Tabel IV.9</b> Yield Hasil Hidrolisa Kulit Kopi dengan Rasio <i>Aspergillus niger</i> : <i>Trichoderma viride</i> Penelitian Terdahulu.....	IV-33
<b>Tabel IV.10</b> Tabel peningkatan yield hidrolisa.....	IV-34
<b>Tabel IV.11</b> Hasil Uji HPLC Gula Reduksi.....	IV-38

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **I.1 Latar Belakang**

Produksi gula reduksi dari lignoselulosa telah banyak menarik perhatian para peneliti dalam kurun beberapa tahun ini. Pada umumnya produk samping atau limbah pertanian merupakan bahan yang mengandung lignoselulosa dari hasil samping atau limbah kegiatan pertanian dan perkebunan mulai dari pra-panen, pasca panen sampai dengan aktivitas pengolahan pangan (Mtui G.Y.S et. al, 2009). Lignoselulosa merupakan limbah biomass tanaman yang tersusun atas selulosa, hemiselulosa, dan lignin.

Salah satu limbah perkebunan yang mengandung lignoselulosa adalah kulit kopi. Kulit kopi dihasilkan dari penanganan dan pengolahan buah kopi. Limbah kulit kopi mengandung selulosa 63%, hemiselulosa 2,3%, lignin 17%, protein 11,5%, tannin 1,8-8,56% dan pektin 6,5% (Grisel Corro et. al, 2013). Sedangkan menurut hasil penelitian Pérez-Díaz et. al. pada tahun 2015 kulit kopi mengandung 46,3% selulosa, 35% hemiselulosa, 18,8% lignin dan 8,2% abu. Saat ini pemanfaatan kulit kopi belum optimal dan bernilai ekonomis tinggi, karena pada umumnya petani membuang atau menjual limbah tersebut dengan harga murah untuk pakan ternak dan kompos. Padahal jumlah produk samping ini sangat melimpah karena produktivitas tanaman kopi di Indonesia cukup tinggi. Luas areal produktif perkebunan kopi Indonesia pada tahun 2015 adalah 1.254.382 hektar, dimana luas areal sebesar 1.206.243 hektar dikelola oleh rakyat dan menghasilkan 706.770 ton kopi, sedangkan sisanya dikelola oleh pemerintah dan swasta menghasilkan 32.235 ton (Statistik Perkebunan Indonesia, 2015).

Salah satu contoh produk yang dapat dihasilkan dari limbah kulit kopi adalah gula reduksi. Gula reduksi dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku pembuatan bioetanol, tes diagnostik untuk penyakit diabetes, reaktan untuk reaksi Maillard yang muncul ketika memasak makanan bertepung, dan tingkat indikasi kualitas produk makanan seperti jus dan *wine*. Contoh gula yang termasuk gula reduksi adalah glukosa manosa, fruktosa, laktosa dan maltosa. Sifat pereduksi dari suatu gula ditentukan oleh ada tidaknya gugus hidroksil bebas yang reaktif.

Penelitian terdahulu dari hidrolisa enzimatis menggunakan surfaktan yaitu tentang mekanisme dari efek Poli Etilen Glikol (PEG 4000) pada hidrolisis enzimatis dari lignoselulosa (Li J. et al, 2012). Percobaan ini menggunakan tiga jenis substrat, yaitu ekstrak residu tongkol jagung yang merupakan produk samping pembuatan xilosa sebelum di *pretreatment* dengan gliserol (DLYMZ), setelah di *pretreatment* dengan gliserol menghasilkan lignin (Lignin) dan selulosa murni (Avicel PH-101). Jenis enzim yang digunakan adalah ACCELLERASE™ 1000.

Hasil dari penelitian ini menyatakan konversi selulosa meningkat dengan penambahan PEG 4000. Peningkatan terbaik dari konversi selulosa pada Avicel adalah pada 51% sedangkan pada DLYMZ adalah 22%. Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa efek PEG 4000 adalah untuk mengurangi adsorpsi lignin yang tidak produktif. Namun pada Avicel yang merupakan substrat selulosa murni, konversi substrat tersebut juga meningkat dengan penambahan PEG 4000. Maka kehadiran lignin tidak memberikan efek positif yang penting pada hidrolisis enzim dengan PEG 4000. Namun dari hasil efek PEG 4000 pada adsorpsi selulosa pada substrat lignoselulosa, untuk sampel lignin kapasitas adsorpsi menurun sebanyak 88% dengan penambahan PEG 4000 dan untuk substrat selulosa menurun 44%. Hasil ini membuktikan bahwa PEG 4000 memang mengurangi adsorpsi lignin yang tidak produktif,

namun tidak hanya lignin, PEG 4000 juga mengurangi adsorpsi komponen lignoselulosa lainnya. Efek PEG 4000 juga untuk mencegah deaktivasi selulase yang terimbas oleh selulase dan untuk menaikkan penghilangan amorf selulosa.

Selain itu terdapat penelitian terdahulu mengenai hidrolisis enzimatik menggunakan surfaktan tween 20 berjudul “pendekatan optimisasi dari hidrolisis enzimatik dari bagas tebu dengan *pretreatment* organosolv” oleh Mesa L et. al pada tahun 2010. Pembuatan etanol dari bagas tebu ini dilakukan dengan proses *pretreatment* organosolv kemudian diikuti dengan hidrolisis enzimatik lalu proses akhir yaitu fermentasi. Penelitian ini akan membahas tentang efek dari variabel operasi yang digunakan (tipe katalis, konsentrasi dan waktu *pretreatment*) dan tahap-tahap hidrolisis enzimatik (konsentrasi substrat, penambahan xilanase dan tween 20, dan rasio selulase- $\beta$ -glukosidase). Hasil terbaik dari konsentrasi glukosa yang diperoleh adalah 28,8 g/L dan yield 25,1 g/100g diperoleh ketika substrat dipretreatment dengan 1,25% (w/w) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> selama 60 menit, dan selanjutnya di hidrolisis menggunakan konsentrasi substrat sebesar 10% (w/v) dengan penambahan xilanase (300 UI/g) dan tween 20 (2,5% w/w). Fermentasi substrat dilakukan dengan kondisi optimum ini menggunakan mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae* menghasilkan yield etanol sebesar 92,8% selama 24 jam. Penambahan tween 20 menghasilkan efek yang paling signifikan pada yield etanol dibandingkan variabel yang lain. Hal tersebut karena: (1) surfaktan dapat mengubah struktur substrat sehingga membuat selulosa lebih mudah dihidrolisis oleh enzim. (2) surfaktan meningkatkan stabilitas enzim dengan mengurangi denaturasi thermal dan (3) surfaktan mempengaruhi interaksi antara enzim dan substrat, dimana surfaktan mencegah enzim yang terabsorpsi dari proses inaktivasi.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui penurunan kadar lignin dari hasil *pretreatment* limbah kulit kopi secara

biologis menggunakan mikroorganisme *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis*, dan *Trichoderma reesei*. Yang kedua mengetahui kadar glukosa dan xilosa hasil hidrolisis limbah kulit kopi secara enzimatis menggunakan campuran enzim selulase dan xilanase murni dan biologis menggunakan mikroorganisme *Aspergillus niger* dan *Trichoderma viride*. Yang ketiga mengetahui pengaruh penambahan surfaktan PEG 4000 dan Tween 80 dengan berbagai konsentrasi pada proses hidrolisis enzimatis.

Proses *pretreatment* pada penelitian ini bertujuan untuk mempermudah akses enzim selulase untuk menghidrolisa selulosa menjadi monomer-monomer gula dan untuk menurunkan kadar lignin. Dibanding metode *pretreatment* lainnya, *pretreatment* secara biologis menggunakan mikroorganisme lebih aman, ramah lingkungan dan tidak membutuhkan energi yang besar untuk mendegradasi lignin dari biomassa lignoselulosa (Kumar et. al, 2009). Mikroorganisme yang digunakan adalah *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis* dan *Trichoderma reesei* karena *Aspergillus niger* secara efektif dapat mendegradasi lignin dan pektin, *Bacillus subtilis* dapat mendegradasi pektin dan *Trichoderma reesei* dapat mendegradasi lignin. (Shahzadi et. al, 2014)

Selulosa dan hemiselulosa yang dihasilkan dari *pretreatment* biologis kemudian dihidrolisa secara enzimatis menggunakan enzim selulase dan xilanase murni dan biologis menggunakan mikroorganisme *Aspergillus niger* dan *Trichoderma viride* untuk menghasilkan glukosa dan xilosa. Pemilihan metode hidrolisis secara enzimatis berdasar pada penelitian terdahulu yang menyatakan bahwa hidrolisis enzimatis dapat menghasilkan yield glukosa murni yang tinggi dengan proses yang spesifik, dapat dilakukan dalam suhu operasi rendah, konsumsi energi rendah dan tidak menyebabkan korosi (Mesa et. al, 2010). Pemilihan metode hidrolisis secara biologis karena mikroorganisme yang digunakan pada proses ini akan menghasilkan fungal selulase,

dimana fungsinya sama dengan enzim yang digunakan pada proses enzimatik, namun yield yang dihasilkan tidak lebih bagus dari proses enzimatik, karena proses enzimatik menggunakan enzim murni. Proses hidrolisis enzimatik pada penelitian ini juga menggunakan surfaktan PEG 4000 dan Tween 80 yang berguna untuk memperbesar nilai konversi hidrolisis enzimatik substrat biomassa dan mencegah deaktivasi enzim selulase (Li J. et al, 2011).

## **I.2 Rumusan Masalah**

1. Perlu dipelajari alternatif pembuatan gula reduksi dengan proses yang ramah lingkungan dan dihasilkan dari bahan yang dapat diperbaharui dan murah seperti limbah kulit kopi.
2. Ketersediaan limbah biomass yang mengandung lignoselulosa sangat melimpah di Indonesia salah satunya adalah limbah kulit kopi. Pemanfaatan limbah tersebut belum optimal, khususnya untuk dijadikan gula reduksi.
3. Proses hidrolisis dilakukan dengan menggunakan enzim selulase dan xilanase murni. Namun, dari segi ekonomi, harga enzim murni cukup mahal maka dilakukan pretreatment secara biologis untuk menghilangkan lignin sebelum dilakukan proses hidrolisis agar enzim selulase dan xilanase tidak terabsorpsi oleh lignin.
4. Efek surfaktan pada interaksi antara enzim xilanase dengan lignin belum sepenuhnya jelas, oleh karena itu akan dibahas efek surfaktan PEG 4000 dan Tween 80 pada adsorpsi/desorpsi xilanase dari/ke lignin dari limbah kulit buah kopi.

## **I.3 Batasan Masalah**

1. Bahan baku yang digunakan adalah limbah kulit kopi Robusta dari PTPN XII Malang, Jawa Timur.

2. *Pretreatment* limbah kulit kopi dilakukan secara biologis dengan menggunakan mikroorganisme *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis* dan *Trichoderma reesei*.
3. Hidrolisa limbah kulit kopi dilakukan secara biologis (mikroorganisme *Aspergillus niger* dan *Trichoderma viride*) dengan penambahan surfaktan PEG 4000 dan enzimatik (enzim selulase dan xilanase murni) dengan penambahan berbagai konsentrasi surfaktan PEG 4000 dan Tween 80.

#### **I.4 Tujuan Penelitian**

1. Mengetahui penurunan kadar lignin dan pektin dari hasil *pretreatment* limbah kulit kopi secara biologis menggunakan mikroorganisme *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis*, dan *Trichoderma reesei*.
2. Mengetahui kadar glukosa hasil hidrolisis limbah kulit kopi secara enzimatik menggunakan campuran enzim selulase dan xilanase murni dan biologis menggunakan mikroorganisme *Aspergillus niger* dan *Trichoderma viride*.
3. Mengetahui pengaruh penambahan surfaktan PEG 4000 dan Tween 80 dengan berbagai konsentrasi pada proses hidrolisis enzimatik.

#### **I.5 Manfaat Penelitian**

1. Pemanfaatan limbah biomass kulit kopi yang memiliki kadar selulosa dan hemiselulosa yang cukup besar (65,3%) menjadi gula reduksi.
2. Dapat digunakan menjadi bahan baku pembuatan bioetanol yang merupakan sumber energi ramah lingkungan.
3. Hasil penelitian ini digunakan sebagai bahan baku pembuatan bioetanol untuk penelitian selanjutnya.
4. Menjadi referensi penelitian pemanfaatan limbah biomass limbah kulit kopi selanjutnya.

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **II.1 Limbah Kulit Kopi**

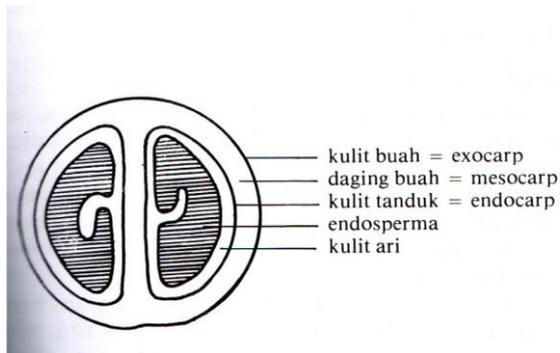
Bahan baku utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah limbah kulit kopi hasil pengolahan perkebunan kopi. Kopi yang sudah digiling, direndam, dan dicuci akan meninggalkan limbah kulit kopi. Menurut Direktorat Pascapanen Dan Pembinaan Usaha Direktorat Jenderal Perkebunan - Kementerian Pertanian (2010), dalam 1 ha areal pertanaman kopi akan memproduksi limbah segar sekitar 1,8 ton. Limbah kulit kopi ini berikutnya hanya akan ditumpuk dan tidak dimanfaatkan secara optimal. Pemanfaatan secara optimal hanya dilakukan pada biji kopi.

Buah kopi yang telah matang dapat dibedakan menjadi dua bagian utama, yaitu biji dan kulit, namun dalam pengertian umum buah kopi terdiri dari kulit buah, daging buah, dan biji.

Buah kopi terdiri dari beberapa lapisan dari luar kedalam yaitu :

1. Eksokarp yaitu lapisan terluar dari, biasanya satu lapisan tipis yang akan berwarna merah apabila sudah matang.
2. Mesokarp yaitu lapisan dibawah eksokarp, mengandung serabut yang terdiri dari satu lapisan atau lebih, biasanya lebih tebal, dan manis apabila sudah matang.
3. Endokarp yaitu lapisan terdalam dari, terdiri atas jaringan sel berding tebal, merupakan lapisan tanduk yang menjadi batas kulit dan biji.
4. Spermoderm/kulit ari merupakan kulit yang paling tipis dan menempel pada kulit kopi.
5. Endosperm atau keping biji, merupakan bagian buah kopi yang diambil dan dimanfaatkan menjadi bubuk kopi.

(Kustantini, 2014)



**Gambar II.1** Struktur buah kopi

Kandungan zat makanan kulit buah kopi dipengaruhi oleh metode pengolahannya apakah secara basah atau kering seperti. Pada metode pengolahan basah, buah kopi ditempatkan pada tangki mesin pengupas lalu disiram dengan air, mesin pengupas bekerja memisahkan biji dari kulit buah. Sedangkan pengolahan kering lebih sederhana, biasanya buah kopi dibiarkan mengering pada batangnya sebelum dipanen. Selanjutnya langsung dipisahkan biji dan kulit buah kopi dengan menggunakan mesin. Limbah kopi lalu dikumpulkan dan dibiarkan hingga busuk selanjutnya, ditebarkan di sekeliling pohon kopi. Tujuannya adalah sebagai pengganti pupuk yang menyuburkan tanaman. Selain sebagai kompos/dekomposer, limbah kulit kopi juga digunakan sebagai bahan baku pembuatan jamu, ataupun sebagai pakan ternak.

**Tabel II.1** Kandungan zat makanan kulit buah kopi berdasarkan metode pengolahan

Metode Pengolahan	Bahan Kering (%)	% Bahan Kering				
		Protein	Serat	Abu	Lemak	Bahan Lain
Basah	23	12.8	24.1	9.5	2.8	50.8
Kering	90	9.7	32.6	7.3	1.8	48.6

(Murni, 2008)

Sistematika tanaman kopi robusta, *Coffea robusta*, menurut Rahardjo, 2012 adalah sebagai berikut:

Kingdom : *Plantae*

Sub kingdom : *Tracheobionita*

Divisi : *Magnoliophyta*

Kelas : *Magnoliopsida*

Sub Kelas : *Astridae*

Ordo : *Rubiaceae*

Genus : *Coffea*

Spesies : *Coffea robusta*

Kopi robusta memiliki tekstur lebih kasar dari kopi arabika. Dalam pertumbuhannya, kopi robusta hampir sama dengan kopi arabika yakni tergantung pada kondisi tanah, cuaca, proses pengolahan. Kopi robusta biasanya digunakan sebagai kopi instant atau cepat saji. Kopi robusta memiliki kandungan kafein yang lebih tinggi, rasanya lebih netral, serta aroma kopi yang lebih kuat. Kandungan kafein pada kopi robusta mencapai 2,8% serta memiliki jumlah kromosom sebanyak 22 6 kromosom.

Kandungan kimia buah kopi antara lain:

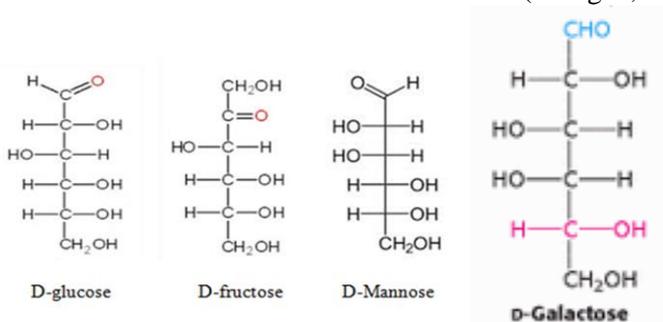
1. Air : 11,23%	11. Vitamin B6 :
2. Kafein : 1,21%	0,143%
3. Lemak : 12,27%	12. Vitamin B12 :
4. Gula : 8,55%	0,00011%
5. Selulosa :	13. Sodium : 4%
18,87%	14. Ferrum : 3,7%
6. Nitrogen :	15. Fluor : 0,45%
12,07%	16. Hemiselulosa :
7. Protein: 11.5 %	2,3 %
8. Abu : 3,92%	17. Lignin : 17%
9. Vitamin B1 :	18. Tannin : 1,8-
0,2%	8,56 %
10. Vitamin B2 :	19. Pektin : 6,5 %
0,23%	

(Kustantini, 2014)

## II.2 Gula Reduksi

Gula reduksi adalah golongan gula yang dapat mereduksi senyawa-senyawa penerima elektron. Ujung dari gugus gula reduksi mengandung gugus aldehid atau keton bebas. Gugus aldehid bebas ini sangat mudah mereduksi sampel lain dan gugus aldehid menjadi gugus karbonil. Yang termasuk dalam golongan gula reduksi adalah semua monosakarida dan disakarida kecuali sukrosa. Analisa yang dapat digunakan untuk mengetahui golongan gula reduksi adalah analisis Nelson-Somogyi. Dalam analisa ini, sampel akan direaksikan dengan arsenomolybdat yang akan menghasilkan molybdine biru, bahan berwarna biru ini kemudian akan diukur nilai absorbansinya. Intensitas warna biru yang terbentuk ekivalen dengan jumlah gula reduksi dalam sampel. Jika nilai absorbansinya semakin tinggi maka kandungan gula reduksi dalam sampel semakin banyak.

(Maligan, 2014)



Gambar II.2 Beberapa contoh gula reduksi

## II.3 Lignoselulosa

Lignoselulosa adalah jaringan yang tersusun dari mikrofibril selulosa yang membentuk kluster-kluster, dengan ruang antar mikrofibril terisi dengan hemiselulosa dimana kluster-kluster tersebut terikat kuat oleh lignin membentuk satu kesatuan. Secara kimia, lignoselulosa mengandung tiga

komponen utama yaitu lignin, selulosa, dan hemiselulosa, serta sedikit kandungan lain. Lignoselulosa umumnya dijumpai pada tanaman tak berkayu (*Softwood*) dan tanaman berkayu (*Hardwood*), sehingga sel kayu biasa dipakai untuk meneliti lignoselulosa.

(Litbang Pertanian, 2010)

**Tabel II.2** Komposisi kimia beberapa bahan lignoselulosa

Bahan	Selulosa (%)	Hemiselulosa (%)	Lignin (%)
Kulit kacang	25-30	25-30	30-40
Tongkol jagung	45	35	15
Jerami padi	32.1	24	18
Serat kapas	80-95	5-20	0
Serat kapuk	64	23	13
Tandan sawit	35.71	29.86	21.97
Kertas	85-99	0	0-15
Bagas	33.4	30	18.9
Kertas koran	40-55	25-40	18-30
Rumput	45	31.4	12

(Darnoko, 2003)

### A. Hemiselulosa

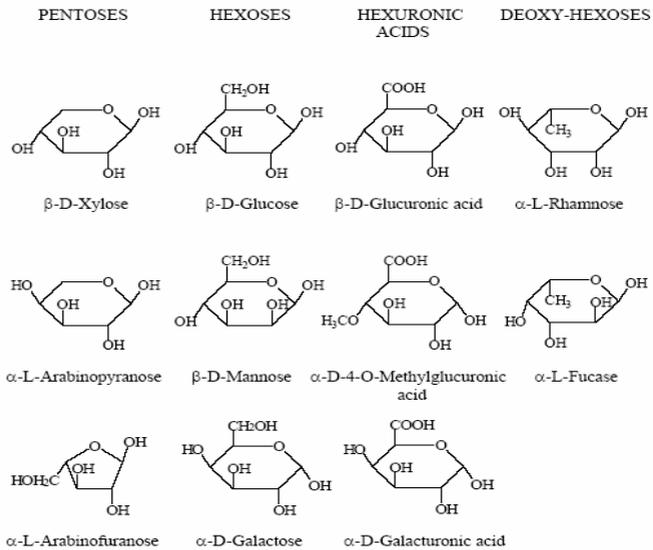
Hemiselulosa termasuk dalam kelompok polisakarida heterogen yang dibentuk melalui jalan biosintesis yang berbeda dari selulosa. Hemiselulosa relatif mudah dihidrolisis oleh asam menjadi komponen-komponen monomer hemiselulosa terdiri dari D-glukosa, D-manosa, D-galaktosa, D-xilosa, L-arabinosa, dan sejumlah kecil L-ramnosa di samping menjadi asam D-glukuronat, asam 4-Ometil-D-glukuronat, dan asam D-galakturonat. Kebanyakan

hemiselulosa mempunyai derajat polimerisasi hanya 200.

(Palonen, 2004; Sjöström, 1998).

Hemiselulosa mempunyai rantai polimer yang pendek dan tak berbentuk, oleh karena itu sebagian besar dapat larut dalam air. Rantai utama dari hemiselulosa dapat berupa homopolimer (umumnya terdiri dari satu jenis gula yang berulang) atau juga berupa heteropolimer (campurannya beberapa jenis gula).

(Ibrahim, 1998)



**Gambar II.3** Struktur unit penyusun hemiselulosa

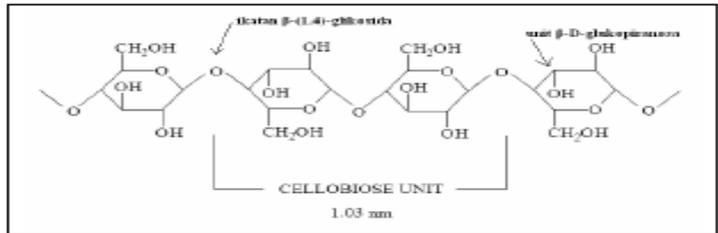
Hemiselulosa yang terkandung pada *hardwood* utamanya adalah xilan (15 – 30%) yang terdiri atas unit-unit xilosa yang dihubungkan oleh ikatan  $\beta$ -(1,4)-glikosida dengan percabangan berupa unit asam 4-O-methylglucuronic dan ikatan  $\alpha$ -(1,2)-

glikosida. Gugus O-asetil terkadang menggantikan gugus OH pada posisi C2 dan C3. Pada *softwood* kandungan hemiselulosa terbesar adalah galaktoglukomanan (15 – 20%) , xilan (7 – 10%), dan gugus asetil. Xilan pada *softwood* memiliki cabang berupa unit arabiofuranosa yang dihubungkan oleh ikatan  $\alpha$ -(1,3)- glikosida.

(Ibrahim, 1998)

## **B. Selulosa**

Selulosa adalah komponen utama kayu, kira-kira 40 – 50 % kayu kering. Selulosa merupakan homopolisakarida yang tersusun atas unit-unit  $\beta$ -D-glukopiranosida yang terikat satu sama lain dengan ikatan-ikatan  $\beta$ -(1,4)-glikosida. Molekul-molekul selulosa seluruhnya berbentuk linier dan mempunyai kecenderungan kuat membentuk ikatan-ikatan hidrogen intra- dan intermolekul. Memiliki struktur yang berserat dan ikatan-ikatan hidrogen yang kuat, selulosa mempunyai kekuatan tarik yang tinggi dan tidak larut dalam kebanyakan pelarut. Selulosa tidak berwarna, tidak mempunyai rasa dan bau, tidak larut dalam air atau larutan basa, relatif stabil terhadap panas, tidak meleleh jika dipanaskan, mulai terurai (dekomposisi) pada temperatur 260 – 270 °C, tahan terhadap hidrolisis, dan stabil terhadap oksidasi. Tetapi selulosa akan larut dalam larutan asam mineral dengan konsentrasi tinggi (akibat hidrolisis), dan jika hidrolisisnya belum berlangsung terlalu jauh maka selulosa dapat diendapkan kembali membentuk fragmen-fragmen padatan polimer dengan berat molekul yang lebih kecil melalui pengenceran larutan dalam asam kuat tersebut dan air. Selulosa baru mengalami hidrolisis dalam asam mineral encer pada temperatur yang tinggi (>100 °C).



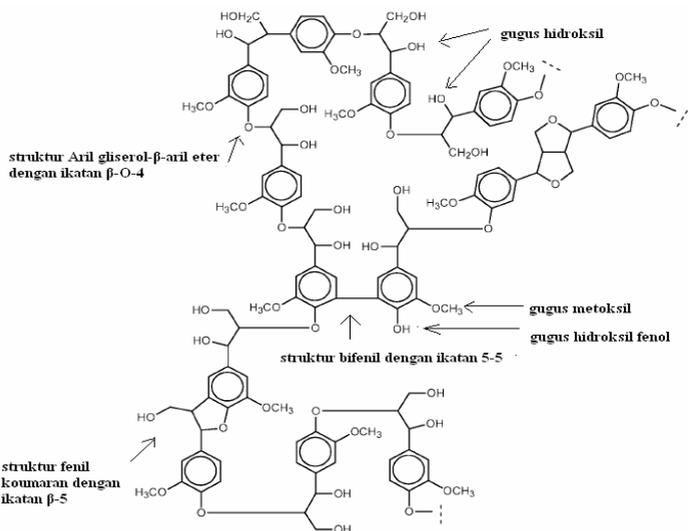
**Gambar II.4** Struktur selulosa  
(Litbang Pertanian, 2010)

### C. Lignin

Lignin merupakan komponen kimia dan morfologi yang karakteristik dari jaringan tumbuhan tinggi, seperti *pteridovita* dan *spermatofita* (*gymnosperm* dan *angiosperm*), dimana ia terdapat dalam jaringan vaskuler yang khusus untuk pengangkutan cairan dan memberikan kekuatan mekanik sedemikian rupa sehingga tumbuhan yang besar seperti pohon yang tingginya lebih dari 100 m tetap dapat berdiri kokoh.

(Fengel, 1984)

Struktur molekul lignin sangat berbeda bila dibandingkan polisakarida karena terdiri atas sistem aromatik yang tersusun atas unit-unit fenilpropana: unit *guaiacyl* (G) dari prekursor *trans*-koniferil alkohol, unit *syringyl* (S) dari prekursor *trans*-sinapil alkohol, dan *phidroksipenil* (H) dari prekursor *trans*-p-koumaril alkohol (Palonen, 2004). Unit-unit fenilpropana ini kemudian berikatan dengan struktur-struktur minor sehingga membentuk suatu jaringan polimer yang dikenal dengan nama lignin.



**Gambar II.5** Struktur lignin pada *softwood*

Lignin adalah polimer berkadar aromatik-fenolik yang tinggi, berwarna kecoklatan, dan relatif lebih mudah teroksidasi. Lignin memiliki berat molekul yang bervariasi antara 1000 sampai dengan 20.000, tergantung pada sumber biomasnya. Lignin relatif stabil terhadap aksi kebanyakan larutan asam mineral, tetapi larut dalam larutan basa panas dan larutan ion bisulfit ( $\text{HSO}_3^-$ ) panas. Lignin mempunyai titik pelunakan dan titik leleh yang rendah, lignin kayu berdaun jarum (pohon *spruce*) melunak pada 80 – 90 °C (basah) dan 120 °C (kering) dan meleleh pada 140 – 150 °C.

(Litbang Pertanian, 2010)

#### D. Pektin

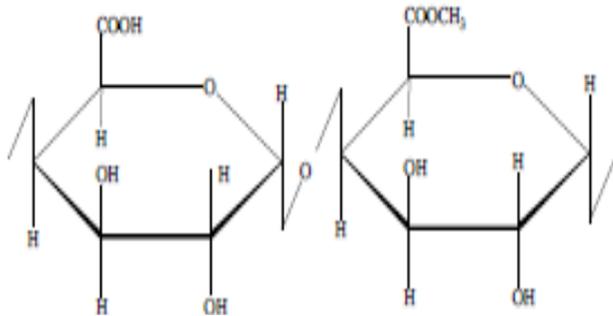
Pektin merupakan polisakarida, komponen utama adalah polimer linier dari asam D-galakturonat yang berikatan dengan ikatan 1,4- $\alpha$ -glikosidik. Asam D-

galakturonat memiliki struktur yang sama seperti struktur D-galaktosa, perbedaannya terletak pada gugus alkohol primer C6 yang memiliki gugus karboksilat. Sebagian gugus karboksilat pada polimer pektin mengalami esterifikasi dengan metil menjadi gugus metoksil dan biasanya mengandung sekitar 8,0-11,0% gugus metoksil.

(Hart, 2003)

Pektin bersifat koloid reversibel, tidak larut dalam alkohol dan dalam pelarut organik lainnya seperti metanol, aseton, atau propanol. Kelarutan pektin meningkat seiring kenaikan derajat esterifikasi dan turunnya berat molekul. Larutan dari pektin bersifat asam karena adanya gugus karboksilat. Pemanasan dengan asam akan menyebabkan reaksi hidrolisis menghasilkan gugus ester metil.

Viskositas larutan pektin bergantung pada berat molekul, derajat esterifikasi, pH, temperatur dan konsentrasi elektrolit. Peningkatan konsentrasi elektrolit akan menyebabkan menurunnya viskositas.



**Gambar II.6** Struktur pektin

(Syah. MN, 2011)

## II.4 Proses Pretreatment Bahan yang Mengandung Lignoselulosa

Gula reduksi dapat dihasilkan dengan menghidrolisa selulosa dan hemiselulosa yang terdapat dalam *softwood* maupun *hardwood* dengan bantuan enzim. Proses hidrolisa selulosa dalam lignoselulosa jauh lebih sulit dibandingkan hidrolisis selulosa yang bebas karena lignoselulosa merupakan bahan yang amat rapat sehingga pada kondisi biasa bersifat inert dan tak bisa ditembus oleh air apalagi enzim. Oleh sebab itu diperlukan suatu proses awal (*pretreatment*) untuk mempersiapkan bahan agar dapat disakarifikasi oleh enzim. Tanpa adanya *pretreatment*, gula yang dihasilkan dari hidrolisis kurang dari 20%, sedangkan dengan adanya *pretreatment* hasilnya meningkat menjadi 90% bahkan lebih. Untuk meningkatkan luas permukaan dari lignoselulosa dilakukan proses pengecilan ukuran (*size reduction*) sebagai langkah awal pengolahan. Pada banyak proses digunakan bahan lignoselulosa yang berukuran  $< 3$  mm. Keberhasilan *pretreatment* ini ditentukan oleh besarnya kandungan lignin dan pektin yang hilang dari bahan.

(Syah. MN, 2011)

### A. Pretreatment Fisika

*Pretreatment* ini bertujuan untuk mengurangi ukuran partikel bahan baku. Pengurangan ukuran ini merupakan salah satu cara yang paling efektif untuk meningkatkan aksesibilitas enzim ke bahan lignoselulosa. Keunggulan utama dari metode ini adalah ramah lingkungan karena tidak menggunakan bahan-bahan kimia dan tidak menghasilkan residu berbahaya. Berbagai perlakuan fisika ini telah banyak diujicoba namun sebagian besar perlakuan fisika tersebut memerlukan banyak energi sehingga tidak layak secara ekonomi. Selain itu, pemecahan lignin juga tidak berjalan dengan optimal. Metode *pretreatment* fisika antara lain:

- Milling
- Steam pretreatment
- Iradiasi sinar gamma
- Gelombang ultrasonik
- Pirolisis

(Hidayat, 2013)

## **B. Pretreatment Kimia**

*Pretreatment* kimia mempunyai tujuan utama untuk meningkatkan biodegradasi selulosa dengan menghilangkan lignin. Metode ini juga bertujuan menurunkan tingkat polimerisasi dan kristalinitas komponen selulosa. *Pretreatment* kimia ini awalnya dikembangkan di industri kertas untuk delignifikasi bahan selulosa agar dihasilkan kertas yang baik.

- Pretreatment Asam

Pada *pretreatment* ini, digunakan larutan asam sebagai katalisnya. Asam memiliki pengaruh yang kuat pada lignin dibandingkan pada struktur kristalin selulosa. Tujuan utama metode ini adalah melarutkan sebagian hemiselulosa agar enzim selulase dapat menjangkau struktur selulosa. Metode ini dapat dibagi menjadi dua kelompok, yakni perlakuan dengan asam pekat dan perlakuan dengan asam encer. Perlakuan dengan asam pekat kurang disukai pada produksi bioetanol karena dapat meningkatkan pembentukan senyawa inhibitor, menyebabkan korosi pada peralatan, dan sulit *recovery* asam yang digunakan. Sebaliknya, *pretreatment* dengan asam encer lebih disukai untuk produksi bioetanol.

Meskipun penggunaan asam encer ini menghasilkan produk degradasi yang lebih rendah dari asam pekat tetapi berbagai studi menunjukkan bahwa metode ini paling sesuai untuk diterapkan pada produksi bioetanol skala besar. Beberapa kelebihan metode ini adalah: 1) Metode ini dapat dilakukan pada

suhu tinggi dalam waktu singkat atau menggunakan suhu yang lebih rendah tetapi dalam waktu yang lebih lama; 2) Asam yang digunakan bukan hanya dapat melarutkan hemiselulosa tetapi juga dapat mengkonversi hemiselulosa yang terlarut menjadi gula; 3) Metode ini dapat mengurangi pemakaian hemiselulase selama proses hidrolisis enzimatik. Berbagai larutan asam yang dapat digunakan antara lain asam sulfat ( $H_2SO_4$ ), asam klorida ( $HCl$ ), asam nitrat ( $HNO_3$ ) dan asam fosfat ( $H_3PO_4$ ). Berdasarkan hasil hidrolisis enzimatik, pemakaian asam sulfat untuk *pretreatment* bahan lignoselulosa diketahui lebih baik dibandingkan dengan pemakaian larutan asam lainnya.

- *Pretreatment* Basa

Metode *pretreatment* basa dalam pengolahan biomassa lignoselulosa umumnya menggunakan basa seperti natrium, kalium, kalsium, dan amonium hidroksida. Pemakaian basa menyebabkan perubahan struktur lignin dengan cara mendegradasi ester dan rantai sampingglukosidiknya. Penggunaan basa juga menyebabkan dekrystalisasi parsial selulosa, solvasi parsial hemiselulosa dan mengakibatkan selulosa membesar. Proses ini dilakukan dengan cara merendam biomassa dalam larutan alkali pada suhu dan waktu yang telah ditentukan. Tahap netralisasi perlu dilakukan sebelum masuk tahap hidrolisis enzimatik untuk menghilangkan lignin dan zat inhibitor (misalnya garam, asam fenolik, dan aldehyd).

(Menon dan Rao, 2012)

Dibandingkan *pretreatment* asam metode ini lebih efektif dalam solubilisasi lignin, sebaliknya kurang dalam mendegradasi selulosa dan hemiselulosa. Efektifitas metode ini juga tergantung kadar lignin

pada biomassa. NaOH, KOH, Ca(OH)<sub>2</sub>, dan NH<sub>4</sub>OH merupakan larutan basa yang terbukti efektif mendegradasi biomassa lignoselulosa. Sebagai contoh, NaOH mampu meningkatkan tingkat degradasi kayu keras dari 14% menjadi 55% dengan cara mengurangi kadar ligninnya dari 55% menjadi 20%. *Pretreatment* berbagai biomassa lignoselulosa seperti jerami gandum, rumput, kayu keras, dan kayu lunak menggunakan NaOH juga mampu mengurangi kadar lignin menjadi kurang dari 26%. Sedangkan berdasarkan Sun *et al.*, (1995) kondisi optimal yang diperlukan untuk mengurangi 60% kadar lignin dan 80% hemiselulase pada jerami gandum adalah menggunakan 1,5% NaOH selama 144 jam pada suhu 20°C.

- *Organosolv*

Metode *pretreatment* organosolv menggunakan pelarut organik/*aqueous* (etanol, metanol, etilen glikol, gliserol, dll) untuk mengekstrak lignin dan meningkatkan aksesibilitas selulase. Pelarut organik yang dicampur dengan air digunakan untuk merendam biomassa untuk selanjutnya dipanaskan pada suhu 100-250°C. Penambahan asam (HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, oksalat, atau salisilat) sebagai katalis dilakukan jika proses dibawah suhu 185-210°C. Penambahan asam juga dapat meningkatkan laju delignifikasi dan menghasilkan xilosa lebih banyak. Penggunaan etanol dan metanol lebih disukai karena memiliki massa jenis yang rendah, titik didih rendah dan lebih murah dibandingkan bahan pelarut lainnya. Salah satu masalah utama pada metode ini adalah diperlukannya proses penghilangan pelarut menggunakan evaporasi atau kondensasi. Pemisahan pelarut dilakukan agar tidak menghambat proses hidrolisis enzimatik dan fermentasi oleh

mikroorganisme. Masalah lainnya adalah harga pelarut yang relatif mahal dan tingginya zat inhibitor (seperti furfural dan fenol) yang dihasilkan selama proses *pretreatment*.

(Hidayat, 2013)

### **C. Pretreatment Secara Biologis**

*Pretreatment* secara biologis menggunakan mikroorganisme pendegradasi kayu dan zat penyusunnya seperti lignin, hemiselulosa, dan selulosa. Kelompok utama mikroorganisme tersebut adalah jamur pembusuk putih dan coklat, serta jamur pembusuk lunak. Mikroorganisme tersebut diketahui mampu merubah komposisi kimia dan struktur biomassa lignoselulosa. Berbagai jamur pembusuk putih seperti *Phanerochaete chrysosporium*, *Ceriporia lacerata*, *Cyathus stercolerus*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Pycnoporus cinnabarinus*, dan *Pleurotus ostreatus* diketahui mempunyai efisiensi delignifikasi yang tinggi. Secara umum, kelompok cendawan pembusuk coklat dan pembusuk lunak mendegradasi selulosa dan sedikit memodifikasi lignin. Sedangkan kelompok cendawan pembusuk putih secara aktif mendegegradasi komponen lignin. Banyak

penelitian akhir-akhir ini yang mencoba untuk mencari organisme yang dapat mendegradasi lignin secara efektif dan spesifik. Cendawan pembusuk putih saat ini dianggap sebagai kelompok yang potensial untuk *biopretreatment* biomassa.

Berdasarkan Itoh *et al.* (2003) dan Munoz *et al.* (2007) *pretreatment* secara biologis dapat digabungkan dengan *pretreatment* organosolv pada produksi etanol dengan substrat *Pinus radiata*, *Acacia dealbata* dan potongan kayu. Hasil penelitian mereka

menunjukkan bahwa proses delignifikasi secara biologis dan kimiawi dapat berperan sinergis dengan cara meningkatkan sakarifikasi selulosa dan mengurangi proses yang berbahaya. Beberapa kelebihan *pretreatment* ini adalah: biaya rendah, pemakaian energi yang rendah, tidak menggunakan bahan kimia, dampak terhadap lingkungan sedikit, dan tidak dihasilkan zat inhibitor. Sedangkan kekurangan metode ini adalah masih rendahnya laju hidrolisis yang dihasilkan, sebagian besar mikroorganisme lignolitik mengkonsumsi tidak hanya lignin tetapi juga hemiselulosa dan selulosa, proses *pretreatment*-nya memerlukan waktu yang lama dan pertumbuhan mikroorganisme perlu terus dikontrol.

Mikroorganisme yang akan digunakan dalam penelitian ini antara lain:

#### ***Aspergillus niger***

*Aspergillus niger* merupakan salah satu spesies paling umum dan mudah diidentifikasi dari marga *Aspergillus*. *Aspergillus niger* dapat tumbuh pada suhu 35°C-37°C (optimum), 6°C-8°C (minimum), 45°C-47°C (maksimum) dan memerlukan oksigen yang cukup (aerobik). *Aspergillus niger* memiliki bulu dasar berwarna putih atau kuning dengan lapisan konidiospora tebal berwarna coklat gelap sampai hitam. Kepala konidia berwarna hitam, bulat, cenderung memisah menjadi bagian-bagian yang lebih longgar dengan bertambahnya umur. Konidiospora memiliki dinding yang halus dan berwarna coklat.



**Gambar II.7** Morfologi jamur *Aspergillus niger*  
(Hidayat, 2007)

*Aspergillus niger* dalam pertumbuhannya berhubungan langsung dengan zat makanan yang terdapat dalam substrat, molekul sederhana yang terdapat di sekeliling hifa dapat langsung diserap sedangkan molekul yang lebih kompleks harus dipecah dahulu sebelum diserap ke dalam sel, dengan menghasilkan beberapa enzim ekstraseluler. Bahan organik dari substrat digunakan oleh *Aspergillus niger* untuk aktivitas transport molekul, pemeliharaan struktur sel dan mobilitas sel. *Aspergillus niger* bersifat toleran terhadap aktivitas air rendah, mampu tumbuh pada substrat dengan potensial osmotik cukup tinggi dan sporulasi pada kelembaban relatif rendah.

*Aspergillus niger* dapat tumbuh dengan cepat dan digunakan secara komersial dalam produksi asam sitrat, asam glukonat dan pembuatan beberapa enzim seperti amilase, pektinase, glukoamilase dan selulase. Kombong (2004) menjelaskan bahwa *Aspergillus niger* yang ditumbuhkan dalam medium pati kentang dan pati jagung dapat menghasilkan glukoamilase dan menghasilkan maltosa. Rosita (2008) melaporkan *Aspergillus niger* menghasilkan enzim  $\alpha$ -amilase sebesar 373,14 U/ml dan glukoamilase sebesar 230,79 U/ml. Purwantari dkk. (2004) menyatakan pH optimum

*Aspergillus niger* pada fermentasi tepung ganyong untuk produksi etanol adalah 4,5 dan menghasilkan gula pereduksi tertinggi sebesar 1,230 g/100 ml pada hari ke-4. Zakpa et al. (2009) melaporkan konsentrasi substrat tongkol jagung optimum dalam sakarifikasi oleh *Aspergillus niger* adalah 6% dengan kadar gula pereduksi tertinggi sebesar 3,1105 mg/ml.

### ***Trichoderma reesei***

*Trichoderma reesei* merupakan salah satu kapang yang mampu mendegradasi polisakarida mannan dengan menghasilkan beberapa enzim, salah satunya adalah mannanase yang diperoleh pada substrat kopi, *bean gum*, dan *blue mussel*. Adapun kelebihan dari kapang ini adalah mudah diperoleh serta dalam aplikasinya tidak terlalu sulit (mudah dikembangkan).

(Jaelani, 2007)

*T. reesei* tumbuh pada kisaran suhu optimal 25-32°C dengan pH 4-5,5. Komponen utama dari sistem selulase *T. reesei* adalah kedua jenis enzim selobiohidrolasanya, yaitu CBHI dan CBHII, yang berjumlah total 80% dari total protein selulase yang dihasilkan. Sekarang, *T. reesei* adalah mikroorganisme utama untuk menghasilkan enzim selulase dan hemiselulase, namun walaupun dalam industri dihasilkan enzim selulase sebesar 100 g untuk tiap satu liter *T. reesei* diperlukan usaha ekstra untuk mengurangi biaya dan menambah yield produk serta efisiensi campuran enzim.

(Seiboth, 2011)

### ***Bacillus subtilis***

Bakteri ini telah digunakan selama beberapa dekade sebagai bahan penelitian dalam bidang biokimia dan genetika, tergolong dalam bakteri gram positif. Kemampuan potensial yang paling diketahui adalah sifat antibiotiknya dengan variasi struktur yang beragam. Dikenal sebagai salah satu bakteri penghasil endospora, *B. subtilis* adalah salah satu mikroorganisme yang diketahui urutan susunan genomnya.

(Stein, 2006)

Sesuai namanya, mikroorganismenya ini berbentuk batang baik tipis maupun tebal, biasanya berkumpul membentuk rantai atau terpisah. Endospora yang dihasilkan berbentuk bulat dan oval. Dapat berkembang pada suhu 45°C – 55°C dan mempunyai pertumbuhan suhu optimum pada suhu 60°C – 80°C.

Biasanya habitat bakteri ini adalah di dalam tanah, dan memiliki kemampuan bertahan hidup yang kuat menggunakan endospora. Endospora tersebut akan melindungi *B.subtilis* sehingga dapat tahan pada kondisi lingkungan yang ekstrim. Tidak bersifat patogen langsung pada manusia walau dapat mengkontaminasi makanan. Spora yang dimiliki *B.subtilis* dapat bertahan hidup pada suhu ekstrim sekalipun dan sanggup membuat roti menjadi rusak atau busuk.

(Ariyanti. W, 2016)

**Tabel II.3** Perbandingan berbagai Jenis Proses *Pretreatment*

No	Metode Pretreatment	Kelebihan	Kekurangan
1	Milling	-Mengurangi kristalinitas dan derajat polimerisasi selulosa -Ukuran partikel sangat kecil sehingga meningkatkan luas permukaan spesifik dan ukuran pori -Lignin removal: 77% (dibantu NaOH) *3	-Butuh daya dan konsumsi energi yang besar

2	Steam explosion	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Menyebabkan transformasi lignin dan hemiselulosa ada yang terlarut</li> <li>-Harga murah</li> <li>-Yield glukosa dan hemiselulosa lebih tinggi bila menggunakan pretreatment kombinasi</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Menghasilkan senyawa beracun</li> <li>-Degradasi parsial hemiselulosa</li> </ul>
3	Liquid hot water	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Tidak perlu menurangi ukuran partikel</li> <li>-Tidak terllau membutuhkan bahan kimia</li> <li>-Tidak membutuhkan bahan yang anti karat</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Butuh energi dan air dalam jumlah besar</li> <li>-Senyawa beracun dihasilkan</li> </ul>
4	Ammonia fiber expansion (AFEX)	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Meningkatkan luas permukaan yang bersifat dapat diakses</li> <li>-Mengurangi pembentukan inhibitor</li> <li>-Tidak membutuhkan ukuran partikel yang kecil</li> <li>-Lignin removal: <math>\pm 50\%</math> *4</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Tidak efektif pada biomassa yang memiliki kandungan lignin tinggi</li> <li>-Membutuhkan amonia dalam jumlah banyak (mahal)</li> </ul>

5	CO2 explosion	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Meningkatkan luas permukaan yang bersifat dapat diakses</li> <li>-Murah</li> <li>- Tidak ada pembentukan senyawa inhibitor</li> <li>-Tidak bersifat mudah terbakar</li> <li>-Recovery mudah setelah ekstraksi dan ramah lingkungan</li> </ul>	-Membutuhkan tekanan tinggi
6	Wet oxidation	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Derajat kelarutan hemiselulosa dan lignin tinggi</li> <li>-Pembentukan senyawa yang dapat mendegradasi biomass dapat dihindari</li> <li>-Lignin removal: <math>\pm 58.3-88\% *1,2</math></li> </ul>	-Butuh oksigen dan katalis alkalin (mahal)
7	Concentrated acid	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Yield glukosa tinggi</li> <li>-Suhu operasi=ambient</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Butuh recovery dan harga asam yang dipakai cenderung mahal</li> <li>-Butuh material yang tahan korosi</li> </ul>

			-Asam pekat beracun dan berbahaya
8	Diluted acid	-Recovery sugar tinggi pada akhir proses -Pembentukan produk beracun rendah	-Konsentrasi gula reduksi cenderung rendah -Ada produk yang dapat mendegradasi biomass
9	Alkali	-Derajat polimerisasi dan kristalinitas selulosa berkurang -Struktur lignin hancur -Lignin removal: $\pm 87.5\%$ (pada bahan lime) dan rata-rata 36.4-60% *2, 3	-Mahal -Tidak dapat dipakai pada skala besar
10	Ozonolysis	-Efektif menghilangkan konten lignin -Tidak menghasilkan residu beracun -Dilakukan pada tekanan dan suhu ruangan	-Mahal karena banyak memakai ozon
11	Organosolv	-Lignin dan hemiselulosa terhidrolisa	-Pelarut harus dikeringkan dan direcycle -Mahal

		-Lignin removal: 41-66.2% *1,7	
12	Biological	-Energi rendah -Delignifikasi efektif -Derajat polimerisasi selulosa berkurang -Hidrolisa parsial hemiselulosa -Tidak butuh bahan kimia -Kondisi lingkungan sedang	-Laju proses lambat -Laju treatment sangat lambat -Tidak terlalu efektif untuk skala komersial
13	Iradiasi	-Meningkatkan hasil hidrolisis enzimatis dari lignoselulosa -Mudah menembus struktur lignoselulosa -Memproduksi radikal bebas yang berguna dalam modifikasi struktur lignin dan pemecahan kristal selulosa -Lignin removal: $\pm 74\%$ *1	-Alat yang mahal
14	Gelombang ultrasonik	-Xilosa yang dihasilkan tinggi -Menyebabkan kavitasi sehingga	-Teknologi baru (mahal) -Tidak bertujuan untuk

		<p>berbagai perubahan fisika dan kimia dapat terjadi</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Lignin removal: hampir 100% (dengan penambahan NaOH dan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)*8</li> </ul>	<p>menghidrolisis biomassa, melainkan agar substrat yang dihasilkan lebih mudah untuk di hidrolisis</p>
15	Pirolisis	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Lignin terdekomposisi dengan sangat efektif</li> <li>-Dapat menghidrolisis parsial hemiselulosa, memodifikasi struktur menurunkan kristalinitas selulosa dan derajat polimerisasinya</li> <li>-Gula reduksi yang dihasilkan tinggi</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Kondisi anaerob</li> <li>-Butuh basa kuat</li> <li>-Suhu dan tekanan tinggi</li> <li>-Efektif dan ekonomis pada produksi bioetanol</li> </ul>
16	Ionic Liquids	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Memiliki stabilitas suhu dan kimia yang baik</li> <li>-Tidak mudah terbakar</li> <li>-Memiliki kisaran suhu yang luas, dan merupakan</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Biaya tinggi</li> <li>-Regenerasi pelarut dibutuhkan</li> <li>-Kurang data toksilologi</li> <li>-Kurangnya pengetahuan</li> </ul>

		pelarut yang baik untuk berbagai jenis bahan -Karakteristiknya dapat disesuaikan sesuai kebutuhan dari proses -Lignin removal: $\pm 54\%$ *5, 6	dasar mengenai karakteristik fisika-kimia <i>ionic liquids</i> -Masalah zat inhibitor yang mungkin dihasilkan perlu diteliti
--	--	---	---

## II.5 Proses Hidrolisis

Pada dasarnya, proses hidrolisis adalah proses dimana pemecahan suatu senyawa kompleks menjadi senyawa yang lebih sederhana dengan bantuan air termasuk inversi gula, saponikasi lemak dan ester, pemecahan protein dan reaksi Grignard. Selain air, juga digunakan larutan asam atau basa.

### 1. Hidrolisis murni

Suatu proses dikatakan hidrolisis murni apabila dalam proses tersebut hanya ada senyawa kompleks dan air. Reaksi yang terjadi dalam proses ini berlangsung lambat namun bisa dipercepat dengan bantuan uap air. Biasanya dilakukan pada senyawa-senyawa yang bersifat reaktif dan sangat jarang digunakan.

### 2. Hidrolisis dengan larutan asam

Menggunakan asam pekat atau encer, biasanya asam sulfat dan asam klorida karena harganya yang cukup terjangkau, namun lebih sering digunakan asam sulfat karena sifatnya yang tidak korosif. Larutan asam ini berfungsi sebagai katalisator. Jika menggunakan asam encer, kecepatan reaksi akan berbanding lurus dengan konsentrasi  $H^+$ .

### 3. Hidrolisis dengan larutan basa

Larutan basa yang paling sering digunakan adalah NaOH dan KOH. Penggunaan hidrolisis dengan larutan

basa sangat terbatas karena produk yang dihasilkan adalah garam bukan asam.

#### **4. Alkali fusion**

Dilakukan tanpa memakai air atau memakai air pada suhu yang tinggi, misal pada NaOH padat (air sangat sedikit). Penggunaannya dalam industri biasanya hanya untuk tujuan tertentu, misalnya peleburan bahan-bahan selulosa (tongkol jagung) yang digunakan pada suhu tinggi dengan NaOH padat menghasilkan asam oksalat dan asam asetat.

(Clark, 2008)

#### **5. Hidrolisis dengan enzim**

Enzim berfungsi sebagai katalis dan biasanya dihasilkan dari mikroba. Enzim merupakan biokatalis dalam sel yang dalam jumlah kecilpun tidak mempengaruhi fungsinya sebagai biokatalis. Fungsi terpenting dari enzim adalah kemampuannya menurunkan energi aktivasi suatu reaksi kimia. Kemampuan enzim dalam mendegradasi substrat dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain konsentrasi enzim, konsentrasi substrat, pH serta suhu.

Menurut Poedjiadi (1994), enzim merupakan protein dengan struktur tiga dimensi yang kompleks yang aktif di bawah kondisi khusus dan hanya dengan substrat spesifik. Enzim adalah molekul biopolimer yang tersusun dari serangkaian asam amino dalam komposisi dan susunan rantai yang teratur dan tetap. Enzim merupakan produk protein sel hidup yang berperan sebagai biokatalisator dalam proses biokimia, baik yang terjadi di dalam sel maupun di luar sel.

##### **A. Enzim Xilanase**

Xilanase merupakan enzim ekstraseluler yang dapat menghidrolisa xilan (hemiselulosa) menjadi suatu rantai pendek xilooligosakarida. Xilanase merupakan enzim yang

dilaporkan dapat digunakan sebagai pemutih pulp yang ramah lingkungan menggantikan klorin yang biasa digunakan dalam proses pemutihan pulp. Enzim xilanase yang digunakan dalam pemutih kertas memerlukan suhu 80 °C dan pH 6-8.

Beberapa mikroorganisme penghasil xilanase adalah *Bacillus spp*, *B.circulans*, *Clostridium stercorarium*. Untuk melakukan proses pemurnian enzim, dilakukan pemekatan protein enzim ekstrak kasar dengan menambahkan senyawa yang dapat memekatkan protein.

### **B. Enzim Selulase**

Enzim selulase merupakan kumpulan dari beberapa enzim yang bekerja bersama untuk menghidrolisa selulosa. Mikroorganisme tertentu menghasilkan partikel yang dinamakan selulosom. Partikel inilah yang akan terdisintegrasi menjadi enzim-enzim, yang secara sinergis mendegradasi selulosa. Menurut Salam dan Gunarto (1999), selulase merupakan enzim yang dapat memutuskan ikatan glukosida  $\beta$ -1,4 di dalam selulosa. Dalam menghidrolisis senyawa selulosa, kemampuan selulase sangat digantungkan pada substrat yang di gunakan.

Enzim selulase merupakan salah satu kelompok enzim yang termasuk dalam suatu sistem yang diproduksi mikroorganisme dalam degradasi material sel tumbuhan. Enzim ini termasuk dalam famili glikosil hidrolase. Enzim selulase berperan dalam hidrolisis selulosa dengan memecah ikatan  $\beta$ -1,4-D-glikosida untuk menghasilkan oligosakarida maupun glukosa. Berdasarkan aktivitasnya terhadap berbagai substrat, selulase diklasifikasikan menjadi tiga tipe, yaitu endoglukanase (*endo- $\beta$ -1,4-glucanase*),  $\beta$ -glukosidase ( *$\beta$ -D-glucoside lucohydrolase*) dan

selobiohidrolase atau eksoglukanase (*exo-β-1,4-glucanase*).

(Zhang, 2006)

### C. Surfaktan

Surfaktan atau *surface active agent* adalah molekul-molekul yang mengandung gugus hidrofilik (suka air) dan lipofilik (suka minyak/lemak) pada molekul yang sama. Surfaktan terbagi menjadi dua bagian yaitu kepala dan ekor. Gugus hidrofilik berada di bagian kepala (polar) dan lipofilik di bagian ekor (non polar). Bagian polar molekul surfaktan dapat bermuatan positif, negatif atau netral. Umumnya bagian non polar (lipofilik) adalah merupakan rantai alkil yang panjang, sementara bagian yang polar (hidrofilik) mengandung gugus hidroksil.

Sifat-sifat surfaktan adalah dapat menurunkan tegangan permukaan, meningkatkan kestabilan partikel yang terdispersi dan mengontrol jenis formulasi baik itu *oil in water (o/w)* atau *water in oil (w/o)*. Selain itu surfaktan juga akan terserap ke dalam permukaan partikel minyak atau air sebagai penghalang yang akan mengurangi atau menghambat penggabungan (*coalescence*) dari partikel yang terdispersi. Sifat-sifat ini dapat diperoleh karena sifat ganda dari molekulnya.

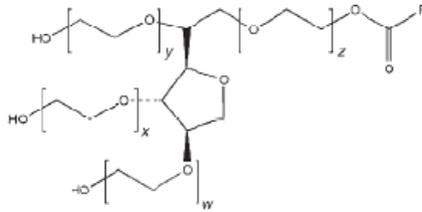
Penambahan surfaktan dalam larutan akan menyebabkan turunnya tegangan permukaan larutan. Setelah mencapai konsentrasi tertentu, tegangan permukaan akan konstan walaupun konsentrasi surfaktan ditingkatkan. Bila surfaktan ditambahkan melebihi konsentrasi ini maka surfaktan mengagregasi membentuk misel. Konsentrasi terbentuknya misel ini disebut *Critical Micelle Concentration*

(CMC). Tegangan permukaan akan menurun hingga CMC tercapai. Setelah CMC tercapai, tegangan permukaan akan konstan yang menunjukkan bahwa antar muka menjadi jenuh dan terbentuk misel yang berada dalam keseimbangan dinamis dengan monomernya.

(Zuhrina, 2010)

Aplikasi surfaktan sangat luas. Beberapa contoh aplikasi surfaktan antara lain bahan utama untuk industri deterjen dan pembersih lainnya, bahan *emulsifier* pada industri kosmetik dan farmasi, bahan *emulsifier* untuk sanitasi industri pangan. Selain itu surfaktan juga digunakan untuk pembuatan gula reduksi, seperti polietilen glikol (PEG) 4000 dan Tween 80.

Tween 80 adalah ester asam lemak polioksietilen sorbitan, dengan nama kimia polioksietilen 20 sorbitan monooleat. Rumus molekulnya adalah  $C_{64}H_{124}O_{26}$ . Pada suhu  $25^{\circ}C$ , Tween 80 berwujud cair, berwarna kekuningan dan berminyak, memiliki aroma yang khas, dan berasa pahit. Bersifat larut dalam air dan etanol, tidak larut dalam minyak mineral. Kegunaan Tween 80 antara lain sebagai: zat pembasah, emulgator, dan peningkat kelarutan. Selain fungsi, fungsi tersebut, Tween 80 juga berfungsi sebagai peningkat penetrasi suatu senyawa.



$$w + x + y + z = 20$$

**Gambar II.8** Rumus bangun Tween 80

PEG (polietilen glikol) merupakan salah satu jenis bahan pembawa yang sering digunakan sebagai bahan tambahan dalam suatu formulasi untuk meningkatkan pelarutan obat yang sukar larut. Bahan ini merupakan salah satu jenis polimer yang dapat membentuk kompleks polimer pada molekul organik apabila ditambahkan dalam formulasi untuk meningkatkan kecepatan pelarutan yang dapat membentuk kompleks dengan berbagai obat. Cangkang kapsul dengan menggunakan basis polietilen glikol memiliki beberapa keuntungan karena sifatnya yang inert, tidak mudah terhidrolisis, tidak membantu pertumbuhan jamur.

Nama lain dari basis ini adalah carbowax, carbowax sentry, lipoxol, lutrol E dan phenol E. Polietilen glikol (PEG) disebut juga makrogol, merupakan polimer sintetik dari oksietilen dengan rumus struktur  $H(OCH_2CH_2)_nOH$ , dimana  $n$  adalah jumlah rata-rata gugus oksietilen. PEG umumnya memiliki bobot molekul antara 200–300000. Penamaan PEG umumnya ditentukan dengan bilangan yang menunjukkan bobot molekul rata-rata. Konsistensinya sangat dipengaruhi oleh bobot molekul. PEG dengan bobot molekul 200-600 (PEG 200-600) berbentuk cair, PEG 1500 semi padat, dan

PEG 3000-20000 atau lebih berupa padatan semi kristalin, dan PEG dengan bobot molekul lebih besar dari 100000 berbentuk seperti resin pada suhu kamar.

Umumnya PEG dengan bobot molekul 1500-20000 yang digunakan untuk pembuatan dispersi padat. Polimer ini mudah larut dalam berbagai pelarut, titik leleh dan toksisitasnya rendah, berada dalam bentuk semi kristalin. Kebanyakan PEG yang digunakan memiliki bobot molekul antara 4000 dan 20000, khususnya PEG 4000 dan 6000. Proses pembuatan dispersi padat dengan PEG 4000, umumnya menggunakan metode peleburan, karena lebih mudah dan murah.

(Leuner and Dressman, 2000)

## **6. Hidrolisa Biologi**

Hidrolisa biologi dapat dilakukan dengan beberapa cara memakai bahan biologi yang sudah terdekomposisi, mengatur kondisi optimum mikroorganisme atau dengan penambahan bakteri atau enzim. Efek penambahan enzim bervariasi sesuai enzim yang digunakan (Davidsson *et al.*, 2008). Metode hidrolisa biologi yang lebih murah biasanya menggunakan hidrolisa anaerobik karena semakin sedikit bahan kimia maupun energi yang digunakan dan dapat meningkatkan kinetika reaksi dan efisiensi total proses diakibatkan kompetisi yang menurun antara bakteri asidogenik dan bakteri yang dipakai dalam langkah sebelumnya. Kekurangan dari hidrolisa biologi berkaitan dengan pemisahan karena melibatkan fase yang berbeda sehingga proses akan semakin sulit untuk dioperasikan. Ketelitian dalam menangani mikroorganisme juga dibutuhkan dalam proses hidrolisa.

(Falk. Lisa, 2015)

### *Trichoderma viride*

Morfologi dari koloni mikroorganismenya ini berwarna hijau gelap dengan struktur berbentuk bantal. Secara mikroskopis, bulatan konidia berdiameter 1.5  $\mu\text{m}$ , laju pertumbuhannya 26.66 mm/hari dan koloni akan matang dalam tiga hari. Spesies ini dikenal dengan kemampuannya sebagai *biocontrol* dalam menekan pertumbuhan makhluk hidup yang bersifat patogen.

## **II.6 Penelitian Terdahulu**

1. Yumarta Tansil et al (2016) melakukan penelitian tentang “Optimasi Teknik Produksi Gula Reduksi dari Limbah Kulit Buah Kopi (*Parchment hull / endocarp*)”.
2. Tri Widjaja et al (2016), melakukan penelitian tentang pengaruh pretreatment dan variasi mikroorganismenya pada produksi ethanol dari kulit kopi. Pada penelitian ini didapatkan hasil pretreatment terbaik menggunakan pretreatment organosolv dengan kadar ethanol 50% (v/v) yang dapat menurunkan lignin hingga 0,2% (w/w). Hidrolisis yang dilakukan menggunakan campuran enzim selulase dan xilanase murni pada suhu 60°C, pH 3 selama 30 jam menghasilkan yield sebesar 0,164 gram gula reduksi/gram selulosa dan hemiselulosa dari kulit kopi yang telah dipretreatment menggunakan metode organosolv dengan ethanol 50% (v/v).
3. Atik Rahmawati et al (2015) melakukan penelitian tentang hidrolisis enzimatis pati jahe emprit dengan enzim alfa amilase. Hasil yang didapatkan dari penelitian ini adalah perlakuan konsentrasi enzim dan lama inkubasi memberikan pengaruh nyata ( $\alpha=0.05$ ) terhadap kadar gula reduksi, kadar dextrose equivalent (DE), viskositas dingin, dan viskositas panas. Perhitungan perlakuan terbaik didapatkan pada

parameter konsentrasi enzim 0.08% dan lama inkubasi 3 jam. Kadar gula reduksi yang terkandung adalah 6.22%, kadar DE 6.94%, viskositas dingin 96.33 cps, viskositas panas 87.33 cps, dan TPT 19.33.

4. Ye Sun et al (2001) melakukan penelitian tentang hidrolisa lignoselulosa untuk menghasilkan etanol. Dalam penelitian ini didapatkan kesimpulan bahwa produksi etanol dari lignoselulosa memiliki prospek yang sangat besar yaitu dapat menggantikan 40% kebutuhan pasar bahan bakar AS dengan bahan baku 2,5 ton bongkol jagung. Selain itu proses hidrolisa ini juga terbukti ramah lingkungan dan mengurangi limbah.

*(Halaman ini sengaja dikosongkan)*

## **BAB III METODOLOGI PENELITIAN**

Penelitian skripsi ini bertujuan untuk menghasilkan gula reduksi dari kulit kopi dengan memanfaatkan komponen selulosa maupun hemiselulosanya menggunakan proses *pretreatment* biologis memakai mikroorganisme *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis*, dan *Trichoderma reesei*. Setelah melewati tahap *pretreatment*, dilanjutkan dengan proses hidrolisa enzimatis menggunakan enzim *selulase* dan enzim *xylanase*, dan hidrolisa menggunakan *Trichoderma viride* dan *Aspergillus niger*, dalam hidrolisa ini disertai penambahan surfaktan PEG 4000 dan Tween 80 .

### **III.1 Kondisi Operasi**

- *Fungal treatment*
  - Massa kulit kopi : 500 gram  
(ukuran 100-120 mesh )
  - Rasio Kulit kopi : air : 1 : 4 (w/v)
  - Lama *fungal treatment* : 4 hari
  - pH *fungal treatment* : 5
  - Suhu *fungal treatment* : 35°C
  - Tekanan : 1 atm
  - Kecepatan *shaker incubator* : 125 rpm

### **III.2 Variabel yang Digunakan**

- *Fungal Treatment* kulit kopi
  - Rasio *Bacillus subtilis* : *Aspergillus niger*  
: 2:1 (v/v)
  - Rasio *Aspergillus niger* : *Trichoderma reesei*  
: 1:1 (v/v)
  - Rasio mikroorganisme : massa kulit kopi  
: 30 ml : 100 gr
- ❖ **Pembuatan starter**

- Massa kulit kopi : 1 gram
  - Rasio *Aspergillus niger* : *Trichoderma viride* : 1:1; 1:2; 2:1 (v/v)
  - Rasio enzim xilanase : enzim selulose : 14,524 ml : 20,552 ml
  - Rasio mikroorganisme : larutan buffer : 3 : 27 (ml/ml)
  - Tekanan : 1 atm
- Hidrolisa kulit kopi
- Waktu Hidrolisa : 16 jam
  - Rasio penambahan surfaktan PEG 4000 : massa kulit kopi : 1 : 100 (gr/gr)
  - Rasio penambahan surfaktan Tween 80 : massa kulit kopi : 1 : 100 (gr/gr)

### III.3 Parameter yang Dianalisa

#### III.3.1 Analisa Pendahuluan Limbah Kulit Kopi

Kadar glukosa, selulosa, hemiselulosa, lignin, dan pektin

#### III.3.2 Analisa Parameter Penelitian

- Kadar selulosa, hemiselulosa, lignin, dan pektin sebelum, saat dan setelah *funggal treatment* oleh *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis*, dan *Trichoderma reesei*.
- Kadar glukosa sebelum dan setelah melewati proses hidrolisa oleh enzim *selulase* dan enzim *xylanase* dan setelah melewati proses hidrolisa oleh *Aspergillus niger* dan *Trichoderma viride*.

### III.4 Dimensi Alat

- |                        |                 |
|------------------------|-----------------|
| 1. Tabung reaksi       | 4. Gelas ukur   |
| 2. Gelas Erlenmeyer    | 5. Cawan        |
| 3. <i>Beaker glass</i> | 6. Gelas arloji |
|                        | 7. Spatula      |

- |                             |                             |
|-----------------------------|-----------------------------|
| 8. Labu ukur                | 22. Pipet tetes             |
| 9. Pipet ukur               | 23. Oven                    |
| 10. <i>Haemocytometer</i>   | 24. <i>Vortex</i>           |
| 11. Jarum Ose               | 25. <i>Vacuum pump</i>      |
| 12. Spektrofotometer        | 26. Kuvet                   |
| 13. <i>Centrifuge</i>       | 27. Rak kayu                |
| 14. Mikropipet              | 28. Termometer              |
| 15. Mikroskop               | 29. Labu leher dua          |
| 16. <i>Autoclave</i>        | 30. <i>Heater</i>           |
| 17. <i>Hot plate</i>        | 31. <i>Oilbath</i>          |
| 18. <i>Stirrer</i>          | 32. <i>Reflux condensor</i> |
| 19. Neraca analitik         | 33. Karet penghisap         |
| 20. Inkubator               | 34. <i>Incubator shaker</i> |
| 21. <i>Shaker incubator</i> |                             |

### III.5 Bahan yang Digunakan

- |                             |  |
|-----------------------------|--|
| 1. Kulit buah kopi          | 11. Tween 80                               |
| 2. <i>Tricoderma reesei</i> | 12. Asam dinitrosalisilat                  |
| 3. <i>Tricoderma viride</i> | 13. CMC ( <i>Carboxymethyl cellulose</i> ) |
| 4. <i>Aspergillus niger</i> | 14. Kertas saring                          |
| 5. <i>Bacillus subtilis</i> | 15. <i>Nutrien broth</i>                   |
| 6. Asam Sitrat              | 16. Enzim selulase                         |
| 7. NaOH                     | 17. Enzim xilanase                         |
| 8. Aquadest                 | 18. Bubuk xilan                            |
| 9. Sodium sitrat            | 19. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>         |
| 10. PEG 4000                |  |

### III.6 Metode Penelitian

Penelitian ini dibagi dalam

1. Tahap *pre-treatment* mekanik kulit buah kopi
2. Tahap *pre-treatment* biologis kulit kopi (*Fungal treatment*)

3. Tahap hidrolisis selulosa dan hemiselulosa pada kulit kopi menjadi gula reduksi dengan enzimatis oleh enzim selulase dengan enzim xylanase murni dan biologis dengan mikroorganisme *Aspergillus niger* dan *Trichoderma viride*.

### III.6.1 *Pre-treatment* kulit buah kopi

- Kulit kopi dikeringkan dengan bantuan sinar matahari.
- Kulit kopi digiling.
- Kulit kopi dioven pada suhu 105° C sampai massanya konstan.
- Kulit kopi diayak dengan menggunakan *screener* hingga didapat ukuran 100-120 mesh.

### III.6.2. *Fungal Treatment*

#### A. *Pre-treatment* biologis dengan mikroorganisme

- *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger*, dan *Trichoderma reesei* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Teknik, Jurusan Teknik Kimia FTI-ITS.
- Jumlah mikroorganisme *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger* dan *Trichoderma reesei* dihitung menggunakan metode *counting chamber*.
- Larutan kulit kopi dibuat dengan rasio kulit kopi : air = 1 : 4 (w/v).
- Mikroorganisme *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger*, dan *Trichoderma reesei* sesuai variabel dimasukkan ke larutan kopi untuk dilakukan proses *fungal treatment*.
- *Fungal treatment* dilakukan pada suhu 35° C, pH 5 selama 4 hari.
- Pada sebelum, saat dan setelah proses *fungal treatment*, campuran diambil secara berkala untuk dilakukan analisa lignin dan pektin.

## **B. Analisa Jumlah Sel**

Menurut Caprette (2007) metode menghitung jumlah sel menggunakan suatu alat yang disebut dengan *counting chamber* (ruang hitung). Alat ini dapat digunakan untuk menghitung jumlah sel per unit volume. Tipe *counting chamber* yang paling banyak digunakan adalah *haemocytometer*.

Berikut ini langkah-langkah yang dilakukan untuk analisa jumlah sel bakteri :

1. Membuat larutan *nutrient broth* 100 ml dalam erlenmeyer dan disterilkan dengan *autoclave*.
2. Menanam mikroorganisme, menginkubasi dengan suhu 30 °C dan memasukkan 1 ml sampel dalam tabung reaksi. Sampel diencerkan sampai 10 ml.
3. Meneteskan ke permukaan *haemocytometer* hingga dapat menutupi seluruh permukaannya.
4. *Haemacytometer* diletakkan di bawah lensa mikroskop untuk dihitung jumlahnya.
5. Melakukan pengamatan di mikroskop dengan perbesaran 400x.

## **C. Prosedur analisa kadar selulosa, hemiselulosa dan lignin dengan metode chesson (Datta dkk, 1981)**

### **1. Prosedur pembuatan larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N**

- Mengambil sedikit aquadest di dalam labu ukur 1000 ml.
- Menambahkan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 98% sebanyak 27 ml ke dalam labu ukur 1000 ml dengan hati-hati.
- Menambahkan aquadest hingga batas.

### **2. Prosedur pembuatan larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72%**

- Mengambil sedikit aquadest di dalam labu ukur 10 ml.
- Menambahkan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 98% sebanyak 3,7 ml ke dalam beaker glass dengan hati-hati.

- Menambahkan aquadest hingga batas.

### **3. Prosedur analisa kadar hemiselulosa, selulosa dan lignin dengan metode chesson**

- Menimbang 1 gr sampel kering (berat a) ditambahkan 150 ml H<sub>2</sub>O dan direflux pada suhu 100°C dengan *oilbath* selama 2 jam, angkat dan biarkan sampai suhu 40°C.
- Hasilnya disaring, residu dicuci dengan air panas hingga filtratnya jernih ( $\pm$  300 ml air panas yang ditambahkan).
- Residu kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 60°C sampai beratnya konstan dan kemudian ditimbang (berat b).
- Residu ditambahkan 150 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N, kemudian direflux dengan *oilbath* selama 2 jam, angkat dan biarkan sampai suhu 40°C.
- Hasilnya disaring dan dicuci air panas sampai pH nya netral ( $\pm$  300 ml) dan residunya dikeringkan hingga beratnya konstan. Berat ditimbang (berat c).
- Residu kering ditambahkan 10 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% dan direndam pada suhu kamar selama 4 jam.
- Ditambahkan 150 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N dan direflux pada suhu 100°C dengan *oilbath* selama 2 jam, angkat dan biarkan sampai suhu 40°C.
- Residu disaring dan dicuci dengan H<sub>2</sub>O sampai netral ( $\pm$  400 ml).
- Residu kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 60°C sampai beratnya konstan dan ditimbang (berat d).
- Selanjutnya residu diabukan dengan furnace pada suhu 600°C selama 4 jam dan ditimbang (berat e).

**Perhitungan kadar Selulosa dan kadar Lignin menggunakan rumus berikut ini:**

Kadar Hemiselulose =  $(b - c) / a \times 100\%$

Kadar Selulosa =  $(c - d) / a \times 100\%$

Kadar Lignin =  $(d - e) / a \times 100\%$

### **III.6.3 Hidrolisa selulosa dan hemiselulosa pada kulit buah kopi menjadi glukosa.**

#### **A. Prosedur Hidrolisis kulit kopi menggunakan *Aspergillus niger* dan *Trichoderma viride***

- Analisa glukosa, xilosa, fruktosa dan galaktosa sebelum hidrolisa .
- **Pembuatan Starter:** Kulit kopi (100 mesh) sebanyak 1 gram yang sudah melewati tahap *funggal treatment* dimasukkan ke erlenmeyer.
- *Aspergillus niger* dan *Trichoderma viride* sesuai variabel dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang sudah berisi kulit kopi kemudian dipanaskan perlahan-lahan sampai 30°C.
- Mikroorganisme sebanyak 3 ml dimasukkan kedalam erlenmeyer dengan rasio (sesuai variabel) kemudian ditambahkan buffer sitrat 0,1 M pH 5,5 hingga volume total larutan mencapai 30 ml.
- Surfaktan PEG 4000 + starter : massa kulit kopi sebesar 1 : 100 (gr/gr).
- Sampel diinkubasi pada suhu 35°C dan waktu inkubasi 16 jam.
- Analisa glukosa, xilosa, fruktosa, dan galaktosa sesudah hidrolisa.

#### **B. Prosedur Hidrolisis kulit kopi menggunakan enzim selulase murni dan enzim xilanase murni.**

- Analisa glukosa, xilosa, fruktosa, dan galaktosa sebelum hidrolisa

- **Pembuatan Starter:** 1 gram kulit kopi (100-120 mesh) yang sudah di *pre-treatment* secara biologis dan dimasukkan ke erlenmeyer.
- Enzim selulase sebesar 20,552 ml dan enzim xilanase sebesar 14,524 ml dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang sudah berisi kulit kopi kemudian dipanaskan perlahan-lahan sampai 40 °C.
- Buffer sitrat 0,1 M, pH 5,5 ditambahkan ke dalam larutan enzim dan kulit kopi hingga volume total 30 ml.
- Surfaktan PEG 4000/Tween 80+ Starter: massa kulit kopi sebesar 1 : 100 (gr/gr).
- Sampel diinkubasi *incubator shaker* pada suhu 35°C dan waktu inkubasi 16 jam.
- Konsentrasi glukosa dianalisa dengan metode DNS pada awal dan akhir waktu hidrolisis.

#### C. Pembuatan Larutan Buffer Sitrat pH 5,5

- Asam sitrat sebanyak 5,7024 gram ditimbang dan dimasukkan ke dalam tabung erlenmeyer.
- Natrium sitrat sebanyak 20,66 gram ditambahkan ke dalam erlenmeyer yang sudah berisi asam sitrat.
- Asam sitrat dan natrium sitrat dilarutkan dengan aquades hingga 1000 ml.
- pH larutan buffer diatur dengan penambahan NaOH 0,1 M atau H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 M hingga pH larutan buffer menjadi 5,5.

#### D. Pembuatan larutan DNS (Asam Dinitrosalisilat)

- NaOH sebanyak 16 gram ditimbang dan dilarutkan menggunakan aquadest sampai volume 200 ml.
- Natrium potasium tartrat sebanyak 30 gram dan natrium metabisulfit sebanyak 8 gram dilarutkan dengan aquadest sampai volume 500 ml.

- DNS sebanyak 10 gram dilarutkan dengan larutan NaOH sebanyak 200 ml.
- Larutan DNS ditambahkan ke dalam larutan sodium potassium tartrat dan sodium metabisulfit.
- Dilakukan penambahan aquadest hingga volumenya mencapai 1000 ml. Larutan diaduk sampai benar-benar terlarut sempurna.

#### **E. Pembuatan Larutan CMC (*Carboxymetil Cellulose*)**

- Menimbang 2 gram CMC.
- Menambahkan 200 ml buffer sitrat pH 5,5.
- Mengaduk dengan stirrer selama 16 jam.

#### **F. Pembuatan kurva standar**

##### **F.1 Pembuatan kurva standar glukosa untuk mengukur keaktifan enzim selulase :**

- Menimbang sebanyak 0,367 gram *d-glucose* dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml.
- Menambahkan buffer sitrat 0,1 M pH 5,5 sampai volume tepat 100 ml. Larutan ini selanjutnya disebut sebagai larutan induk glukosa.
- Mengisi masing-masing 6 tabung reaksi dengan larutan induk glukosa berturut-turut sebanyak 0 ml, 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml dan 5 ml.
- Menambahkan masing-masing buffer sitrat 0,1 M pH 5,5 berturut-turut sebanyak 5 ml, 4 ml, 3 ml, 2 ml, 1 ml dan 0 ml, sehingga diperoleh 6 macam konsentrasi larutan standar glukosa.
- Mengambil 0,2 ml dari tiap konsentrasi larutan standar glukosa dan ditambahkan 1,8 ml CMC (*carboxymetil cellulose*) ke dalam tabung reaksi.
- Menginkubasi larutan dalam inkubator bersuhu 35°C

- Menambahkan masing-masing larutan 3 ml DNS (*dinitrosalicylic acid*) dan divortex hingga homogen.
- Memanaskan masing-masing tabung reaksi yang berisi larutan pada air mendidih selama 10 menit.
- Mendinginkan pada air es selama 10 menit.
- Mengangkat dan mendinginkan larutan sampai mencapai suhu ruangan.
- Mengukur absorbansi menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm dengan larutan 0:5 sebagai blanko. Kurva kalibrasi larutan standar glukosa dibuat dengan cara mengplot konsentrasi glukosa terhadap absorbansi.

**F.2 Pembuatan kurva standar xilosa untuk mengukur keaktifan enzim xilanase :**

- Menimbang sebanyak 0,367 gram *d-xylose* dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml.
- Menambahkan buffer sitrat 0,1 M pH 5,5 sampai volume tepat 100 ml. Larutan ini selanjutnya disebut sebagai larutan induk xilosa
- Mengisi masing-masing 6 tabung reaksi dengan larutan induk xilosa berturut-turut sebanyak 0 ml, 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml dan 5 ml.
- Menambahkan masing-masing buffer sitrat 0,1 M pH 5,5 berturut-turut sebanyak 5 ml, 4 ml, 3 ml, 2 ml, 1 ml dan 0 ml, sehingga diperoleh 6 macam konsentrasi larutan standar xilosa.
- Mengambil 0,2 ml dari tiap konsentrasi larutan standar xilosa dan ditambahkan 1,8 ml CMC (*carboxymetil cellulose*) ke dalam tabung reaksi.
- Menginkubasi larutan dalam inkubator bersuhu 35°C

- Menambahkan masing-masing larutan 3 ml DNS (*dinitrosalicylic acid*) dan divortex hingga homogen.
- Memanaskan masing-masing tabung reaksi yang berisi larutan pada air mendidih selama 10 menit.
- Mendinginkan pada air es selama 10 menit.
- Mengangkat dan mendinginkan larutan sampai mencapai suhu ruangan.
- Mengukur absorbansi menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm dengan larutan 0:5 sebagai blanko. Kurva kalibrasi larutan standar xilosa dibuat dengan cara mengplot konsentrasi glukosa terhadap absorbansi.

## **G. Uji aktifitas enzim selulase dan enzim xilanase :**

### **G.1 Prosedur uji aktifitas enzim selulase sebelum di koreksi :**

- Memasukkan 0,2 ml enzim selulase kedalam dua tabung reaksi.
- Menambahkan 1,8 ml larutan CMC (*carboxymetil cellulose*) ke dalam tabung reaksi berisi enzim selulase dan 2 ml CMC ke dalam tabung reaksi sebagai larutan blanko.
- Menginkubasi selama 10 menit pada suhu 35°C.
- Menambahkan 3 ml DNS (*dinitrosalicylic acid*) ke dalam masing-masing tabung reaksi.
- Menghomogenkan campuran tersebut dengan menggunakan *vortex*.
- Memanaskan campuran tersebut pada air mendidih 100°C selama 10 menit.
- Mendinginkan campuran tersebut pada air es selama 10 menit.

- Mengangkat dan mendinginkan larutan sampai suhunya sama dengan suhu ruangan.
- Mengukur absorbansi pada panjang gelombang 540 nm.

## **G.2 Prosedur uji aktifitas enzim selulase untuk larutan koreksi:**

- Memasukkan 0,2 ml larutan enzim selulase kedalam dua tabung reaksi dan 0,2 larutan CMC ke dalam tabung reaksi sebagai blanko.
- Menginkubasi selama 10 menit pada suhu 35°C.
- Menambahkan 3 ml DNS (*dinitrosalicylic acid*) ke dalam masing-masing tabung reaksi.
- Menghomogenkan campuran tersebut dengan menggunakan *vortex*.
- Memanaskan masing-masing larutan yang berisi larutan pada air mendidih 100°C selama 2 menit.
- Menambahkan 1,8 ml larutan CMC (*carboxymetil cellulose*) ke dalam tabung reaksi.
- Memanaskan campuran tersebut pada air mendidih selama 10 menit.
- Mendinginkan campuran tersebut pada air es selama 10 menit.
- Mengangkat dan mendinginkan tabung reaksi sampai suhunya sama dengan suhu ruangan.
- Mengukur absorbansi pada panjang gelombang 540 nm.
- Perhitungan absorbansi (A) = Absorbansi (sebelum) – Absorbansi (sesudah)

### **G.3 Prosedur uji aktifitas enzim xilanase sebelum di koreksi :**

- Memasukkan 0,2 ml enzim xilanase kedalam dua tabung reaksi.
- Menambahkan 1,8 ml larutan xilan ke dalam tabung reaksi berisi enzim selulase dan 2 ml CMC ke dalam tabung reaksi sebagai larutan blanko.
- Menginkubasi selama 10 menit pada suhu 35°C.
- Menambahkan 3 ml DNS (*dinitrosalicylic acid*) ke dalam masing-masing tabung reaksi.
- Menghomogenkan campuran tersebut dengan menggunakan *vortex*.
- Memanaskan campuran tersebut pada air mendidih 100°C selama 10 menit.
- Mendinginkan campuran tersebut pada air es selama 10 menit.
- Mengangkat dan mendinginkan larutan sampai suhunya sama dengan suhu ruangan.
- Mengukur absorbansi pada panjang gelombang 540 nm.

### **G.4 Prosedur uji aktifitas enzim xilanase untuk larutan koreksi:**

- Memasukkan 0,2 ml larutan enzim xilanase kedalam dua tabung reaksi dan 0,2 larutan xilan ke dalam tabung reaksi sebagai blanko.
- Menginkubasi selama 10 menit pada suhu 35°C.
- Menambahkan 3 ml DNS (*dinitrosalicylic acid*) ke dalam masing-masing tabung reaksi.

- Menghomogenkan campuran tersebut dengan menggunakan *vortex*.
- Memanaskan masing-masing larutan yang berisi larutan pada air mendidih 100°C selama 2 menit.
- Menambahkan 1,8 ml larutan xilan) ke dalam tabung reaksi.
- Memanaskan campuran tersebut pada air mendidih selama 10 menit.
- Mendinginkan campuran tersebut pada air es selama 10 menit.
- Mengangkat dan mendinginkan tabung reaksi sampai suhunya sama dengan suhu ruangan.
- Mengukur absorbansi pada panjang gelombang 540 nm.
- Perhitungan absorbansi (A) = Absorbansi (sebelum) – Absorbansi (sesudah)

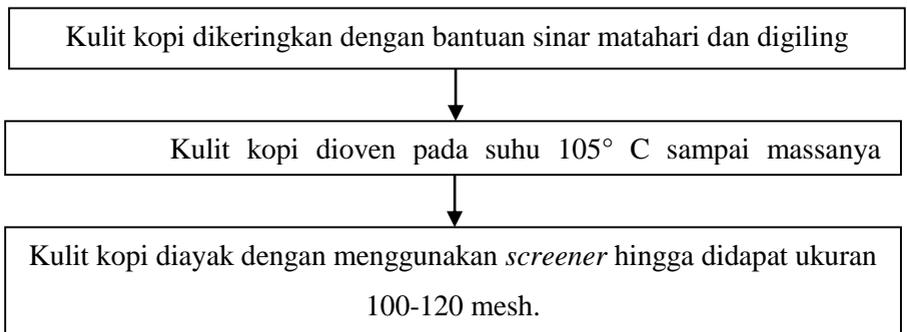
#### **H. Prosedur analisa konsentrasi glukosa dan xilosa**

- Sampel yang sedang dihidrolisis diambil sebanyak 2 ml dan dimasukkan ke dalam *microtube*.
- Sampel disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 10000 rpm dan suhu 4°C untuk memisahkan endapan.
- Sampel yang telah disentrifugasi diambil 0,2 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi.
- Aquadest ditambahkan sebanyak 1,8 ml ke dalam tabung reaksi yang berisi sampel.
- Sebanyak 3 ml larutan DNS ditambahkan dan dihomogenkan dengan *vortex* agar tercampur merata.
- Campuran tersebut dipanaskan dengan air mendidih selama 10 menit.

- Campuran didinginkan dengan air es selama 10 menit.
- Campuran direndam pada air dengan suhu ruang ( $\pm 25^{\circ}\text{C}$ ) selama 10 menit.
- Dilakukan pengukuran absorbansi dengan panjang gelombang 540 nm.

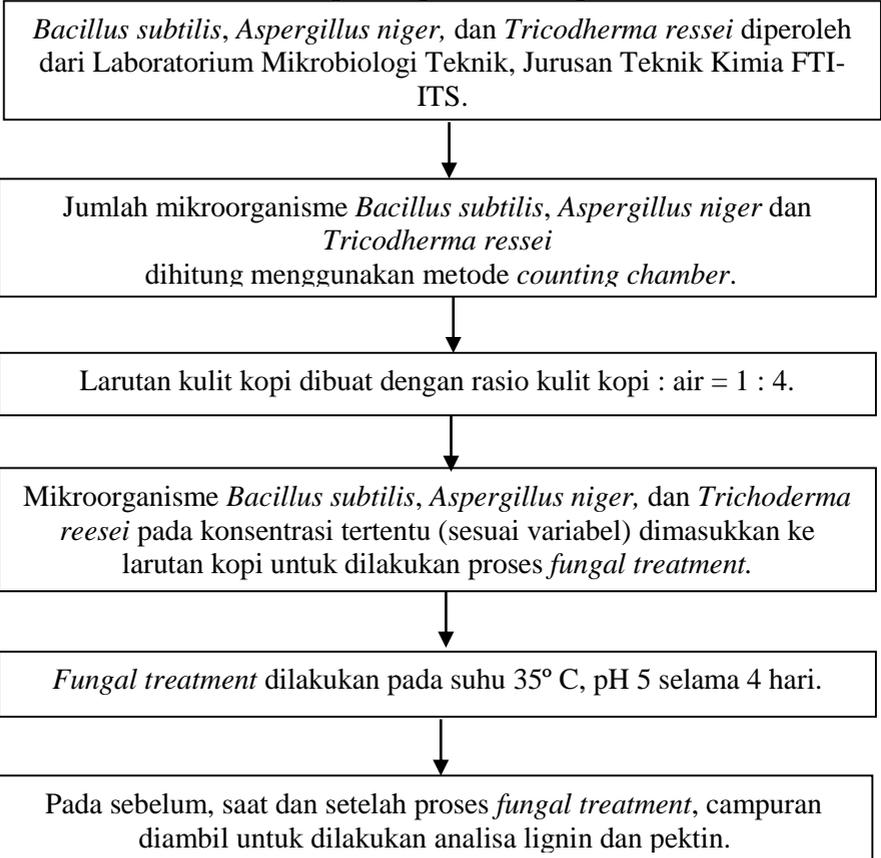
### III.7 Diagram Alir

#### III.7.1 Pre-treatment kulit kopi



### III.7.2 Fungal treatment

#### A. *Pre-treatment biologis dengan mikroorganisme*



### **B. Analisa Jumlah Sel**

Membuat larutan *nutrient broth* 100 ml dalam erlenmeyer dan disterilkan dengan *autoclave*.

Menanam mikroorganismenya, menginkubasi dengan suhu 30 °C dan memasukkan 1 ml sampel dalam tabung reaksi. Sampel diencerkan sampai 10 ml.

Meneteskan ke permukaan *haemocytometer* hingga dapat menutupi seluruh permukaannya.

*Haemocytometer* diletakkan di bawah lensa mikroskop untuk dihitung jumlahnya.

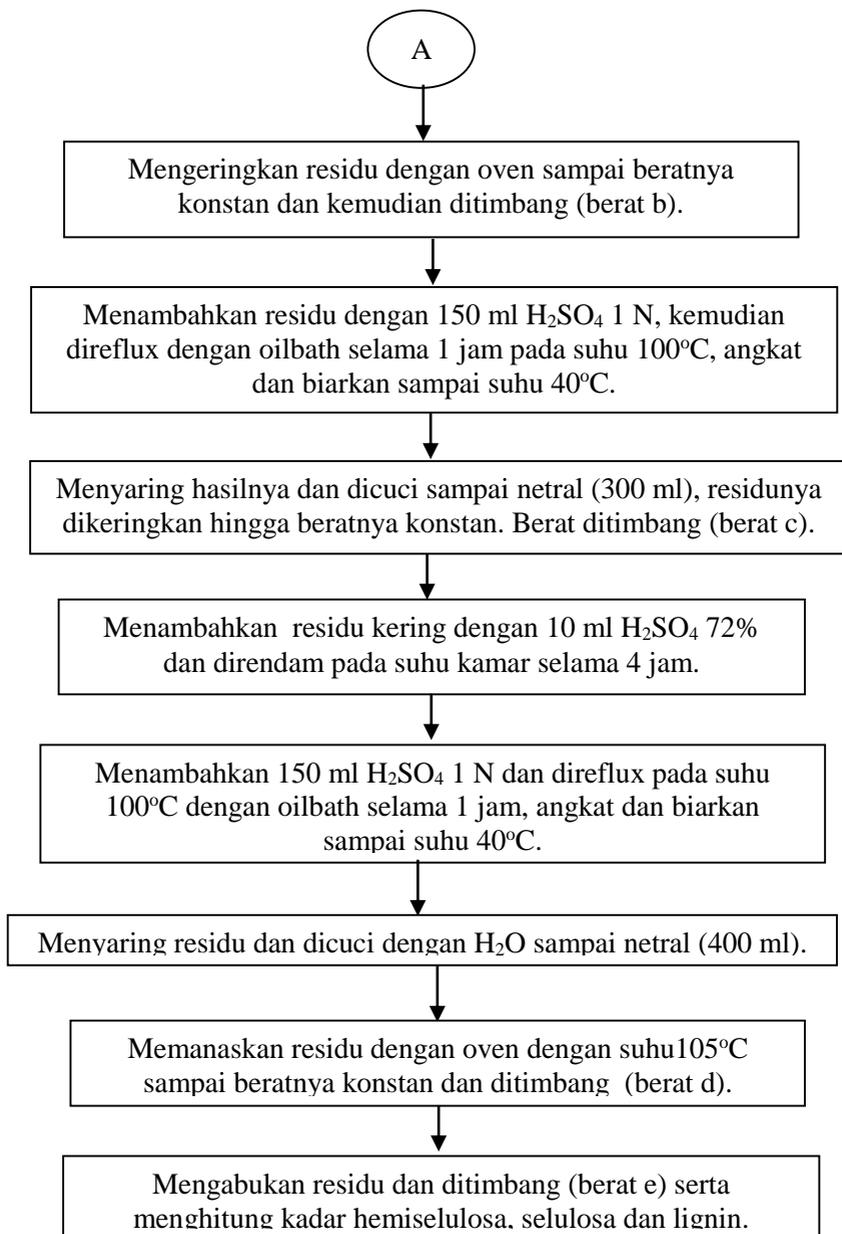
Melakukan pengamatan di mikroskop dengan perbesaran 400x

### **C. Prosedur analisa kadar selulosa, hemiselulosa dan lignin dengan metode chesson (Datta dkk, 1981)**

Menimbang 1 gr sampel kering (berat a) ditambahkan 150 ml H<sub>2</sub>O dan direflux pada suhu 100°C dengan *oilbath* selama 2 jam, angkat dan biarkan sampai suhu 40°C.

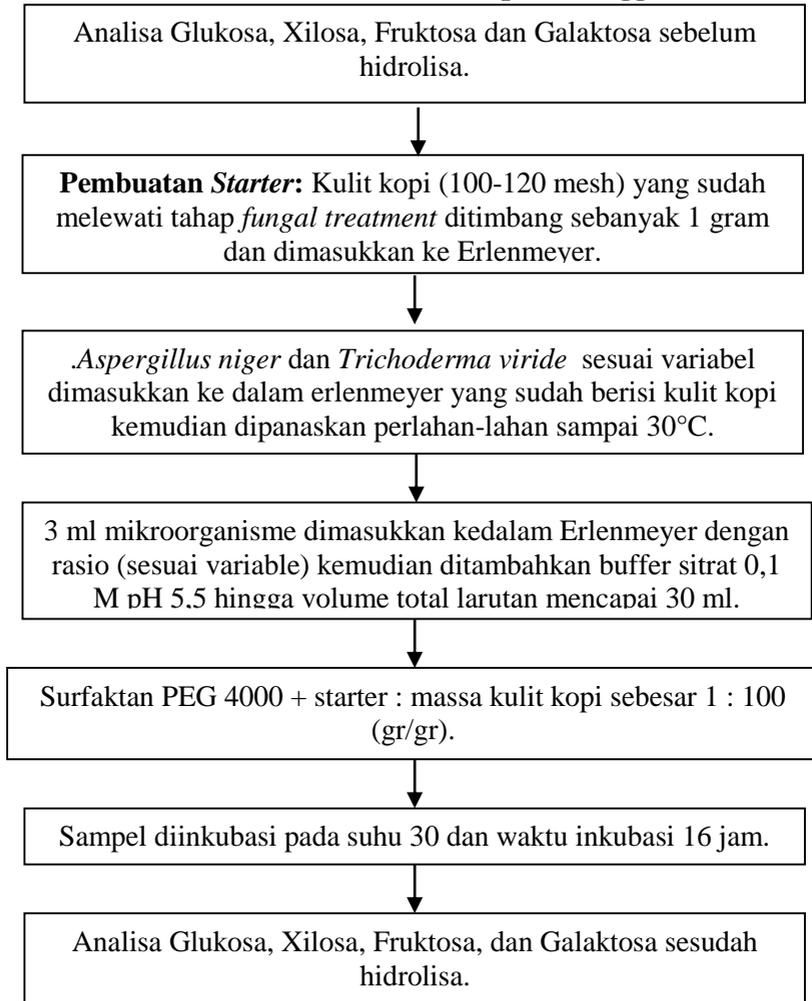
Menyaring hasilnya dan residu dicuci dengan air panas 300 ml.

A

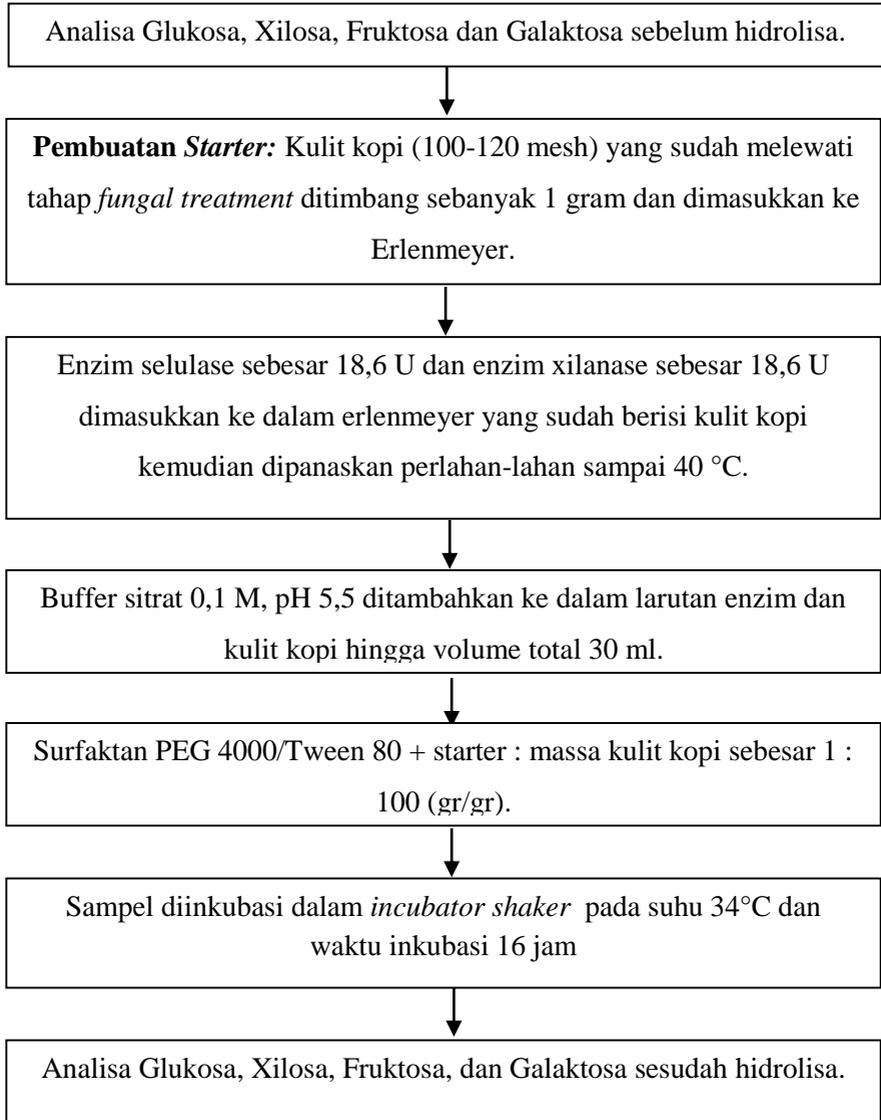


### III.7.3 Hidrolisis selulosa dan hemiselulosa pada kulit buah kopi menjadi glukosa.

#### A. Prosedur Hidrolisis kulit kopi menggunakan



**B.      **Prosedur Hidrolisis kulit kopi menggunakan enzim selulase murni dan enzim xilanase murni.****



### C. Pembuatan Larutan Buffer Sitrat pH 5,5

Asam sitrat sebanyak 5,7 gram ditimbang dan dimasukkan ke

Sodium sitrat sebanyak 20,66 gram ditambahkan ke dalam erlenmeyer yang sudah berisi asam sitrat.

Asam sitrat dan sodium sitrat dilarutkan dengan aquades hingga 1000

pH larutan buffer diatur dengan penambahan NaOH 0,1 M atau H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 M hingga pH larutan buffer menjadi 5,5.

### D. Pembuatan Larutan DNS ( Asam Dinitrosalisilat)

NaOH sebanyak 16 gram ditimbang dan dilarutkan menggunakan aquadest sampai volume 200 ml.

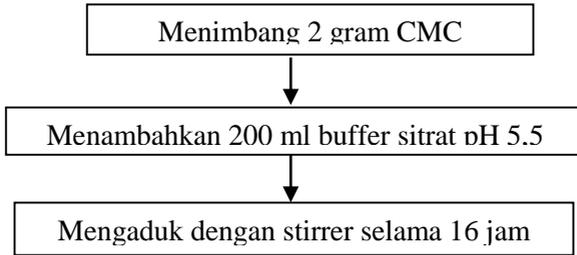
Sodium potassium tartrat sebanyak 30 gram dan sodium metabisulfit sebanyak 8 gram dilarutkan dengan aquadest sampai volume 500 ml.

DNS sebanyak 10 gram dilarutkan dengan larutan NaOH sebanyak 200

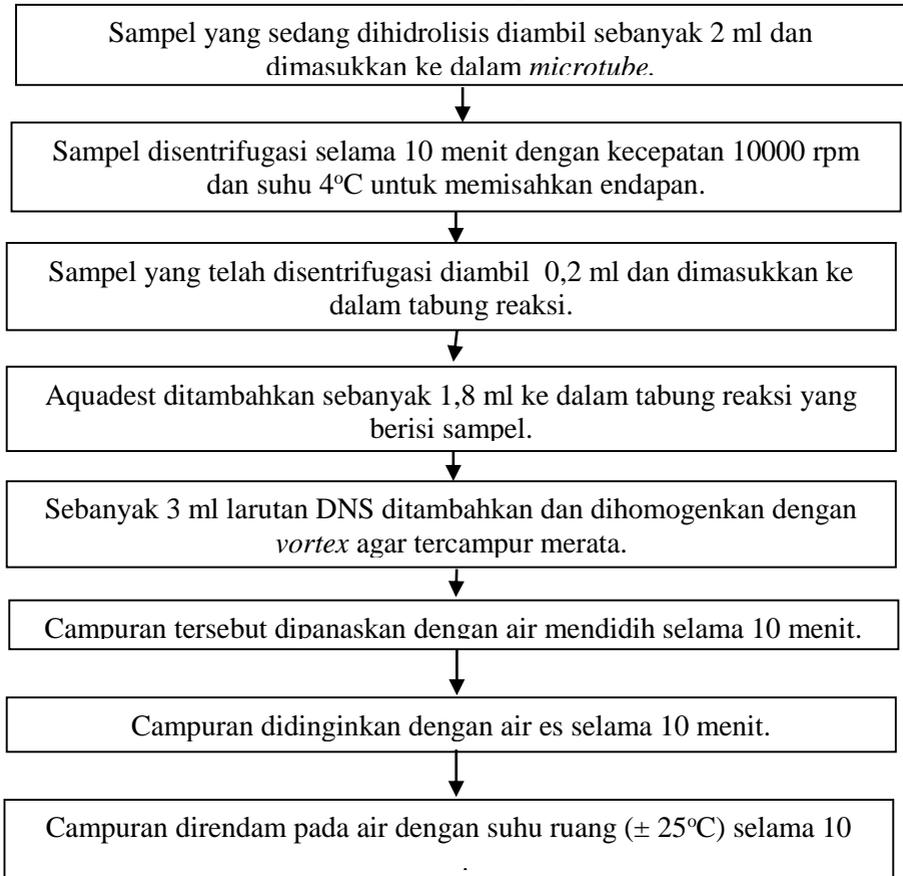
Larutan DNS ditambahkan ke dalam larutan sodium potassium tartrat dan sodium metabisulfit.

Dilakukan penambahan aquadest hingga volumenya mencapai 1000 ml. Larutan diaduk sampai benar-benar terlarut sempurna.

### E. Pembuatan Larutan CMC (*Carboxymetil Cellulose*)

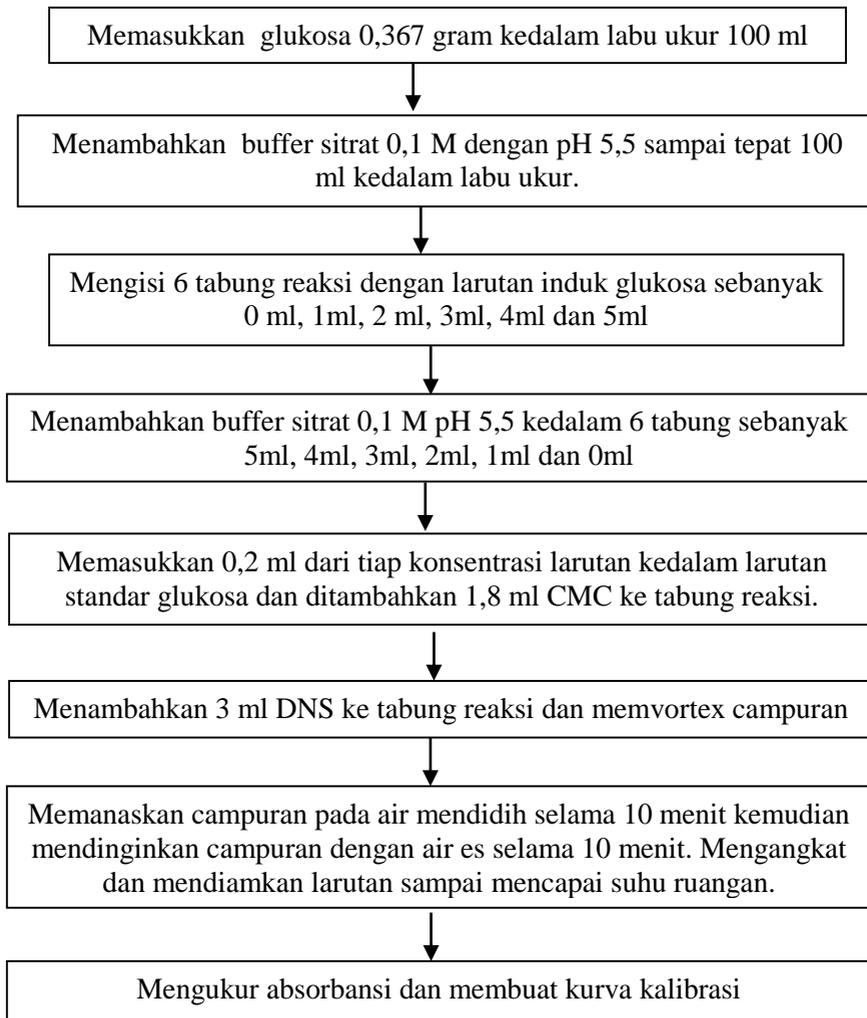


### F. Prosedur analisa konsentrasi glukosa dan xilosa



## **G. Pembuatan kurva standar**

### **G.1 Pembuatan kurva standar glukosa untuk mengukur keaktifan enzim selulase:**



## G.2 Pembuatan kurva standar xilosa untuk mengukur

Memasukkan glukosa 0.367 gram kedalam labu ukur 100 ml

Menambahkan buffer sitrat 0,1 M dengan pH 5,5 sampai tepat 100 ml kedalam labu ukur.

Mengisi 6 tabung reaksi dengan larutan induk glukosa sebanyak 0 ml, 1ml, 2 ml, 3ml, 4ml dan 5ml

Menambahkan buffer sitrat 0,1 M pH 5,5 kedalam 6 tabung sebanyak 5ml, 4ml, 3ml, 2ml, 1ml dan 0ml

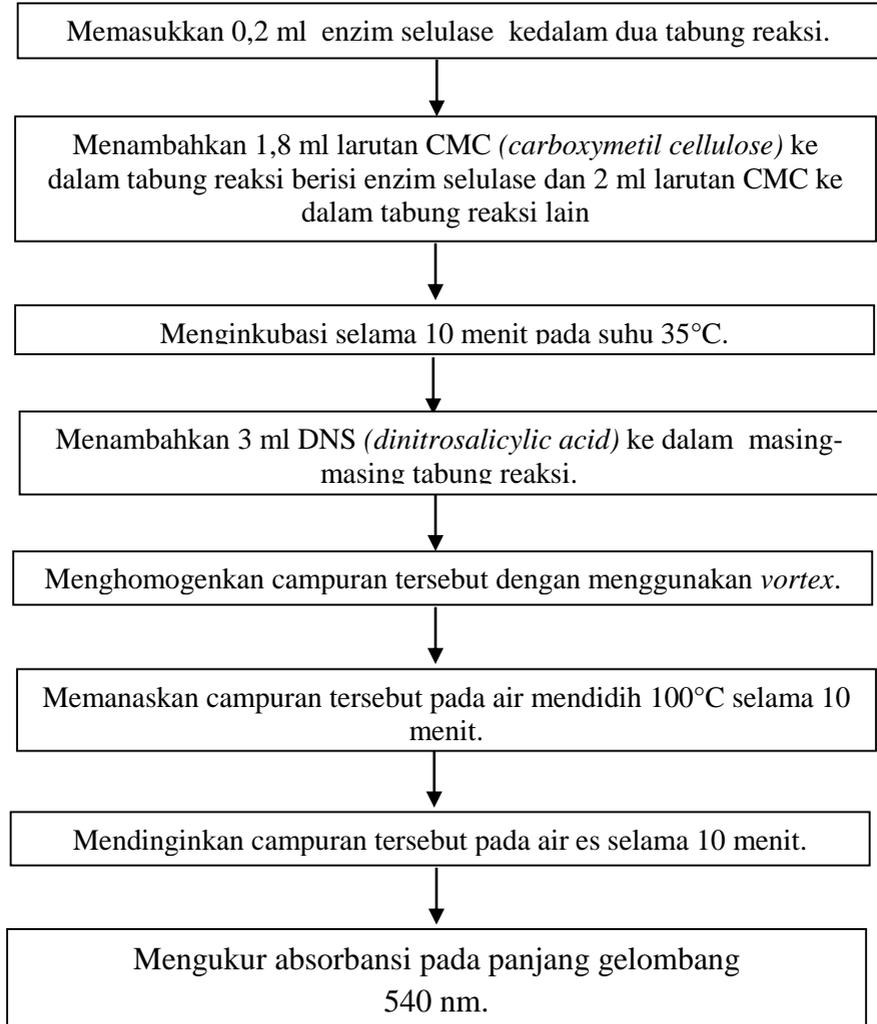
Memasukkan 0,2 ml dari tiap konsentrasi larutan kedalam larutan standar glukosa dan ditambahkan 1,8 ml larutan xilan ke tabung reaksi.

Menambahkan 3 ml DNS ke tabung reaksi dan memvortex campuran

Memanaskan campuran pada air mendidih selama 10 menit kemudian mendinginkan campuran dengan air es selama 10 menit. Mengangkat dan mendinginkan larutan sampai mencapai suhu ruangan.

Mengukur absorbansi dan membuat kurva kalibrasi

**H. Uji aktifitas enzim selulase dan enzim xilanase :**  
**H.1 Prosedur uji aktifitas enzim selulase sebelum di koreksi:**



## H.2 Prosedur uji aktifitas enzim selulase untuk larutan koreksi :

Memasukkan 0,2 ml larutan enzim selulase kedalam dua tabung reaksi dan 0,2 larutan CMC ke dalam tabung reaksi sebagai blanko.

Menginkubasi selama 10 menit pada suhu 35°C.

Menambahkan 3 ml DNS (*dinitrosalicylic acid*) ke dalam masing-masing tabung reaksi.

Menghomogenkan campuran tersebut dengan menggunakan *vortex*.

Memanaskan masing-masing tabung reaksi yang berisi larutan pada air mendidih 100°C selama 2 menit.

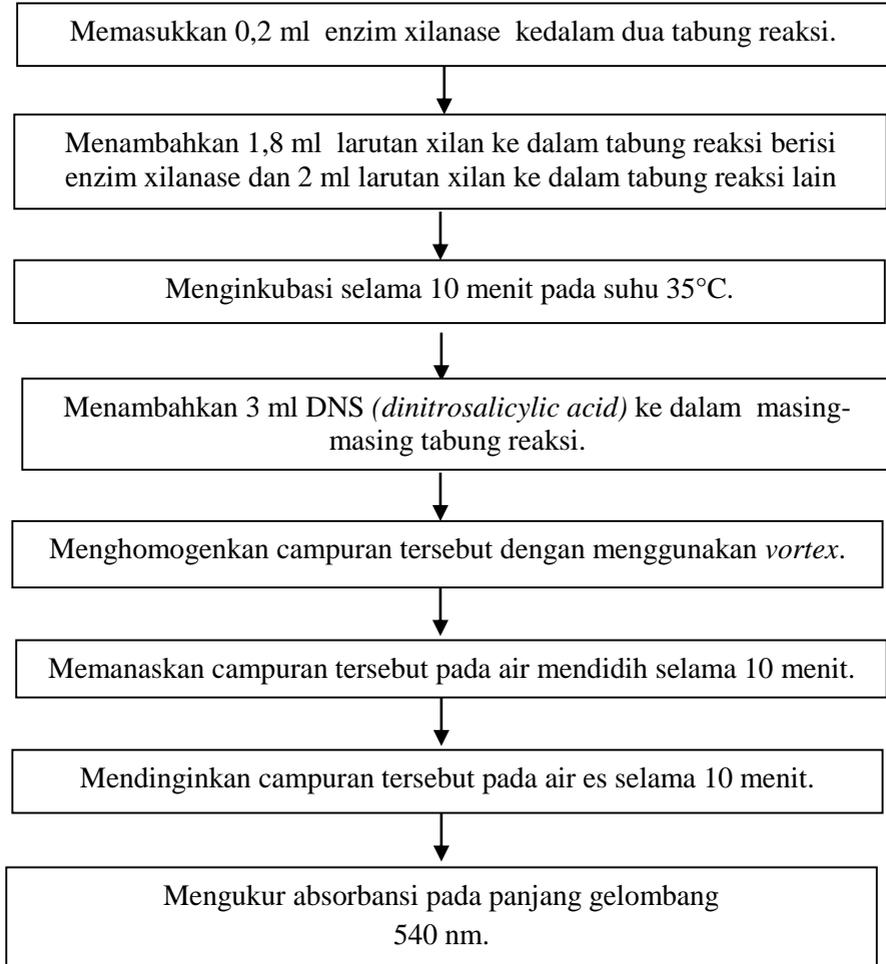
Menambahkan 1,8 ml larutan CMC (*carboxymetil cellulose*) ke dalam tabung reaksi

Memanaskan campuran pada air mendidih dan mendinginkan campuran tersebut pada air es selama masing-masing 10 menit. Mengangkat dan mendinginkan tabung reaksi sampai suhunya sama dengan suhu ruangan.

Mengukur absorbansi pada panjang gelombang 540 nm.

Perhitungan absorbansi (A) =  
Absorbansi (sebelum) – Absorbansi (sesudah)

### H.3 Prosedur uji aktifitas enzim xilanase sebelum di koreksi :



#### H.4 Prosedur uji aktifitas enzim xilanase untuk larutan koreksi :

Memasukkan 0,2 ml larutan enzim xilanase dalam dua tabung reaksi dan 0,2 larutan xilan ke dalam tabung reaksi sebagai blanko.

Menginkubasi selama 10 menit pada suhu 35°C.

Menambahkan 3 ml DNS (*dinitrosalicylic acid*) ke dalam masing-masing tabung reaksi.

Menghomogenkan campuran tersebut dengan menggunakan *vortex*.

Memanaskan masing-masing tabung reaksi yang berisi larutan pada air mendidih 100°C selama 2 menit.

Menambahkan 1,8 ml larutan xilan ke dalam tabung reaksi

Memanaskan campuran pada air mendidih dan mendinginkan campuran tersebut pada air es selama masing-masing 10 menit. Mengangkat dan mendinginkan tabung reaksi sampai suhunya sama dengan suhu ruangan.

Mengukur absorbansi pada panjang gelombang 540 nm.

Perhitungan absorbansi (A) =  
Absorbansi (sebelum) – Absorbansi (sesudah)

## **BAB IV**

### **HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN**

Tujuan dari penelitian ini dua yakni, pertama mengetahui penurunan kadar lignin dan pektin dari hasil *pretreatment* limbah kulit kopi secara biologis menggunakan mikroorganisme *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis*, dan *Trichoderma reesei*. Kedua mengetahui kadar glukosa dan xilosa hasil hidrolisis limbah kulit kopi secara enzimatik menggunakan campuran enzim selulase dan xilanase murni dan biologis menggunakan mikroorganisme *Aspergillus niger* dan *Trichoderma viride*, serta mengetahui pengaruh penambahan surfaktan PEG 4000 dan Tween 80 dengan berbagai konsentrasi pada proses hidrolisis.

Oleh karena itu pada penelitian ini terdapat beberapa tahapan proses, tahap pertama adalah tahap persiapan yaitu pembuatan kurva pertumbuhan masing-masing mikroorganisme dan pembuatan kurva standar glukosa dan xilosa, dimana kurva pertumbuhan digunakan untuk proses *pretreatment* dan kurva standar glukosa, xilosa digunakan untuk proses hidrolisa enzimatik. Setelah dilakukan tahap persiapan, selanjutnya dilakukan tahap kedua yaitu *pretreatment*. Proses *pretreatment* sendiri terdiri dari dua tahap, tahap yang pertama adalah *pretreatment* secara mekanik dan tahap kedua adalah *pretreatment* secara biologis. Setelah dilakukan *pretreatment*, tahap ketiga adalah hidrolisa. Pada penelitian ini hidrolisa dilakukan dengan dua cara, yaitu secara biologis dan secara enzimatik. Setelah dilakukan hidrolisa selanjutnya dilakukan analisa hasil percobaan. Tahap-tahap dalam penelitian ini akan dibahas dalam poin-poin dibawah.

#### **IV.1 *Pretreatment* Kulit Buah Kopi**

Pada penelitian ini dilakukan *pretreatment* kulit buah kopi terlebih dahulu. *Pretreatment* ini penting karena lignin, pektin, hemiselulosa dan selulosa dalam kulit kopi terdiri dari ikatan kovalen, ikatan intermolekular, gaya van der Waals yang membentuk struktur kompleks dan susah ditembus oleh proses hidrolisa dan bersifat tidak larut dalam air (Ayeni, 2015). *Pretreatment* kulit kopi dilakukan dengan dua tahap, yaitu tahap pertama *pretreatment* secara mekanik lalu tahap kedua *pretreatment* secara biologis. *Pretreatment* sangat dibutuhkan dalam penelitian ini, karena proses *pretreatment* dapat merusak struktur lignin sehingga membuat selulosa lebih mudah didegradasi saat proses hidrolisis (Mood S.H et al, 2013) selain itu *pretreatment* dapat menurunkan kristalin selulose dan meningkatkan porositas material (Ye sun et al, 2002).

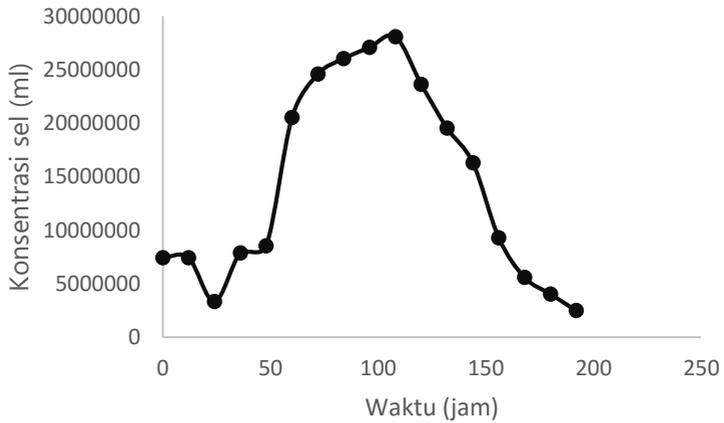
*Pretreatment* kulit kopi tahap pertama yaitu secara mekanik. Kulit buah kopi yang diperoleh dari PT. Perkebunan Nusantara XII Kebun Bangelan dikeringkan dengan sinar matahari dengan tujuan untuk menghindari pembusukan kulit buah kopi selama kurang lebih tujuh hari. Setelah itu kulit kopi dihaluskan dengan mesin penggiling lalu diayak dengan *screener* berukuran 120 mesh, tujuannya yaitu untuk membantu proses hidrolisis, karena partikel-partikel substrat yang lebih kecil membuat permukaan kontak antara substrat dengan enzim akan semakin luas sehingga kandungan lignoselulose dalam substrat lebih mudah di degradasi saat proses hidrolisis. Ukuran partikel substrat optimum untuk proses hidrolisa adalah 100-120 mesh (Anwar et al, 2012). Setelah diayak, selanjutnya kulit kopi dimasukkan kedalam oven dengan suhu 60°C selama 27 jam, tujuannya yaitu agar kulit kopi benar-benar kering. Dalam kurun waktu 27 jam setelah massa kulit kopi yang telah di oven konstan, didapatkan kadar air kulit kopi sebesar 11,377%.

*Pretreatment* selanjutnya yaitu *pretreatment* secara biologis. Pada penelitian ini mikroorganisme yang digunakan

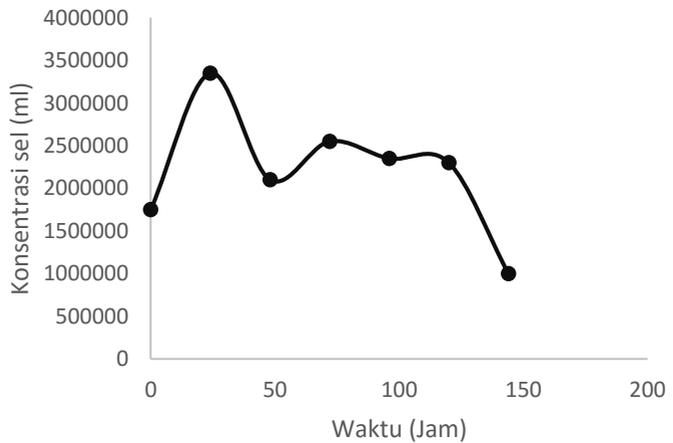
adalah *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger* dan *Bacillus subtilis*. Pemilihan mikroorganisme tersebut karena fungi jenis *brown-rot* seperti *Aspergillus niger* biasanya dapat mendegradasi selulosa, fungi jenis *soft-rot* seperti *Trichoderma reesei* dapat mendegradasi selulosa dan lignin (Ye Sun et al, 2002), sedangkan bakteri *Bacillus subtilis* mendegradasi pektin. Selain itu, *Trichoderma reesei* juga merupakan mikroorganisme dengan aktivitas degradasi selulosa paling baik bila dibandingkan dengan *cellulotic* fungi lainnya (Shahzadi et al, 2014). Variabel yang digunakan pada *pretreatment* biologis ini adalah *Aspergillus niger* : *Trichoderma reesei* = 1:1 (v/v) dan *Bacillus subtilis* : *Trichoderma reesei* = 2:1 (v/v). Penggunaan variabel ini merujuk pada penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa campuran mikroorganisme *Aspergillus niger* : *Trichoderma reesei* = 1:1 (v/v) dan *Bacillus subtilis* : *Trichoderma reesei* = 2:1 (v/v) menghasilkan penurunan lignin terbaik (Nuniek et al, 2016).

Langkah pertama yang dilakukan adalah membuat kurva pertumbuhan. Kurva pertumbuhan berguna untuk mengetahui waktu yang dibutuhkan mikroorganisme untuk mencapai fase log. Fase log merupakan fase dimana mikroorganisme mengalami pertumbuhan pesat (Sundstrom, 1994 ). Mikroorganisme yang berada dalam fase log sangat efektif mendegradasi lignoselulose dalam substrat, oleh karena itu mikroorganisme yang digunakan pada proses *pretreatment* berada dalam fase log. Hasil kurva pertumbuhan yang diperoleh dapat dilihat pada appendix A-3. Setelah diperoleh fase log tiap mikroorganisme, selanjutnya membuat suspensi mikroorganisme dengan lama inkubasi sesuai dengan waktu yang diperoleh dari fase log tersebut. Setelah itu *pretreatment* biologis dapat dilakukan. *Pretreatment* biologis dilakukan menggunakan inkubator shaker untuk menjaga suhu sampel 30°C selama 4 hari (96 jam) dengan kecepatan putaran 125

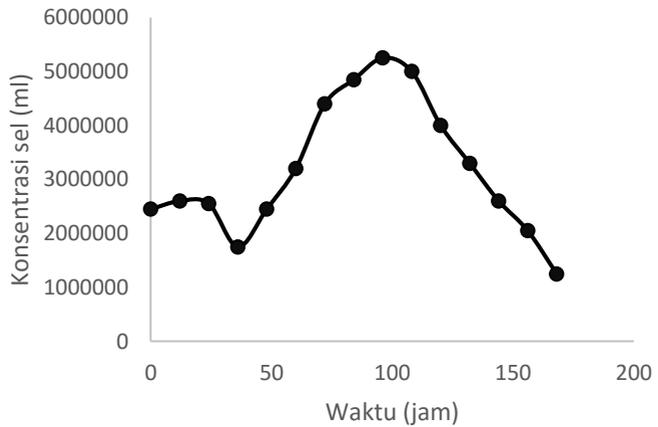
rpm. Berikut ini adalah kurva pertumbuhan mikroorganisme yang digunakan dalam proses *pretreatment*



(a)

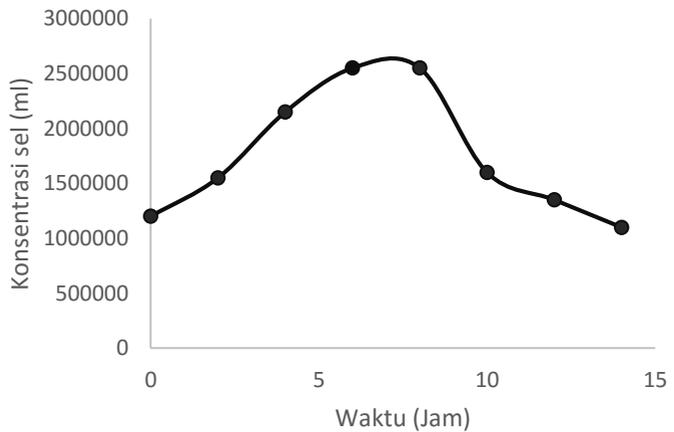


(b)



(c)

**Gambar IV.1** Kurva Pertumbuhan Fungi (a) *Trichoderma ressei*, (b) *Aspergillus niger* dan (c) *Trichoderma viride*



**Gambar IV.2** Kurva Pertumbuhan Bakteri *Bacillus subtilis*  
Berikut data analisa kandungan lignoselulosa sebelum dan sesudah *pretreatment*:

**Tabel IV.1** Hasil Analisa Kandungan Selulosa Sebelum dan Sesudah *Pretreatment*

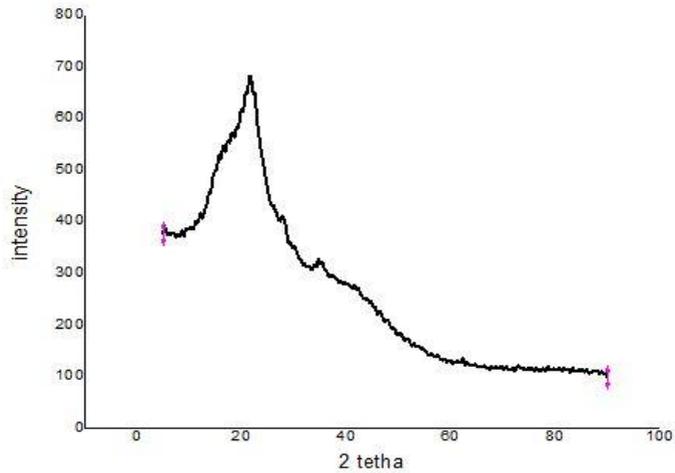
Variabel	Tannin (%)	Lignin (%)	Pektin (%)	Selulosa (%)	Hemiselulosa (%)
BS:TR	3.05	1.96	0.98	65.82	24.7
AN:TR	2.15	2.05	1.04	67.05	26.18
Kulit kopi awal	4.05	6.82	2.18	58.62	21.96

(Balai Penelitian dan Konsultasi Industri)

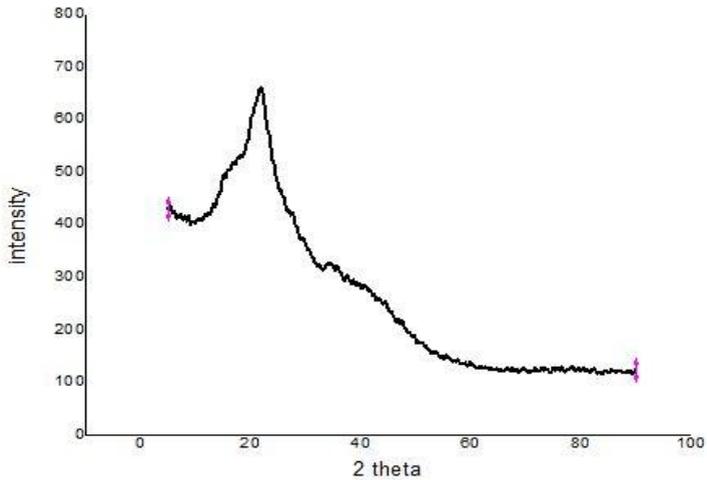
Dari data diatas dapat dilihat bahwa terjadi penurunan kandungan lignin pada variabel *pretreatment* BS:TR dan variabel AN:TR dimana kadar lignin dari kulit kopi awal sebesar 6.82% dan setelah *pretreatment* menjadi 1.96% untuk variabel BS:TR dan 2.05% untuk variabel AN:TR. Sedangkan untuk kandungan pektin juga mengalami penurunan setelah proses *pretreatment*, dimana kadar pektin pada kulit kopi awal sebesar 2.18 dan setelah *pretreatment* menjadi 1.04% untuk variabel AN:TR dan 0.98% untuk variabel BS:TR. Hal tersebut juga di ikuti dengan penambahan kandungan selulosa dan hemiselulosa, dimana kadar selulosa kulit kopi awal sebesar 58.62% dan setelah *pretreatment* menjadi 67.05% untuk variabel AN:TR dan 65.82% untuk BS:TR. Untuk kadar hemiselulosa kulit kopi awal sebesar 21.96% dan setelah *pretreatment* menjadi 26.18% untuk variabel AN:TR dan 24.7% untuk variabel BS:TR. Penurunan kadar lignin dan penambahan kadar selulosa dan hemiselulosa menandakan bahwa mikroorganisme yang digunakan pada proses ini telah merusak lapisan lignin dan membuat kandungan selulosa dan hemiselulosa semakin bertambah (Mood S.H et al, 2013). Dari tabel diatas penurunan kandungan lignin pada variabel *pretreatment* AN:TR lebih besar dari variabel BS:TR, hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Atika pada 2016, dimana *Aspergillus niger* efektif mendegradasi lignin dan pektin, *Trichoderma reesei* efektif

mendegradasi lignin sehingga variabel *pretreatment* yang menggunakan mikroorganisme tersebut mendegradasi lignin lebih banyak.

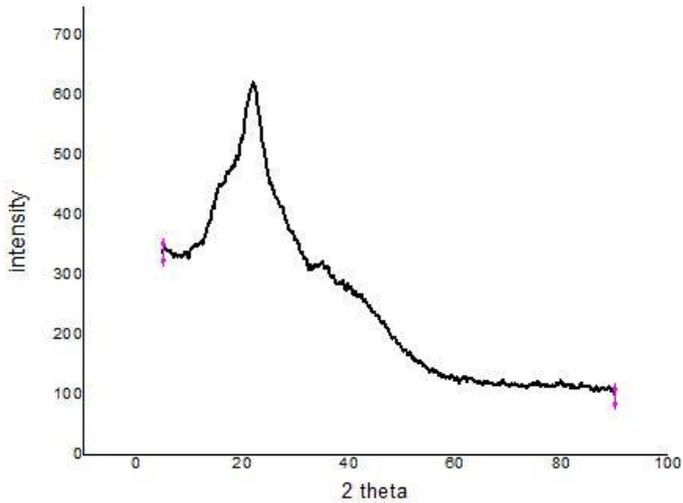
Selulosa merupakan biopolimer yang dapat diperbaharui dan melimpah di bumi (Barnette dkk., 2011). Selulosa terdiri dari *D-glucosyranose* dan dihubungkan dengan ikatan  $\beta$ -1,4-*glycosidic*. Terdapat ikatan hidroksil dalam makromolekul selulosa yang terdiri dari beberapa intra- dan intermolekul ikatan hidrogen sehingga menghasilkan berbagai macam struktur kristalin selulosa (Park et al, 2010). Karena struktur selulosa begitu kompleks, maka dibutuhkan analisa *X-Ray Diffraction* untuk mengetahui bagaimana struktur kristalin dari substrat yang digunakan. Struktur kristalin selulosa tidak sempurna, sebagian besar dari struktur selulosa yang berada dilapisan luar (*less-ordered*) disebut amorf sedangkan sisanya yang berada dilapisan dalam selulosa (*ordered*) disebut kristalin. Semakin banyak amorf pada struktur kristalin, semakin mudah substrat selulosa didegradasi oleh enzim (Park et al, 2010). Analisa *X-Ray Diffraction* ini dilakukan pada kulit buah kopi sebelum dan sesudah *pretreatment*. Berikut hasil analisa *X-Ray Diffraction* untuk kedua variabel *pretreatment*:



**Gambar IV.3a** Grafik Hasil Analisa X-Ray Diffraction kulit buah kopi sebelum *pretreatment*



**Gambar IV.3b** Grafik Hasil Analisa X-Ray Diffraction kulit buah kopi sesudah *pretreatment* variabel BS:TR = 2:1



**Gambar IV.3c** Grafik Hasil Analisa X-Ray Diffraction kulit buah kopi sesudah *pretreatment* variabel AN:TR = 1:1

Dari grafik diatas terlihat hasil analisa kulit kopi sebelum *pretreatment* menunjukkan puncak difraksi pada  $2\theta = 21,6^\circ$ ;  $22,6^\circ$ ;  $27,7^\circ$  dan  $28,2^\circ$ , merujuk pada *reflector plane* (021); (002); dan (040). Puncak sampel sebelum *pretreatment* dan setelah *pretreatment* terlihat pada Gambar IV.3a dan IV.3b dimana puncak difraksi sampel AN:TR = 1:1 pada  $2\theta = 22,045^\circ$  dan BS:TR = 2:1 =  $22,033^\circ$ . Hasil ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh Bistamam et. al. pada 2015 dimana puncak difraksi pada  $2\theta = 22^\circ$  merupakan karakteristik dari kristalin selulosa I (bentuk selulosa yang paling banyak ditemui di alam). Setelah dilakukan *pretreatment* kulit buah kopi secara biologis, diperoleh hasil analisa X-Ray Diffraction dengan puncak difraksi pada *reflector plane* (021) dan (002) mengalami peningkatan intensitas seperti yang terlihat pada Gambar IV.3a dan IV.3b. Hasil yang didapatkan merupakan karakter umum dari bentuk

amorf selulosa yang sering ditemukan setelah *pretreatment* dengan cara pelarutan dan regenerasi, dimana luas area pada *reflector plane* (021) dan (002) mengalami peningkatan (Xiao et. al., 2011).

Dari gambar diatas, sampel kulit kopi yang belum di *pretreatment* tidak menunjukkan adanya puncak difraksi pada  $2\theta = 35^\circ$  sedangkan pada sampel hasil *pretreatment* menunjukkan adanya puncak difraksi  $2\theta = 35,07^\circ$ . Pada struktur hemiselulosa, puncak difraksi pada  $2\theta = 35^\circ$  (Hamada et. al., 2013). Hal ini menunjukkan bahwa kandungan hemiselulosa pada sampel yang telah di *pretreatment* telah meningkat.

Metode XRD juga digunakan untuk mencari nilai *Crystallinity Index* bahan lignoselulosa. XRD akan membaca nilai *Crystallinity Index* dari jumlah kristal selulosa dalam sampel padatan, jika proses *pretreatment* dilakukan maka nilai *Crystallinity Index* akan meningkat. Perhitungan dilakukan dengan membaca hasil XRD dengan menentukan besar nilai intensitas selulosa kristalin dan amorf. Intensitas selulosa amorf dapat dilihat pada sudut  $2\theta$  sekitar  $18^\circ$  dan selulosa kristalin pada  $22-24^\circ$ .

Nilai *Crystallinity Index (CrI)* dihitung dengan memakai persamaan

$$CrI = (I_{002} - I_{am}) / I_{002} \times 100\%$$

Dimana nilai  $I_{002}$  adalah nilai intensitas dari selulosa kristalin yang berada pada  $2\theta = 22,5^\circ$  dan  $I_{am}$  adalah intensitas selulosa amorf pada saat  $2\theta = 18,7^\circ$ .

(Zhu et.al, 2012)

Berdasarkan Gambar IV.3, nilai CrI dapat ditampilkan dalam tabel berikut

**Tabel IV.2** CrI kulit kopi pada berbagai variabel

No	Variabel	$I_{002}$	$I_{am}$	CrI(%)
1	Unpretreatment	653.24	583.46	10.68
2	Pretreatment BSTR	592.75	502.50	15.22
3	Pretreatment ANTR	601.41	506.35	15.81

Adanya peningkatan nilai CrI menunjukkan hilangnya senyawa amorf dari sampel sehingga struktur selulosa terbuka, hal ini berarti berkurangnya lignin dan pektin.

#### IV.2 Produksi Enzim Selulase dan Xilanase Murni

Jika persiapan untuk metode biologis adalah mempersiapkan fase log, maka persiapan untuk metode enzimatik adalah mempersiapkan aktivitas dan kurva standar enzim. Enzim selulase murni yang digunakan merupakan enzim selulase dari *Aspergillus niger*, sedangkan enzim xilanase murni digunakan enzim xilanase dari *Trichoderma longibrachiatum*. Tahap ini menggunakan nilai absorbansi yang diperoleh dengan pemakaian Spektrofotometer yang kemudian diplot dengan konsentrasi glukosa/xilosa sehingga didapatkan kurva yang dimaksud. Kurva standar glukosa untuk mengukur keaktifan enzim selulosa dan kurva standar xilosa untuk mengukur keaktifan enzim xilanase.

Adapun kurva yang didapatkan dan perhitungan ditunjukkan oleh tabel-tabel dan gambar-gambar berikut:

**Tabel IV.3** Perhitungan Kurva Standar Glukosa (dengan CMC) untuk Menguji Keaktifan Enzim Selulase

Larutan glukosa (ml)	Larutan Buffer (ml)	Diambil (ml)	Volume Total (ml)	Konsentrasi ( $\mu\text{mol/ml}$ )		Absorbansi
				Tabung *	Kuvet ^	
0	5	0,2	5	0	0	0
1	4	0,2	5	0.734	0.4078	0.160
2	3	0,2	5	1.468	0.8156	0.2412
3	2	0,2	5	2.202	1.2233	0.3438
4	1	0,2	5	2.936	1.6311	0.4078

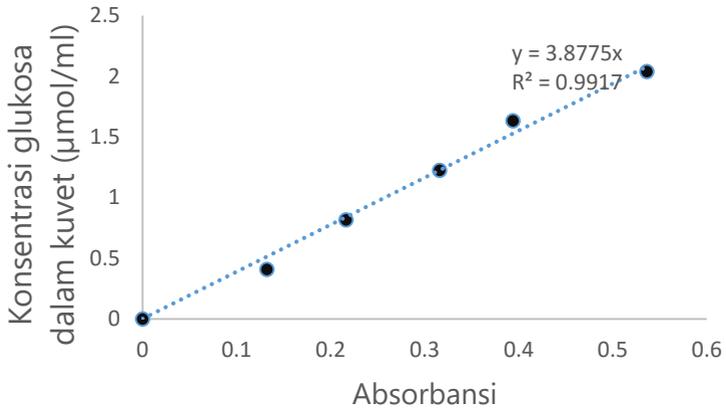
5	0	0,2	5	3.67	2.039	0.506
---	---	-----	---	------	-------	-------

**Tabel IV.4** Perhitungan Kurva Standar Xilosa (dengan Xilan) untuk Menguji Keaktifan Enzim Xilanase

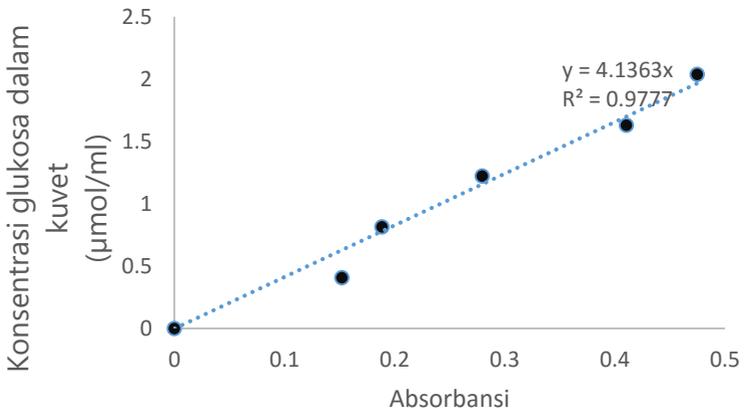
Larutan xilosa (ml)	Larutan Buffer (ml)	Diambil (ml)	Volume Total (ml)	Konsentrasi ( $\mu\text{mol/ml}$ )		Absorbansi
				Tabung *	Kuvet ^	
0	5	0,2	5	0	0	0
1	4	0,2	5	0.734	0.4078	0.152
2	3	0,2	5	1.468	0.8156	0.1886
3	2	0,2	5	2.202	1.2233	0.2794
4	1	0,2	5	2.936	1.6311	0.4106
5	0	0,2	5	3.67	2.0388	0.4748

\*Konsentrasi larutan glukosa/xilosa dan buffer sitrat

^Konsentrasi larutan setelah ditambah 1,8 ml CMC dan 3 ml DNS



**Gambar IV.4** Kurva Standar Glukosa (dengan CMC) untuk Menguji Keaktifan Enzim Selulase



**Gambar IV.5** Kurva Standar Xilosa (dengan xilan) untuk Menguji Keaktifan Enzim Xilanase

Setelah kurva standar glukosa dan xilosa yang telah didapat, langkah selanjutnya adalah menguji keaktifan enzim

selulase dan xilanase murni. Keaktifan enzim diuji dengan metode DNS dan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 540 nm. Kedua kurva di atas (Gambar IV.4 dan Gambar IV.5) diperoleh dari larutan glukosa dan xilosa yang masing-masing dicampurkan dengan *Carboxymetil Cellulose* (CMC) dan xilan. CMC digunakan karena CMC dapat dihidrolisis oleh enzim selulase sehingga menghasilkan glukosa, sedangkan xilan dihidrolisis oleh enzim xilanase menjadi xilosa. Berdasarkan hal tersebut maka dapat diketahui bagaimana dan berapa aktivitas dari enzim tersebut. panjang gelombang yang digunakan untuk mengukur absorbansi dari enzim selulase dan enzim xilanase adalah 540 nm. Pemilihan panjang gelombang tersebut dikarenakan pada panjang gelombang 540 nm, reaksi gula reduksi dengan reagen *Dinitrosalicylic Acid* (DNS) akan menghasilkan warna merah atau jingga setelah dipanaskan dan didinginkan sehingga dapat terbaca absorbansinya oleh panjang gelombang 540 nm.

Satu unit (1U) aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dibutuhkan untuk menghasilkan satu  $\mu$ mol gula reduksi per menit. hasil pengukuran aktivitas enzim selulase murni dari *Aspergillus niger* dan enzim xilanase murni dari *Trichoderma longibrachiatum* pada berbagai variasi pH ditunjukkan pada tabel berikut.

**Tabel IV.5** Pengukuran Aktivitas Enzim Selulase dan Enzim Xilanase Murni

Enzim	Absorbansi			Slope	Aktivitas (U/ml)	Kebutuhan enzim (ml)
	A1	A2	A1-A2			
Selulase	1,6378	1,419	0.2188	3,8775	2,121	14,344
Xilanase	0,801	0,4426	0.3584	4,1363	1,48254	12,5468

Untuk mendapatkan kebutuhan campuran enzim selulase murni dan enzim xilanase murni didapatkan dengan menghitung aktivitas enzim. Konsentrasi enzim yang

dibutuhkan dalam hidrolisis adalah 18,6 U enzim selulase murni dan 18,6 U enzim xilanase murni untuk 1 gram kulit buah kopi yang dihidrolisis, sehingga setelah didapatkan aktivitas enzim dengan rumus:

$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{(A_1 - A_2) \times \text{slope kurva} \times V \text{ sampel (5 mL)}}{\text{waktu inkubasi} \times V \text{ enzim (0,2 mL)}}$$

Setelah itu dilakukan pembagian antara konsentrasi enzim yang dibutuhkan dalam hidrolisis dengan aktivitas enzim, dan didapatkan kebutuhan enzim campuran sebesar 26,891 ml.

### IV.3 Hidrolisa Enzimatis

Hidrolisis enzimatis kulit buah kopi bertujuan untuk mengubah kandungan selulosa dan hemiselulosa menjadi gula reduksi dengan bantuan campuran enzim selulase murni dan enzim xilanase murni. Dalam tahap ini, perlu dipersiapkan kurva standar glukosa tanpa CMC (digantikan *aquadest*) yang berfungsi untuk menguji konsentrasi glukosa pada saat proses hidrolisis berlangsung. Hal ini dikarenakan penggunaan CMC hanya diperlukan pada saat mengetahui aktivitas dari enzim selulase.

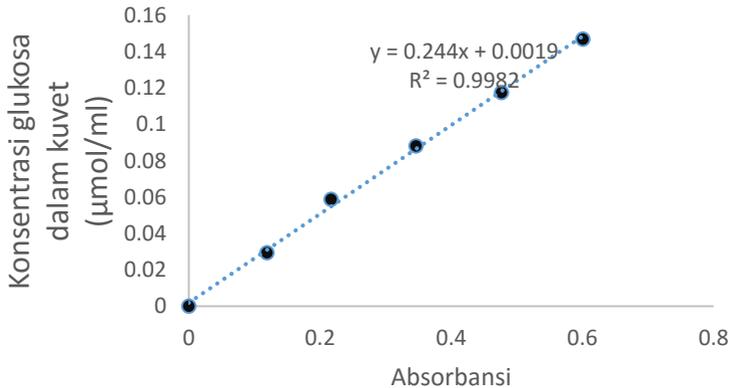
**Tabel IV.6** Perhitungan Kurva Standar Glukosa (dengan CMC) untuk Uji Konsentrasi Gula Reduksi Hasil Hidrolisa Kulit Buah Kopi

Larutan glukosa (ml)	Larutan Buffer (ml)	Diambil (ml)	Volume Total (ml)	Konsentrasi (μmol/ml)		Absorbansi
				Tabung*	Kuvert^	
0	5	0,2	5	0	0	0.0000
1	4	0,2	5	0.734	0.0294	0.0838
2	3	0,2	5	1.468	0.05874	0.2112
3	2	0,2	5	2.202	0.0881	0.3416

4	1	0,2	5	2.936	0.11747	0.4602
5	0	0,2	5	3.67	0.14684	0.5988

\*Konsentrasi larutan glukosa/xilosa dan buffer sitrat

^Konsentrasi larutan setelah ditambah 1,8 ml CMC dan 3 ml DNS



**Gambar IV.6** Kurva Standar Glukosa (tanpa CMC) untuk Menguji Keaktifan Enzim Selulase

Setelah diketahui kebutuhan enzim untuk setiap variabel percobaan, erlenmeyer 250 mL berisi 1 gram kulit buah kopi yang telah di-pretreatment ditambahkan campuran enzim selulase murni dan enzim xilanase murni sesuai dengan kebutuhan. Setelah itu pH larutan diuji menggunakan kertas pH untuk memastikan bahwa pH larutan hidrolisis tepat sesuai dengan variabel kemudian larutan dipanaskan sampai suhu 40 °C karena enzim bekerja optimum pada suhu diatas 35 °C. Kemudian ditambahkan buffer sitrat sampai volume hidrolisis mencapai 30mL. Buffer sitrat dipilih karena pada penelitian terdahulu, buffer sitrat memiliki pengaruh yang lebih signifikan untuk menciptakan kondisi asam yang sesuai pada

proses hidrolisis enzimatis dibandingkan dengan penggunaan buffer asetat (Ferreira et al, 2009).

Lalu surfaktan ditambahkan ke dalam tabung sesuai dengan variabel dan dimasukkan ke dalam inkubator shaker dengan suhu 35 °C selama 16 jam dengan kecepatan shaker 125 rpm. Setelah dan sebelum hidrolisa, setiap sampel diuji kandungan gula reduksinya dengan metode DNS. Sampel hasil hidrolisat diambil menggunakan pipet tetes dan dimasukkan ke dalam *microtube* sampai memenuhi *microtube*. Sampel lalu disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4°C untuk memisahkan antara larutan hidrolisat yang akan diuji dengan padatan kulit buah kopi yang terikut pada pengambilan sampel. Cairan hidrolisat sebanyak 0,2 mL yang telah dipisahkan ditambahkan 1,8 mL aquadest dan 3 mL larutan DNS.

Larutan campuran kemudian dihomogenkan menggunakan vortex. Larutan campuran yang telah homogen, kemudian dipanaskan selama 10 menit dalam air mendidih. Setelah dilakukan pemanasan selama 10 menit, larutan campuran kemudian didinginkan menggunakan air es selama 10 menit yang kemudian dilanjutkan dengan membiarkan dikondisi atmosfer sampai suhu sampel konstan. Sampel kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Pada penelitian ini, dilakukan 21 proses hidrolisis untuk membandingkan setiap variasi dari kondisi operasi yang telah ditentukan dimana setiap variabel percobaan dilakukan pengulangan sebanyak dua kali (duplo).

Yield gula reduksi didefinisikan sebagai perbandingan jumlah gula reduksi yang dihasilkan selama hidrolisis dengan variasi waktu tertentu dengan gram selulosa dan hemiselulosa dalam 1 gram kulit buah kopi setelah dilakukan *pretreatment*. Yield gula reduksi hasil hidrolisis kulit kopi dapat dihitung menggunakan persamaan sebagai berikut:

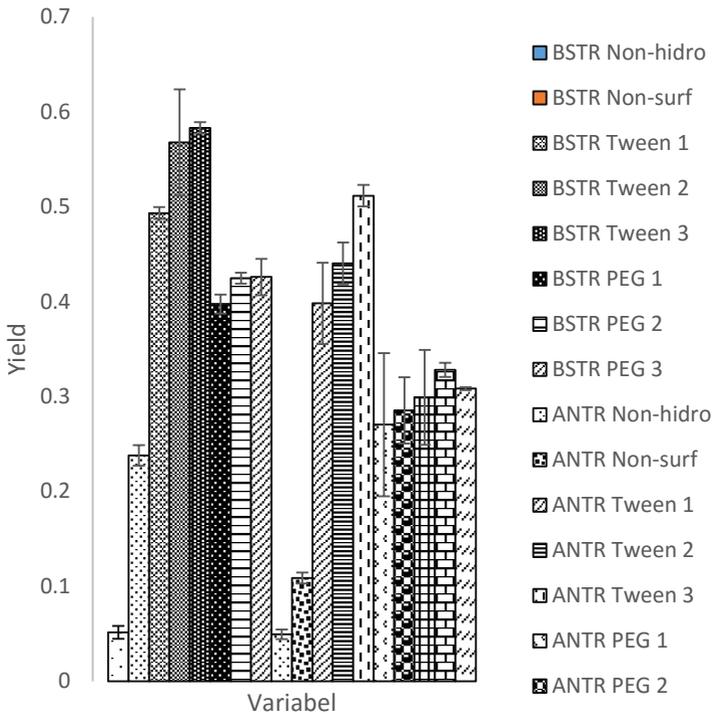
Yield gula reduksi =  $\frac{\text{konsentrasi gula reduksi} \times \text{volume hidrolisat}}{\%(\text{selulosa}) \times \text{gram kulit kopi yang dihidrolisis}}$

Berdasarkan hasil analisa pada hidrolisis enzimatik yang telah dilakukan didapatkan hasil sebagai berikut:

**Tabel IV.7** Hasil Analisa Gula Reduksi Hidrolisis Enzimatik pada Berbagai Variabel Surfaktan

No	Hasil Pretreatment	Surfaktan	Variabel (Banyak Surfaktan)	Konsentrasi Gula Reduksi (Kuvet) (g/L)	Konsentrasi Gula Reduksi (Erlenmeyer) (g/L)	Massa Gula Reduksi (gram)	Yield
1		Tanpa hidrolisa		0.045212	1.130295	0.033909	0.051379
2		Non surfaktan		0.21038	5.259503	0.157785	0.237867
3	BSTR	Tween 80	1 gram	0.435001	10.87503	0.326251	0.493206
4			2 gram	0.499798	12.49495	0.374848	0.567858
5			3 gram	0.515203	12.88007	0.386402	0.583094
6		PEG 4000	1 gram	0.351238	8.780944	0.263428	0.397364
7			2 gram	0.374056	9.351403	0.280542	0.424697
8			3 gram	0.377522	9.438055	0.283142	0.425874
9		Tanpa hidrolisa		0.044345	1.108632	0.033259	0.049327
10	ANTR	Non surfaktan		0.097251	2.431278	0.072938	0.108619
11		1 gram		0.357496	8.937399	0.268122	0.398053

12		Tween	2 gram	0.39543	9.885757	0.296573	0.440159
13		80	3 gram	0.460804	11.52011	0.345603	0.511553
14		PEG	1 gram	0.247352	6.183791	0.185514	0.270353
15		4000	2 gram	0.256113	6.402828	0.192085	0.285339
16			3 gram	0.269881	6.747029	0.202411	0.299217
17	Non	PEG	3 gram	0.311667	7.791667	0.23375	0.328009
18	pretreatment	Tween	3 gram	0.289426	7.23565	0.21707	0.308217
		80					

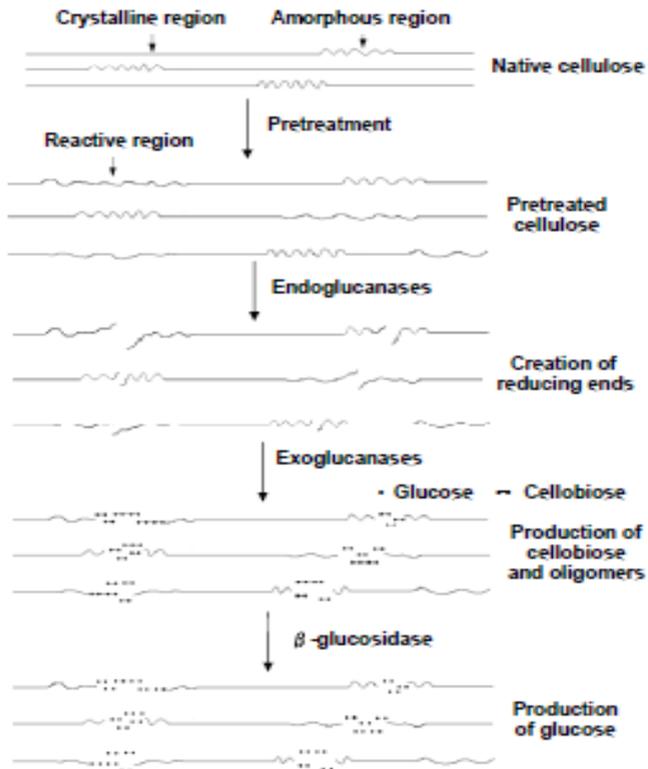


**Gambar IV.7** Yield Hasil Hidrolisis Enzimatik pada Berbagai Variabel

Proses hidrolisa enzimatis terjadi dengan penyerapan selulosa ke permukaan dan proses biodegradasi selulosa menjadi gula reduksi seiring dengan proses desorpsi enzim selulase akan terjadi. Degradasi enzimatis selulosa terpenuhi bila terjadi kerja sinergis antara tiga jenis enzim: endo-glucanases, exo-glucanases dan  $\beta$ -glucosidases yang biasanya membentuk enzim selulase atau biasa disebut enzim selulitik.

Endo-glucanases akan menyerang area *low-crystallinity* pada jaringan selulosa dan menghasilkan senyawa gula yang tidak memiliki rantai akhir, exo-glucanases mendegradasi rantai gula dengan memindahkan unit selubiose (dimer dari glukosa) dari senyawa gula yang tidak memiliki rantai akhir, selubiose lalu dipecah menjadi glukosa oleh  $\beta$ -glucosidases. Langkah ini sangat penting untuk melengkapi depolimerisasi selulosa menjadi glukosa. Karena hemiselulosa mengandung unit gula yang berbeda, enzim hemiselulitik lebih kompleks dan mengandung sedikitnya endo-1,4-  $\beta$ -D-xylosidases, endo-1,4- $\beta$ -D-mannanases,  $\beta$ -mannosidases, acetyl xylan esterases,  $\alpha$ -glucuronidases,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases dan  $\alpha$ -galactosidases. Karena alasan ini umumnya mikroorganisme yang digunakan untuk menghasilkan enzim xilanase harus diperhatikan kadar dan aktivitas dari masing-masing enzim hemiselulitiknya.

(Tazerhadeh, 2007)



**Gambar IV.8** Proses pembentukan glukosa dari selulosa pada hidrolisa enzimatik

(Tazerhadeh, 2007)

Ada beberapa alasan digunakannya penambahan surfaktan ke dalam proses hidrolisa enzimatik, seperti: surfaktan dapat meningkatkan kestabilan dan mencegah terjadinya denaturasi pada enzim, surfaktan dapat mempengaruhi struktur substrat dan membuat substrat lebih bersifat *accessible* selama proses hidrolisa dengan cara mengurangi tegangan permukaannya, surfaktan dapat mempengaruhi hubungan substrat-enzim yang akan

meningkatkan keefektifan konversi selulosa menjadi gula reduksi (Eriksson, 2002). Pemilihan massa surfaktan didasarkan pada penelitian (Yan Zhou, 2015) yang menyatakan bahwa surfaktan non-ionik yang ditambahkan pada proses hidrolisa akan menghasilkan hasil yang signifikan, namun apabila lebih dari lima gram tidak akan memberikan efek yang berarti karena kelarutan surfaktan yang sudah jenuh.

Alasan pemilihan digunakannya PEG 4000 sebagai surfaktan adalah karena hasil penelitian kali ini akan dibandingkan dengan hasil penelitian terdahulu (Atika, 2016). Sedangkan Tween 80 dipilih karena dapat meningkatkan penetrasi enzim selulase ke dalam substrat. Berdasarkan hasil analisa dan perhitungan diatas, didapatkan bahwa semakin besar massa surfaktan yang dimasukkan ke dalam sampel maka akan menghasilkan konsentrasi gula reduksi yang lebih besar dan semakin besar pula yield gula reduksi yang dihasilkan. Hal ini menunjukkan bahwa surfaktan memiliki efek yang sangat positif pada hidrolisa enzimatis.

Jika dibandingkan dengan sampel yang tidak dihidrolisa, kandungan gula reduksi variabel lain sudah jauh berbeda baik pada sampel non surfaktan maupun yang diberi surfaktan namun efek pemberian surfaktan menunjukkan hasil signifikan terutama pada variabel sampel BSTR yang diberi surfaktan Tween 80. Hal ini menunjukkan bahwa Tween 80 adalah surfaktan yang lebih baik jika dibandingkan dengan PEG 4000. Juga dibuktikan dengan lebih besarnya nilai yield sampel dengan surfaktan Tween 80 daripada PEG 4000. Dari tabel tersebut pada sampel BSTR besar peningkatan Tween 80 3 gram pada sampel non-hidrolisa, non-surfaktan dan PEG 4000 3 gram berturut-turut adalah 91,188%, 52,535% dan 26,963%. Pada sampel ANTR besar peningkatan Tween 80 3 gram pada sampel non-hidrolisa, non-surfaktan dan PEG 4000 3 gram berturut-turut adalah 91,814%, 49,499% dan 41,508%. Pengaruh surfaktan ini juga dapat dilihat pada sampel yang belum di-*pretreatment* sama sekali dimana yield gula

reduksinya melebihi yield sampel BSTR maupun ANTR yang tidak diberi surfaktan. Disini dapat nyatakan bahwa proses *pretreatment* yang dilakukan kurang efektif karena proses *pretreatment* biologis memerlukan waktu yang relatif lama.

Jika ditilik dari segi surfaktan, Tween 80 lebih efektif daripada PEG 4000. Hal ini disebabkan karena Tween 80 akan meningkatkan kelarutan enzim (Rowe, 2009) dan mengurangi daya serap enzim sehingga enzim bekerja optimal dengan mengelilingi substrat dahulu. Alasan lainnya adalah dengan ditamhkannya Tween 80 ke dalam larutan hidrolisa, kemungkinan besar suhu larutan akan naik kurang lebih sampai 10 °C karena ikatan non-ionik yang terbentuk. Kenaikan suhu ini akan menyebabkan enzim bekerja lebih optimal namun untuk mikroorganismenya hal ini tidak terlalu baik karena suhu optimumnya adalah 35 °C. (Eriksson, 2002).

Hasil penelitian hidrolisa enzimatis ini pun jauh lebih baik dari hasil penelitian terdahulu yang menggunakan substrat kulit kopi, hidrolisa biologis dengan penambahan surfaktan PEG 4000 (Atika, 2016) dengan rasio mikroorganismenya *Aspergillus niger:Trichoderma viride* = 2:1 (v/v) + Surfaktan memiliki yield sebesar 0,173%. Sedangkan, variabel *pretreatment Bacillus subtilis:Trichoderma reesei* (2:1) (v/v) dengan rasio mikroorganismenya *Aspergillus niger:Trichoderma viride* = 1:2 (v/v) + Surfaktan memiliki gula total sebesar 1,9%. Penelitian terdahulu yang lain adalah penelitian menggunakan hidrolisa enzimatis yang menghasilkan gula reduksi sebesar 0,137 gram pada kondisi optimum. (Yumi, 2015). Maka jika dibandingkan, dengan penelitian (Atika, 2016) peningkatan pada penelitian ini sebesar 76.5% sedangkan untuk penelitian (Yumi, 2015) peningkatan yang ada sebesar 70.33%.

Dari penjelasan diatas, dapat dinyatakan bahwa larutan campuran enzim murni dan surfaktan dapat melakukan hidrolisis selulosa dan hemiselulosa pada kulit buah kopi menjadi gula reduksi. Adanya kombinasi dari campuran enzim selulase murni dan enzim xilanase murni dapat

memaksimalkan proses hidrolisis kulit buah kopi, dimana selulosa yang terkandung pada kulit buah kopi dihidrolisis menjadi gula reduksi jenis glukosa oleh enzim selulase murni dan hemiselulosa dihidrolisis oleh enzim xilanase murni menjadi gula reduksi jenis xilosa.

#### **IV.4 Hidrolisa Biologis**

Proses hidrolisis bertujuan untuk mendegradasi selulosa dan hemiselulosa dari substrat yang telah *di pretreatment* menjadi gula reduksi. Pemilihan metode hidrolisa ini karena metode ini ramah lingkungan, kebutuhan energi rendah, tidak memerlukan bahan kimia dan dapat menghindari degradasi gula sehingga menghasilkan yield yang lebih tinggi (Mussato S. I dan Teixeira J. A., 2010). Mikroorganisme yang digunakan pada proses hidrolisa ini adalah *Aspergillus niger* dan *Trichoderma viride* dengan variabel *Aspergillus niger* : *Trichoderma viride* = 1:1; 1:2 dan 2:1.

Penggunaan mikroorganisme *Aspergillus niger* dan *Trichoderma viride* mengacu pada penelitian terdahulu yang menyatakan bahwa *Aspergillus niger* dan *Trichoderma viride* merupakan mikroorganisme penghasil enzim selulase yang lebih berpotensi dibandingkan mikroorganisme lainnya (Ul-haq dkk., 2005). Selain itu, menurut penelitian Pandey A, dkk pada tahun 2000 *Aspergillus niger* merupakan mikroorganisme yang paling cocok untuk kultivasi pada kulit kopi, dimana mikroorganisme tersebut dapat menghasilkan enzim pektinase. *A. niger* juga diketahui dapat menghasilkan enzim selulase dengan *specific activity* yang tinggi (Howard R.L et. al, 2003). Alasan penggunaan campuran mikroorganisme *Aspergillus niger* dengan *Trichoderma viride* pada penelitian ini karena campuran mikroorganisme tersebut dapat mengasilkan yield hidrolisis yang lebih tinggi bila dibandingkan dengan tanpa pencampuran. Penambahan *Trichoderma viride* yang efektif menghasilkan enzim  $\beta$ -glukosidase pada *A niger* akan membantu menghidrolisis selobiose dimana selobiose

merupakan inhibitor dari aktivitas selulase (Sun Y et. al. 2002). Mikroorganisme tersebut akan menghasilkan fungal selulase, dimana enzim ini dapat menjadi alternatif untuk pembuatan gula reduksi dan bioethanol (Shin C. S dkk., 2000).

Hidrolisis secara enzimatik ini akan menghasilkan fungal selulase (Shin C. S dkk., 2000) dengan menggunakan selulosa yang terkandung dalam substrat sebagai sumber karbonnya. Mikroorganisme selulolitik dapat membangun hubungan sinergis dengan spesies non-selulolitik dalam limbah selulosa, interaksi yang terjadi menghasilkan degradasi selulosa. Mikroorganisme dapat mendegradasi selulosa dan menghasilkan fungal enzim dengan spesifikasi yang berbeda (Sánchez E et. al. 2009). Sistem dari fungal selulase ini meliputi tiga enzim hidrolisis, yaitu: endo-1,4- $\beta$ -D-glukanase [Karboksimetil selulosa (EC.3.2.1.4)] atau karboksimetil selulosa akan memecah ikatan  $\beta$  pada bagian amorf selulosa; exo-1, 4- $\beta$ -D-glukanase [Selobiohidrolase (EC.3.2.1.91)] atau selobiohidrolase merupakan komponen utama dari fungal selulase (40-70% dari total protein selulase) akan menghidrolisis selobiose dari bagian kristalin selulosa dan  $\beta$ -glukosidase [sellobiase (EC.3.2.1.21)] yang melepas glukosa dari sellobiose dan rantai pendek selooliosakarida (Ul-haq dkk., 2005).

Umumnya, endoglukanase dan selobiohidrolase akan berkerja secara sinergis untuk menghidrolisis selulosa (Howard R.L et. al, 2003). Selain itu hidrolisis biologis juga akan menghasilkan *microbial* hemiselulase (Howard R.L et. al, 2003). Hemiselulosa akan terdegradasi menjadi monomer gula dan asam asetat. Hemiselulase diklasifikasikan berdasarkan aktivitas mereka terhadap substrat, endo-1,4- $\beta$ -xilanase (EC 3.2.1.8) menghasilkan oligosakarida dari pemutusan ikatan xilan dan xilan 1,4- $\beta$ -xilosidase (EC 2.3.1.37) menghasilkan xilosa dan oligosakarida (Sánchez E. et. al. 2009).

Langkah awal pada proses ini adalah mempersiapkan suspensi mikroorganisme sesuai dengan lama waktu inkubasi

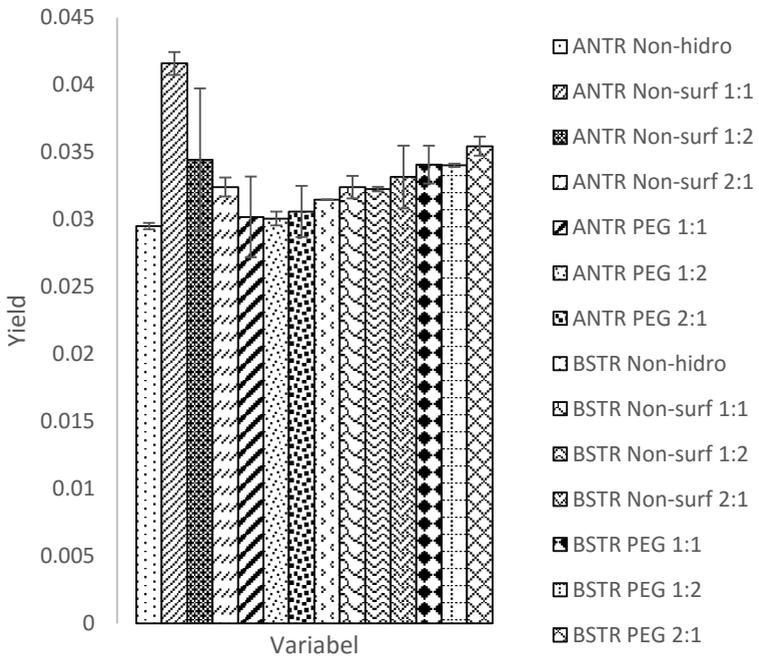
yang telah diperoleh dari kurva pertumbuhan. Setelah suspensi telah selesai di inkubasi, selanjutnya melakukan hidrolisa biologis dengan variabel yang telah ditentukan dengan suhu 30°C, kecepatan 125 rpm dan waktu inkubasi selama 96 jam. Berikut data hasil hidrolisa biologis yang diperoleh:

**Tabel IV.8** Hasil Analisa Gula Reduksi Hidrolisis Biologis pada Berbagai Variabel

No	Hasil <i>pretreatment</i>	Surfaktan	Variabel (perbandi ngan AN:TV)	Konsentrasi Gula Reduksi (Kuvet) (g/L)	Konsentrasi Gula Reduksi (Erlenmeyer) (g/L)	Massa Gula Reduksi (gram)	Yield
1			Tanpa hidrolisa	0.02643718	0.66092950	0.01982789	0.02951276
2			1:1	0.03726868	0.93171700	0.02795151	0.04159190
3		PEG 4000	1:2	0.03081792	0.77044800	0.02311344	0.03443751
4	AN:TR		2:1	0.02900170	0.72504247	0.02175127	0.03241445
5			1:1	0.02701943	0.67548586	0.02026458	0.03018597
6		Tanpa surfaktan	1:2	0.02691858	0.67296450	0.02018894	0.03006734
7			2:1	0.02741708	0.68542708	0.02056281	0.03059105
8			Tanpa hidrolisa	0.02768882	0.69222050	0.02076662	0.03147508
9			1:1	0.02995639	0.74890973	0.02246729	0.03406631
10	BS:TR	PEG 4000	1:2	0.02992200	0.74804991	0.02244150	0.03402720
11			2:1	0.03116873	0.77921830	0.02337655	0.03544499

12		1:1	0.02849470	0.71236748	0.02137102	0.03240408
13	Tanpa	1:2	0.02836278	0.70906950	0.02127209	0.03225407
14	surfaktan	2:1	0.02915709	0.72892725	0.02186782	0.03315735

---



**Gambar IV.9** Yield Hasil Hidrolisis Biologis pada Berbagai Variabel

Dari tabel diatas terlihat hasil gula reduksi hidrolisis biologis yang diperoleh dengan kedua variabel mengalami peningkatan dari kulit kopi awal, dimana sebelumnya yield gula reduksi dari kulit kopi tanpa hidrolisa sebesar 0.0314750 (g/g) untuk hasil *pretreatment* BS:TR dan 0.0295127 (g/g) untuk hasil *pretreatment* AN:TR sedangkan kulit kopi yang telah dihidrolisis pada variabel *pretreatment* BS:TR menghasilkan yield gula reduksi terbanyak sebesar 0.0331573 (g/g) pada variabel AN:TV = 2:1, begitu pula dengan variabel AN:TR menghasilkan yield gula reduksi terbanyak sebesar 0.0305910 pada variabel AN:TV = 2:1. Hal ini sesuai dengan

penelitian terdahulu dimana *Aspergillus niger* merupakan fungsi dengan *specific activity* tertinggi untuk menghasilkan enzim selulase (Howard R.L et. al, 2003), karena jumlah *A niger* lebih banyak pada variabel tersebut, sehingga yield selulosa yang dihasilkan pun lebih tinggi.

Pada hasil hidrolisis menggunakan surfaktan, hasil yang diperoleh meningkat bila dibandingkan dengan hasil hidrolisis tanpa surfaktan pada variabel yang sama untuk semua variabel mikroorganisme AN:TV, dimana jumlah yield pada variabel *pretreatment* AN:TR dengan variabel hidrolisis AN:TV 1:1, 1:2 dan 2:1 tanpa surfaktan berturut-turut sebesar 0.0301859, 0.0300673 dan 0.0305910 (g/g) sedangkan bila dengan surfaktan yield gula reduksi mengalami peningkatan menjadi berturut-turut sebesar 0.0415919, 0.0344375 dan 0.0324144 (g/g), bila dihitung dalam persen kenaikan yield gula reduksi sebesar 37,78%, 14,53% dan 5,96%. Pada variabel *pretreatment* BS:TR dengan variabel hidrolisis AN:TV 1:1, 1:2 dan 2:1 tanpa surfaktan berturut-turut sebesar 0.0324040, 0.0322540 dan 0.0331573 (g/g) sedangkan bila dengan surfaktan yield gula reduksi mengalami peningkatan menjadi berturut-turut sebesar 0.0340663, 0.0340272 dan 0.0354449 (g/g). Bila dihitung dalam persen kenaikan yield gula reduksi sebesar 5,13%, 5,5% dan 6,9%. Hasil ini sesuai dengan penelitian terdahulu yang mengatakan bahwa penggunaan surfaktan dapat meningkatkan delignifikasi dan meningkatkan yield hidrolisis fungal enzim (Cao et. al, 2013). Mekanisme dari surfaktan yang dapat menjelaskan efeknya terhadap enzim yaitu: (1) mengubah struktur substrat menjadi lebih mudah didegradasi oleh enzim (Kaar dan Holtzapple, 1998). (2) menstabilkan enzim untuk menghindari denaturasi (Kaar dan Holtzapple, 1998). (3) meningkatkan interaksi positif antara substrat dan enzim (Eriksson et. al., 2002) dan (4) menurunkan jumlah enzim yang tidak produktif mengikat lignin dan molekul lainnya yang terlibat pada aktivitas enzim selulase (Qing et. al, 2010).

Selain itu hasil hidrolisis ini dapat dibandingkan dengan penelitian terdahulu yang telah dilakukan oleh Atika dkk pada 2016. Tabel hasil hidrolisis biologis yang telah dilakukan oleh Atika dkk dapat dilihat pada tabel IV.8. Hasil yang diperoleh lebih kecil bila dibandingkan dengan tabel IV.8, hal tersebut dikarenakan beberapa faktor, yaitu karena perbedaan lama proses *pretreatment*, proses *pretreatment* pada penelitian ini lebih singkat dan perbedaan metode analisa. Simpangan baku data-data hasil analisa ini berkisar dari 0,0006-0,0053 yang menandakan bahwa penyebaran data sudah baik

**Tabel IV.9** Yield Hasil Hidrolisa Kulit Kopi dengan Rasio *Aspergillus niger* : *Trichoderma viride* Penelitian Terdahulu

No	Pre-Treatment Terbaik	Variabel	Yield (	gram gula reduksi yang dihasilkan gram (hemiselulosa + selulosa) di kulit kopi yang dihidrolisa )
		AN:TR		
1	BS-TR=1:2	AN:TV=1:1		0.116
2		AN:TV=1:1 + Surfaktan		0.123
3		AN:TV=1:2		0.143
4		AN:TV =1:2 + Surfaktan		0.152
5		AN:TV=2:1		0.131
6		AN:TV=2:1 + Surfaktan		0.140
7	AN:TR=1:1	AN:TV=1:1		0.167
8		AN:TV=1:1 + Surfaktan		0.195
9		AN:TV=1:2		0.188
10		AN:TV=1:2 + Surfaktan		0.190
11		AN:TV=2:1		0.173
12		AN:TV=2:1 + Surfaktan		0.207

(Atika, 2016)

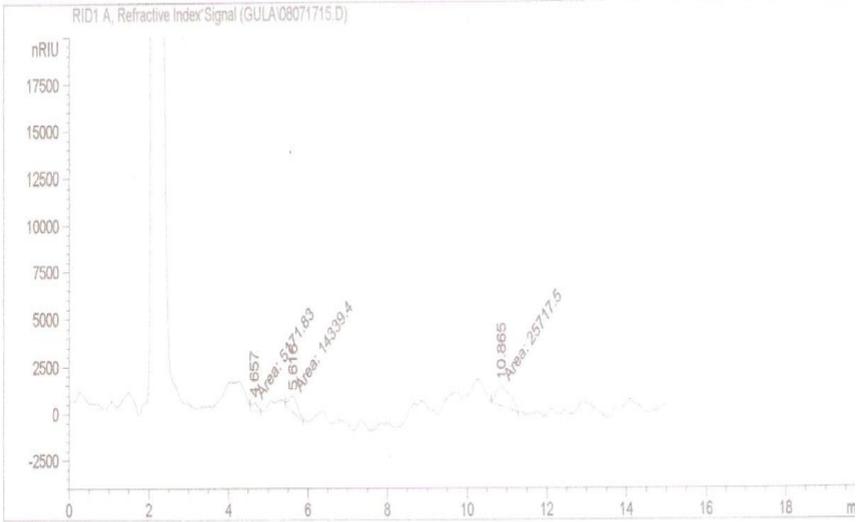
**Tabel IV.10** Tabel peningkatan yield hidrolisa

No	Hasil Pretreatment	Hidrolisa Enzimatis			Hidrolisa Biologis			Peningkatan Yield
		Surfaktan	Variabel (Banyak Surfaktan)	Yield	Surfaktan	Variabel (perbandingan AN:TV)	Yield	
1	BSTR	Tanpa hidrolisa		0.051379	Tanpa hidrolisa		0.029513	42.55849
2		Tween 80	1 gram	0.493206	Tanpa surfaktan	1:01	0.030186	93.87964
3			2 gram	0.567858		1:02	0.030067	94.70513
4			3 gram	0.583094		2:01	0.030591	94.75366
5		PEG 4000	1 gram	0.397364	PEG 4000	1:01	0.041592	89.53306
6			2 gram	0.424697		1:02	0.034438	91.89128
7			3 gram	0.425874		2:01	0.032414	92.38873
8	ANTR	Tanpa hidrolisa		0.049327	Tanpa hidrolisa		0.031475	36.19093
9		Tween 80	1 gram	0.398053	Tanpa surfaktan	1:01	0.032404	91.85935
10			2 gram	0.440159		1:02	0.032254	92.67218
11			3 gram	0.511553		2:01	0.033157	93.5183
12		PEG 4000	1 gram	0.270353	PEG 4000	1:01	0.034066	87.39934
13			2 gram	0.285339		1:02	0.034027	88.0748
14			3 gram	0.299217		2:01	0.035445	88.1541

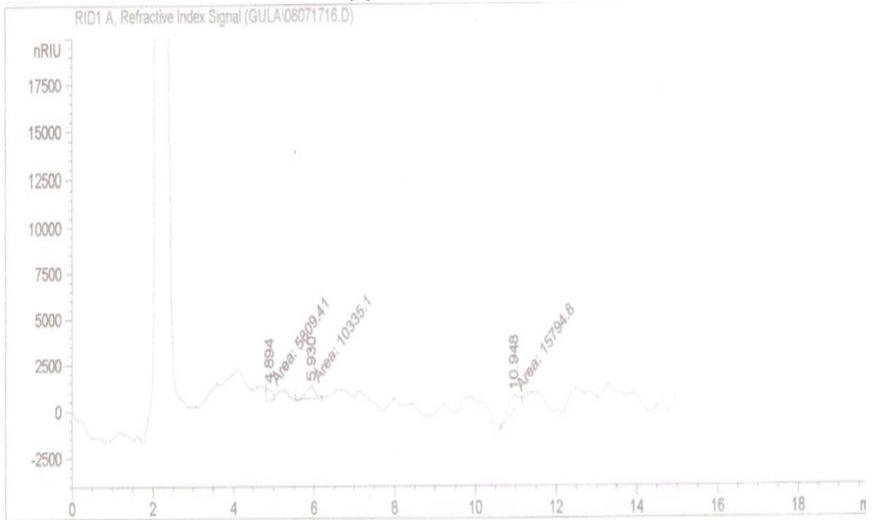
Jika hasil dari hidrolisa enzimatis dibandingkan dengan hidrolisa biologis, maka hasil yang lebih baik adalah hasil dari hidrolisa enzimatis, dimana untuk hasil yield hidrolisis biologis terbaik sebesar 0,0415919 (g/g) pada variabel *pretreatment* AN:TR dan variabel hidrolisis AN:TV = 2:1 + PEG 4000 sedangkan hasil yield hidrolisis enzimatis terbaik sebesar 0,583 (g/g) pada variabel BSTR+Tween 3 gram. Hal ini dikarenakan karena enzim berguna sebagai katalis yang akan menurunkan energi aktivasi pada saat proses hidrolisa, terutama karena enzim yang digunakan pada penelitian ini adalah campuran enzim murni, sehingga lebih efektif dalam proses hidrolisis. Alasan lain adalah surfaktan bekerja lebih baik bersama-sama dengan enzim daripada dengan mikroorganisme. Eriksson, 2002 menyatakan bahwa selain meningkatkan kestabilan enzim dan mempengaruhi ikatan substrat-enzim, surfaktan juga mengurangi tegangan permukaan substrat sehingga penetrasi enzim pada saat hidrolisa meningkat yang kemudian meningkatkan konversi menjadi gula reduksi.

Jika dibandingkan antara kedua hidrolisa pada variabel sebelum penambahan surfaktan maupun setelah penambahan surfaktan PEG 4000, semua hasil hidrolisa enzimatis lebih baik daripada hasil hidrolisa biologis karena pada dasarnya memang hidrolisa enzim terutama enzim murni akan bekerja lebih baik menghidrolisis selulosa menjadi gula reduksi. Jika ditilik dari segi ekonomis, maka yang lebih murah adalah hidrolisa biologis karena harga mikroorganisme yang dipakai jauh lebih murah daripada harga enzim.

Kandungan gula reduksi pada masing-masing sampel terbaik hidrolisa lalu diuji dengan metode HPLC dan menghasilkan:

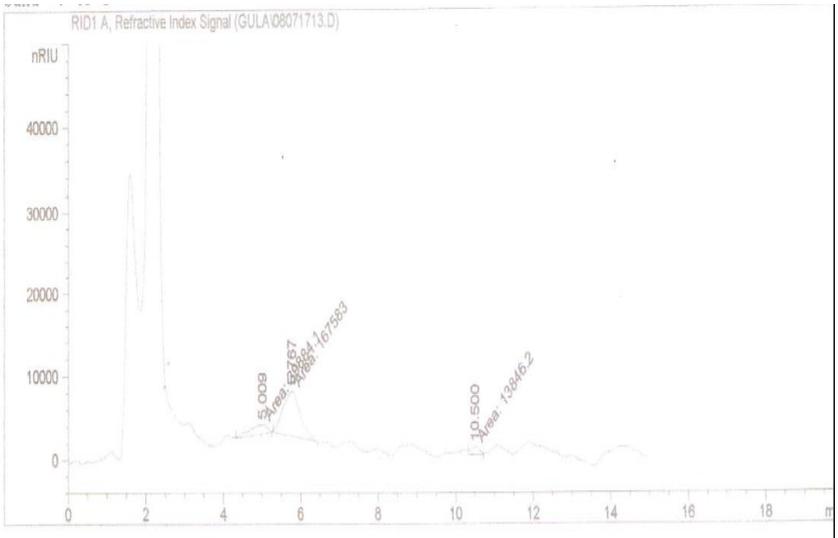


(a)

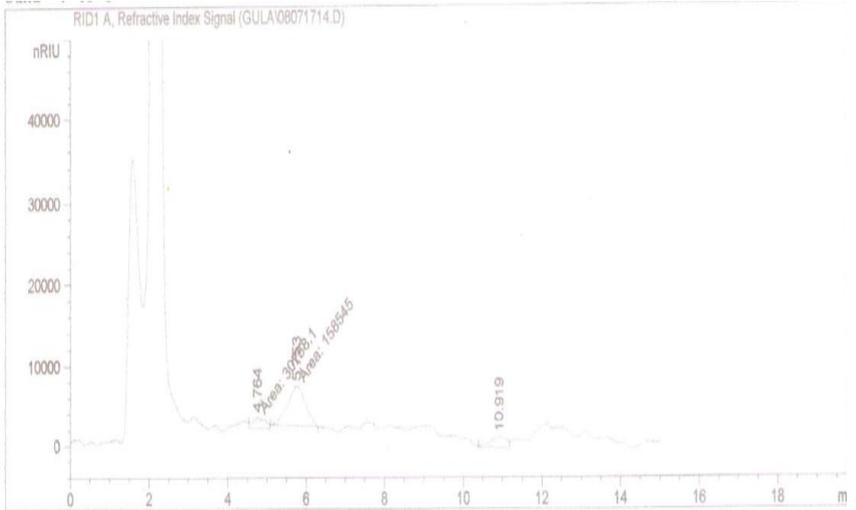


(b)

**Gambar IV.10** Grafik Hasil Analisa HPLC Hidrolisa Biologis



(a)



(b)

**Gambar IV.11** Grafik Hasil Analisa HPLC Hidrolisa Enzimatis

Dari analisa HPLC tersebut, didapatkan hasil sebagai berikut:

**Tabel IV.11** Hasil Uji HPLC Gula Reduksi

Sampel	Area			Kadar (%)		
	Fruktosa	Glukosa	Sukrosa	Fruktosa	Glukosa	Sukrosa
Enzimatis 1	39884.1	167583	13846.2	8.53	30.64	2.77
Enzimatis 2	30758.1	158545	41973.9	6.58	28.98	8.38
Rata-rata				7.555	29.81	5.575
Biologis 1	5171.0833	14339.4	25717.5	1.11	2.62	5.14
Biologis 2	5809.4058	10335.1	15794.8	1.24	1.89	3.15
Rata-rata				1.175	2.255	4.145

HPLC adalah suatu teknik kromatografi yang menggunakan fasa gerak cairan dan fasa diam cairan atau padat, termasuk metode analisis terbaru. Banyak kelebihan metode ini jika dibandingkan dengan metode lainnya seperti mampu memisahkan molekul-molekul dari suatu campuran, kecepatan analisis dan kepekaan yang tinggi, dekomposisi / kerusakan bahan yang dianalisis dapat dihindari, resolusi yang baik, dapat digunakan bermacam-macam detektor pada saat analisa, kolom dapat digunakan kembali, mudah melakukan "sample recovery".

(Effendy, 2004)

Analisa HPLC ini dilakukan di Unit Layanan Pengujian (ULP) Fakultas Farmasi Universitas Airlangga dengan alat Agilent 1100 Series HPLC, menggunakan detektor jenis *Agilent 1260 Refractive Index Detector, positive polarity* 35 °C dan kolom *Agilent Zorbax Carbohydrate* 4,6 x 150 mm, 5 µm. Sesuai namanya, sampel yang diuji dengan HPLC haruslah berfase cair, dalam hal ini sampel hidrolisa sebanyak 100 mg dilarutkan dalam 10 ml aquadest (1% m/v). Kolom adalah tempat sampel diinjeksikan, di dalam kolom terjadi pemisahan komponen-komponen pada sampel untuk selanjutnya tiap cuplikan dideteksi oleh detektor baik komponen sampel (kualitatif) maupun kadarnya (kuantitatif). Pengujian ini

dilakukan pada suhu 45 °C karena pemilihan kolom yang beroperasi pada suhu diatas suhu atmosferik dan bukan merupakan kromatogram penukar ion sehingga dengan suhu tersebut detektor akan dapat mendeteksi kandungan dengan baik karena sensitifitas yang baik, *noise* yang rendah dan kisaran respon linier yang luas. Eluen digunakan sebagai penambah kekuatann fasa gerak selama analisa berlangsung, dapat memepersingkat waktu retensi senyawa-senyawa pada sampel dalam kolom. Eluen yang digunakan adalah campuran Asetonitril:air (ACN:W=90:10) yang dicampur pada suhu 30 °C, kecepatan aliran 1,2 ml/menit.

(Effendy, 2004)

Pengujian ini dilakukan dengan cara duplo dengan terlebih dahulu mencari kurva standar masing-masing gula reduksi yang akan dianalisa, dimana setiap kurva diuji sebanyak tiga kali dengan reagen masing-masing gula reduksi. Setelah nilai rata-rata dari setiap kurva standar didapatkan, dilakukan pengujian pada sampel yang dapat dilihat pada Tabel IV.9. Dapat dilihat bahwa dalam semua jenis gula reduksi, sampel hidrolisa enzimatis menghasilkan hasil yang lebih banyak dibandingkan hidrolisa biologis. Besar peningkatan berurutan pada fruktosa, glukosa, sukrosa masing-masing sebesar: 84,45%, 92,44% dan 25,65%. Dari hasil-hasil ini dapat disimpulkan bahwa hidrolisa enzimatis lebih baik dalam proses hidrolisa selulosa dan hemiselulosa menjadi gula reduksi. Untuk kurva standar dan penjelasan lebih lanjut tentang grafik HPLC dapat dilihat di lampiran.

*(Halaman ini sengaja dikosongkan)*

## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **V.1 Kesimpulan**

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa

1. Proses *pretreatment* biologis dilakukan dengan variabel campuran mikroorganisme *Bacillus subtilis: Trichoderma resei* menghasilkan persen kenaikan selulosa, penurunan lignin dan pektin berturut-turut sebesar 10,939%, 71,261% dan 55,046%. Untuk variabel *Aspergillus niger: Trichoderma resei* menghasilkan persen kenaikan selulosa, penurunan lignin dan pektin berturut-turut sebesar 12,572%, 69,941% dan 52,294%.
2. Hasil hidrolisa enzimatik disertai penambahan surfaktan menghasilkan yield sebesar 0,4583 pada variabel BSTR+3 gram Tween 80 dengan kandungan fruktosa, glukosa dan sukrosa sebesar 7,555; 29,81; 5,575 (% w/v), untuk hidrolisa biologis menghasilkan yield 0.03444 dengan kandungan fruktosa, glukosa dan sukrosa sebesar 1,175; 2,255; 4,145 (% w/v).
3. Penambahan surfaktan baik PEG 4000 maupun Tween 80 pada proses hidrolisa enzimatik dapat meningkatkan konsentrasi gula reduksi seiring dengan besarnya massa surfaktan, dengan peningkatan terbesar pada variabel BSTR+3 gram Tween 80 sebesar 52,535%.

#### **V.2 Saran**

1. Perlu dipertimbangkan metode lain untuk uji analisa penurunan lignin.
2. Perlu dipertimbangkan pemakaian *pretreatment* lain selain biologis agar waktu penurunan lignin lebih singkat.
3. Perlu digunakannya proses optimasi pada proses enzimatik untuk mengurangi pemakaian enzim.

4. Perlu dipertimbangkan kandungan selubiose dalam proses perhitungan yield hidrolisa.

## DAFTAR PUSTAKA

- ACS Publications. 2009. *Methods for Pretreatment of lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production*.
- Amiri, H. dan Keikhorso, K. 2014. *Organosolv Pretreatment of Rice Straw for Efficient Aceton, Butano, and Ethanol Production*. Isfahan University of Technology. Bioresource Technology. 152, pp. 450-456.
- Ayeni, Augustine O. 2015. *Compositional Analysis of Lignocellulosic Materials: Evaluation of an Economically Viable Method suitable for Woody and non-woody Biomass*. American Journal of engineering Research 2320-0847.
- Bistamam M.S.A, dkk. 2012. *Development of Green Nanocomposites reinforced by Cellulose Nanofibers from Waste Newspaper*. Design, Manufacturing and Applications of Composites 135-142
- Chundawat S.P, dkk. 2006. *Effect of Particle Size Based Separation of Milled Corn Stover on AFEX Pretreatment and Enzymatic Digestibility*. Biotechnology and Bioengineering 96:2.
- Dewi, Chandra dkk. 2004. *Produksi Gula Reduksi oleh *Rhizopus oryzae* dari Substrat Bekatul*. Surakarta:Biologi Mipa UNS
- Direktorat Jenderal Perkebunan. 2014. “*Statistik Perkebunan Kopi Indonesia.*”

- Duff S. J. B dan Murray W. D. 1995. *Bioconversion of Forest Products Industry Waste Cellulosics to Fuel Ethanol: A Review*. *Bioresource Technology* 55: 1-33
- Effendy, De Lux Putra. 2004. *Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dalam Bidang Farmasi*. Medan:FMIPA USU
- Eriksson, T dkk. 2002. *Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose*. *Enzyme Microb. Technol.* 31 (3), 353–364.
- Falk, Lina. 2015. “*Evaluation of Biological Hydrolysis Pre-treatment and the Biogas Potential of Sludge from Compact Waste Water Treatment*”. Lund University
- Ferreira, Susana, dkk.. 2009. *Response Surface Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Cistus ladanifer and Cystisus striatus for Bioethanol Production*. *Biochemical Engineering Journal* 45 (2009) 192-200.
- Goswami, dkk. 2015. ”*Microbial Xylanase and their applications - A review.*”  
International Journal of Current Research and Academic Review
- Harmsen, P.F.H dkk. 2010. *Literature Review of Physical and Chemical Pretreatment Processes for Lignocellulosic Biomass. Food and Biobased Research*. Germany:Wageningen
- Hidayat, A. S. 2005. *Konsumsi BBM dan Peluang Pengembangan Energi Alternatif*. *Jurnal Inovasi*, Vol. 5 (17): 11-17.
- Howard R.L, dkk. 2003. *Lignocellulose Biotechnology: issues of Bioconversion and Enzyme Production*. *Biotechnology* vol. 2 (12:602-619)
- Itoh, H, dkk. 2003. *Bioorganosolve Pretreatments for Simultaneous Saccharification and Fermentation of Beech Wood by Ethanolysis and White Rot Fungi*. *J. Biotechnol.* 103, 273-280.

- Kaar, W.E. dan Holtzapple, M.T., 1998. *Benefits from Tween During Enzymic Hydrolysis of Corn Stover*. Biotechnol. Bioeng. 59 (4), 419–427.
- Kementrian Pertanian. 2010. *Hasil Penelitian Pertanian Komoditas Kopi*. Bogor
- Khandelwai, dkk. 2012. “*Isolation, characterization & biomass production of Trichoderma viride using various agro products- A biocontrol agent*”. Pelagia Research Library
- Kikas, T. 2015. “*Effect of lignin content of lignocellulosic material on hydrolysis Efficiency*.” Agronomy Research
- Kuhad, Ramesh Chander dkk. 2011. *Microbial Cellulases and Their Industrial Applications*. India: New Delhi
- Kumar, dkk. 2009. “*Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production*”. I&EC Research.
- Kustantini, Diana. 2010. “*Beberapa hal yang Mempengaruhi Viabilitas Benih Kopi*”. BBPPTP Surabaya
- Lee, J.M. 1992. *Biochemical Engineering*. Prantice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, hal. 83 – 94.
- Li J, dkk. 2012. *The Mechanism of Poly(Ethylene Glycol) 4000 Effect on Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulose*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 89: 203-210
- Lynd L.R, dkk. 1999. *Biochemical Engineering*. Biotechnol.
- Maurya, Davendra Prasad dkk. 2015. *An Overview of Key Pretreatment Processes for Biological Conversion of Lignocellulosic Biomass to Bioethanol*. Biotech.
- Mesa L, González E, dkk. 2010. *An Approach to Optimization of Enzymatic Hydrolysis from Sugarcane Bagasse Based on Organosolv Pretreatment*. J Chem Technol Biotechnol 85:1092-1098

- Mood, S. H, dkk. 2013. *Lignocellulose Biomass to Bioethanol, a Comprehensive Review with a Focus on Pretreatment*. Renewable and Sustainable Energy Reviews 27 : 77-93
- Mosier, N dkk.. 2005. *Features of Promising Technologies for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass*. Bioresource Technology 96 : 673–686.
- Mtui, GYS. 2009. *A Review : Recent Advance in Pretratment of Lignocellulosic Wates and Production of Value Added Product*. African J.of Bioethanol 8, 1398-1415.
- Nuniek H, dkk. *Pengaruh Variasi Pretreatment Biologis pada Limbah Kulit Kopi Terhadap Proses Hidrolisa untuk Menghasilkan Gula Reduksi*. Surabaya: 2017.
- Ogura, Kazuma dkk. 2014. *Pretreatment of Japanese Cedar ny Ionic Liquid Solutions in Combination with acid and Metal Ion and It's Application to High solid Loading*. Biotechnology for Biofuels 2014, 7:120.
- Pandey A, dkk. 2000. *Biotechnological Potential of Coffee Pulp and Coffee Husk for Bioprocess*. Biochemical Engineering Journal 6:153-162
- Park, S. Baker dkk. 2010. *Cellulose Crystallinity Index: Measurement Techniques and Their Impact on Interpreting Cellulase Performance*. Biotechnology for Biofuels 3(10): 1-10.
- Perez, Jose A dkk. 2016. *Sequential enzymatic saccharification and fermentation of ionic liquid and organosolv pretreated agave bagasse for ethanol production*. Bioresource Technology.
- Probiotics News. 2009. “*Bacillus subtilis – Identification & Safety*.” Protexin health Care
- Qing, Q., dkk. 2010. *Impact of surfactants on pretreatment of corn stover*. Bioresour. Technol. 101 (15), 5941–5951.

- Raud, M dkk. 2015. *Effect of Lignin Content of Lignocellulosic Material on Hydrolysis Efficiency*. Argonomy Research pp 405-412
- Sánchez C. 2009. *Lignocellulosic Residues: Biodegradation and Bioconversion by Fungi*. Biotechnology Advances 27: 185-194
- Schuster, dkk. 2002. “*On the safety of Aspergillus niger – a review*”. Mini review
- Shahzadi T, dkk. 2014. *Advances in Lignocellulosic Biotechnology: A Brief Review on Lignocellulosic Biomass and Cellulases*. Advances in Bioscience and Biotechnology 5:246-251
- Shin, C.S dkk. 2000. *Enzyme Production of Trichoderma reesei RutC-30 on Various Lignocellulosic Substrates*. App. Biochem.& Biotechnol
- Singh, dkk. 2014. “*Optimal Physical Parameters for Growth of Trichoderma Species at Varying pH, Temperature and Agitation*”
- Soebijanto, T. 1986. *HFS dan Industri Ubi Kayu Lainnya*. Jakarta: Gramedia.
- Stein, Torsten. 2005. “*Bacillus subtilis antibiotics: structures, syntheses and specific functions.*” Micro review
- Sugesty. 1986. *Sumber Bahan Baku Pulp*. Balai Besar Pulp dan Kertas, 1-20.
- Sun, Ye dan Jiayang Cheng. 2008. “*Hydrolysis of lignocellulosic materials for Ethanol production: a review.*” Bioresource Technology.
- Sunjoto, W.D dkk. 2011. “*Peningkatan Kecepatan Dekomposisi Limbah Kulit Kopi dengan Penambahan Trichoderma spp sebagai Dekomposer dan Pseudomonas sp untuk Pengkayaan Kandungan Fosfat.*” Universitas Jember.

- Taherzadeh, dkk. 2007. “*Enzyme-based Hydrolysis Processes for Ethanol From Lignocellulosic Material: A Review.*”
- Timilsena, Yakindra Prasad. 2012. *Effect of Different Pretreatment Methods in Combination with the Organosolv Delignification Process and Enzymatic Hydrolysability of Three Feedstocks in Correaltion with Lignin Structure.* Nepal:Kathmandu.
- Ucisik, Ahmed Suheyl dan Mogens Henze. 2008. “*Biological hydrolysis and acidification of sludge under anaerobic conditions: The effect of sludge type and origin on the production and composition of volatile fatty acids.*”
- Ul-Haq I, dkk. 2005. *Cotton Saccharifying Activity of Cellulases Produced by Co-culture of Aspergillus niger and Trichoderma viride*, Research Journal of Agriculture and Biological Science 1(3):241-245.
- Verardi, dkk. 2009. *Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass: Current Status of Processes and Technologies and Future Perspectives.* Italy
- Wang, Wei dkk. 2012. *Combination of biological pretreatment with liquid hot water pretreatment to enhance enzymatic hydrolysis of Populus tomentosa.* Bioresource Technology 107 (2012) 282–286.
- Xiao, Wenwen, dkk. 2011. *The Study of Factors Affecting the Enzymatic Hydrolysis of Cellulose After Ionic Liquid Pretreatment.* Carbohydrate Polymers 87:2019-2023.
- Zhao, Xin-Qing dkk. 2011. “*Bioethanol from Lignocellulosic Biomass.*” Adv. Biochemical Engineering.
- Zhao, Yan dkk. 2015. *Non-ionic Surfactants do not Consistently Improve the enzymatic*

*Hydrolysis of Pure Cellulose.* Bioresource Technology pp 136-143

Zhu, Z dkk. 2012. *Pretreatment of sugarcane Baggasse with NH<sub>4</sub>OH-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Ionic Liquid for Efficient Hydrolysis and Bioethanol Production.* Bioresource Technology 119:119-207

Zegeye, dkk. 2011. *Biocontrol activity of Trichoderma viride and Pseudomonas fluorescens against Phytophthora infestans under greenhouse conditions.*

**APPENDIKS A**  
**A-1**  
**PERHITUNGAN KADAR AIR DAN XILOSA**  
**UNTUK MENGUKUR AKTIVITAS ENZIM**

A-1.1 Perhitungan Kadar Air Bahan Baku Kulit Kopi

$$\text{Kadar Air (\%)} = \frac{W_2 - W_1}{W_{\text{sampel}}} \times 100\%$$

Keterangan : W1 = Berat cawan + sampel yang sudah di oven

W2 = Berat cawan + sampel

W<sub>sampel</sub> = Berat sampel yang diuji

Perhitungan : W1 = 17.04 gr

W2 = 17.67 gr

W<sub>sampel</sub> = 1.081 gram

$$\text{Kadar Air (\%)} = \frac{39,2687 - 39,0733}{1,718} \times 100\% \\ = 11,377 \%$$

**A-2**  
**PERHITUNGAN JUMLAH SEL UNTUK PEMBUATAN**  
**KURVA PERTUMBUHAN MIKROORGANISME**

A-2.1 Contoh perhitungan jumlah sel mikroorganisme

*Trichoderma viride* pada jam 16.30 tanggal 19 Maret 2017

Run	A	B	C	D	E	Total
1	8	10	9	10	9	46
2	6	7	7	5	7	32

Jumlah sel/kotak run 1:  $46/5 = 9,2$  sel/kotak

Jumlah sel/kotak run 2:  $32/5 = 6,4$  sel/kotak

Rata-rata sel/kotak =  $\frac{9,2 + 6,4}{2} = 7,8$  sel/kotak

Luas 1 kotak = 1 mm<sup>2</sup> dan jumlah kotak = 25 sehingga jumlah sel tiap mm<sup>2</sup> :

$$\frac{7,8 \frac{\text{sel}}{\text{kotak}}}{\frac{1 \text{ mm}^2}{25 \text{ kotak}}} = 195 \frac{\text{sel}}{\text{kotak}}$$

Tinggi kotak = 0,1 mm sehingga jumlah sel tiap mm<sup>3</sup>:

$$\frac{195 \frac{\text{sel}}{\text{mm}^2}}{0,1 \text{ mm}} = 1950 \frac{\text{sel}}{\text{mm}^3}$$

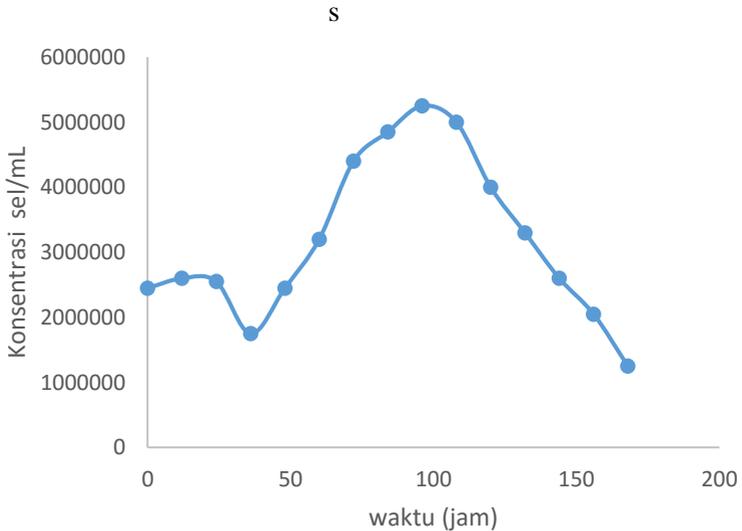
Dengan faktor pengenceran 10x, jumlah sel tiap ml:

$$1950 \frac{\text{sel}}{\text{mm}^3} \times 10 \times 1000 \frac{\text{mm}^3}{1 \text{ ml}} = 19500000 \frac{\text{sel}}{\text{ml}}$$

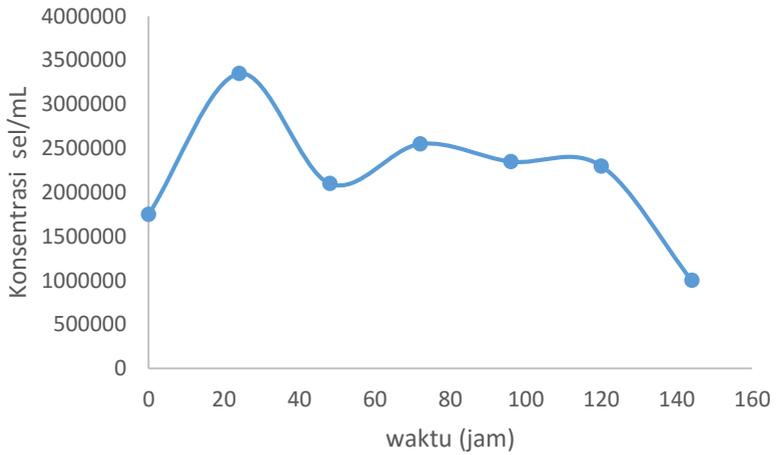
### A-3

## KURVA PERTUMBUHAN MIKROORGANISME

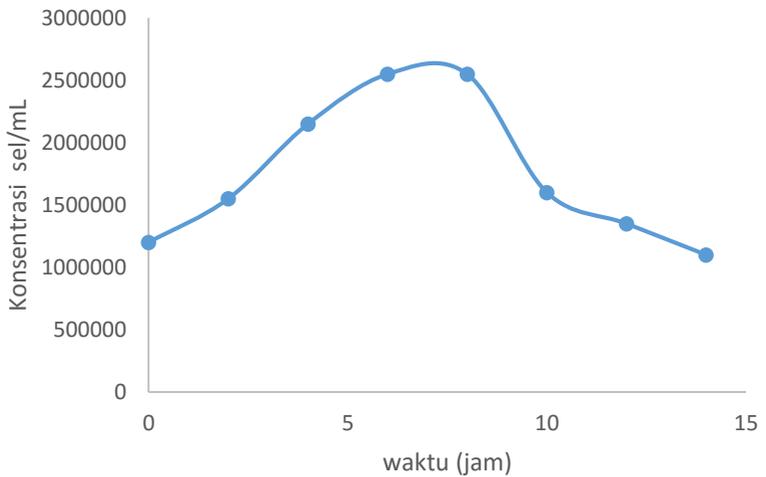
A-3.1 Kurva pertumbuhan mikroorganisme *Trichoderma viride*:



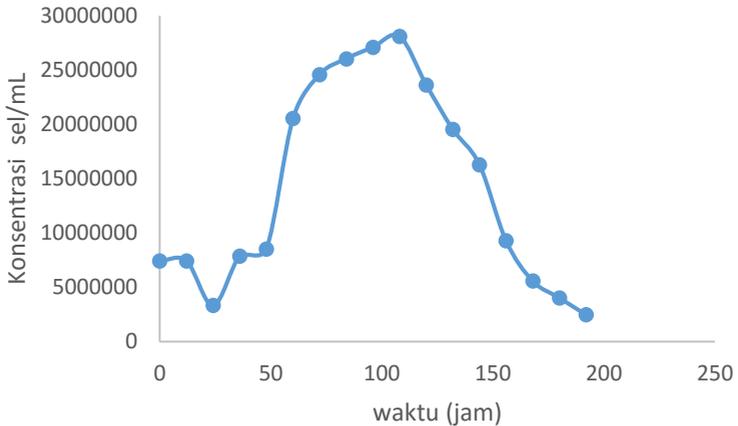
A-3.2 Kurva pertumbuhan mikroorganisme *Aspergillus niger*:



A-3.3 Kurva pertumbuhan mikroorganisme *Bacillus subtilis*:



A-3.4 Kurva pertumbuhan mikroorganisme *Trichoderma reesei*:



**A-4**

**PERHITUNGAN KURVA STANDAR GLUKOSA DAN XILOSA UNTUK MENGHITUNG JUMLAH KEBUTUHAN ENZIM SELULASE DAN XILANASE**

A-4.1 Perhitungan Kurva Standar Glukosa

$$\begin{aligned} \text{Massa glukosa} &= 0,3671 \text{ gram} \\ \text{Volume buffer sitrat pH 5} &= 100 \text{ ml} \\ \text{BM glukosa} &= 180 \text{ gram/mol} \\ \text{Mol glukosa} &= \text{massa glukosa/BM} \\ &= 0,3671 \text{ gr} / (180 \text{ gram/mol}) \\ &= 0,00203 \text{ mol} \\ &= 2038,8889 \mu\text{mol} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi glukosa awal} &= \text{mol glukosa/ volume buffer} \\ &\quad \text{sitrat pH 5} \\ &= 20388,889 \mu\text{mol}/100 \text{ ml} \\ &= 20,388 \mu\text{mol/ml} \end{aligned}$$

Misalkan pada pengenceran 1:4 (glukosa : buffer sitrat)

Konsentrasi di tabung reaksi:

$$= \frac{\text{konsentrasi glukosa awal} \times \text{larutan glukosa}}{\text{volume total}}$$

$$= \frac{20,388 \mu\text{mol/ml} \times 1 \text{ ml}}{5 \text{ ml}}$$

$$= 4,0776 \mu\text{mol/ml}$$

Konsentrasi di kuvet:

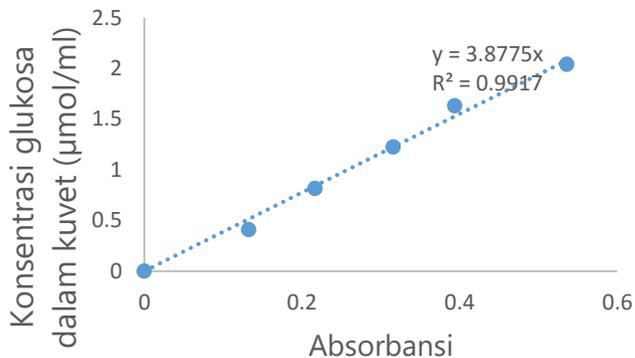
$$= \frac{\text{konsentrasi di tab. reaksi} \times \text{larutan glukosa}}{\text{volume total}}$$

$$= \frac{4,0776 \mu\text{mol/ml} \times 0,2 \text{ ml}}{5 \text{ ml}}$$

$$= 0,163 \mu\text{mol/ml}$$

Untuk konsentrasi yang lain, perhitungan dapat dilakukan dengan langkah yang sama. Kemudian diplot antara konsentrasi glukosa vs absorbansi untuk tiap pengenceran, lalu dilakukan regresi linier dan diperoleh persamaan  $y = 3,8775x$  dengan  $y$  sebagai konsentrasi glukosa ( $\mu\text{mol/ml}$ ) dan  $x$  sebagai absorbansi.

Kurva standar Selulase (CMC)



#### A-4.2 Perhitungan Kurva Standar Xilosa

$$\begin{aligned} \text{Massa xilosa} &= 0,3687 \text{ gram} \\ \text{Volume buffer sitrat pH 5} &= 100 \text{ ml} \\ \text{BM xilosa} &= 150,13 \text{ gram/mol} \\ \text{Mol xilosa} &= \frac{\text{massa xilosa}}{\text{BM xilosa}} \\ &= \frac{0,3687 \text{ gram}}{150,13 \text{ gram/mol}} \\ &= 0,0025 \text{ mol} \\ &= 2455,872 \text{ } \mu\text{mol} \\ \text{Konsentrasi xilosa awal} &= \frac{\text{mol xilosa}}{\text{volume}} \\ \text{buffer sitrat pH 5} &= \frac{2455,872 \text{ } \mu\text{mol}}{100 \text{ ml}} \\ &= 24,559 \text{ } \mu\text{mol/ml} \end{aligned}$$

Misalkan pada pengenceran 1:4 (xilosa : buffer sitrat)

Konsentrasi di tabung reaksi:

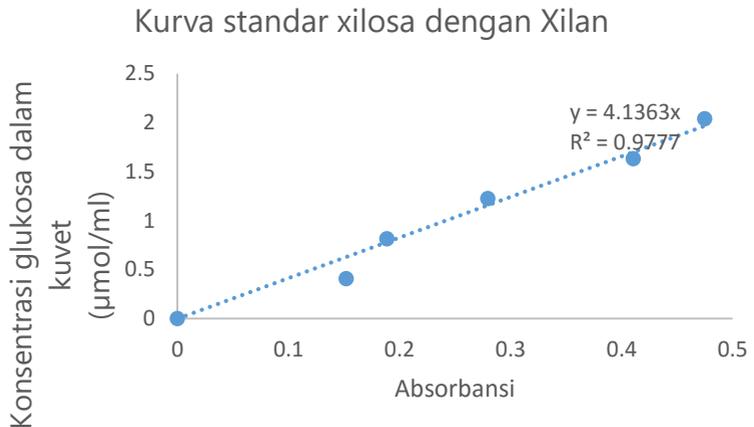
$$\begin{aligned} &= \frac{\text{konsentrasi xilosa awal} \times \text{larutan xilosa}}{\text{volume total}} \\ &= \frac{24,559 \text{ } \mu\text{mol/ml} \times 1 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} \\ &= 4,912 \text{ } \mu\text{mol/ml} \end{aligned}$$

Konsentrasi di kuvet:

$$\begin{aligned} &= \frac{\text{konsentrasi di tabung reaksi} \times \text{larutan xilosa}}{\text{volume total}} \\ &= \frac{4,912 \text{ } \mu\text{mol/ml} \times 0,2 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} \\ &= 0,196 \text{ } \mu\text{mol/ml} \end{aligned}$$

Untuk konsentrasi yang lain, perhitungan dapat dilakukan dengan langkah yang sama. Kemudian diplot antara konsentrasi xilosa vs absorbansi untuk tiap pengenceran, lalu

dilakukan regresi linier dan diperoleh persamaan  $y = 4,1363x$  dengan  $y$  sebagai konsentrasi xilosa ( $\mu\text{mol/ml}$ ) dan  $x$  sebagai absorbansi.



### A-5

#### PERHITUNGAN JUMLAH KEBUTUHAN ENZIM

Untuk perhitungan aktivitas enzim dapat dilakukan dengan cara yang sama:

$$\text{Aktifitas enzim} = \frac{(A1-A2) \times \text{slope kurva} \times V \text{ sampel}}{\text{waktu inkubasi} \times V \text{ enzim}}$$

Dimana :

A1 = absorbansi larutan sebelum koreksi

A2 = absorbansi larutan koreksi

A = absorbansi larutan setelah koreksi

Volume sampel = 5 ml

Waktu inkubasi = 10 menit

Volume enzim = 0,2 ml

Slope yang diperoleh dari kurva standard glukosa dan xilosa yang telah dihitung :

#### A-5.1 Perhitungan Kebutuhan Enzim

Kebutuhan enzim untuk enzim selulase murni dan enzim xylanase murni

Kebutuhan enzim = 18,6 U/1 gr kulit biji kopi

$$\text{Aktifitas enzim} = \frac{(1,6378-1,419) \times 3,8775 \times 5}{10 \times 0,2} \\ = 2,121 \text{ U/ml}$$

Kebutuhan enzim selulase murni:

=  $\frac{\text{kebutuhan enzim}}$

aktivitas enzim

$$= \frac{18,6 \text{ U}}{2,121 \text{ U/ml}}$$

2,121 U/ml

$$= 14,344 \text{ ml}$$

Kebutuhan enzim xylanase murni:

=  $\frac{\text{kebutuhan enzim}}$

aktivitas enzim

$$= \frac{18,6 \text{ U}}{1,48254 \text{ U/ml}}$$

1,48254 U/ml

$$= 12,5468 \text{ ml}$$

### A-6

#### PERHITUNGAN KURVA STANDARD UNTUK MENGUKUR JUMLAH GULA REDUKSI

##### A-6.1 Perhitungan Kurva Standar Gula Reduksi

Misalkan kurva standar gula reduksi menggunakan larutan buffer pH 5

Massa glukosa = 0,3671 gram

Volume buffer sitrat pH 5 = 100 ml

Konsentrasi glukosa awal = massa glukosa/ volume  
buffer sitrat pH 5

$$= 0,3671 \text{ gram}/100 \text{ ml}$$

$$= 0,0037 \text{ gram/ml}$$

$$= 3,671 \text{ gram/L}$$

Misalkan pada pengenceran 1:4 (glukosa : buffer sitrat)

Konsentrasi di tabung reaksi

$$= \frac{\text{konsentrasi glukosa awal} \times \text{larutan glukosa}}{\text{volume total}}$$

$$= \frac{3,671 \text{ gram/L} \times 1 \text{ ml}}{5 \text{ ml}}$$

$$= 0,7342 \text{ gram/L}$$

Konsentrasi di kuvet

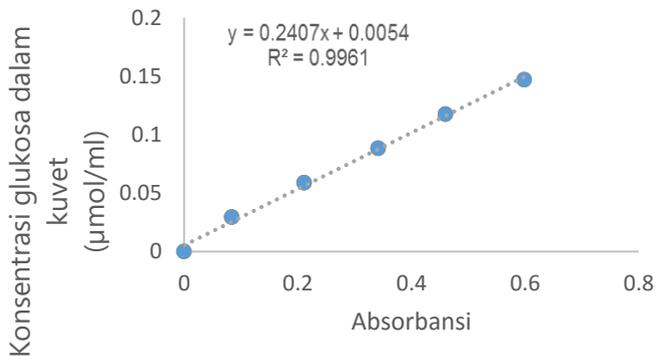
$$= \frac{\text{konsentrasi di tab. reaksi} \times \text{larutan glukosa}}{\text{volume total}}$$

$$= \frac{0,7342 \text{ gram/L} \times 0,2 \text{ ml}}{5 \text{ ml}}$$

$$= 0,029 \text{ gram/L}$$

Untuk konsentrasi yang lain, perhitungan dapat dilakukan dengan langkah yang sama. Kemudian diplot antara konsentrasi gula reduksi vs absorbansi untuk tiap pengenceran, lalu dilakukan regresi linier dan diperoleh persamaan  $y = 0,2407x + 0,0054$  dengan  $y$  sebagai konsentrasi gula reduksi (gram/L) dan  $x$  sebagai absorbansi.

Kurva standar glukosa (tanpa CMC)



## A-6.2 Perhitungan Konsentrasi, Massa, dan Yield Gula Reduksi

### 1. Perhitungan konsentrasi gula reduksi

Perhitungan gula reduksi pada data absorbansi (analisa DNS) hidrolisis campuran enzim selulase dan enzim xilanase pada sampel hidrolisa biologis kulit kopi awal pretreatment BS:TR, suhu hidrolisis 30°C dan waktu inkubasi selama 16 jam.

$$\text{Absorbansi} = 0,0924$$

Konsentrasi gula di kuvet

$$= \text{Absorbansi} \times \text{slope kurva standar hidrolisis} + \text{intercept}$$

$$= 0,0924 \times 0,2407 + 0,0054$$

$$= 0,027641 \text{ gram/L}$$

Konsentrasi gula di erlenmeyer

$$= \frac{\text{konsentrasi gula di kuvet} \times \text{volume kuvet}}{\text{volume sampel}}$$

$$= \frac{0,027641 \text{ gram/L} \times 5 \text{ ml}}{0,2 \text{ ml}}$$

$$= 0,691 \text{ gram/L}$$

Untuk perhitungan konsentrasi sampel lainnya dapat dilakukan dengan cara yang sama.

### 2. Perhitungan massa gula reduksi

Perhitungan gula reduksi pada data hasil konsentrasi gula hidrolisis campuran enzim selulase dan enzim xilanase pada sampel hidrolisa biologis kulit kopi awal pretreatment BS:TR, suhu hidrolisis 30°C dan waktu inkubasi selama 16 jam.

$$\text{Konsentrasi gula di erlenmeyer} = 0,691 \text{ gram/L}$$

$$\text{Volume larutan hidrolisis} = 30 \text{ ml}$$

$$\text{Massa gula reduksi} = \text{konsentrasi gula} \times \text{volume larutan}$$

$$= 0,691 \text{ gram/L} \times (30/1000) \text{ L}$$

$$= 0,0207 \text{ gram}$$

Perhitungan massa gula reduksi variabel lainnya dapat dilakukan dengan cara yang sama.

### 3. Perhitungan yield gula reduksi

Perhitungan gula reduksi pada data hasil massa gula hidrolisis campuran enzim selulase dan enzim xilanase pada sampel hidrolisa biologis kulit kopi awal pretreatment BS:TR, suhu hidrolisis 30°C dan waktu inkubasi selama 16 jam.

$$\text{Massa gula reduksi} = 0,0207 \text{ gram}$$

$$\text{Massa kulit kopi yang dihidrolisis} = 1,0024 \text{ gram}$$

$$\text{Yield gula reduksi} = \frac{\text{konsentrasi gula reduksi} \times \text{volume hidrolisat}}{\%(\text{selulosa}) \times \text{gram kulit kopi yang dihidrolisis}}$$

$$\text{Yield gula reduksi} = \frac{\text{massa gula reduksi}}{\%(\text{selulosa}) \times \text{massa kulit kopi}}$$

$$= \frac{0,021 \text{ gram}}{(24.3166)\% \times 1,0024 \text{ gram}}$$

$$= 0,0862 \frac{\text{gr gula reduksi}}{\text{gr (selulosa) kulit kopi}}$$

Untuk perhitungan yield variabel lainnya dapat dilakukan dengan cara yang sama



## BIODATA PENULIS I



Christa Bella Rotua Hutapea, lahir di Medan pada tanggal 28 September 1995 yang merupakan anak ketiga dari tiga bersaudara. Penulis telah menempuh pendidikan formal, yaitu lulus dari TK Santo Yoseph Medan pada tahun 2001, lulus dari SD Santo Yoseph Medan pada tahun 2007, lulus dari SMP Santo Thomas 1 Medan pada tahun 2010, dan lulus dari SMA Santo Thomas 1 Medan pada tahun 2013. Setelah menyelesaikan pendidikan di jenjang SMA, penulis melanjutkan pendidikan Strata-1 di Departemen Teknik Kimia, FTI – ITS dengan nomor registrasi 2313100047. Selama kuliah penulis aktif di Persekutuan Doa Kristen Katolik (PDKK) Teknik Kimia ITS, Persekutuan Mahasiswa Kristen ITS, mengikuti kegiatan kepanitiaan jurusan Teknik Kimia ITS, serta berbagai pelatihan dan seminar yang diadakan di Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS).

Email : [christabellahutapea@gmail.com](mailto:christabellahutapea@gmail.com)

Hp : 082260667127

## BIODATA PENULIS II



**Romida Evannita Sitorus** lahir di Siborongborong, Sumatra Utara pada tanggal 13 Nopember 1995. Penulis menempuh pendidikan formal di SDN 313330 Sibuntuon, Humbang Hasundutan kemudian sekolah menengah pertama di SMPN 1 Lintong Nihuta dan menempuh pendidikan menengah atas di SMAN 2 Balige dan lulus pada tahun 2013. Sejak tahun tahun 2013, penulis melanjutkan jenjang pendidikan S1 di Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS), Fakultas Teknologi Industri, Jurusan Teknik Kimia.

Penulis melakukan penelitian skripsi di Laboratorium Teknologi Biokimia sampai dengan terselesaikannya skripsi ini. Penulis menjalani kerja praktek di P.T Semen Indonesia Tbk selama satu bulan terhitung dari tanggal 1 Juni – 30 Juni 2016.

Penulis menyelesaikan tugas Pra-Desain **“Garam Farmasi dari Garam Rakyat dengan Metode Pencucian”** dan skripsi berjudul **“ Studi Teknik Produksi Gula Reduksi dari Limbah Kulit Buah Kopi (*Parchment hull / endocarp*)”** di bawah bimbingan Prof. Dr. Ir. Tri Widjaja, M.Eng. Apabila ada saran dan kritik yang sekiranya dapat membangun tentang penelitian ini, maka pembaca dapat menghubungi penulis melalui e-mail: [evasitorus7@gmail.com](mailto:evasitorus7@gmail.com)