



TESIS - TK 142541

PRODUKSI HIDROGEN DARI SABUT KELAPA MELALUI PRETREATMENT AIR SUBKRITIS DAN HIDROLISIS ENZIMATIK

FITRI JUNIANTI
NRP. 2314 201 006

Dosen Pembimbing :
Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M. Eng

PROGRAM MAGISTER
BIDANG KEAHLIAN TEKNOLOGI PROSES
JURUSAN TEKNIK KIMIA
FAKULTAS TEKNOLOGI INDUSTRI
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA
2016



TESIS - TK 142541

PRODUCTION OF HYDROGEN FROM COCONUT HUSK BY SUBCRITICAL WATER PRETREATMENT AND ENZYMATIC HYDROLISIS

FITRI JUNIANTI
NRP. 2314 201 006

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

MAGISTER PROGRAM
PROCESS OF TECHNOLOGY
CHEMICAL ENGINEERING DEPARTMENT
FACULTY OF INDUSTRIAL TECHNOLOGY
SEPULUH NOPEMBER INSTITUTE OF TECHNOLOGY
SURABAYA
2016

LEMBAR PENGESAHAN

**PRODUKSI HIDROGEN DARI SABUT KELAPA MELALUI
PRETREATMENT AIR SUBKRITIS DAN HIDROLISIS
ENZIMATIK**

Tesis ini disusun memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar

Magister Teknik (MT)

di

Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya

Oleh:

Fitri Junianti

NRP. 2314 201 006

Tanggal Ujian : 13 Juli 2016

Periode Wisuda : September 2016

Disetujui oleh:

1. **Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M.Eng (Pembimbing)**
NIP. 1966 05 23 1991 02 1001

2. **Prof. Dr. Ir. Danawati Hari P., M.Pd (Penguji)**
NIP. 1951 07 29 1986 03 2001

3. **Dr. Ir. Sumarno, M.Eng (Penguji)**
NIP. 1964 06 08 1991 02 1001

4. **Prof. Dr. Ir. Tri Widjaja, M.Eng (Penguji)**
NIP. 1961 10 21 1986 03 1001

Arief Widjaja
Danawati Hari P.
Sumarno
Tri Widjaja



Direktur Program Pascasarjana,

Prof. Ir. Djauhar Manfaat, M.Sc, Ph D
NIP. 1960 12 02 1987 01 1001

PRODUKSI HIDROGEN DARI SABUT KELAPA MELALUI PRETREATMENT AIR SUBKRITIS DAN HIDROLISIS ENZIMATIK

Nama : Fitri Junianti
NRP : 2314201006
Dosen Pembimbing : Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M. Eng

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk memproduksi hidrogen dari bahan berlignoselulosa. Sabut kelapa merupakan bahan berlignoselulosa yang mengandung 22% selulosa, 10% hemiselulosa, 47% lignin. Ada tiga tahap yang dilakukan dalam penelitian ini, tahap pertama hidrolisis sabut kelapa menggunakan metode subkritis dalam reaktor *batch* pada tekanan 40, 80 dan 160 bar dan suhu 120-300⁰C selama 1 jam. Tahap kedua padatan hasil subkritis didegradasi dengan menggunakan enzim campuran selulase dan xilanase. Selanjutnya tahap ketiga, hasil hidrolisat sabut kelapa akan difermentasi oleh bakteri *Enterobacter aerogenes* untuk menghasilkan hidrogen. Padatan hasil metode air subkritis selanjutnya dikarakterisasi menggunakan XRD dan SEM. Penentuan yield gula reduksi menggunakan metode DNS dan HPLC, sedangkan untuk menentukan yield hidrogen dianalisis menggunakan GC. Massa gula reduksi tertinggi hasil pretreatment SCW diperoleh sebesar 0.897 g pada 150⁰C; 80 bar dan waktu reaksi 60 menit sedangkan setelah hidrolisis enzimatik massa gula reduksi tertinggi pada 40 bar; 130⁰C; dengan waktu reaksi 60 menit yaitu 0.517 g. Hasil fermentasi dari hidrolisat sabut kelapa terbaik diperoleh total yield hidrogen sebesar 0,279 mol hidrogen/mol gula reduksi terkonsumsi.

Kata kunci: sabut kelapa, hidrolisis air subkritis, *selulase*, *xilanase*, gula reduksi dan hidrogen

Halaman ini sengaja dikosongkan

Production Of Hydrogen From Coconut Husk By Subcritical Water Pretreatment And Enzymatic Hydrolysis

Name : Fitri Junianti
NRP : 2314 201 006
Advisors : Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M. Eng

ABSTRACT

In this study, produce hydrogen from lignoselulose contained material. Coconut husk is a lisnoselulose material contains 22% cellulose, 10% hemicellulose, and 47% lignin. There are three steps in this study, the first step is coconut husk hydrolysis using subcritic methods in batch reactor at pressure 40, 80, and 160 bar and temperature of 120-300⁰C for an hour. Second, solid from the subcritic methods is degraded using the mixture on enzymes cellulose and xylanase. And then the last step, the yield from coconut husk hydrolysis will be fermented by microorganism *Enterobacter aerogenes* to produce hydrogen. Solid from subcritic methods is characterized by XRD and SEM. Yield of reducing sugar is determined by DNS methods and HPLC analysis, while yield of fermentation by GC analysis. The highest mass of reducing sugar obtained 0.897 g at 150°C; 80 bar and reaction time 60 min. For enzymatic hydrolysis, the highest mass of reducing sugar obtained 0.517 g at 40 bar; 130°C; and reaction time 60 min. The yield of fermentation of coconut husk hydrolyzate was 0,279 mol hydrogen/mol reducing sugar consumed.

Key Words: coconut husk, subcritical water, cellulose, xylanase, reducing sugar and hydrogen

Halaman ini sengaja dikosongkan

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	
LEMBAR PENGESAHAN	
KATA PENGANTAR.....	i
ABSTRAK	iii
ABSTRACT.....	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.4 Manfaat Penelitian	5
BAB 2 KAJIAN PUSTAKA DAN DASAR TEORI	7
2.1 Sabut Kelapa	7
2.2 Lignoselulosa	8
2.3 Proses <i>Pretreatment</i> Lignoselulosa dengan Metode Air Subkritis.....	11
2.3.1 Metode Air Subkritis.....	11
2.3.2 Teknologi Subkritis dalam Degradasi Lignoselulosa	13
2.4 Enzim.....	15
2.4.1 Enzim Selulase.....	17
2.4.2 Enzim Xilanase.....	18
2.4.3 Pengukuran Aktifitas Enzim.....	19
2.5 Gula Reduksi.....	20
2.5.1 Glukosa.....	21
2.5.2 Xilosa	22
2.6 Hidrogen	22
2.7 Produksi Hidrogen Dengan Proses Fermentasi	24

2.8 Peneliiian Terdahulu.....	27
BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN	29
3.1 Tempat dan Waktu Peneliatian	29
3.2 Bahan, Alat dan Skema Peralatan Penelitian	29
3.2.1 Bahan Penelitian	29
3.2.2 Alat Penelitian	29
3.2.3 Skema Peralatan Air Subkritis.....	29
3.3 Diagram Alir Penelitian	31
3.4 Variabel Penelitian	32
3.5 Tahapan Metode Penelitian	32
3.5.1 <i>Pretreatment</i> Sabut Kelapa	32
3.5.1.1 <i>Pretreatment</i> Mekanik	32
3.5.1.2 <i>Pretreatment</i> dengan Metode Air Subkritis.....	32
3.5.1.3 <i>Pretreatment</i> dengan Metode Autoclave.....	33
3.5.2 Analisa Kadar Hemiselulosa, Selulosa, dan Lignin dengan Metode Gravimetri.....	33
3.5.3 Penyiapan dan Pengukuran Konsentrasi Gula Reduksi.....	34
3.5.3.1 Pembuatan Buffer Sitrat 0,1 M pH 5,5.....	34
3.5.3.2 Pembuatan Larutan DNS.....	34
3.5.3.3 Pembuatan Kurva Standar Glukosa.....	34
3.5.3.4 Pembuatan Larutan Blanko.....	35
3.5.3.5 Analisa Konsentrasi Glukosa dengan Metode DNS.....	35
3.5.4 Penyiapan dan Pembuatan Larutan Enzim Selulase Xilanase Murni.....	35
3.5.4.1 Pembuatan Buffer Sitrat 0,1 M pH 3.....	35
3.5.4.2 Pembuatan larutan enzim selulase dari <i>Aspergillus</i> <i>Niger</i>	36
3.5.4.3 Pembuatan larutan enzim Xilanase dari <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	36

3.5.5	Persiapan Uji Aktivitas.....	36
3.5.5.1	Pembuatan larutan CMC.....	36
3.5.5.2	Pembuatan Larutan Xilan.....	36
3.5.5.3	Pembuatan Kurva Standar Glukosa untuk Mengukur Keaktifan Enzim Selulase.....	36
3.5.5.4	Pembuatan Kurva Standar Xilosa untuk Mengukur Keaktifan Enzim Xilanase.....	37
3.5.6	Uji Aktivitas Enzim.....	37
3.5.6.1	Uji Aktivitas Enzim Selulase Sebelum Koreksi.....	37
3.5.6.2	Uji Aktivitas Enzim Selulase Larutan Koreksi.....	37
3.5.6.3	Uji Aktivitas Enzim Xilanase Sebelum Koreksi.....	38
3.5.6.4	Uji Aktivitas Enzim Xilanase Larutan Koreksi.....	38
3.5.7	Proses Hidrolisis Sabut Kelapa.....	38
3.5.7.1	Hidrolisis Sabut kelapa dengan Enzim Selulase dan Enzim Xilanase.....	38
3.5.7.2	Analisa Konsentrasi Glukosa dengan Metode DNS.....	39
3.5.8	Penyiapan dan Proses Fermentasi.....	39
3.5.8.1	Persiapan Media Fermentasi	39
3.5.8.2	Proses Aklimatisasi	39
3.5.8.3	Pembuatan Kurva Standar Jumlah Sel.....	40
3.5.8.4	Proses Fermentasi	40
3.6	Kondisi Operasi Penelitian	41
BAB 4 HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN.....		43
4.1	Pretreatment.....	43
4.1.1	Pretreatment Mekanik.....	43
4.1.2	Pretreatment Subkritis.....	44
4.1.3	Pretreatment Autoclave.....	45
4.2.	Komposisi Lignoselulosa dari Sabut Kelapa Sebelum dan Sesudah SCW.....	46

4.3	Analisa Konsentrasi dan Yield Gula Reduksi setelah Pretreatment SCW dan Autoclave.....	48
4.3.1	Konsentrasi dan Yield Gula Reduksi Pretreatment Autoclave.....	48
4.3.2	Konsentrasi dan Yield Gula Reduksi Pretreatment SCW.....	49
4.3.2.1	Pengaruh Temperatur terhadap Gula Reduksi pada Sabut Kelapa.....	49
4.3.2.2	Pengaruh Tekanan terhadap Gula Reduksi Pada Sabut Kelapa.....	51
4.3.3	Perhitungan Konsentrasi Gula Reduksi dengan Analisa HPLC.....	53
4.4	Karakterisasi Padatan Sabut Kelapa Hasil SCW.....	55
4.4.1	Analisa Scanning Elektron Micrograph.....	55
4.4.2	Analisa X-ray diffraction.....	56
4.5	Analisa Konsentrasi, Massa dan Yield Gula Reduksi setelah Hidrolisis Enzimatik.....	58
4.5.1	Persiapan dan Pembuatan Enzim Selulase dan Xilanase Murni	58
4.5.2	Hidrolisis Enzimatik pada Padatan Hasil Pretreatment SCW.....	59
4.5.3	Massa Total Gula Reduksi.....	62
4.6	Perbandingan Hasil Gula Reduksi pada Penelitian ini dengan Penelitian Terdahulu.....	65
4.7	Fermentasi Gula Reduksi Hasil Pretreatment SCW.....	67
4.7.1	Fermentasi Liquid SCW dan Liquid Enzimatik.....	68
4.7.1.1	Fermentasi Liquid SCW.....	68
4.7.1.2	Fermentasi Liquid Enzimatik.....	69

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	73
5.1 Kesimpulan.....	73
5.2 Saran.....	73
DAFTAR PUSTAKA.....	xiii
APPENDIKS	

Halaman ini sengaja dikosongkan

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Sifat-Sifat Hidrogen dan Bensin sebagai Bahan Bakar	23
Tabel 2.2	Beberapa Metode untuk Mendapatkan Hidrogen	24
Tabel 3.1	Variabel <i>Pretreatment</i> Air Subkritis.....	32
Tabel 3.2	Variabel <i>Pretreatment</i> Autoclave.....	32
Tabel 4.1	Massa Sabut Kelapa Sebelum dan Sesudah Pretreatment Subkritis dengan Waktu Reaksi 60 Menit.....	44
Tabel 4.2	Massa Sabut Kelapa Sebelum dan Sesudah Pretreatment Autoclave.....	45
Tabel 4.3	Kadar Hemiselulosa, Selulosa, dan Lignin Setelah SCW.....	46
Tabel 4.4	Perbandingan Gula Reduksi Hasil HPLC dengan analisa DNS.....	53
Tabel 4.5	Data Intensitas Kurva Kristalin (I_{002}) dan Data Intensitas Kurva nonkristalin/ <i>amorf</i> (I_{am}) dalam perhitungan Cr.I Menggunakan metode Intensitas.....	58
Tabel 4.6	Perbandingan Massa Gula Reduksi Hasil Pretreatment SCW, Hidrolisis Enzimatik dan Total Gula Reduksi dengan Massa lignoselulosa Sabut Kelapa pada Berbagai Variabel.....	64
Tabel 4.7	Perbandingan Hasil Gula Reduksi pada Penelitian ini dengan Penelitian Terdahulu.....	65
Tabel 4.8	Data Hasil Perhitungan Analisa GC Hidrolisat SCW Sabut Kelapa 80 bar, 150°C.....	69
Tabel 4.9	Data Hasil Perhitungan Analisa GC Hidrolisat Hasil Enzimatik Sabut Kelapa 80 bar, 150°C.....	71

Halaman ini sengaja dikosongkan

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Sabut kelapa	8
Gambar 2.2	Konfigurasi dari kayu tissue.....	8
Gambar 2.3	Struktur Molekul Selulosa.....	9
Gambar 2.4	Struktur Molekul Hemiselulosa	10
Gambar 2.5	Struktur Molekul Lignin	11
Gambar 2.6	Diagram Fase Air pada Bidang P-T.....	12
Gambar 2.7	Hubungan Suhu terhadap Kerapatan, Konstanta Dielektrik dan Ionisasi Air Suhu pada Tekanan 30 Mpa.....	13
Gambar 2.8	Skema Proses <i>Pretreatment</i>	15
Gambar 2.9	Skema Hidrolisis Selulosa oleh Sistem Enzim Selulase.....	18
Gambar 2.10	Struktur Polimer Xilan dan Pematongannya oleh Aktifitas Enzim Xilanase.....	19
Gambar 2.11	Reaksi CMC Menjadi Glukosa dan Xilan menjadi Xilosa dalam Pengukuran Aktifitas Enzim.....	20
Gambar 2.12	Reaksi DNS dan Glukosa Menjadi Zat Warna Merah.....	20
Gambar 2.13	Gambar Glukosa (gugus aldehid) dan Fruktosa (gugus keton).....	21
Gambar 2.14	Gambar struktur D-glukosa dan L-glukosa.....	22
Gambar 2.15	Struktur Molekul Xilosa	22
Gambar 2.16	Lajur Fermentasi Hidrogen.....	25
Gambar 2.17	Skema Reaksi Produksi Hidrogen oleh <i>E. Aeorgenes</i>	26
Gambar 3.1	Rangkaian Peralatan Air Subkritis	30
Gambar 3.2	Diagram Alir Penelitian	31
Gambar 3.3	Rangkaian Alat Proses Fermentasi Gula Reduksi menjadi Hidrogen	40
Gambar 4.1	Grafik Nilai Konsentrasi dan Yield Gula Reduksi Pretreatment Autoclave dengan Metode DNS.....	48
Gambar 4.2	Reaksi Lignoselulosa setelah Pretreatment SCW.....	51

Gambar 4.3	Grafik Nilai Konsentrasi dan Yield Gula Reduksi Pretreatment SCW dengan Metode DNS.....	52
Gambar 4.4	Hasil Analisa SEM Sebelum SCW dan Setelah Pretreatment SCW pada 150 °C, 80 bar.....	55
Gambar 4.5	Metode Penentuan Cr.I dengan Perhitungan Intensitas I_{002} dan I_{am}	56
Gambar 4.6	Penentuan Kristalin (I_{002}) dan nonkristalin/ <i>amorf</i> (I_{am}) pada Unpretreatment.....	57
Gambar 4.7	Penentuan Kristalin (I_{002}) dan Nonkristalin/ <i>amorf</i> (I_{am}) pada Variabel 150°C dan 80 bar.....	57
Gambar 4.8	Yield Gula Reduksi Hidrolisis Enzimatik Produk SCW 40 bar.....	60
Gambar 4.9	Yield Gula Reduksi Hidrolisis Enzimatik Produk SCW 80 bar.....	60
Gambar 4.10	Yield Gula Reduksi Hidrolisis Enzimatik Produk SCW 160 bar.....	61
Gambar 4.11	Konsentrasi Gula Reduksi dan Jumlah Sel terhadap Waktu Fermentasi pada Hidrolisat Sabut kelapa 80 bar dan 150°C.	68
Gambar 4.12	Produksi Hidrogen dan Konsumsi Gula Reduksi terhadap Waktu Fermentasi pada Hidrolisat Enzimatik Sabut Kelapa <i>Treated</i> 80 bar dan 150°C.....	70

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pemenuhan energi di dunia sebagian besar berasal dari pembakaran bahan bakar fosil yang berumur jutaan tahun dan tidak dapat diperbaharui. Kebutuhan energi ini semakin meningkat seiring dengan meningkatnya jumlah penduduk dan kemajuan diberbagai sektor misalnya sektor ekonomi, industri, pertanian dan transportasi. Hal ini menyebabkan ketersediaan bahan bakar fosil akan menipis dan akan habis dalam jangka waktu tertentu. Selain persediaan bahan bakar fosil yang semakin menipis, masalah lain yang dihadapi adalah pencemaran lingkungan yang ditimbulkan akibat bahan bakar fosil ini seperti pemanasan global dan polusi udara. Hal ini yang mendorong masyarakat dunia khusus dibidang penelitian untuk mencari sumber energi alternatif yang ramah lingkungan, salah satunya dengan pemanfaatan limbah industri atau pertanian.

Energi alternatif yang banyak dikembangkan antara lain: bioenergi etanol, metanol, biodiesel, dan energi dari gas hidrogen. Bentuk energi alternatif produksi gas hidrogen diproyeksikan akan menjadi bahan bakar yang lebih efisien dan ramah lingkungan oleh banyak Negara. Hal ini dikarenakan hidrogen memiliki kalor bakar 120.1 MJ/kg lebih tinggi dibandingkan gasolin 42,5 MJ/kg, solar 43,3 MJ/kg, metana 50,1 MJ/kg maupun etanol 26,9 MJ/kg (Bossel, 2003), selain itu suplai energi yang dihasilkan sangat bersih karena hanya menghasilkan uap air sebagai emisi selama berlangsungnya proses pembakaran hidrogen.

Hidrogen dapat dihasilkan melalui proses konvensional seperti elektrolisis air, gasifikasi dan reaksi uap air (Cheng dkk 2014). Gasifikasi minyak bumi dan elektrolisa kurang efektif karena membutuhkan cadangan minyak bumi dan energi yang besar (Benneman, 1997). Produksi hidrogen dengan cara fermentasi yang lebih dikenal dengan biohidrogen merupakan proses yang mengkombinasikan antara pemanfaatan limbah dan energi terbarukan. Limbah yang dijadikan substrat untuk produksi hidrogen fermentasi adalah sisa makanan, endapan pada sistem pembuangan air, pupuk kandang, dan limbah pertanian.

Substrat yang mengandung karbohidrat seperti pati dan selulosa lebih baik daripada protein untuk produksi hidrogen fermentasi (Li dkk, 2009)

Yield hidrogen yang didapat dari hasil fermentasi antara lain yang dilakukan oleh Su dkk (2009) dengan menggunakan bakteri *Clostridium butyricum* + *Rhodopseudomonas palustris* pada sampel glukosa 10 g/L didapat yield sebesar 681,4 mL/g. Cheng, dkk (2012) dengan menggunakan tipe dark-fermentasi untuk sampel xylose 10 g/L diperoleh yield maksimum 190,6 mL/g. Sukrosa sebanyak 20g/L yang difermentasi dengan menggunakan *Clostridium pasteurianum* + *Rhodopseudomonas palustris* WP3-5 diperoleh yield sebesar 929.2 mL/g (Cheng dkk, 2008). Xia dkk (2013) dengan menggunakan asam glutamid 10 g/L yang difermentasi diperoleh yield 292.9 mL/g. Yield hidrogen yang diperoleh dengan menggunakan kombinasi dark dan photo fermentasi untuk Asam alanin 10 g/L sebesar 418,6 mL/g, asam serine 10 g/L sebesar 270,2 mL/g dan asam aspartik 10 g/L sebesar 237 mL/g (Cheng dkk, 2014). Berbagai penelitian menunjukkan glukosa memiliki yield terbesar untuk produksi hidrogen secara fermentasi.

Glukosa dapat diperoleh dari bahan baku limbah cair dan limbah padat biomassa (Reungsang dkk., 2004; Raghavendra dkk., 2007). Limbah padat biomassa yang ketersediaannya sangat melimpah adalah sabut kelapa. Kelapa merupakan salah satu komoditas andalan perkebunan Indonesia yang produksi buahnya rata-rata 15,5 miliar butir/tahun setara dengan 3.02 juta ton kopra, 3.75 juta ton air, 0.75 juta ton tempurung, 1,8 juta ton serat sabut, dan 3,3 juta ton debu sabut (Gunasekaran, dkk, 2012). Seluruh bagian buah kelapa pada dasarnya dapat diolah menjadi produk baru melalui empat komponen utama 35% sabut, 12% tempurung, 28% daging dan 25% air kelapa. Namun pemanfaatan hanya terpusat pada daging dan tempurung sedangkan sabut kelapa belum banyak diolah menjadi produk yang bernilai lebih tinggi.

Menurut Bilba dkk (2007) kandungan utama dalam sabut kelapa terdiri dari 22% selulosa, 10% hemiselulosa, 47% lignin, 12% air (moisture), 1.5% abu, dan 7.5% ekstrak. Dari data tersebut, kandungan selulosa dan hemiselulosa dari sabut kelapa cukup tinggi sehingga dapat dikembangkan sebagai sumber bahan

baku ideal untuk memproduksi hidrogen melalui proses hidrolisis enzimatis dan fermentasi (Orchidea, dkk., 2010)

Lignoselulosa tersusun dari lignin dan karbohidrat seperti selulosa dan hemiselulosa dan komponen lainnya seperti protein, garam dan mineral. Selulosa secara alami diikat oleh hemiselulosa dan tersusun secara padat oleh lapisan lignin (Maryana, dkk., 2014). Adanya lignin yang menyebabkan bahan-bahan lignoselulosa sulit untuk dihidrolisis. Oleh sebab itu, proses *pretreatment* dan hidrolisis merupakan tahapan sangat penting yang dapat mempengaruhi perolehan *yield* hidrogen (Iranmahboob dkk., 2002) dan (Singh, 2014)

Proses *pretreatment* pada bahan lignoselulosa dilakukan untuk membuka struktur lignoselulosa agar selulosa menjadi lebih mudah diakses oleh enzim yang memecah polimer polisakrida menjadi bentuk monomer sehingga mengurangi penggunaan enzim dan menekan biaya operasi (Dashtban dkk, 2009). Proses *pretreatment* dapat dilakukan dengan cara konvensional yaitu menggunakan asam dan dapat juga dengan metode sub/superkritis. Penggunaan asam pada *pretreatment* dapat menurunkan kadar hemiselulosa lebih tinggi dari pada menggunakan basa. Namun penggunaan asam ini kurang efektif karena tidak menurunkan kadar lignin secara signifikan, selain itu penggunaan asam ini menghasilkan limbah yang beracun. Sedangkan metode subkritis memiliki keuntungan sebagai reaksi pelarut yang ramah lingkungan, tidak beracun, tidak mudah terbakar, ekonomis, tidak mudah meledak, mudah dalam penggunaan dan pengoperasiannya (Park dkk,2012 dan Prado dkk, 2014a)

Meskipun *yield* gula yang diperoleh dengan metode air subkritis sekitar 9-13% lebih rendah dari metode asam dan penggunaan enzimnya 33% lebih tinggi dari metode asam, namun yang menjadi keunggulan dari teknologi air subkritis adalah tidak digunakannya asam dan basa selama proses *pretreatment* sehingga tidak meninggalkan limbah beracun (King dkk., 2012).

Penelitian yang dilakukan oleh Zhang dan Wu (2014) menunjukkan kadar glukosa sebelum *pretreatment* 37,2% meningkat menjadi 54,1% setelah *pretreatment*, kadar xilan dari 24,6% berkurang menjadi 1,8% setelah *pretreatment*. Setelah hidrolisis enzimatis kadar glukosa berkurang menjadi 3,5%

dan xilan berkurang 0,2%. Hal ini dikarenakan selulosa dan hemiselulosa terdegradasi selama hidrolisis enzimatik.

Terdegradasinya selulosa dan hemiselulosa selama proses enzimatik menjadi monomer-monomer glukosa merupakan acuan dalam produksi hidrogen. Untuk memudahkan proses degradasi sebelumnya dilakukan proses pretreatment dengan metode subkritis sehingga jumlah enzim yang digunakan sedikit, yield glukosa lebih banyak dan efisiensi biaya. Selain memperhatikan proses pretreatment dan enzimatik hal yang juga harus diperhatikan adalah pemilihan bahan yang akan digunakan dalam produksi hidrogen. Bahan yang digunakan tentunya yang berbahan lignoselulosa, mudah didapat, dan tergolong dalam biomass.

Dalam kurun waktu terakhir ini beberapa penelitian masih menggunakan bagas tebu, daging kelapa, ijuk sawit, dan biji anggur sebagai bahan untuk produksi hidrogen. Sedangkan penelitian mengenai sabut kelapa yang juga merupakan bahan lignoselulosa untuk produksi hidrogen belum dilakukan. Oleh karena itu penelitian dilakukan dengan menggunakan limbah sabut kelapa sebagai bahan untuk produksi hidrogen. Tahapan yang dilakukan dalam penelitian ini meliputi *pretreatment* menggunakan metode air subkritis untuk mengubah susunan kristalin pada bahan lignoselulosa menjadi lebih amorf. Analisa yang digunakan dalam metode ini meliputi SEM dan XRD. Tahapan selanjutnya proses enzimatik untuk mendegradasi lignoselulosa menjadi monomer-monomer gula reduksi. Untuk menentukan kadar dari gula reduksi ini dilakukan analisa dengan HPLC. Tahap terakhir yaitu fermentasi dengan menggunakan bakteri *Enterobacter aerogenes*. Untuk menghitung yield yang dihasilkan dalam proses fermentasi ini dilakukan analisa GC.

1.2 Perumusan Masalah

Dari uraian latar belakang diatas dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut:

1. Bahan lignoselulosa yang terdapat pada tumbuhan dan limbah pertanian tersedia sangat melimpah di Indonesia terutama kelapa. Kelapa dapat memberikan limbah sabut kelapa yang sangat besar dan belum optimal

pemanfaatannya padahal mengandung selulosa dan hemiselulosa yang tinggi, sehingga dapat dimanfaatkan untuk menghasilkan hidrogen

2. Metode *pretreatment* lignoselulosa dengan teknik konvensional menggunakan asam memiliki kelemahan karena asam sangat sulit didaur ulang sehingga mencemari lingkungan, oleh karena itu dipilih metode yang ramah lingkungan seperti metode subkritis yang menggunakan air sebagai pelarut sehingga tidak menghasilkan limbah yang beracun
3. Yield gula reduksi dari konversi lignoselulosa yang didapatkan dari *pretreatment* subkritis belum maksimal sehingga diperlukan tahapan lebih lanjut yaitu hidrolisis enzimatis sehingga didapatkan yield gula reduksi maksimal yang akan memberikan pengaruh pada yield hidrogen yang akan didapatkan.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah:

1. Mendegradasi sabut kelapa sebagai bahan berlignoselulosa menjadi gula reduksi dengan *pretreatment* air subkritis
2. Meningkatkan yield gula reduksi hasil *pretreatment* subkritis dengan hidrolisis enzimatis
3. Memproduksi hidrogen dari yield gula reduksi yang terbaik dengan metode fermentasi

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui kegunaan lain dari sabut kelapa yang selama ini hanya dianggap sebagai limbah pertanian.
2. Mengoptimalkan pemanfaatan sabut kelapa menjadi hidrogen.
3. Sebagai salah satu cara untuk membuat bahan baku pembuatan sumber energi terbarukan dan ramah lingkungan.
4. Memberikan informasi tentang produksi hidrogen secara fermentasi.

Halaman ini sengaja dikosongkan

BAB II

KAJIAN PUSTAKA DAN DASAR TEORI

2.1 Sabut Kelapa (Coconut Husk)

Secara umum, kelapa terdiri atas tiga jenis, yaitu kelapa dalam, kelapa genjah, dan kelapa hibrida. Ketiga jenis kelapa ini berbeda saat mulai berbuah, jumlah produksi buah, dan komposisi kimia buah. Faktor yang sangat mempengaruhi mutu bahan baku hasil samping kelapa adalah komposisi kimia buah. Kelapa dalam kandungan selulosa, pentosa, lignin, dan arang, pada tempurung serta sabut lebih tinggi dari pada kelapa genjah dan hibrida, sedangkan kelapa genjah dan hibrida kadar abunya yang lebih tinggi. Kondisi ini menyebabkan untuk industri arang dan serat sabut mutu buah kelapa dalam lebih baik dibandingkan dengan buah kelapa genjah dan hibrida. Untuk industri air kelapa ke tiga jenis kelapa ini tidak jauh berbeda (Mahmud dan Ferry, 2005).

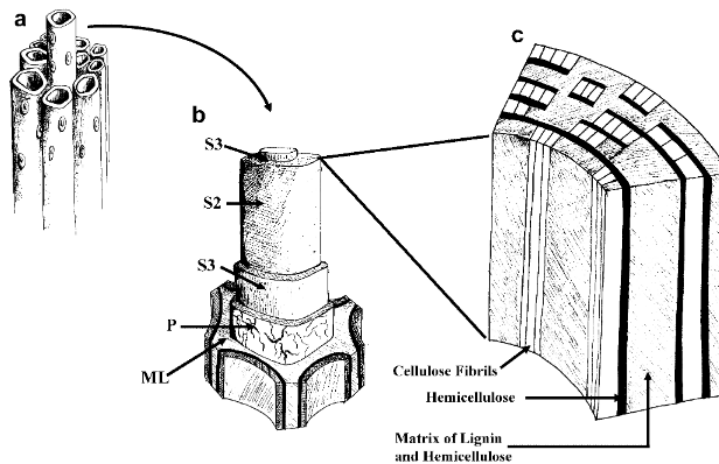
Sabut kelapa seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.1 merupakan bagian terluar buah kelapa yang membungkus tempurung kelapa. Ketebalan sabut kelapa berkisar 5-6 cm yang terdiri atas lapisan terluar (exocarpium) dan lapisan dalam (endocarpium). Endocarpium mengandung serat-serat halus yang dapat digunakan sebagai bahan pembuat tali, karung, pulp, karpas, sikat, keset, isolator panas dan suara, filter, bahan pengisi jok kursi/mobil dan papan hardboard. Satu butir buah kelapa menghasilkan 0,4 kg sabut yang mengandung 30% serat (Rindengan dkk, 1995). Produk primer dari pengolahan sabut kelapa terdiri atas serat (serat panjang), bristle (serat halus dan pendek), dan debu sabut. Kandungan dari sabut kelapa terdiri dari 22 % selulosa, 10% hemiselulosa, 47% lignin, 12% air (*moisture*), 1,5% abu dan 7,5% ekstrak (Bilba, dkk., 2007). Kandungan selulosa dari sabut kelapa cukup tinggi sehingga sabut kelapa berpotensi untuk memproduksi glukosa melalui proses hidrolisis.



Gambar 2.1. Sabut Kelapa

2.2 Lignoselulosa

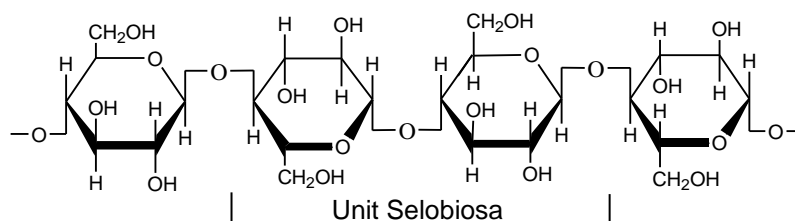
Lignoselulosa merupakan komponen utama dari biomassa. Lignoselulosa di alam berasal dari rumput, limbah pertanian, limbah hutan, limbah perkotaan dan berasal dari kayu seperti ditunjukkan pada Gambar 2.2. Lignoselulosa terdiri dari tiga jenis polimer yaitu selulosa, hemiselulosa, dan lignin. Selulosa dan hemiselulosa adalah makromolekul dari gula yang berbeda sedangkan lignin adalah polimer aromatik yang disintesis dari prekursor fenilpropanoid. Komposisi dan persentase polimer ini bervariasi dari satu spesies tanaman yang lain. Komposisi dalam tanaman tunggal bervariasi sesuai usia, tahap pertumbuhan, dan kondisi lain (Perez dkk, 2002).



Gambar 2.2 Konfigurasi dari kayu tissue

Menurut Saha dkk, 2005 bahan lignoselulosa tersusun 35-50% selulosa, 20-35% hemiselulosa, dan 10-25% lignin. Komponen ini merupakan sumber utama untuk menghasilkan produk bernilai tinggi seperti gula dari hasil fermentasi, bahan kimia, bahan bakar cair, sumber karbon dan energi.

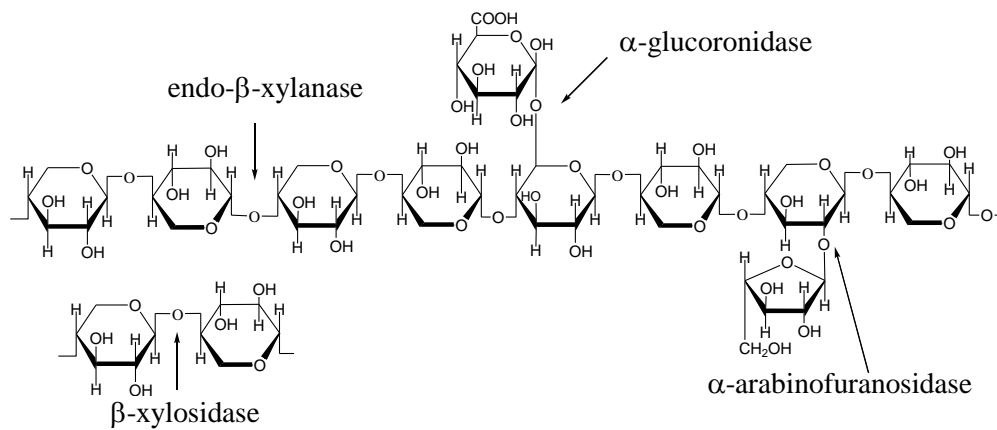
Selulosa (C₆H₁₀O₅)_n merupakan komponen utama lignoselulosa berupa mikrofibril-mikrofibril homopolisakarida dan merupakan biopolimer linier dari molekul anhidroglukopiranososa pada ikatan β-1,4 glukosidik yang berlimpah di alam (Dashtban dkk, 2009). Struktur selulosa (Gambar 2.3) secara umum berbentuk teratur (kristalin), tetapi ada juga bagian-bagian yang berbentuk tidak teratur (amorf). Tingkat kekristalan selulosa mempengaruhi kemampuan hidrolisis baik melalui teknik konvensional maupun secara enzimatik (Toor dkk., 2011).



Gambar 2.3 Struktur Molekul Selulosa

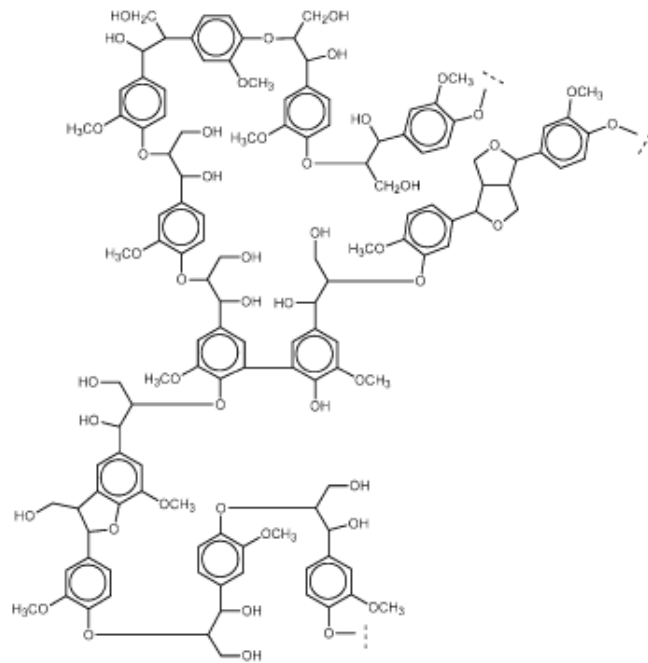
Hemiselulosa dikenal juga dengan poliosa, karena terdiri atas berbagai macam gula monomer, yaitu pentose (ksilosa, rhamnosa, dan arabinosa); heksosa (glukosa, manosa, dan galaktosa); dan asam uronik (4-*O*- metilglukoronik, D-glukoronik, dan D-galaktoronik) (Ibrahim, 1998). Komponen utama hemiselulosa kayu lunak adalah glukomanan sedangkan komponen utama hemiselulosa kayu keras adalah xilan, xilan terikat pada selulosa, pektin, lignin dan polisakarida lainnya untuk membentuk dinding sel tanaman. Jumlah xilan di alam sangat besar dimana merupakan jumlah terbesar kedua setelah selulosa (Subramariyan dan Prema, 2002)

Hemiselulosa seperti pada Gambar 2.4 memiliki rantai polimer yang pendek dan tidak berbentuk, sehingga sebagian besar dapat larut dalam air. Oleh karena itu, hemiselulosa relatif mudah dihidrolisis oleh asam menjadi monomer-monomernya (Girio dkk., 2010)



Gambar 2.4 Struktur Molekul Hemiselulosa

Lignin adalah heteropolimer amorf yang terdiri dari tiga unit fenilpropan (p-coumaryl coniferil dan sinapyl alkohol) yang terikat dengan ikatan yang berbeda seperti yang terlihat pada Gambar 2.5. Fungsi utama lignin adalah memperkuat struktur tanaman dalam menahan terhadap serangan mikroba dan tekanan oksidasi (Hendriks dan Zeeman, 2009). Lignin sulit didegradasi karena mempunyai struktur yang kompleks dan heterogen yang berikatan dengan selulosa dan hemiselulosa (Howard dkk, 2003). Lignin dengan menggunakan metode hidrolisis lignin pada kondisi suhu yang rendah ($\pm 100^{\circ}\text{C}$) dapat terurai menjadi *methoxy phenols*. Selain itu lignin dapat dioksidasi oleh larutan alkali dan mudah larut dalam larutan sulfid dalam keadaan biasa (Octavia, 2011).

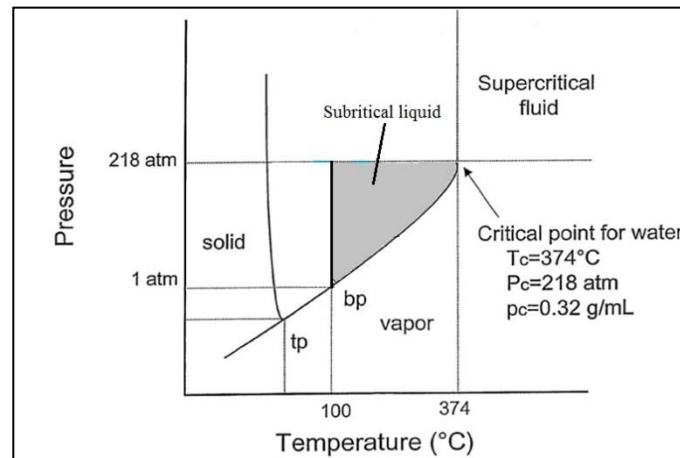


Gambar 2.5 Struktur Molekul Lignin

2.3. Proses Pretreatment Lignoselulosa dengan Metode Air Subkritis

2.3.1 Metode Air Subkritis

Rekayasa air dengan perubahan tekanan dan suhu dikenal juga dengan subkritis dan superkritis air seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.6 Subkritis air merupakan air yang berada pada suhu antara ke titik didih kritis atau dekat dengan titik kritis yaitu $100\text{-}374^{\circ}\text{C}$ (Prado, 2014) sedangkan superkritis air merupakan air yang dikondisikan pada suhu diatas 374°C dan tekanan diatas 218 atm.



Gambar 2.6. Diagram Fase Air pada bidang P-T

Air adalah molekul polar membentuk ikatan –H antar molekul dan mempunyai solubilitas rendah pada sebagian besar bahan organik. Ketika air dipanaskan, ikatan –H mulai melemah sehingga terjadi disosiasi air menjadi:

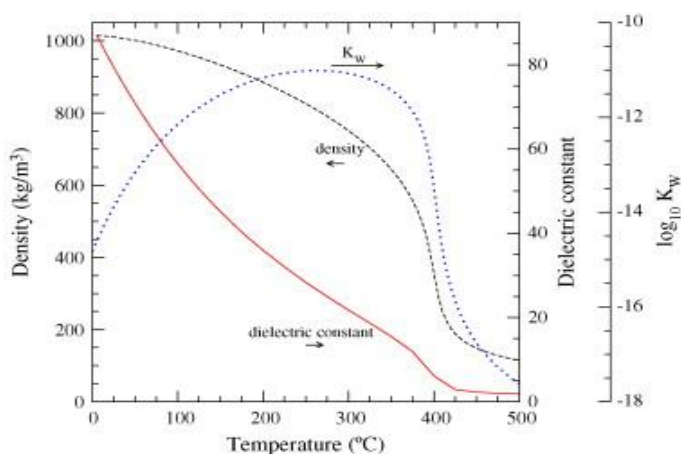


Perubahan tekanan dan suhu pada air dapat mengubah viskositas, kerapatan, konstanta dielektrik dan konstanta ionik pada air. Pada kondisi subkritis kepolaran air berkurang dan lebih menyerupai senyawa-senyawa organik seperti etanol dan metanol. Kelarutan molekul organik mengalami kenaikan secara drastis pada air karena pada kondisi tersebut air tidak lagi bersifat netral namun berperan sebagai prekursor katalis yang berbasis asam maupun basa. Keadaan ini menjadikan kegunaan air semakin luas disebabkan sifat asam dan basa yang semakin kuat sehingga air berperan sebagai katalisator, degradator, oksidator (Arai, 2002).

Konstanta ionisasi dari air (K_w) sangat tinggi pada daerah subkritis 10^{-12} (1 bar keadaan normal 10^{-14}), hal ini menunjukkan bahwa banyak reaksi asam basa yang terjadi dan bertindak sebagai katalis (Toor dkk., 2011). Ketika campuran cairan dan gas pada kondisi kesetimbangan dipanaskan, menyebabkan ekspansi termal, cairan akan menjadi kurang rapat. Pada saat yang sama, gas akan menjadi lebih rapat ketika tekanan dinaikkan, dan pada titik kritis kerapatan menjadi identik. Pada titik transisi, sifat fisik fasa cair dan gas merupakan sifat

kombinasi yang memungkinkan keadaan ini sangat cocok untuk proses-proses yang baru seperti degradasi bahan-bahan polimer yang tidak mungkin dilakukan oleh substansi dalam keadaan normal (Wen dkk, 2009).

Konstanta dielektrik merupakan sifat yang akan mempengaruhi efek polaritas dan sifat medium sebagai katalis asam atau basa. Konstanta dielektrik berbanding terbalik dengan suhu. Semakin meningkat suhunya maka semakin kecil nilai konstanta dielektriknya. Pada suhu 25⁰C nilai konstanta dielektriknya 80 dan pada suhu 250⁰C menjadi 27 seperti pada Gambar 2.7. Begitu juga dengan densitasnya menurun seiring dengan peningkatan suhu. Pada densitas yang rendah, air subkritis adalah pelarut yang buruk bagi senyawa-senyawa polar tetapi menjadi pelarut yang baik bagi senyawa-senyawa non polar dan gas.



Gambar 2.7 Hubungan Suhu terhadap K erapatan, Konstanta Dielektrik dan Ionisasi Air pada Tekanan 30 Mpa (Peterson dkk., 2008)

Menurut Toor dkk (2011) kerapatan air pada subkritis terletak antara kerapatan normal dan kerapatan superkritis, sehingga dapat dilakukan proses gasifikasi bahan-bahan biomass, seperti selulosa dan bahan organik karena ion H⁺ dan OH⁻ beraksi secara radikal menghasilkan gas. Ion H⁺ bertindak sebagai pengdegradasi lignin dan OH⁻ sebagai pengdegradasi hemiselulosa pada proses hidrolisis lignoselulosa menjadi gula.

2.3.2 Teknologi Subkritis dalam Degradasi Lignoselulosa

Fluida subkritis dan superkritis secara intensif dimulai sejak tahun 1980. Pada awalnya dikembangkan CO₂ pada kondisi superkritis untuk keperluan

ekstraksi, dan selanjutnya pemanfaatan kondisi operasi air subkritis hingga superkritis mulai dikembangkan untuk keperluan degradasi limbah yang dapat menguraikan bahan beracun dan bahan organik lain menjadi lebih cepat (Broll dkk., 1999).

Beberapa aplikasi fluida superkritis antara lain ekstraksi kafein, kolestrol dari makanan, nikotin dari rokok, aseton dari antibiotik, bahan organik dari air, pemindahan monomer, oligomer dari fraksinasi polimer, fraksinasi polimer dan pemisahan (Perry dkk., 1999)

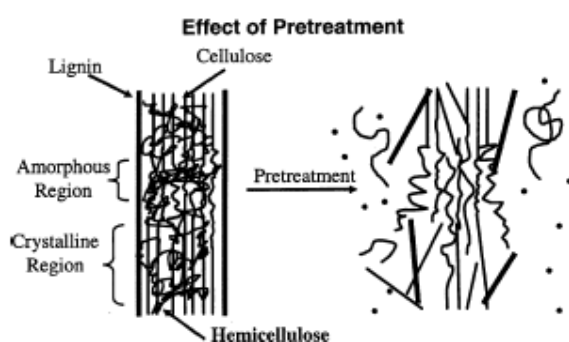
Perbandingan antara teknologi konvensional dan teknologi superkritis yaitu teknologi superkritis memiliki keunggulan, seperti proses yang cepat dan tanpa katalis serta ramah lingkungan (Wen D., dkk., 2009). Karena operasi dalam keadaan temperatur dan tekanan tinggi, metode subkritis memerlukan bahan khusus tentunya memerlukan biaya desain dan konstruksi lebih besar dari pada metode konvensional. Studi kinetika secara detail tentang konversi selulosa pada kondisi air sub dan superkritis telah dilakukan pada tekanan 25 Mpa dengan waktu konversi pendek dari 0,02 sampai 13,1 detik. Model reaksi bertujuan untuk memverifikasi mekanisme reaksi yang terjadi dan kemudian menemukan model laju reaksi pada kondisi sub dan superkritis (Sasaki dkk., 2004).

Publikasi mengenai produksi gula langsung dari proses degradasi lignoselulosa pada kondisi sub dan superkritis telah banyak dilaporkan. Wang dkk (2012) menghidrolisis selulosa dengan teknik campuran etanol/air pada subkritis dimana gula yang dihasilkan kemudian diproses menjadi etanol. Hasil gula dicapai 98,22% pada kondisi fraksi mol etanol 0,22, temperatur 260°C, tekanan 5,75Mpa, waktu reaksi 35 detik. Dari pengukuran indeks Kristal turun dari 0,618 menjadi 0,211

Yield gula reduksi yang didapat dengan menggunakan metode subkritis dengan kondisi operasi 208 dan 257 °C dengan tekanan 20Mpa selama 30 menit yaitu 11,7%/100 gram sabut kelapa; 6,4%/100 gram defatted grape seed dan 11,9%/100 gram palm fiber. (Prado dkk, 2014b). Sebelumnya Prado dkk (2014a) mendapatkan yield gula reduksi 23%/100 gram bagas tebu dengan menggunakan metode subkritis pada 208 dan 257°C pada tekanan 20 Mpa selama 30 menit.

Teknik kombinasi teknik air subkritis dan superkritis yaitu pertama bahan lignoselulosa didegradasi pada kondisi superkritis dengan suhu optimum 384⁰C dan waktu reaksi 19 detik menghasilkan oligosakarida sebesar 20 mg/2,5 mL air untuk kedua substrat limbah jagung dan gandum. Setelah itu dilanjutkan hidrolisis pada kondisi subkritis untuk menghasilkan gula. Diperoleh gula hexose untuk limbah jagung sebesar 27,4% pada 280⁰C selama 27 detik, sedangkan gandum sebesar 6,7% pada pada 280⁰C selama 54 detik (Zhao dkk., 2009)

Salah satu kombinasi yang sering dilakukan yaitu penggunaan enzim. Kemampuan enzim menghidrolisis bahan lignoselulosa dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya kandungan lignin dan hemiselulosa dan tingkat kekristalan selulosa. Oleh karena itu *pretreatment* diperlukan untuk mengubah struktur dan komposisi kimia dari lignoselulosa untuk memfasilitasi kecepatan dan efisiensi hidrolisis karbohidrat menjadi gula fermentasi dengan menurunkan tingkat kekristalan selulosa sehingga meningkatkan fraksi amorph selulosa, serta meningkatkan porositas material (Mosier dkk, 2005; Sanchez dan Cardona, 2008; Zhu dkk., 2008; Hsu dkk., 2010) seperti ditunjukkan pada Gambar 2.8. *Pretreatment* juga harus bisa meningkatkan kemampuan pembentukan gula selama proses hidrolisis, menghalangi terbentuknya inhibitor pada hidrolisis berikutnya dan selama proses fermentasi, menghalangi kehilangan karbohidrat dan biaya yang efektif (Sun dan Cheng, 2005; Kumar dan Wyman, 2009).



Gambar 2.8 Skema Proses *Pretreatment* (Hsu, dkk., 1980)

2.4 Enzim

Enzim merupakan senyawa protein yang dapat mengkatalisis seluruh reaksi kimia dalam sistem biologi. Aktivitas katalitiknya bergantung kepada

integritas strukturnya sebagai protein. Enzim dapat mempercepat reaksi biologis, dari reaksi yang sederhana, sampai ke reaksi yang sangat rumit. Enzim bekerja dengan cara menempel pada permukaan molekul zat-zat yang bereaksi sehingga mempercepat proses reaksi. Enzim mengikat molekul substrat membentuk kompleks enzim substrat yang bersifat sementara dan lalu terurai membentuk enzim bebas (Lehninger, 1982)

Enzim memiliki keunggulan sifat, antara lain mempunyai aktivitas yang tinggi, efektif, spesifik dan ramah lingkungan (Lidya dan Djenar, 2000), sedangkan menurut (Saktiwansyah, 2001), enzim memiliki sifat yang khas, yaitu sangat aktif walaupun konsentrasinya amat rendah, sangat selektif dan bekerja pada kondisi yang tidak ekstrim, yaitu tanpa temperatur atau tekanan tinggi dan tanpa logam yang umumnya beracun. Hal inilah yang menyebabkan reaksi yang dikatalisis secara enzimatik menjadi lebih efisien dibandingkan dengan reaksi yang dikatalisis oleh katalis kimia (August, 2000)

Mekanisme reaksi kerja enzimatik mempunyai beberapa tahapan, yaitu: (1). Permukaan dari substrat melakukan kontak dengan suatu daerah spesifik pada permukaan molekul enzim yang disebut tempat aktif. (2). Terjadi pembentukan senyawa antara yang bersifat sementara disebut paduan enzim-substrat (*enzyme-substrat complex*). (3). Molekul substrat ditransformasi dengan penyusunan kembali atom-atom, pemutusan molekul substrat, kombinasi dengan molekul substrat lainnya. (4). Molekul substrat yang telah ditransformasi menghasilkan produk yang dilepaskan dari molekul enzim karena tidak ada lagi kesesuaian dengan tempat aktif dari enzim. (5). Enzim yang tidak mengalami perubahan menjadi bebas untuk bereaksi dengan molekul substrat lainnya (Tortora dkk., 2007). Mekanisme satu reaksi enzim-substrat dapat ditulis sebagai (Le James 1992):



Beberapa faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim, diantaranya suhu, pH, konsentrasi substrat dan enzim, aktivator dan inhibitor. Enzim dapat bekerja dalam dengan berbagai cara yaitu: menurunkan energi aktivasi dengan menciptakan suatu lingkungan yang mana keadaan transisi terstabilisasi; menurunkan energi keadaan transisi tanpa mengubah bentuk substrat dengan menciptakan lingkungan yang memiliki distribusi muatan yang berlawanan dengan menyediakan lintasan reaksi alternatif; menurunkan perubahan entropi reaksi dengan membawa substrat pada orientasi yang tepat untuk bereaksi (Campbell, 2010)

2.4.1 Enzim Selulase

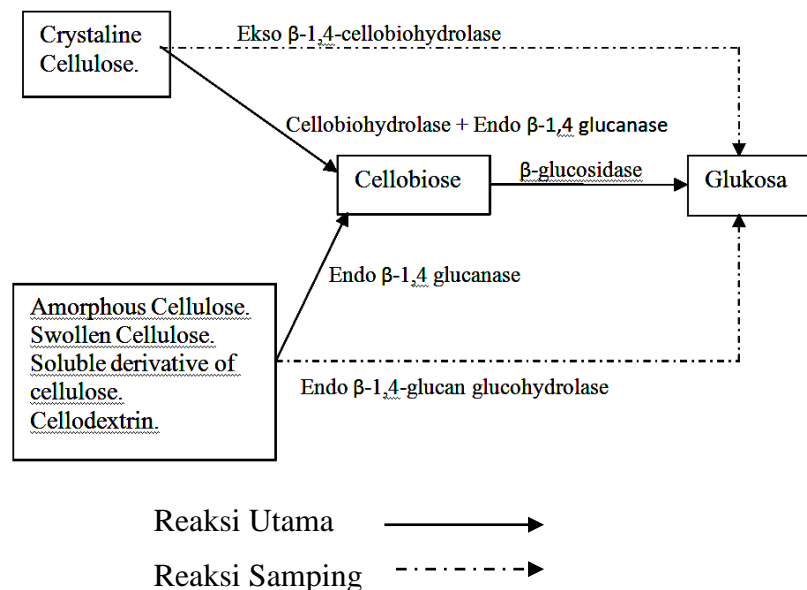
Selulase adalah enzim kompleks yang memotong secara bertahap rantai selulosa menjadi glukosa (Gerhartz, 1990). Tiga komponen yang telah teridentifikasi dalam enzim selulase adalah endoglukanase (endo- β -1,4-D-glukan-4-glukanohidrolase, E.C. 3.2.1.4) yang memecah ikatan β -1,4 pada rantai selulosa secara acak, eksoglukanase (β -1,4-D-glukan-selobiohidrolase, E.C. 3.2.1.91) yang memecahkan satuan selobiosa dari ujung rantai dan β -glukosidase (E.C. 3.2.1.21) menjadi glukosa (Dahot dan Noomrio, 1996)

Enzim selulase dapat mengubah selulosa tak tersubstitusi menjadi selobiosa yang kemudian dihidrolisis lebih lanjut dengan β -glukosidase (Alexander dkk, 1992). Pemutusan ikatan ini akan menghasilkan oligosakarida turunan selulosa, yang akhirnya diubah menjadi monomer glukosa (Chaplin, 1994). Nama sistematik dari selulase adalah β -1,4-D-glukan-glukano hidrolase (Pigman dan Hirton, 1970). Hidrolisis selulosa menjadi glukosa secara konsisten melewati dua tahap penting dalam sistem enzimatik, yaitu pemecahan ikatan glukosidik pada selulosa menjadi selobiosa oleh β -1,4-glukanase dan pemecahan ikatan β -1,4-glukosidik pada selobiosa menjadi glukosa oleh β -glukosidase (Fox, 1991).

Selulase dapat diproduksi oleh jamur, bakteri, dan tumbuhan. Salah satu mikroorganisme utama yang dapat memproduksi selulase adalah jamur. Jamur berfilamen seperti *Trichoderma* dan *Aspergillus* adalah penghasil enzim selulase dan *crude enzyme* secara komersial (Ul-Haq dkk., 2005). *T.reesei* menghasilkan endoglukanase dan eksoglukanase sampai 80% tetapi β -glukosidasenya lebih

rendah sehingga produk utama hidrolisisnya bukan glukosa melainkan selobiosa yang merupakan inhibitor kuat terhadap endoglukanase dan eksoglukanase (Ahmed dan Vermette, 2008; Martins dkk, 2008). *Aspergillus niger* menghasilkan β -glukosidase tinggi akan tetapi endo- β -1, 4-glukanase dan ekso β -1,4 glukanasanya rendah (Juhasz dkk, 2003). Oleh karena itu perlu adanya penambahan β -glukosidase dari luar untuk mempercepat konversi selobiosa menjadi glukosa dengan cara mengkombinasikan enzim selulase dari *T.reesei* dan *A.niger*.

Enzim selulase yang berasal dari gabungan mikrofungi *T.reesei* dan *A.niger* memiliki kemampuan yang tinggi didalam memecahkan ikatan pada struktur selulosa sehingga mampu menghasilkan glukosa yang lebih tinggi seperti pada Gambar 2.9 (Kodri dan Rini, 2013).



Gambar 2.9 Skema Hidrolisis Selulosa oleh Sistem Enzim Selulase (Bailey and Ollis, 1986)

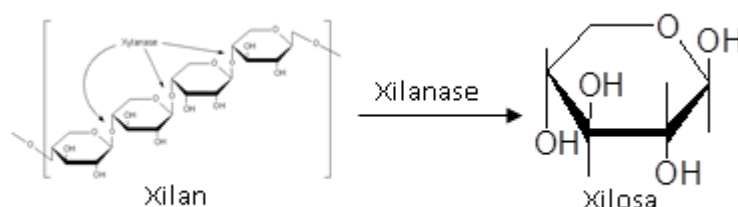
2.4.2 Enzim Xilanase

Xilanase merupakan kelompok enzim yang memiliki kemampuan untuk menghidrolisis hemiselulosa, dalam hal ini yaitu xilan atau polimer dari xilosa dan xilo-oligosakarida. Xilanase dapat diklasifikasikan berdasarkan substrat yang

dihidrolisis yaitu β -xilosidase, eksoxilase, dan endoxilase (Muljana, dkk., 2013).

β -xilosidase mampu menghidrolisis xilo-oligosakarida rantai pendek menjadi xilosa. Aktivitas enzim akan menurun dengan meningkatnya rantai xilo-oligosakarida. Xilosa juga merupakan inhibitor bagi enzim β -xilosidase. Eksoxilase mampu memutus rantai polimer xilosa (xilan) pada ujung reduksi, sehingga menghasilkan xilosa dan sejumlah oligosakarida rantai pendek. Selain itu eksoxilase dapat mengandung sedikit aktivitas transferase sehingga potensial dalam industri penghasil xilosa. Sedangkan endoxilase mampu memutus ikatan β ,1-4 pada bagian dalam rantai xilan secara teratur. Ikatan yang putus ditentukan berdasarkan panjang rantai substrat, derajat percabangan, ada atau tidaknya gugus substitusi dan pola pemutusan dari enzim hidrolase tersebut (Richana, 2002).

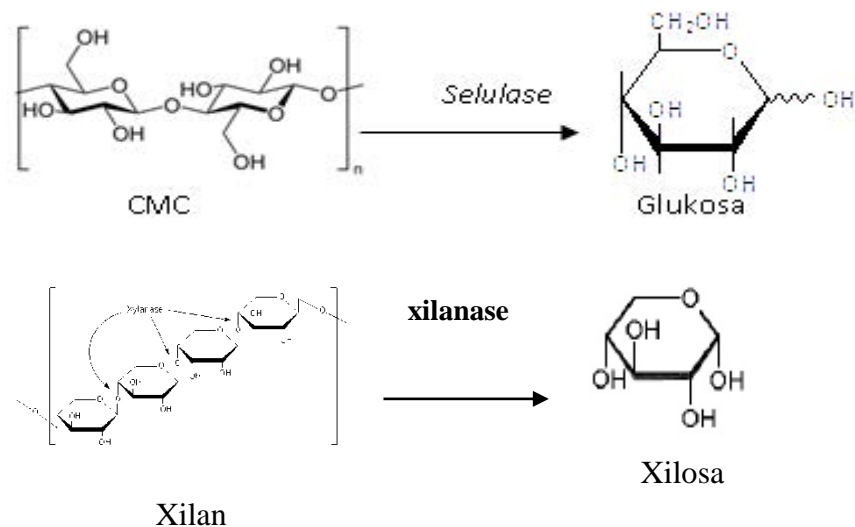
Pada Gambar 2.10 merupakan struktur polimer xilan dan pemotongannya oleh aktifitas enzim xilanase. Sejumlah mikroorganisme yang dapat menghasilkan enzim xilanase seperti: *A. niger*, *Bacillus*, *Cryptococcus*, *Penicillium*, *Aureobasidium*, *Fusarium*, *Rhizomucor*, *Humicola*.



Gambar 2.10 Struktur Polimer Xilan dan Pemotongannya oleh Aktifitas Enzim Xilanase

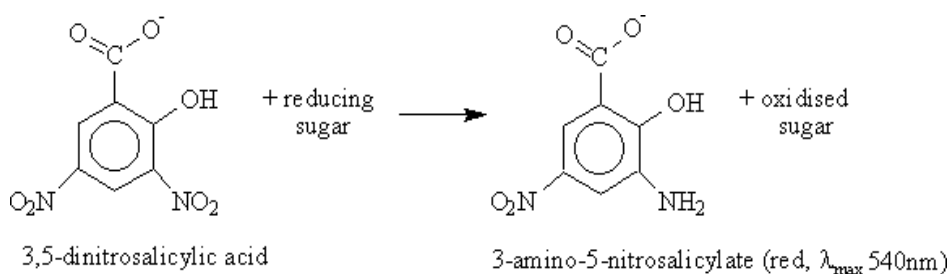
2.4.3 Pengukuran Aktifitas Enzim

Aktifitas enzim selulase dan xilanase dapat diuji dengan menggunakan larutan DNS (*dinitrosalicylic acid*) dan penambahan CMC (*carboxymetil cellulose*) untuk enzim selulase dan penambahan xilan untuk enzim xilanase. Gambar 2.11 merupakan reaksi pembentukan glukosa yang terjadi setelah penambahan CMC. Sedangkan enzim xilanase, setelah ditambahkan dengan xilan akan membentuk xilosa (Indriati, 2012).



Gambar 2.11 Reaksi CMC Menjadi Glukosa dan Xilan menjadi Xilosa dalam Pengukuran Aktifitas Enzim

Reaksi pembentukan glukosa dan xilosa dihentikan dengan penambahan DNS. Ketika DNS bercampur dengan gula reduksi (glukosa ataupun xilosa), maka akan dihasilkan warna merah, yang ditunjukkan pada Gambar 2.12. Selanjutnya akan diukur dengan menggunakan spektrofotometri dengan panjang gelombang 540 nm sehingga didapatkan nilai aktivitas enzim. Satu unit aktivitas enzim selulase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang memproduksi 1 μmol glukosa per menit (Indriati, 2012).

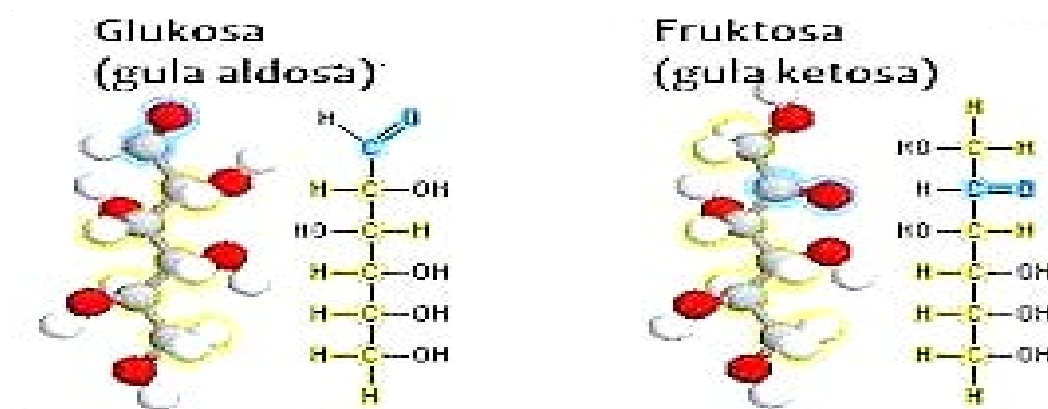


Gambar 2.12 Reaksi DNS dan Glukosa Menjadi Zat Warna Merah

2.5 Gula Reduksi

Gula reduksi merupakan gula yang dapat dioksidasi oleh zat pengoksidasi lembut seperti reagensia Tollens, suatu larutan basa dari $\text{Ag}(\text{NH}_3)_3$ (Fessenden dan Fessenden, 1986). Sifat mereduksi pada gula reduksi disebabkan adanya

gugus hidroksi yang bebas dan reaktif (Lehninger, 1982). Gugus hidroksi yaitu aldehyd pada glukosa dan keton pada fruktosa seperti pada Gambar 2.13



Gambar 2.13 Glukosa (gugus aldehyd) dan Fruktosa (gugus keton)

Pada tumbuhan gula reduksi adalah gula sisa hasil fotosintesis yang disimpan dalam jaringan. Gula reduksi yang dihasilkan dari fotosintesis digunakan pada aktivitas fisiologis tumbuhan seperti misalnya pada proses membuka-menutupnya stomata dalam rangka menjaga turgor sel agar tetap seimbang.

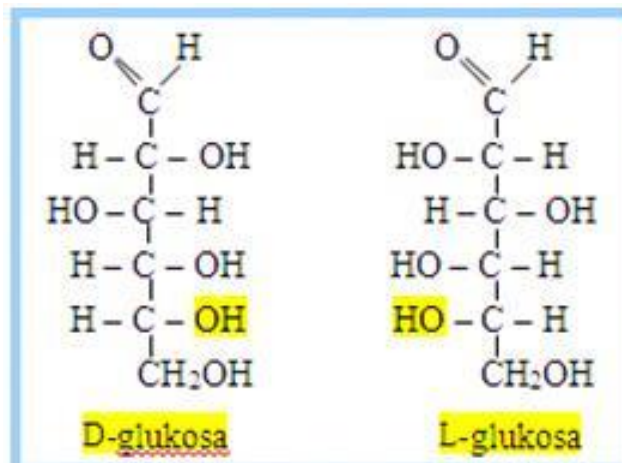
Contoh gula reduksi adalah glukosa, fruktosa, gliseraldehyda dan galaktosa. Sedangkan gula non reduksi contohnya adalah sukrosa.

2.5.1 Glukosa

Glukosa adalah salah satu monosakarida sederhana yang mempunyai rumus molekul $C_6H_{12}O_6$ dengan berat molekul 180,18 gram/mol. Glukosa di alam dapat dihasilkan dari reaksi antara karbondioksida dan air dengan bantuan sinar matahari dan klorofil dalam daun yang disebut juga dengan proses fotosintesis. Glukosa yang terbentuk digunakan untuk pembentukan amilum atau selulosa.



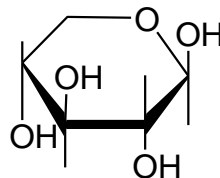
Molekul glukosa dapat dibedakan berdasarkan bentuknya menjadi 2 jenis yaitu molekul D-Glukosa dan L-Glukosa. Posisi gugus hidrogen (-H) dan alkohol (-OH) dalam struktur molekulnya yang membedakan antara D-Glukosa dan L-Glukosa seperti pada Gambar 2.14 Glukosa yang berada dalam bentuk molekul D & L-Glukosa dapat dimanfaatkan oleh sistim tumbuh-tumbuhan, sedangkan sistim tubuh manusia hanya dapat memanfaatkan D-Glukosa.



Gambar 2.14 struktur D-glukosa dan L-glukosa

2.5.2 Xilosa

Xilosa adalah monosakarida tipe aldopentosa yang memiliki lima atom carbon dan satu gugus aldehid dan merupakan salah satu penyusun utama dari hemiselulosa. Xilosa diisolasi dari bahan berlignoselulosa dengan proses hidrolisa asam atau enzim. Xilosa banyak ditemukan di material-material berkayu baik kayu keras maupun kayu lunak dengan bentuk asklis $\text{HOCH}_2(\text{CH}(\text{OH}))_3\text{CHO}$. Xilosa dapat dimanfaatkan menjadi hidrogen dengan proses fermentasi menggunakan *Enterobacter alcaligenes*.



Gambar 2.15 Struktur Molekul Xilosa

2.6 Hidrogen

Hidrogen merupakan unsur paling melimpah di alam semesta, dan nomor tiga terbanyak di permukaan bumi. Tetapi gas hidrogen murni hampir tidak ada di permukaan bumi, karena gas hidrogen bereaksi dengan unsur lain membentuk persenyawaan yang lebih stabil.

Hidrogen adalah bahan kimia non logam, tidak berwarna, tidak berbau, bervalensi tunggal, dan merupakan gas diatomik yang paling ringan. Hidrogen merupakan salah satu bahan bakar yang ramah lingkungan dan juga dapat menggantikan bahan bakar fosil sebagai penyedia energi di masa datang karena

pembakaran hidrogen memperkecil resiko terjadinya pemanasan global dan memperbaiki kualitas udara (Chen dkk, 2006). Dibandingkan dengan bahan bakar fosil seperti bensin atau solar, hidrogen dapat menghasilkan energi yang jauh lebih besar. 1 pound bensin yang dibakar pada suhu 25°C dan tekanan 1 atmosfer akan menghasilkan panas antara 19.000 Btu (44,5 kJ/g) s/d 20.360 Btu (47,5 kJ/g), sedangkan 1 pound solar bisa menghasilkan panas antara 18.250/lb (42,5 kJ/g) s/d 19,240 Btu (44,8kJ/g). Pada keadaan yang sama, 1 pound hidrogen bisa menghasilkan panas 51.500 Btu/lb (119,93 kJ/g) sampai 61.000 Btu (141,86 kJ/g) yang berarti hampir 3 kali lipat dari panas yang bisa dihasilkan oleh pembakaran bensin dan solar (Wan W, 2010). Berikut perbandingan sifat dari hidrogen dan gasoline dapat dilihat pada Tabel 2.1

Tabel 2.1 Sifat- Sifat Hidrogen dan Bensin sebagai Bahan Bakar

Sifat	Hidrogen	Gasoline (Bensin)
Rumus Kimia	H ₂	C ₄ -C ₁₂
Berat Molekul	2,02	100-105200
Komposisi, %berat		
Karbon		85-88
Hidrogen	100	12-15
Oksigen		0
Specific Gravity, 60°F/60°F	0,0696	0,72-0,78
Densitas, lb/gal @60°F	0.00523	6-6,5
Titik Didih, °F	-423	80-437
Titik Beku, °F	-434,6	-40
Viscositas, lb/ft-sec	5,92 E-6	0,5-0,6
Flash point, closed cup, °F	<-423	2,486 E-4 – 2,957 E-4
Specific Heat, Btu/lb °F	3,42	0,48

Sumber: U.S.DOE, 2011

Hidrogen sangat penting dalam reaksi asam basa yang mana banyak reaksi ini melibatkan pertukaran proton antar molekul terlarut. Oleh karena hidrogen merupakan satu-satunya atom netral yang persamaan Schrödingernya dapat diselesaikan secara analitik, kajian pada energetika dan ikatan atom hidrogen memainkan peran yang sangat penting dalam perkembangan mekanika kuantum. Menurut Ramadhan dan Hendrawan, (2013) beberapa metode untuk mendapatkan hidrogen, dapat di lihat pada Tabel 2.2

Tabel 2.2 Beberapa Metode untuk Mendapatkan Hidrogen

Metode	Keterangan
<i>Electolysis</i>	Memisahkan air menjadi hidrogen dan oksigen
<i>Reforming</i>	Memisahkan hidrogen dari gas/cairan hidrokarbon
<i>Gasification & purification</i>	Gasifikasi bahan organik dan plastik ke dalam gas sintesis
<i>Anaerobic Digestion</i>	Konversi hidrokarbon secara biologis (bakteri) dengan adanya oksigen
<i>Fermentation</i>	Konversi hidrokarbon secara biologis dengan menggunakan jamur atau bakteri
<i>Algae</i>	Beberapa alga menghasilkan alga sebagai hasil Metabolisme

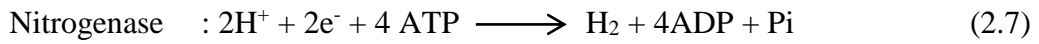
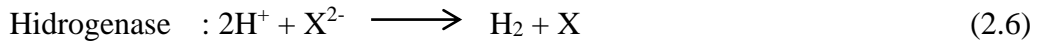
2.7 Produksi Hidrogen Dengan Proses Fermentasi

Hidrogen dapat diproduksi dengan teknologi yang lebih murah dan mudah, yaitu dengan memanfaatkan organisme bakteri melalui proses fermentasi atau foto produksi, untuk merombak substrat organik (limbah dan nonlimbah) menjadi energi H₂. Keunggulan dari biohidrogen antara lain: dapat diperbarui (*renewable energi*) dan ramah lingkungan (*green energi*), hasil samping tidak menimbulkan efek rumah kaca, hujan asam, dan penipisan lapisan ozon pembakarannya berupa uap air sehingga, proses produksi dapat berlangsung pada tekanan dan suhu normal, biaya produksi lebih rendah dibandingkan dengan cara fisik dan kimia, dan dapat memanfaatkan limbah dan sampah organik sebagai substrat fermentasi (Mahyudin,2010).

Jenis bakteri yang sering digunakan dalam produksi hidrogen dengan menggunakan teknik fermentasi seperti *Clostridium*, *Escherichia coli*, *Enterobacter alcaligene*, *Lactobacillus*, *Rhodobium*, *Rhodopedomonas*, *Rhodobacter*, atau *Rhodospirillum* (Anam K., 2010).

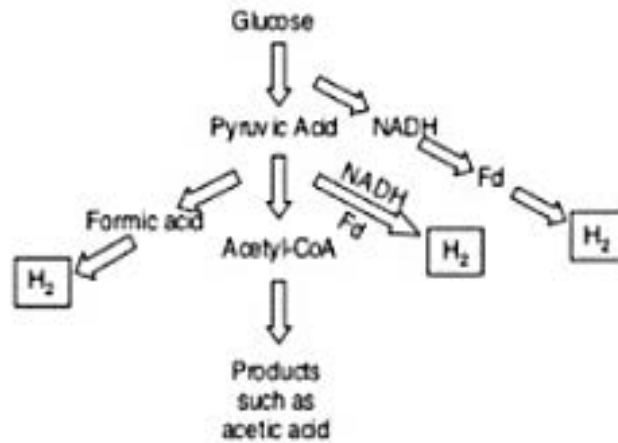
Bakteri fermentasi (bakteri hidrolitik dan fermentasi) akan menghidrolisis polimer menjadi oligomer terlarut dan monomer-monomer melalui enzim ekstraseluler. Kemudian, produk yang dihasilkan akan digunakan oleh bakteri dan difermentasikan membentuk asetat dan rantai pendek asam lemak, alkohol, hidrogen, dan karbon dioksida yang dikeluarkan ke lingkungan (Angelidaki dkk., 2002)

Bakteri penghasil hidrogen diklasifikasikan menjadi 2 jenis oleh perbedaan dalam reaksi enzim. Salah satunya adalah bakteri dengan hidrogenase, dan yang lainnya dengan nitrogenase seperti pada reaksi dibawah ini:



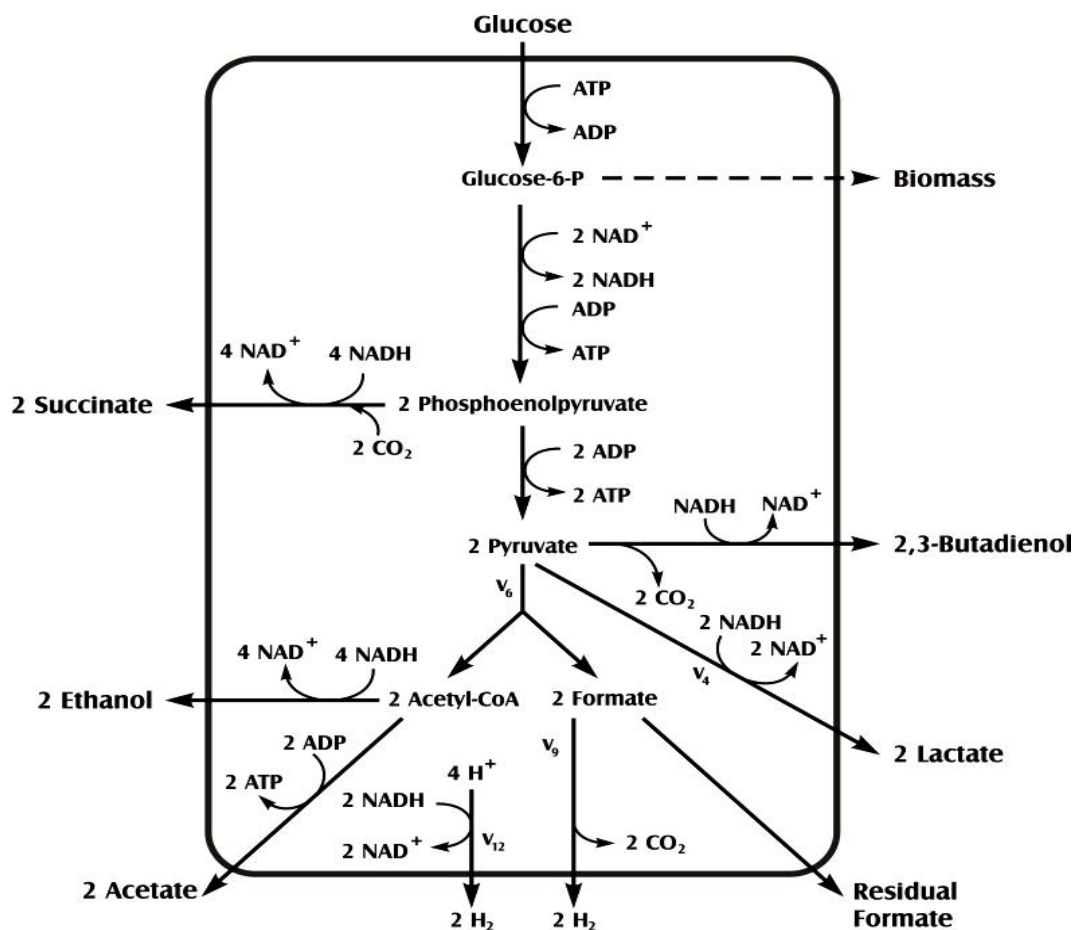
X: pembawa elektron, Pi: Fosfat anorganik

Jalur fermentasi hidrogen seperti pada Gambar 2.16 memperlihatkan bahwa hidrogen terbentuk dari hidrogenase baik melalui NADH dan ferredoxin, melalui ferredoxin saja, atau melalui format-liase. Dalam proses fermentasi hidrogen, hidrogen diproduksi dari dekomposisi oksidatif dari substrat organik.



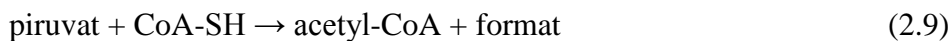
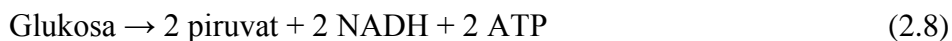
Gambar 2.16 Lajur Fermentasi hidrogen

Produksi hidrogen secara anaerobik lebih mudah dibandingkan dengan metode fermentasi fotosintesis karena penerapan dan perancangan reaktornya lebih mudah. Satu mol substrat glukosa pada kondisi anaerobik dikonversi menjadi 2 mol piruvat, 2 mol adenosin trifosfat (ATP) dan 2 mol nikotinamida adenine dinukleotida reduksi (NADH) berdasarkan alur glikolisis Embden-Meyerhoff seperti diperlihatkan pada Gambar 2.17

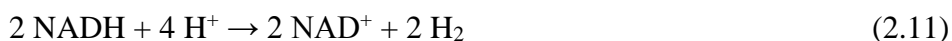


Gambar 2.17 Skema Reaksi Produksi Hidrogen oleh *E. Aeorgenes*
(Lu, dkk., 2011)

Secara sederhana persamaan reaksi pada Gambar 2.16 dapat dituliskan sebagai berikut



Hidrogen dihasilkan melalui jalur format dan jalur NADH berdasarkan reaksi:



NADH adalah koenzim yang berfungsi sebagai pembawa elektron dan ATP adalah sumber energi yang diproduksi selama proses metabolisme.

2.8 Penelitian Terdahulu

Beberapa penelitian yang berkaitan dan mendasari dari rencana penelitian ini yaitu:

1. Ju dkk., pada tahun 2011 melakukan penelitian dengan *pretreatment* alkali dan air subkritis pada kelarutan gula reduksi, dengan menggunakan bagas tebu sebagai substratnya, menentukan kelarutan asam fenolik dan kadar gula netral pada fraksi *liquid*. Kondisi operasi berlangsung pada temperatur 120- 180°C dan tekanan 13 bar. Semakin tinggi molaritas NaOH dan temperatur subkritis semakin tinggi konsentrasi gula yang terlarut. Pada 4M NaOH dan reaktor subkritis pada temperatur 180°C, konsentrasi glukosa masing-masing $0,34 \times 10^{-6}$ g/mL dan $0,45 \times 10^{-6}$ g/mL.
2. Ciftci D dan Marleny D, pada tahun 2015 melakukan penelitian dengan *pretreatment* subkritis air dengan bahan baku sweet blue. Kondisi operasi pada tekanan 50-200 bar, temperature 160 – 200°C, flow rate 2- 10 mL/min, dan pH 2-12. Yield gula hemiselulosa tertinggi 85.5 % pada kondisi operasi 180°C, 50 bar, flow rate 5 mL/min pada pH 6.2. Treatment subkritis air merupakan teknologi yang menjanjikan untuk mendegradasi gula hemiselulosa dari biomass.
3. Pardo dkk., pada tahun 2014 melakukan penelitian dengan menghidrolisis bagas tebu menggunakan metode subkritis air. Kinetik hidrolisis ditentukan dengan reaktor semi *batch* dengan variasi massa substrat (2 dan 11 gram), flow rate (11,22, 33, 44 dan 55 ml/min) dan temperatur (213, 215 dan 290°C) pada tekanan konstan (20 MPa). *Yield* maksimum monosakarida+celobiosa+celotriosa sebesar 5,6% pada temperatur 213°C dan 33 mL/min dan sekitar 60% gula yang diperoleh dalam bentuk oligomer.
4. Anwar N, 2012 melakukan penelitian dengan tujuan untuk memproduksi hidrogen dari jerami padi. Pretreatment awal menggunakan basa NaOH 2% dan 4 %. Pretreatment selanjutnya yaitu hidrolisis enzimatik menggunakan campuran enzim dari *T.Reesei* dan *A.niger*. Campuran

enzim ini lebih baik bila dibandingkan dengan menggunakan enzim tunggal. Yield hidrogen tertinggi 0,356 mol H₂/ mol gula reduksi pada konsentrasi awal 16,7 g/L dan pada suhu 30⁰C.

5. Yusnica S, 2014 melakukan penelitian untuk memproduksi hidrogen dari bagas tebu dengan menggunakan kombinasi pretreatment basa (NaOH) selama 16 jam pada suhu 80⁰C dan pretreatment ionik liquid [DMIM]DMP pada rentang suhu 100-120⁰C selama rentang waktu 10 menit-15 jam. Yield gula reduksi terbaik sebesar 0,556 gr gula reduksi/gr total selulosa dan hemiselulosa yang didapat pada pretreatment NaOH selama 16 jam dan *Ionik liquid* pada suhu 120⁰C selama 20 menit. Yield hidrogen dari hasil fermentasi gula reduksi terbaik yaitu 0,463/mol gula reduksi terkonsumsi.

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Teknologi Biokimia, Teknik Kimia Fakultas Teknik Industri Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya pada bulan September 2015 – Juli 2016.

3.2 Bahan dan Skema Peralatan Penelitian

3.2.1 Bahan Penelitian

Bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah sabut kelapa (120 mesh), *Potato Dextrose Agar* (Merck, Germany), akuades, Asam Sitrat, CMC *Carboxymetil Cellulose* (Sigma, USA), Sodium Sitrat, Sodium metilsulfit, Sodium potassium tartrate, DNS (Sigma. India), bakteri *Enterobacter Aeoregenes*, Gas Nitrogen, Gas CO₂, H₂SO₄ 97-95%, glukosa (Merck), enzim Selulase dan Xilanase dari *A. Niger* (Sigma, USA), NaOH (Merck), FeSO₄.7H₂O (Merck), dan Xylan from Oat Spelts (Sigma-Aldrich, Germany)

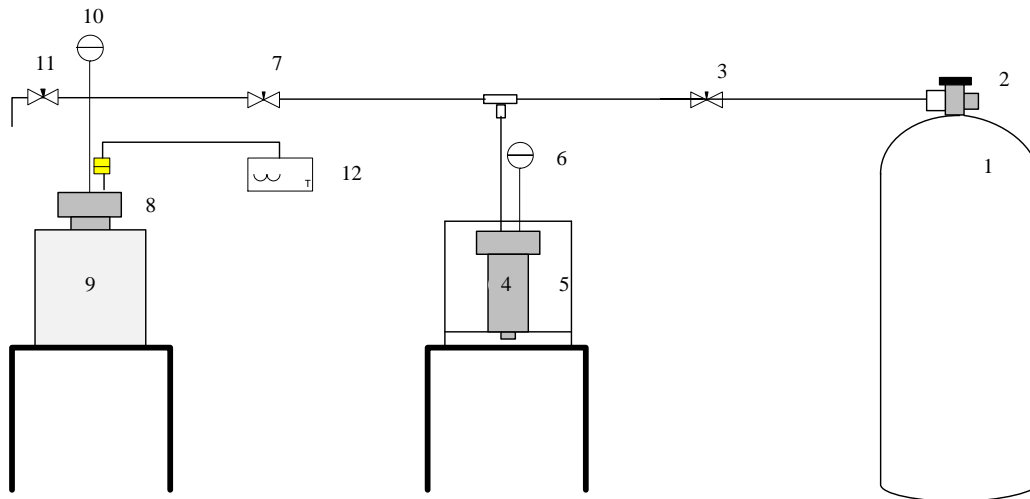
3.2.2. Alat Penelitian

Alat yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah *Analytical balance* (Ohaus), rangkaian alat air subkritis, *Hot plate & stirrer* (Snijders), Oven (VWR Scientific), *Vortex* (VM-300), *Vacuum pump* (Weich), *Spectrophotometer* (Cecil, England), *sentrifuge* digital (Hermle Labortechnik, Germany), *Incubator* (Incucell), GC-2010 plus (Shimadzu, Jepang), dan *Furnance Lin High Therm* (VMK 135 Germany).

3.2.3 Skema Peralatan Air Subkritis

Peralatan air subkritis di konstruksi sendiri dengan menggunakan komponen *Swagelok*. Desain peralatan diadaptasi dari jurnal yang telah dilakukan dari penelitian Ju dkk (2011). Alat ini terdiri atas reaktor subkritis yang terbuat dari stainless stell, tabung karbondioksida (CO₂) bertekanan tinggi, valve pengatur tekanan, pemanas, pengontrol temperatur (PID), dan pengukur tekanan. Pada prinsipnya ada tiga bagian dari peralatan ini, yaitu reaktor subkritis, pemanas dan alat pengontrol. Termokopel dan sensor tekanan dihubungkan dengan reaktor dan

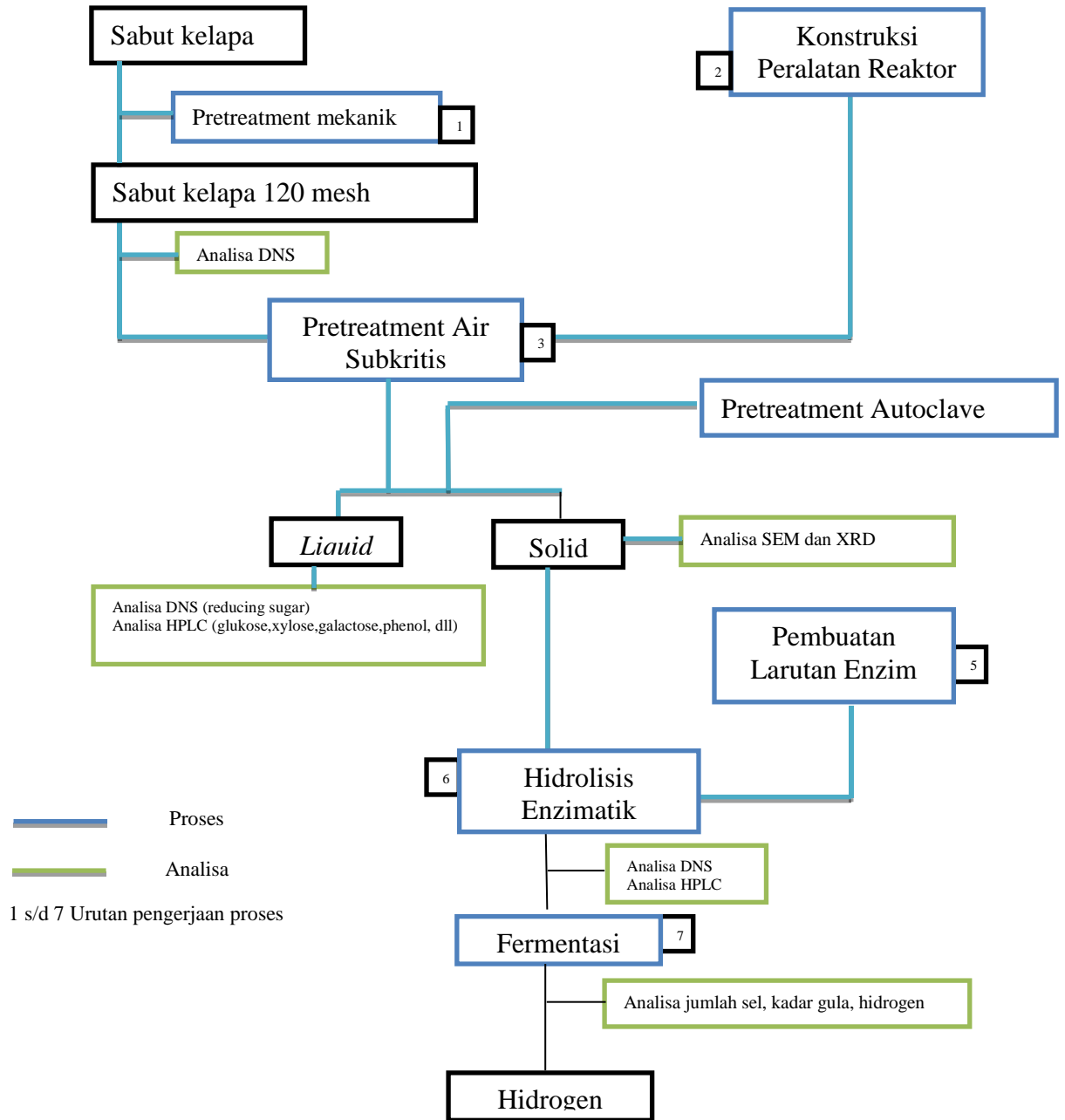
terkait dengan alat pengontrol. Proses akan dijalankan dalam cara *batch* dan ditekan dengan karbondioksida (CO₂). Rangkaian alatnya ditunjukkan pada Gambar 3.1



Gambar 3.1 Rangkaian Peralatan Air Subkritis

- | | | | | |
|-------------|-------------|------------------------------|-------|-----------------------------|
| Keterangan: | 1 | = Tabung gas CO ₂ | 6, 10 | = <i>Pressure Indicator</i> |
| | 2, 3, 7, 11 | = Valve Tekanan | 8 | = Reaktor pemanas |
| | 4 | = Reaktor pendingan | 9 | = <i>Heater</i> |
| | 5 | = <i>Cooler bag</i> | 12 | = Termokopel |

3.3 Diagram Alir Penelitian



3.4 Variabel Penelitian

Variabel tekanan dan suhu yang digunakan dapat dilihat dari Tabel dibawah ini:

Tabel 3.1 Variabel *Pretreatment* air subkritis

P (bar)	T (°C)			
40	120	130	140	150
80	150	160	180	200
160	200	220	260	300

Tabel 3.2 Variabel *Pretreatment* Autoclave

P (bar)	T (°C)	Waktu (Menit)			
1	121	15	30	45	60

3.5 Tahapan Metode Penelitian

3.5.1 *Pretreatment* Sabut kelapa

3.5.1.1 *Pretreatment* Mekanik (Douglas, 1988)

Sabut kelapa sebagai bahan baku yang diperoleh dari limbah hasil pertanian di kota Manado, dikeringkan dibawah sinar matahari selama 2 hari. Kemudian sampel tersebut digiling dengan menggunakan mesin penggiling. Selanjutnya sampel yang sudah berupa butiran-butiran dimasukkan kedalam oven selama 24 jam pada suhu 60 °C dan diayak dengan menggunakan *screener* berukuran 120 mesh.

3.5.1.2 *Pretreatment* dengan Metode Air Subkritis

Prosedur eksperimen dan analisis mengikuti dan diadaptasi dari penelitian sebelumnya yang telah dilaporkan Ju dkk (2011). Massa 6 gram sabut kelapa kering dicampur dengan 120 mL akuades. Karbondioksida disuplai ke reaktor dengan tekanan: 20, 40 dan 80 bar. Sesuai dengan variabel yang ditunjukkan pada Tabel 3.1. Waktu reaksi untuk masing- masing variabel dalam reaktor subkritis selama 60 menit. Data yang akan diperoleh adalah *yield* gula sebagai fungsi temperatur pada kondisi isobar, masing-masing 20, 40 dan 80 bar.

Setelah reaksi selesai, reaktor didinginkan sampai 30°C dan diturunkan tekanannya dengan cara membuka valve otomatis untuk mengeluarkan gas karbondioksida. Campuran terdiri dari padatan dan larutan, kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring, dan padatan yang diperoleh dikeringkan sampai berat konstan. Padatan yang diperoleh akan dianalisis XRD dan SEM untuk mempelajari struktur kristal dan morfologi dari padatan, sedangkan larutan dianalisis dengan DNS (*dinitrosalicylic acid*) dan HPLC untuk mendapatkan konsentrasi gula xylosa, glukosa, arabinosa, galaktosa, manosa, rhamnosa dan asam uronik serta asam-asam *phenolik* (*p-cumaric acid*, *ferulic*, *vanillin*, *syringic acid*, *5-hydroxymethyl-furfural*, dan *p-hydroxybenzoic acid*) yang didegradasi dari lignin.

3.5.1.3 Pretreatment dengan Metode Autoclave

Sabut kelapa sebanyak 6 gram ditambahkan dengan 120 mL akuades selanjutnya di autoclave saat temperatur dan tekanan masing-masing 121°C dan 1 bar tercapai, waktu reaksi dijalankan sesuai dengan variabel yang ditentukan pada Tabel 3.2.

3.5.2 Analisa Kadar Hemiselulosa, Selulosa, dan Lignin dengan Metode Gravimetri

Metode gravimetrik digunakan untuk analisis komposisi kimia dari lignoselulosa dilakukan mengikuti referensi dari Datta dan Rathin (1981). Langkah-langkah analisa adalah sampel kering sebanyak 1 gram (berat a) ditambahkan 150 mL akuades dan direfluks pada suhu 100 °C dengan waterbath selama 1 jam. Kemudian hasilnya disaring dengan kertas saring, residu yang berada di kertas saring dicuci dengan air panas 300 mL. Residu kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 60 °C sampai beratnya konstan dan ditimbang (berat b). Kemudian residu ditambahkan 150 mL H₂SO₄ 1 N dan direfluks dengan waterbath selama 1 jam pada suhu 100 °C. Hasilnya kemudian disaring dan dicuci sampai netral (dengan air biasa sebanyak 300 mL) dan residunya dikeringkan hingga beratnya konstan dan ditimbang (berat c). Residu kering ditambahkan 10 mL H₂SO₄ 72% dan dibiarkan pada suhu kamar selama 4 jam. Kemudian ditambahkan 150 mL H₂SO₄ 1 N dan direfluks pada suhu 100 °C dengan waterbath selama 1 jam kemudian residu disaring dan dicuci dengan akuades

sampai netral. Setelah itu residu dipanaskan dengan oven pada suhu 60 °C sampai beratnya konstan dan ditimbang (berat d). Selanjutnya residu dipanaskan sampai suhu 600 °C pada tungku dan ditimbang (berat e). Cara perhitungan kadar selulosa, hemiselulosa dan kadar lignin menggunakan persamaan berikut ini:

$$\text{Kadar Selulosa} = \left[\frac{c-d}{a} \right] \times 100\%$$

$$\text{Kadar Hemiselulosa} = \left[\frac{b-c}{a} \right] \times 100\%$$

$$\text{Kadar Lignin} = \left[\frac{d-e}{a} \right] \times 100\%$$

3.5.3 Penyiapan dan Pengukuran Konsentrasi Gula Reduksi

3.5.3.1 Pembuatan Buffer Sitrat 0,1 M pH 5,5

Asam sitrat sebanyak 5,7 gram dimasukkan kedalam erlemeyer kemudian ditambahkan 20,67gram sodium sitrat. Larutan asam sitrat dan sodium sitrat ditambahkan dengan akuades hingga 1000 mL. pH larutan buffer diatur dengan menambah 0,1 M NaOH atau 0,1 M H₂SO₄ hingga pH larutan buffer menjadi 5,5.

3.5.3.2 Pembuatan Larutan Reagen DNS (*Asam Dinitrosalisilat*) (Widjaja,2009)

NaOH sebanyak 16 gram dilarutkan dengan akuades hingga volume 200 mL. Kemudian sodium potassium tartrate sebanyak 30 gram dan sodium metabisulfit sebanyak 8 gram dilarutkan dengan akuades sampai volume 500 mL. Sepuluh gram DNS dilarutkan menggunakan larutan NaOH sebanyak 200 mL. Kemudian larutan DNS ditambahkan kedalam larutan sodium potassium tartrate dan sodium metabisulfit, setelah itu dilarutkan sempurna dengan akuades hingga volume 1000 mL.

3.5.3.3 Pembuatan Kurva Standar Glukosa (Widjaja, 2009)

Larutan induk glukosa dibuat dengan cara, glukosa 0,367 gram ditambahkan 0,1 M buffer sitrat dengan pH 5,5 hingga 100 mL ke dalam labu ukur. Larutan induk glukosa diencerkan pada berbagai macam konsentrasi (0:5; 1:4; 2:3; 3:2; 4:1; 5:0) dengan larutan induk glukosa berturut-turut 0 mL, 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL dan 0,1 M buffer sitrat pH 5,5 sebanyak 5 mL, 4 mL, 3 mL, 2 mL, 1 mL, 0 mL. Selanjutnya sebanyak 0,2 mL dari tiap konsentrasi larutan diambil dan dimasukkan kedalam larutan standar glukosa dan

ditambahkan 1,8 mL akuades ke dalam tabung reaksi. Setelah itu diinkubasi pada temperatur 35°C selama 10 menit dan ditambahkan 3 mL DNS ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya campuran tersebut dihomogenkan dengan menggunakan vortex kemudian dipanaskan pada air mendidih selama 10 menit dan didinginkan dengan menggunakan air es selama 10 menit dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Kurva kalibrasi larutan standar glukosa dibuat dengan mengplot konsentrasi glukosa terhadap absorbansi.

3.5.3.4 Pembuatan Larutan Blanko (Widjaja, 2009)

Buffer sitrat 0,1 M dengan pH 5,5 sebanyak 2 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya diinkubasi selama 10 menit pada temperatur 35°C dan ditambahkan 3 mL DNS ke dalam tabung reaksi. Kemudian dipanaskan pada air mendidih selama 10 menit. Setelah itu didinginkan dengan menggunakan air es selama 10 menit dan diukur absorbansinya dengan panjang gelombang 540 nm.

3.5.3.5 Analisa Konsentrasi Glukosa dengan Metode DNS (Miller, 1959)

Sebanyak 0,2 mL *liquid* hasil hidrolisis SCW dan Autoclave dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 1,8 mL akuades. Setelah itu ditambahkan 3 mL larutan DNS dan dihomogenkan menggunakan vortex. Selanjutnya dipanaskan dengan air mendidih selama 10 menit dan didinginkan dengan air es selama 10 menit. Kemudian setelah temperatur larutan normal ($\pm 25^\circ\text{C}$), diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Larutan standarnya menggunakan 2 mL larutan buffer sitrat pH 5,5 yang akan diperlakukan sama seperti sampel hasil hidrolisis SCW.

3.5.4 Penyiapan dan Pembuatan Larutan Enzim Selulase dan Xilanase Murni

3.5.4.1 Pembuatan Buffer Sitrat 0,1 M pH 3

Asam sitrat sebanyak 14,87 gram dimasukkan ke erlemeyer kemudian ditambah 5,06 gram sodium sitrat. Selanjutnya asam sitrat dan sodium sitrat dilarutkan dengan akuades hingga 1000 mL. pH larutan buffer diatur dengan ditambah NaOH 0,1 M atau H₂SO₄ 0,1 M hingga pH larutan buffer menjadi 3.

3.5.4.2 Pembuatan Larutan Enzim Selulase dari *Aspergillus niger*

Enzim selulase murni sebanyak 1 gram dilarutkan dengan buffer sitrat pH 3 sampai volume tepat 100 mL dan dipastikan padatan enzim larut sempurna.

3.5.4.3 Pembuatan Larutan Enzim Xilanase dari *Trichoderma longibrachiatum*

Enzim xilanase murni sebanyak 1 gram dilarutkan dengan buffer sitrat pH 3 sampai volume tepat 100 mL dan dipastikan padatan enzim larut sempurna

3.5.5 Persiapan Uji Aktivitas

3.5.5.1 Pembuatan larutan CMC (*Carboxymetil Cellulose*) (Widjaja, 2009)

CMC (*Carboxymetil Cellulose*) ditimbang sebanyak 1 gram kemudian ditambahkan buffer sitrat dengan pH 5,5 hingga 100 mL dan diaduk dengan stirrer selama 16 jam.

3.5.5.2 Pembuatan Larutan Xilan

Xilan sebanyak 1 gram dilarutkan dalam 80 mL buffer sitrat pH 5,5 pada suhu 60 °C setelah mendidih larutan xilan didinginkan dan diaduk dengan menggunakan *magnetic stirrer* selama 12 jam. Setelah itu diencerkan dengan buffer sitrat hingga volume 100 mL.

3.5.5.3 Pembuatan Kurva Standar Glukosa Untuk Mengukur Keaktifan Enzim Selulase (Widjaja, 2009) :

Larutan induk glukosa dibuat dengan cara, glukosa 0,367 gram ditambahkan buffer sitrat 0,1 M dengan pH 5,5 hingga 100 mL ke dalam labu ukur. Larutan induk glukosa diencerkan pada berbagai macam konsentrasi (0:5; 1:4; 2:3; 3:2; 4:1; 5:0) dengan larutan induk glukosa berturut-turut 0 mL, 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL dan buffer sitrat 0,1 M pH 5,5 sebanyak 5 mL, 4 mL, 3 mL, 2 mL, 1 mL, 0 mL. Selanjutnya sebanyak 0,2 mL dari tiap konsentrasi larutan diambil dan dimasukkan kedalam larutan standar glukosa dan ditambahkan 1,8 mL CMC ke dalam tabung reaksi. Setelah itu diinkubasi pada suhu 35°C selama 10 menit dan ditambahkan 3 mL DNS ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya campuran tersebut dihomogenkan menggunakan vortex kemudian dipanaskan pada air mendidih selama 10 menit dan didinginkan dengan menggunakan air es selama 10 menit dan diukur absorbansinya dengan panjang gelombang 540 nm.

Kurva kalibrasi larutan standar glukosa dibuat dengan mengeplot konsentrasi glukosa terhadap absorbansi.

3.5.5.4 Pembuatan Kurva Standar Xilosa Untuk Mengukur Keaktifan Enzim Xilanase (Widjaja, 2009)

Xilosa ditimbang 0,367 gram dimasukkan kedalam labu ukur 100 mL, dan ditambahkan buffer sitrat 0,1 M dengan pH 5,5 hingga volume 100 mL. Larutan induk xilosa diencerkan pada berbagai macam konsentrasi (0:5; 1:4; 2:3; 3:2; 4:1; 5:0) menggunakan buffer sitrat 0,1 M pH 5,5. Selanjutnya 0,2 mL dari tiap konsentrasi larutan diambil dan dimasukkan ke dalam larutan standar xilosa dan ditambahkan 1,8 mL xilan ke dalam tabung reaksi. Kemudian diinkubasi pada suhu 35°C selama 10 menit dan ditambahkan 3 mL DNS ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya campuran tersebut dihomogenkan dengan menggunakan vortex, kemudian dipanaskan pada air mendidih selama 10 menit. Setelah itu didinginkan dengan menggunakan air es selama 10 menit dan diukur absorbansinya dengan panjang gelombang 540 nm. Kurva kalibrasi larutan standar glukosa dibuat dengan mengeplot konsentrasi glukosa terhadap absorbansi.

3.5.6 Uji Aktivitas Enzim

3.5.6.1 Uji Aktivitas Enzim Selulase Sebelum Koreksi (Widjaja, 2009)

Larutan enzim selulase sebanyak 0,2 mL dan larutan CMC sebanyak 1,8 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 35 °C. Kemudian ditambahkan 3 mL DNS ke dalam larutan dan dihomogenkan menggunakan vortex. Selanjutnya masing-masing tabung reaksi yang berisi larutan dipanaskan pada air mendidih selama 10 menit. Kemudian didinginkan pada air es selama 10 menit, diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm.

3.5.6.2 Uji Aktivitas Enzim Selulase Larutan Koreksi (Widjaja, 2009)

Larutan enzim selulase sebanyak 0,2 mL ditambahkan 3 mL DNS (*dinitrosalicylic acid*) dihomogenkan menggunakan vortex dan dipanaskan dalam air mendidih selama 2 menit. Kemudian ditambahkan 1,8 mL larutan selanjutnya masing-masing larutan dipanaskan kembali pada air mendidih selama 10 menit, lalu didinginkan pada air es selama 10 menit. Kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Perhitungan

aktivitas enzim dilakukan dengan cara menghitung selisih absorbansi larutan enzim selulase sebelum koreksi dan larutan koreksi enzim, kemudian nilainya dikalikan dengan slope kurva standar glukosa.

3.5.6.3 Uji Aktivitas Enzim Xilanase Sebelum Koreksi

Larutan enzim xilanase sebanyak 0,2 mL dan larutan xilan sebanyak 1,8 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 35 °C. Kemudian ditambahkan 3 mL DNS ke dalam larutan dan dihomogenkan dengan menggunakan vortex. Selanjutnya masing-masing tabung reaksi yang berisi larutan dipanaskan pada air mendidih selama 10 menit. Kemudian didinginkan pada air es selama 10 menit, diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm.

3.5.6.4 Uji Aktivitas Enzim Xilanase Larutan Koreksi

Larutan enzim xilanase sebanyak 0,2 mL ditambahkan DNS sebanyak 3 mL kemudian dihomogen dengan menggunakan vortex. Selanjutnya dipanaskan dalam air mendidih selama 2 menit. Kemudian ditambahkan 1,8 mL larutan xilan selanjutnya masing-masing larutan dipanaskan kembali pada air mendidih selama 10 menit, lalu didinginkan pada air es selama 10 menit. Kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Perhitungan aktivitas enzim dilakukan dengan cara menghitung selisih absorbansi larutan enzim xilanase sebelum koreksi dan larutan koreksi enzim, kemudian nilainya dikalikan dengan slope kurva standar glukosa.

3.5.7 Proses Hidrolisis Sabut kelapa

3.5.7.1 Hidrolisis Sabut kelapa dengan Enzim Selulase dan Enzim Xilanase

(Anwar, 2011)

Sebanyak 1 gram sabut kelapa yang sudah dilakukan *pretreatment* dengan metode air subkritis ditambahkan enzim campuran selulase dan xilanase dengan rasio enzim dengan substrat sebesar 18,6 U/1 gram sabut kelapa. Selanjutnya ditambahkan buffer sitrat 0,1 M pH 3 ke dalam larutan enzim dan sabut kelapa sampai 30 mL. Larutan dimasukkan ke dalam inkubator shaker pada suhu 60°C dan 125 rpm. Konsentrasi glukosa dianalisa dalam hidrolisat dengan metode DNS dalam setiap selang waktu tertentu selama 48 jam.

3.5.7.2 Analisa Konsentrasi Gula Reduksi dengan Metode DNS (Miller, 1959)

Sampel yang sedang di hidrolisis diambil 2 mL setiap selang waktu tertentu dan dimasukkan di microtube, kemudian disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 10000 rpm pada 4°C selama 10 menit untuk memisahkan endapan. Setelah disentrifugasi larutan diambil 0,2 mL dan ditambahkan 1,8 mL akuades ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 3 mL larutan DNS dan dihomogenkan dengan menggunakan vortex. Selanjutnya dipanaskan dengan air mendidih selama 10 menit dan didinginkan dengan air es selama 10 menit. Kemudian setelah suhu larutan normal ($\pm 25^{\circ}\text{C}$), absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Larutan standarnya menggunakan 2 mL larutan buffer sitrat pH 5,5 yang akan diperlakukan sama seperti sampel hidrolisat glukosa.

3.5.8 Penyiapan Dan Proses Frementasi

3.5.8.1 Persiapan Media Fermentasi

Hidrolisat sabut kelapa dimasukkan ke dalam erlenmeyer ditambahkan dengan *yeast extract* 0,5% w/v, kemudian di-*flushing* menggunakan N₂ selama 1 menit untuk menghilangkan kelebihan oksigen dalam media. Larutan dibagi ke dalam 2 botol, botol pertama untuk aklimatisasi diisi 10% dari botol kedua. Masing-masing larutan ditutup menggunakan karet yang terhubung dengan selang penghubung gas, lalu disterilisasi dalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit.

3.5.8.2 Proses Aklimatisasi

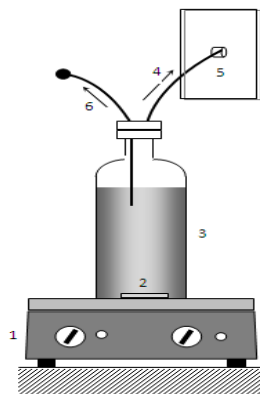
FeSO₄.7H₂O sebanyak 0,35 gr/L disterilkan menggunakan sinar UV di dalam *laminar flow* selama 15 menit lalu dimasukkan ke dalam botol pertama yang berisi 10% larutan hidrolisat glukosa. Kemudian menginokulasi bakteri *Enterobacter Aeoregenes* yang telah dibiakkan dalam PDA selama 1 hari, ke dalam larutan hidrolisat glukosa sebanyak 10 ose. Kemudian tabung ditutup kembali menggunakan karet yang dilengkapi dengan saluran ke hidrogen *bag*. Bakteri *E.Aerogenes* dikembangbiakkan pada suhu kamar selama 14 - 16 jam pada suhu 35°C dan 125 rpm atau sampai konsentrasi sel lebih besar dari 10 juta sel/mL.

3.5.8.3 Pembuatan Kurva Standar Jumlah Sel

Glukosa sebanyak 85,7 gr dilarutkan menggunakan buffer sitrat 0,1 M pH 5,5 hingga volume 1000 mL. Kemudian bakteri *E.aerogenes* diinokulasi ke dalam larutan glukosa dan dikocok menggunakan shaker. Setiap 2 jam diambil 2 sample dalam 2 microtube, salah satu sample microtube dihitung jumlah selnya, dan satu sampel disentrifuge. Endapan (sel) yang telah dipisahkan dari supernatan ditambahkan 5 mL akuades kemudian dihomogenkan dengan menggunakan vortex. Selanjutnya larutan sel diencerkan menggunakan buffer sitrat 0,1 M pH 5,5 hingga didapat 5 macam pengenceran yaitu 1:1 ; 1:2 ; 1:3; 1:4 ; 1:5. Masing - masing larutan hasil pengenceran diukur absorbansinya pada panjang gelombang 600 nm.

3.5.8.4 Proses Fermentasi

Botol pertama yang berisi biakan (aklimatisasi) yang telah berusia 14-16 jam ditambahkan ke botol kedua dan ditutup dengan karet yang dilengkapi dengan saluran (selang) yang dihubungkan dengan hidrogen *bag*. Karet penutup dilapisi dengan isolasi dan plastisin untuk mencegah kebocoran gas. Sebanyak 3 ml sampel diambil menggunakan jarum suntik steril setiap 6 jam sekali dan dilakukan analisa kadar glukosa menggunakan metode DNS, analisa jumlah sel menggunakan spektrofotometer, dan analisa kadar hidrogen dengan menggunakan GC.



Keterangan :

1. *Hot Plate Stirrer*
2. *Magnetik Stirrer*
3. Fermentor
4. Aliran Gas
5. Penampung Gas
6. Aliran Sampel

Gambar 3.3 Rangkaian Alat Proses Fermentasi Gula Reduksi Menjadi Hidrogen

3.6 Kondisi Operasi Penelitian

- a. Jenis Substrat : Sabut kelapa
- b. Jenis mikroorganismenya : *Enterobacter Aerogenes*
- c. Jenis Enzim : Campuran Enzim Murni Selulase dan Xilanase
- d. Konsentrasi enzim : 93 U/5 gram sampel
- e. Tekanan Operasi : 1 atm
- f. Volume cairan
 - Pretreatment* air subkritis : 120 mL
 - Hidrolisis : 30 mL
 - Fermentasi : 120 mL
- g. pH
 - persiapan enzim murni : 5,5
 - proses hidrolisis : 3
 - fermentasi : 7
- h. Suhu Operasi
 - Hidrolisis : 60 °C
 - Fermentasi : 37 °C
- i. Waktu
 - Pretreatment* Air Subkritis : 1 Jam
 - Hidrolisis : 48 Jam
 - Fermentasi : 48 Jam
- j. Analisa Gas Chromatograph**
 - Waktu Analisa : 6 menit
 - Volume inject : 0,2 mL
 - Conditioning GC sebagai berikut :
 - Suhu Pre TCD : 200 °C
 - Suhu SPL-1 : 40 °C
 - Suhu Column : 30°C
 - *Current* : 30 mA

- *Carrier Gas* : N₂
- *Pack Column* : *Molecular Seive 13X* (30 m x 0,53 mm ID
x 20 μm)
- *Injection mode* : Split
- *Column flow* : 1,77 mL/min
- *Linear velocity* : 15 cm/detik
- *Purge flow* : 3 mL/min

k. Analisa HPLC

- Pompa : Isocratic pump waters 1515
- Autosampler : Autosampler Waters 2707
- Detector : Refractive Index Detector Waters 2414
- Kolom : Aminex HPX87P (Biorad, CA)
- Resin Ionic From : Hydrogen
- Support : Sulfonate divinyl benzene-styrene
copolymer 8% cross linkage
- Suhu : 60°C
- Ukuran partikel : 9 micro-meter
- Mobile phase : H₂SO₄ 0,005 M
- Flow rate : 0,6 mL/min

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk memproduksi hidrogen dari sabut kelapa melalui 3 tahapan yaitu:

1. Proses pretreatment terdiri dari:
 - a. Pretreatment mekanik, yang bertujuan untuk memperbesar luas permukaan sabut kelapa agar memudahkan dalam proses hidrolisis
 - b. Pretreatment Subkritis, yang bertujuan untuk meningkatkan kemampuan area permukaan (porositas) selulosa sehingga dapat memudahkan akses enzim dalam menghidrolisis selulosa dan hemiselulosa menjadi gula reduksi
 - c. Pretreatment dengan autoclave, pada dasarnya memiliki tujuan yang sama dengan pretreatment subkritis namun dioperasikan dalam tekanan dan temperatur yang rendah dari subkritis.
2. Proses Hidrolisis enzimatik, yang bertujuan untuk menghidrolisis selulosa dan hemiselulosa menjadi gula reduksi
3. Proses fermentasi, yang bertujuan untuk mengkonversi gula reduksi menjadi gas hidrogen dengan menggunakan bakteri *Enterobacter aerogenes*

4.1 Pretreatment

4.1.1 Pretreatment Mekanik

Sabut kelapa dikeringkan dibawah sinar matahari selama ± 2 hari agar tidak ada pembusukan sehingga dapat bertahan dalam jangka waktu lama. Pengerinan juga memudahkan dalam proses penggilingan. Sabut kelapa yang dikeringkan kemudian digiling selanjutnya dikeringkan dalam oven pada temperatur 60°C . Hal ini dimaksudkan untuk menghambat pertumbuhan mikroba pada sabut kelapa yang digunakan.

Pada penelitian ini ukuran sabut kelapa yang digunakan adalah 120 mesh. Ukuran ini untuk memperbesar luas permukaan sehingga memudahkan mendegradasi selulosa dan hemiselulosa menjadi gula reduksi.

4.1.2 Pretreatment Subkritis

Pretreatment subkritis merupakan pretreatment yang ramah lingkungan karena menggunakan air sebagai pelarutnya. Pada proses subkritis, sifat fisika dan kimia air secara drastis mengalami perubahan seperti konstanta dielektrik, densitas menurun, dan konstanta ionisasinya meningkat seiring dengan meningkatnya temperatur. Pada kondisi ini air terurai menjadi H_3O^+ dan OH^- yang membuat air bisa digunakan sebagai pelarut organik sehingga mampu menghidrolisis sabut kelapa yang berlignoselulosa (Toro dkk, 2014).

Penelitian ini menggunakan subkritis air (SCW) pada tekanan 40, 80, dan 160 bar dengan variabel temperatur dari 120- 300°C dan direaksikan selama 60 menit. Pengaruh tekanan dan temperatur terhadap massa dan pH sabut kelapa selama proses subkritis (SCW) ditunjukkan pada Tabel 4.1

Tabel 4.1 Massa Sabut Kelapa Sebelum dan Sesudah Pretreatment SCW dengan Waktu Reaksi 60 Menit

Variabel			Massa Sabut Kelapa (gram)		pH	
No	Tekanan (bar)	Temperatur (°C)	Awal	Akhir	Awal	Akhir
I	40	120	6.0208	4.7903	7	5
II		130	6.0124	4.7042	7	5
III		140	6.003	4.5696	7	5
IV		150	6.0041	4.0653	7	5
V	80	150	6.0132	4.2076	7	5
VI		160	6.0282	3.9004	7	5
VII		180	6.0123	3.9266	7	5
VIII		200	6.0222	3.9157	7	5
IX	160	200	6.0113	3.749	7	5
X		220	6.015	3.4806	7	5
XI		260	6.0215	2.9159	7	5
XII		300	6.0136	2.6023	7	5

Dari Tabel 4.1 dapat dilihat massa setelah SCW cenderung berkurang dengan semakin meningkatnya temperatur dan tekanan. Massa yang berkurang disebabkan karena sebagian solid larut dalam air yang selama proses hidrolisis menjadi pelarut organik atau polar. Nilai pH pada air setelah SCW juga mengalami perubahan dimana pH dari 7 menjadi pH 5. Penurunan pH ini terjadi karena selama proses pretreatment SCW, sekitar 20-50% dari sabut kelapa terlarut

dan terbentuk senyawa-senyawa organik lain atau produk samping dari degradasi lignoselulosa yang bersifat asam seperti asam asetat, lactic, glycolic, dan formid seperti yang dilaporkan oleh Lu dan Saka (2010). Khuwijitjaru dkk (2012), dengan menggunakan pretreatment SCW dan bahan baku *coconut meal*, melaporkan bahwa terjadi penurunan nilai pH dari 6 ke 3 dengan meningkatnya temperatur dari 100- 200°C. Asam yang terbentuk selama pretreatment SCW ini membantu dalam reaksi hidrolisis.

4.1.3 Pretreatment Autoclave

Pretreatment dengan autoclave dilakukan pada kondisi operasi tekanan 1 atm dan temperatur 121 °C dengan variabel waktu reaksi 15–60 menit. Penggunaan autoclave ini sebagai alternatif pretreatment sabut kelapa untuk melihat pengaruh waktu reaksi terhadap konsentrasi gula reduksi yang akan diperoleh pada penelitian ini. Pada tahun 2014 Wu dkk, menggunakan autoclave dengan pelarut H₂SO₄ sebagai pretreatment awal sebelum hidrolisis enzimatik dengan sampel *Gracilaria sp.* Kondisi operasi pada temperatur 121°C dengan variabel waktu reaksi 0- 60 menit dan konsentrasi pelarut H₂SO₄ 0,1 N. Namun pada penelitian ini pelarut yang digunakan adalah air. Penggunaan pelarut ini sebagai salah satu alternatif untuk menghindari pencemaran lingkungan. Hasil pretreatment dengan menggunakan autoclave ditunjukkan pada Tabel 4.2

Tabel 4.2 Massa Sabut Kelapa Sebelum dan Sesudah Pretreatment Autoclave pada 121°C dan 1 bar

VARIABEL			Liquid		Massa Sabut Kelapa (gram)	
P (bar)	T (°C)	Waktu (Menit)	pH	Volume Akhir (mL)	Awal	Akhir
1	121	15	5	59	6.0890	5.0092
		30	5	56	6.0681	5.2893
		45	5	79	6.0075	4.9673
		60	5	61	6.0098	4.9198

Tabel 4.2 menunjukkan bahwa waktu reaksi juga sangat berpengaruh terhadap massa sabut kelapa setelah pretreatment. Semakin lama waktu reaksinya, massa sabut kelapa semakin berkurang. Hal ini disebabkan ikatan hidrogen dalam

air semakin lama semakin lemah sehingga terjadi disosiasi air yang menyebabkan air dapat melarutkan solid yang mengandung senyawa-senyawa organik.

Pada Tabel 4.2 dapat dilihat nilai pH mengalami perubahan dari pH 7 sebelum pretreatment menjadi pH 5 setelah pretreatment. Hal ini dikarenakan terdisosiasinya air menjadi menjadi H_3O^+ sehingga memberikan pengaruh nilai keasaman pada sabut kelapa setelah dipretreatment dengan autoclave.

4.2 Komposisi Lignoselulosa dari Sabut Kelapa Sebelum dan Sesudah SCW

Pada penelitian ini, penentuan komposisi hemiselulosa, selulosa, dan lignin mengikuti metode gravimetri yang dilakukan oleh Datta dan Rathin (1981). Hasil untuk sabut kelapa unpretreatment 15.31% hemiselulosa; 23.43% selulosa; 48,81% lignin dan 12,45% (abu, ekstrak dan air). Hasil yang didapat ini berbeda dengan hasil yang didapat oleh Bilba, dkk (2007) yaitu 22% selulosa, 10% hemiselulosa, 47% lignin, 12% air (*moisture*), 1,5% abu dan 7,5% ekstrak. Perbedaan ini terutama untuk kandungan hemiselulosa dan selulosa. Hal ini dipengaruhi oleh jenis, asal, kematangan dan *pretreatment* mekanik dari bahan baku yang digunakan (Dam dkk., 2006). Tabel 4.3 menunjukkan kadar lignoselulosa sebelum dan setelah SCW, perhitungan kadar lignoselulosa sampai mendapatkan massa lignoselulosanya dapat dilihat pada lampiran D1-D2.

Tabel 4.3 Kadar Hemiselulosa, Selulosa dan Lignin Setelah SCW

Variabel	Kadar Lignoselulosa Setelah SCW (%)		
	Hemiselulosa	Selulosa	Lignin
Unpretreatment	15.31	23.43	48.81
I (40, 120)	13.92	26.19	47.39
II (40, 130)	9.42	31.53	39.88
III (40, 140)	7.52	31.95	47.05
IV (40, 150)	9.80	26.54	51.04
V (80, 150)	4.93	29.96	53.77
VI (80,160)	3.99	30.42	55.51
VII (80, 180)	6.09	28.91	55.05
VIII (80, 200)	6.15	26.12	54.78
IX (160, 200)	6.63	24.31	47.11
X (160, 220)	8.78	21.43	46.16
XI (160, 260)	12.62	19.55	49.57
XII (160, 300)	13.17	14.77	48.57

Pada Tabel 4.3, kadar hemiselulosa setelah pretreatment SCW pada tekanan 40 bar dengan variabel temperatur 120- 150°C, cenderung mengalami penurunan seiring dengan meningkatnya temperatur saat pretreatment SCW. Hal ini karena hemiselulosa memiliki rantai polimer yang pendek, tidak berbentuk sehingga mudah larut dalam air (Girio dkk, 2010). Kadar hemiselulosa dengan pengaruh tekanan dan temperatur yang semakin tinggi akan berkurang karena hemiselulosa mudah didekomposisi dibandingkan dengan lignin dan selulosa serta dapat dihilangkan sebelum degradasi selulosa pada pretreatment hidrotermal 160 – 240 °C (Sun dkk, 2015). Namun hal yang berbeda didapatkan pada tekanan 80 bar dengan variabel temperatur 180 dan 200°C setelah pretreatment SCW cenderung meningkat, begitu juga untuk tekanan 160 bar dengan variabel temperatur 200- 300°C cenderung meningkat dengan meningkatnya temperatur. Ketidaksesuaian yang didapatkan pada penelitian ini perlu untuk dikonfirmasi ulang untuk mendapatkan nilai yang valid. Walaupun kadar hemiselulosa yang didapatkan cenderung fluktuatif, tetapi jika dibandingkan dengan kadar sebelum pretreatment, kadar hemiselulosa setelah pretreatment mengalami penurunan. Hal ini membuktikan bahwa pretreatment SCW efektif untuk mendegradasi hemiselulosa.

Saat temperatur meningkat, densitas air berkurang dari 0,997 g/cm³ (25 °C; 1 bar) menjadi 0,843 g/cm³ (220 °C; 50 bar); konstanta dielektrik dari 78,5 (25 °C; 1 bar) menjadi 31,7 (220 °C/ 50 bar) sehingga ikatan hidrogen menjadi lemah (Ciftci dkk, 2015). Hal ini membuat sifat air yang semula merupakan pelarut polar menjadi pelarut non polar yang mudah melarutkan senyawa-senyawa organik sehingga pada Tabel 4.3, kadar selulosa 26.19% pada 40 bar; 120°C meningkat menjadi 31.95% pada 40 bar; 140°C. Hal ini sesuai dengan yang dilaporkan oleh Ciftci dkk (2015) pada tekanan yang sama kandungan selulosa dari 66,4% (160°C/50 bar) menjadi 93,3% (220° C/50 bar).

Namun kadar selulosa setelah pretreatment cenderung mengalami penurunan dengan semakin tingginya tekanan dan temperatur karena selulosa yang merupakan homopolimer linier terdiri dari bentuk kristal dan amorf lebih sulit untuk didegradasi dibandingkan dengan hemiselulosa sehingga dengan pengaruh temperatur dan tekanan yang semakin tinggi mengakibatkan selulosa

terdegradasi menjadi monomernya seperti glukosa ataupun fruktosa. Dari hasil yang didapatkan ini membuktikan bahwa hemiselulosa mudah untuk didegradasi dibandingkan selulosa dan lignin; pretreatment SCW merupakan pretreatment yang efektif untuk mendegradasi bahan lignoselulosa.

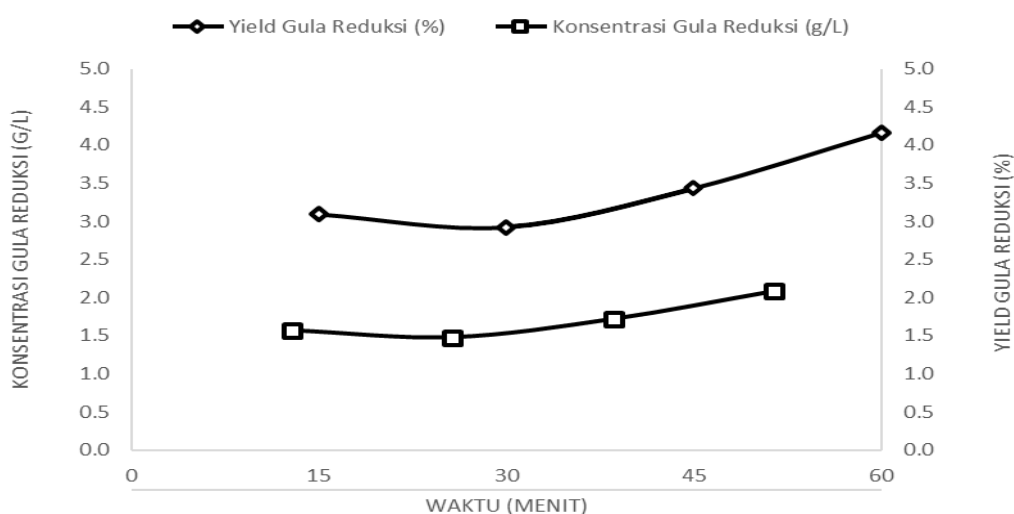
Kadar lignin setelah pretreatment pada Tabel 4.3 cenderung fluktuatif dan nilainya tidak jauh berbeda dengan kadar sebelum pretreatment. Hal ini karena lignin merupakan heteropolimer dan memiliki struktur yang kompleks sehingga sulit untuk didegradasi bila dibandingkan dengan hemiselulosa dan selulosa.

4.3 Analisa Konsentrasi dan Yield Gula Reduksi setelah Pretreatment SCW dan Autoclave

Konsentrasi gula reduksi dianalisa menggunakan metode DNS (3,5-dinitrosalicylic acid). DNS bereaksi dengan gula reduksi membentuk *amino-5-nitrosalicylate* yang ditandai dengan terbentuknya warna merah bata, semakin banyak gula reduksi yang terdapat dalam sampel maka semakin banyak *amino-5-nitrosalicylate* yang terbentuk dan warna larutan semakin pekat yang berarti serapan semakin tinggi. Konsentrasi diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm.

4.3.1 Konsentrasi dan Yield Gula Reduksi Pretreatment Autoclave

Konsentrasi gula reduksi untuk pretreatment autoclave pada tekanan dan temperatur yang sama dengan variasi waktu reaksi 15- 60 menit, terlampir pada lampiran E.2



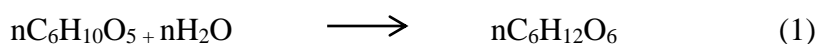
Gambar 4.1 Grafik Nilai Konsentrasi dan Yield Gula Reduksi Pretreatment Autoclave dengan Metode DNS

Dari Gambar 4.1 dapat dilihat bahwa konsentrasi berbanding lurus dengan perolehan yield gula reduksi. Waktu reaksi sangat berpengaruh, semakin lama waktu reaksi semakin besar nilai konsentrasi dan yield yang didapat. Pada waktu reaksi 15 menit konsentrasi gula reduksi 1,5687 g/L dan saat 60 menit konsentrasi menjadi 2,0863 g/L. Wu dkk, (2014) dengan menggunakan asam sulfat sebagai pelarut yang dipretreatmen dengan autoclave pada berbagai variabel waktu dari 10 – 60 menit diperoleh konsentrasi 2,86 g/L (0,09 g/L glukosa + 2,77 g/L galaktosa) pada waktu reaksi 10 menit dan saat waktu reaksi 60 menit konsentrasi menjadi 5,76 g/L (0,64 g/L glukosa + 5,12 g/L galaktosa). Namun pada waktu 30 dan 40 menit yield glukosa yang dilaporkan Wu dkk (2014) adalah sama yaitu 1,89%. Pada penelitian ini juga didapatkan pengecualian pada waktu reaksi 30 menit, konsentrasi dan yield gula reduksi menurun menjadi 1,4771 g/L. Penurunan yield ini bisa dikarenakan jumlah hemiselulosa yang terdegradasi menjadi monomer-monomernya berkurang dan pada saat bersamaan selulosa belum terdegradasi secara maksimal menjadi gula reduksi.

Dalam penelitian ini konsentrasi gula reduksi saat waktu reaksi 60 menit diperoleh 2,0863 g/L jauh lebih kecil sekitar 36,22% dibandingkan yang diperoleh oleh Wu dkk (2014) pada waktu reaksi yang sama yaitu 5,76 g/L. Perbedaan ini dapat disebabkan karena komposisi kimia pada sampel dan jenis pelarut yang berbeda.

4.3.2 Konsentrasi dan Yield Gula Reduksi Pretreatment SCW

Temperatur dan tekanan yang tinggi pada pretreatment SCW menyebabkan ikatan –H pada air mulai melemah sehingga air dapat terdisosiasi menjadi katalis asam (H_3O^+) dan basa (OH^-). Sifat air ini yang mampu mengurai selulosa dan hemiselulosa menjadi gula reduksi seperti pada reaksi dibawah ini

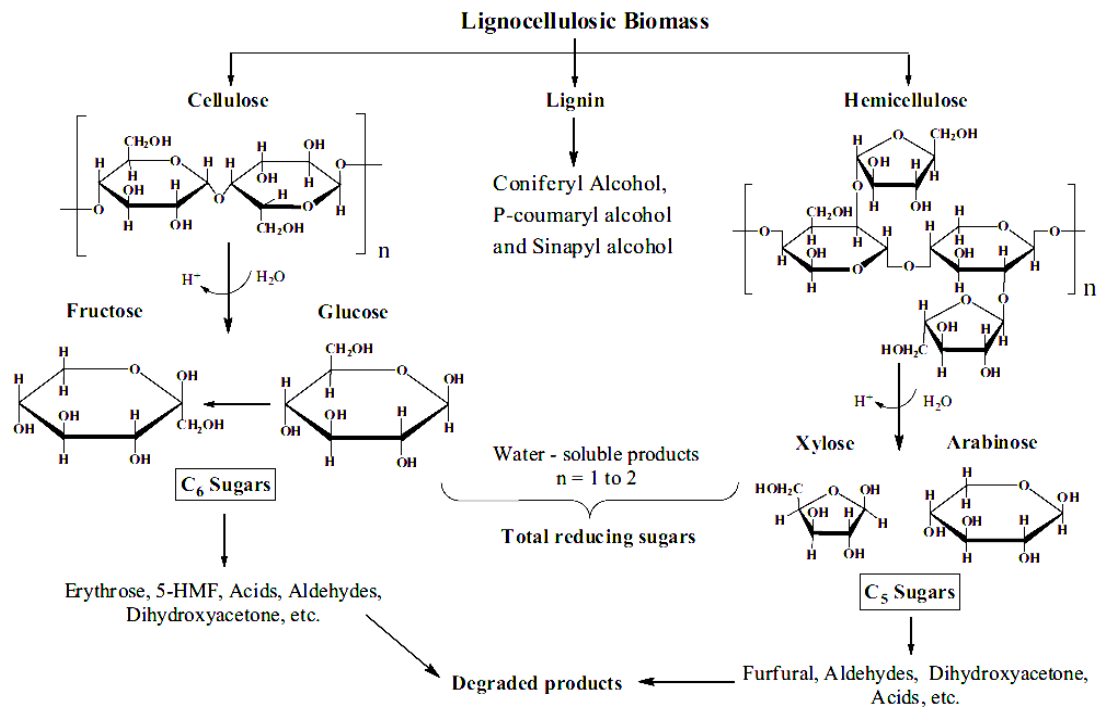


4.3.2.1 Pengaruh Temperatur terhadap Gula Reduksi pada Sabut Kelapa

Pada tekanan 40 bar, konsentrasi gula reduksi mengalami peningkatan dengan semakin meningkatnya variabel temperatur dari 2.528 g/L pada

temperatur 120°C (variabel 1) menjadi 5,272 g/L pada 150°C (variabel 4) seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.3. Nilai konsentrasi yang sebanding dengan meningkatnya temperatur dipengaruhi oleh amorf hemiselulosa yang terlarut (Zhang dan Wu, 2014), selulosa yang terdegradasi menjadi glukosa selama proses pretreatment. Pada Tabel 4.3 kadar hemiselulosa pada tekanan 40 bar cenderung mengalami penurunan, hal ini mengindikasikan bahwa hemiselulosa terdegradasi menjadi monomer-monomer gula reduksi (xilosa dan arabinose) sehingga konsentrasi gula reduksi pada tekanan 40 bar cenderung meningkat dengan meningkatnya temperatur.

Pada Gambar 4.3, konsentrasi gula reduksi pada tekanan 80 bar dengan variabel temperatur 150°C- 200°C cenderung mengalami penurunan. Konsentrasi gula reduksi pada 150°C (variabel 5) adalah 5,596 g/L menurun menjadi 2,2 g/L pada 200°C (variabel 8). Hal ini karena gula mengalami degradasi lanjutan menjadi furfural dan HMF dan kelompok acetyl pada hemiselulosa terdegradasi menjadi asam acetic selama pretreatment seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.2. Penelitian yang dilakukan Zhang dan Wu (2013) menunjukkan konsentrasi inhibitor meningkat sebanding dengan meningkatnya temperatur. Pada tekanan dan waktu reaksi yang sama konsentrasi HMF dari 0,02 g/L pada 140°C meningkat menjadi 0,46 g/L pada 180°C begitu juga dengan furfural dari 0.01 menjadi 6.19 g/L dan asam asetat dari 0.69 menjadi 5.41 g/L. Hal yang sama didapatkan juga oleh Prado dkk (2014), massa furfural 0,028 g pada 213°C meningkat menjadi 0,046 g pada 251°C dan 0,1 g pada 290°C. Begitu juga untuk HMF, 4-hidroxybenzoic dan vanillin mengalami peningkatan massa dengan meningkatnya temperatur. Pada penelitian ini tidak dilakukan analisa inhibitor pada tiap variabel, namun berdasarkan laporan dari penelitian Prado dkk (2014a), Prado dkk (2014b), Zhang dan Wu (2013) dengan indikasi yang sama yaitu kondisi operasi pada tekanan yang tetap dengan variabel temperatur dapat disimpulkan bahwa yield gula reduksi menurun karena telah terdegradasi menjadi asam-asam organik, furfural, HMF dan inhibitor- inhibitor yang lain. Hal yang sama terjadi pada tekanan 160 bar dengan variasi temperatur 200-300°C, konsentrasi gula reduksi cenderung mengalami penurunan dengan semakin meningkatnya temperatur.

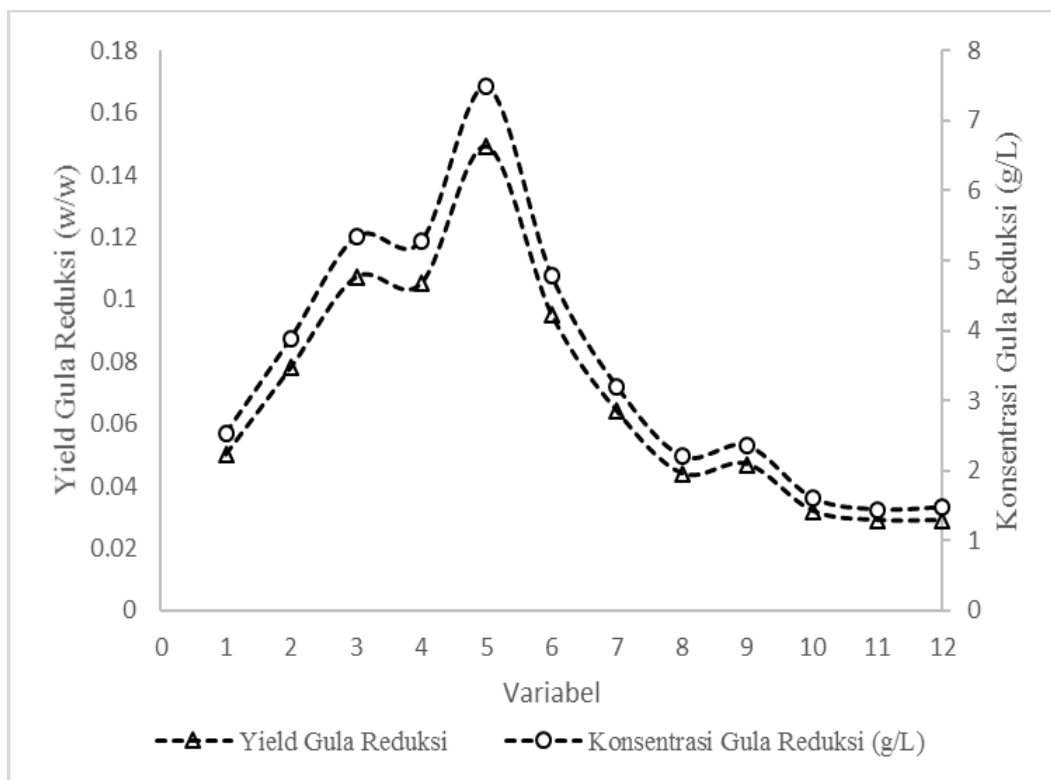


Gambar 4.2 Reaksi Lignoselulosa setelah Pretreatment SCW (Aida dkk, 2010; Kumar dkk, 2010)

4.3.2.2 Pengaruh Tekanan terhadap Gula Reduksi pada Sabut Kelapa

Pada Gambar 4.3 ditunjukkan pada temperatur yang sama yaitu 150°C konsentrasi gula reduksi meningkat dari 5,272 g/L pada tekanan 40 bar menjadi 7.481 g/L pada tekanan 80 bar. Begitu juga pada 200°C dan 80 bar konsentrasi gula reduksi 2,2 g/L meningkat menjadi 2,35 pada 200°C dan 160 bar. Dalam hal ini dapat dilihat bahwa pada temperatur yang sama konsentrasi gula reduksi meningkat dengan semakin besarnya tekanan. Konsentrasi gula reduksi meningkat dari 40 bar ke 80 bar pada 150°C karena semakin banyak hemiselulosa yang terdegradasi menjadi xilosa seperti yang ditunjukkan pada Tabel 4.3 kadar hemiselulosa pada 150°C dan 40 bar 9.8 % berkurang menjadi 4.93% pada 150°C dan 80 bar. Zhang dan Wu (2013) melaporkan pada variabel 1-7 Mpa (10- 70 bar) dengan temperatur dan waktu reaksi yang sama. Massa total xilosa meningkat dari 12.49 g pada 1 Mpa (10 bar) menjadi 14,91 g pada 5 Mpa (50 bar) kecuali pada 7 Mpa (70 bar) mengalami penurunan. Begitu juga pada 80 bar dan 160 bar pada temperatur yang sama 200°C, konsentrasi gula reduksi meningkat dengan meningkatnya tekanan hal ini dikarenakan kadar selulosa berkurang dari 26.12 % pada 80 bar menjadi 24.31% pada 160 bar. Berkurangnya kadar selulosa ini

mengindikasikan selulosa terdegradasi menjadi glukosa. Walaupun dalam penelitian ini belum banyak variabel yang digunakan untuk melihat pengaruh tekanan namun hasil yang didapat sesuai dengan yang dilaporkan oleh Zhang dan Wu (2013) pada temperatur 160°C dengan variabel tekanan dari 10-70 bar, total gula reduksi (xylose dan glukosa) meningkat dari 12,97 g pada 10 bar menjadi 15.31 pada 50 bar, namun pada 70 bar turun menjadi 14,25 g. Prado dkk (2016) menyimpulkan bahwa secara umum yang menjadi parameter kunci dalam SCW adalah temperatur bukan tekanan. Tekanan yang tinggi pada SCW berfungsi menghindari fase transisi dan menjaga air di fase cair ketika menggunakan suhu di atas titik didihnya.



Gambar 4.3 Grafik Nilai Konsentrasi dan Yield Gula Reduksi Pretreatment SCW dengan Metode DNS

Pada penelitian ini didapatkan bahwa maksimum konsentrasi gula reduksi pada pretreatment SCW sebesar 7,481 g/L dengan massa gula reduksi 0,897 gram dan yield 0,149 g/g sabut kelapa pada kondisi operasi 150°C, 80 bar dan waktu reaksi 60 menit. Sedangkan Zhang dan Wu (2013) melaporkan massa maksimum gula reduksi yang didapatkan dengan menggunakan bagas tebu pada kondisi operasi subkritis CO₂: 160°C, 50 bar dengan waktu reaksi 80 menit adalah 0,1626 g. Ju dkk (2011) dengan menggunakan pretreatment SCW pelarut air memperoleh massa gula reduksi 0,45 g dan 0.34 g dengan pelarut NaOH 4 M pada kondisi operasi 180°C dan 13 bar dengan waktu reaksi 60 menit. Park dkk (2012) dengan menggunakan pretreatment SCW memperoleh massa gula reduksi maksimum 0,00814 g *laminaria japonica* pada 200°C dengan penambahan 1% asam asetat. Khuwilitjaru dkk (2012) mendapatkan massa gula reduksi maksimum 0,139 g *coconut meal* pada 200°C selama 3 menit. Dari beberapa massa gula reduksi yang dilaporkan pada penelitian sebelumnya didapatkan bahwa massa gula reduksi dari penelitian ini cenderung lebih tinggi dan lebih ramah lingkungan karena menggunakan air sebagai pelarutnya. Perbedaan massa gula reduksi yang didapatkan pada penelitian ini dengan penelitian sebelumnya dipengaruhi oleh perbedaan sampel dan kondisi operasi.

4.3.3 Perhitungan Konsentrasi Gula Reduksi dengan Analisa HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)

Penggunaan data analisa HPLC untuk memverifikasi hasil konsentrasi gula reduksi yang didapatkan dengan menggunakan metode DNS. Variabel yang di analisa HPLC merupakan variabel yang terbaik untuk tiap pretreatment untuk SCW 150°C, 80 bar, waktu reaksi 60 menit dan enzimatik 130°C, 40 bar, waktu reaksi 60 menit.

Tabel 4.4 Perbandingan Gula Reduksi Hasil HPLC dengan analisa DNS

Pretreatment	Variabel	HPLC			DNS
		Konsentrasi (g/L)			Total Gula Reduksi (g/L)
		Glukosa	Xilosa	Total	
	Unpretreatment	-	-	-	1,97
SCW	40 bar, 130 C	0.032	0.056	0.088	3.891
	80 bar, 150 C	0.145	0.764	0.909	7.481
Enzimatik	40 bar, 130 C	0.421	0.129	0.550	3.709
	80 bar, 150 C	0.410	0.130	0.540	2.922

Pada Tabel 4.4 ditunjukkan konsentrasi total gula reduksi hasil analisa HPLC lebih rendah dibandingkan dengan analisa DNS. Pada pretreatment SCW untuk variabel 40 bar, 130°C konsentrasi total gula reduksi hasil analisa HPLC 0,088 g/L jauh lebih rendah dibandingkan dengan hasil analisa menggunakan metode DNS 3,891 g/L, begitu juga untuk variabel yang lain pada Tabel 4.4. Rendahnya konsentrasi pada HPLC karena hanya gula reduksi jenis glukosa dan xilosa yang terdeteksi sedangkan untuk gula reduksi yang lain seperti galaktosa, arabinosa, manosa tidak terdeteksi. Sedangkan analisa dengan metode DNS tidak dapat diidentifikasi jenis-jenis gula reduksinya karena hanya total gula reduksi yang dapat diidentifikasi.

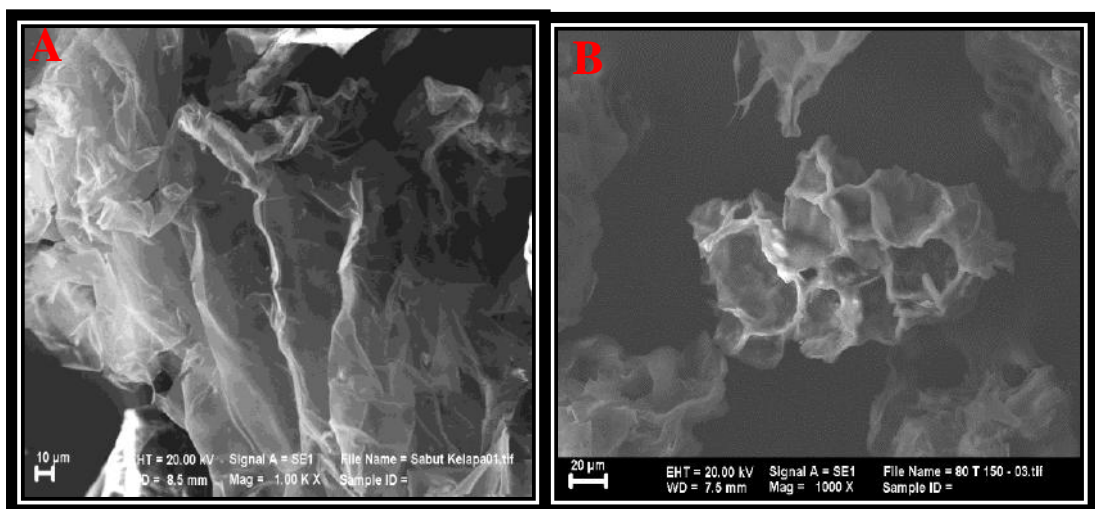
Pada Tabel 4.4 dapat dilihat hasil analisa dengan HPLC menunjukkan konsentrasi glukosa 0,032 g/L pada pretreatment SCW 40 bar; 130°C meningkat menjadi 0,421 g/L pada hidrolisis enzimatik, begitu juga untuk variabel 80 bar 150°C dari 0,145 g/L pada pretreatment SCW meningkat menjadi 0,410 g/L pada hidrolisis enzimatik. Hasil ini sesuai dengan kadar selulosa pada Tabel 4.3 dimana kadar selulosa sebelum SCW untuk variabel 40 bar dan 130°C 23.43% meningkat 31.53% setelah SCW. Meningkatnya kadar selulosa ini memberikan pengaruh pada hasil glukosa selama hidrolisis enzimatik, makin tinggi kadar selulosa makin banyak glukosa yang dihasilkan dari degradasi enzim selulase terhadap selulosa. Pada variabel 40 bar, 130°C konsentrasi xilosa meningkat dari pretreatment SCW 0,056 g/L menjadi 0,129 g/L pada hidrolisis enzimatik. Hal ini karena pada 40 bar dan 130°C hemiselulosa belum terdegradasi secara maksimal sehingga setelah pretreatment SCW konsentrasi xilosa (monomer dari hemiselulosa) masih rendah. Pada saat hidrolisis enzimatik, padatan sabut kelapa hasil SCW yang masih banyak mengandung hemiselulosa, didegradasi oleh enzim xilanase menjadi xilosa. Hal inilah yang menyebabkan konsentrasi xilosa meningkat pada saat hidrolisis enzimatik. Berbeda dengan variabel 80 bar dan 150°C konsentrasi xilosa mengalami penurunan dari pretreatment SCW 0,764 g/L menjadi 0,130 g/L saat hidrolisis enzimatik karena pada saat pretreatment SCW hemiselulosa terdegradasi menjadi xilosa sehingga padatan hasil SCW hanya mengandung sedikit hemiselulosa. Hal ini didukung pada hasil yang dilaporkan di Tabel D.2, dimana massa hemiselulosa sebelum SCW 0,9206 gram mengalami penurunan menjadi 0,2073 gram setelah SCW.

4.4 Karakterisasi Padatan Sabut Kelapa Hasil SCW

Karakterisasi bahan baku dilakukan dengan tujuan untuk melihat perubahan struktur yang terjadi setelah pretreatment. Analisa X-ray *diffraction* (XRD) untuk menentukan tingkat kekristalan dalam total solid sabut kelapa, sedangkan analisa *scanning electron micrograph* (SEM) untuk mengetahui struktur permukaan dari sabut kelapa. Analisa SEM dan XRD menggunakan sampel SCW dengan yield gula reduksi tertinggi yaitu pada kondisi operasi 80 bar, 150°C dan waktu reaksi 60 menit.

4.4.1 Analisa Scanning Elektron Micrograph (SEM)

Pada Gambar 4.4 menunjukkan hasil analisa SEM sebelum dan sesudah pretreatment SCW. Gambar 4.4a merupakan SEM untuk sabut kelapa yang belum dipretreatment. Dari Gambar 4.4a menunjukkan struktur yang masih teratur, rapat, kuat dari sabut kelapa. Hal ini karena selulosa masih terbungkus kuat dengan hemiselulosa dan lignin. Sedangkan Gambar 4.4b menunjukkan hasil analisa SEM untuk sabut kelapa yang dipretreatment SCW pada kondisi operasi 80 bar, 150°C dengan waktu reaksi 60 menit. Pada Gambar 4.4b menunjukkan struktur yang tidak teratur, berongga, permukaan tidak rata. Perubahan struktur ini mengidentifikasi bahwa SCW secara efisiensi menghancurkan sel dinding lignoselulosa (Ciftci dkk, 2015).



Gambar 4.4 Hasil Analisa SEM Sebelum SCW(a) dan Setelah Pretreatmen SCW pada 150 °C, 80 bar (b)

4.4.2 Analisa X-ray diffraction

Salah satu analisa untuk melihat pengaruh pretreatment terhadap sabut kelapa yaitu dengan analisa XRD. Perubahan nilai *Cr.I* menunjukkan adanya pengaruh pretreatment. Dalam hal ini XRD membaca nilai *Cr.I* dari jumlah relatif kristal selulosa dalam total solid.

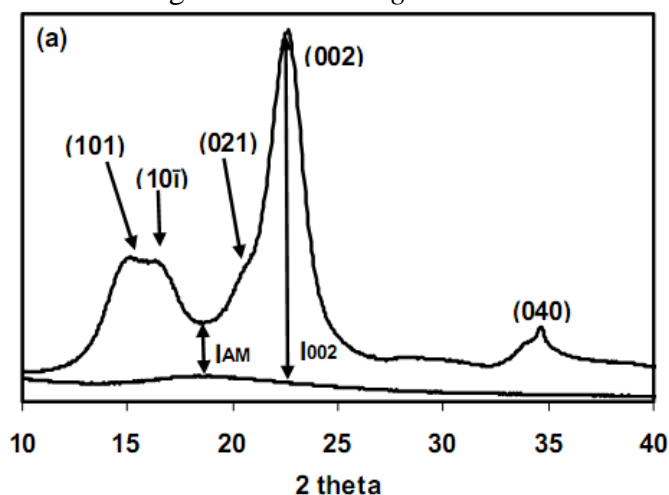
Nilai *Cr.I* dapat diperoleh melalui salah satu perhitungan dengan menentukan intensitas selulosa *amorf* dan intensitas selulosa kristalin. Intensitas selulosa *amorf* (I_{am}) dapat dilihat untuk sudut 2θ didaerah sekitar 18° sedangkan untuk struktur selulosa kristalin dengan bidang I_{002} berada pada sudut sekitar 22° - 24° . Persamaan yang digunakan dalam penentuan *Cr.I* dengan menggunakan metode intensitas adalah sebagai berikut (Poletto dkk., 2012):

$$Cr.I = \frac{I_{002} - I_{am}}{I_{002}} \times 100 \quad (3)$$

Dimana: I_{002} = Intensitas tertinggi dari Peak Kristalin

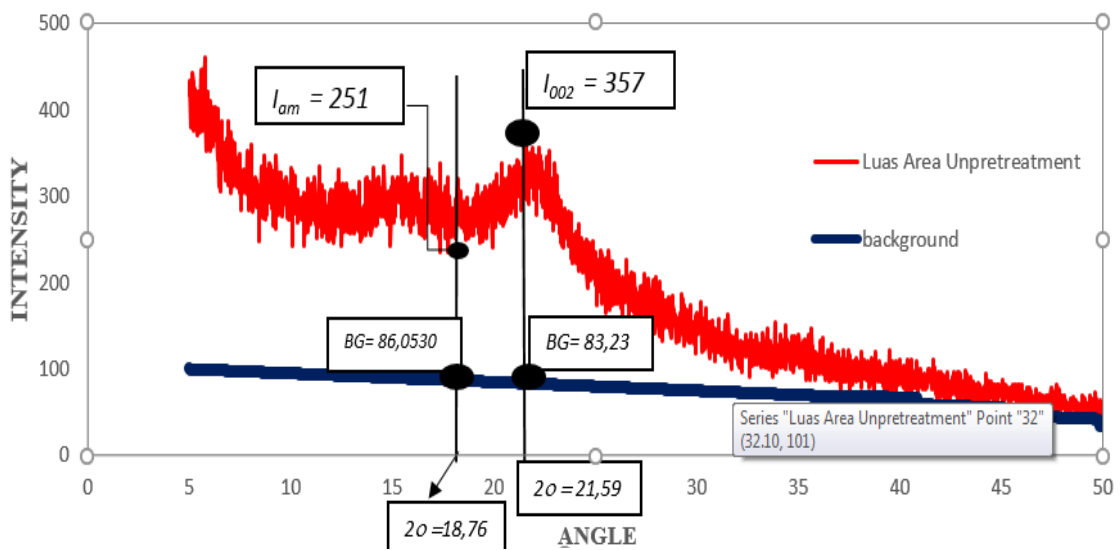
I_{am} = Intensitas tertinggi dari Peak nonkristalin/*amorf*

Pada Gambar 4.5 ditunjukkan bahwa I_{am} adalah intensitas tertinggi kurva nonkristalin/*amorf* dikurangi intensitas *background* sedangkan I_{002} adalah intensitas tertinggi kurva kristalin dikurangi intensitas *background*.

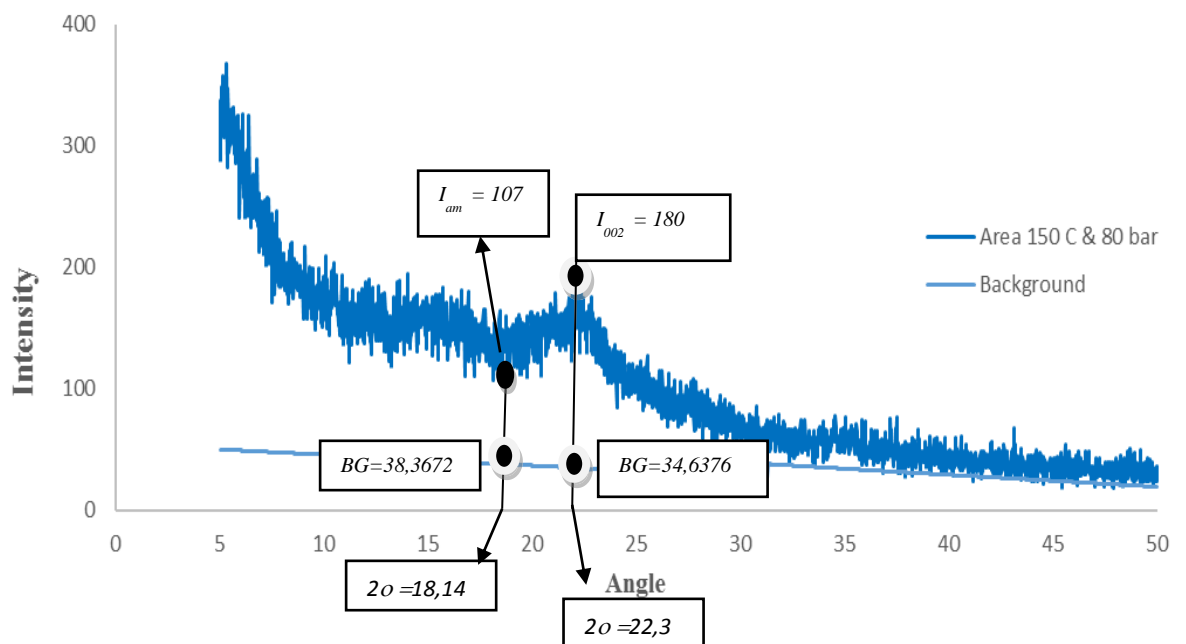


Gambar 4.5 Metode Penentuan *Cr.I* dengan Perhitungan Intensitas I_{002} dan I_{am} (Park dkk, 2010)

Berikut penentuan I_{002} dan I_{am} pada unpretreatment dan variabel 80 bar dan 150°C hasil XRD berdasarkan Gambar 4.5



Gambar 4.6 Penentuan Kristalin (I_{002}) dan nonkristalin/*amorf* (I_{am}) pada Unpretreatment



Gambar 4.7 Penentuan Kristalin (I_{002}) dan nonkristalin/*amorf* (I_{am}) pada Variabel 150°C dan 80 bar

Dari Gambar 4.6 dan 4.7 nilai kristalin selanjutnya dihitung dengan menggunakan persamaan (3) yang ditunjukkan pada Tabel 4.5.

Tabel 4.5 Data Intensitas Kurva Kristalin (I_{002}) dan Data Intensitas Kurva Nonkristalin/*amorf* (I_{am}) dalam Perhitungan Cr.I Menggunakan Metode Intensitas

Substrat	2θ	Kristalin			2θ	Nonkristalin/ <i>Amorf</i>			Cr.I (%)
		I_{002}	<i>Back-ground</i> (BG)	I_{002} - I_{BG}		I_{am}	<i>Back-ground</i> (BG)	I_{am} - I_{BG}	
<i>Control</i>	21,59	357	83,23	273,77	18,76	251	86,05	164,95	39,75
80 bar, 150°C <i>Treated</i>	22,35	180	34,64	145,36	18,14	107	38,37	68,63	52,79

Tabel 4.5 menunjukkan perhitungan data Cr.I yang dilakukan dalam penelitian ini. Pada Tabel 4.5 didapatkan nilai I_{002} untuk control/unpretreatment pada $2\theta = 21,59^\circ$ dan variabel 80 bar dan 150°C pada $2\theta = 22,35^\circ$; sedangkan I_{am} pada $2\theta = 18,76^\circ$ (*control*) dan $2\theta = 18,14^\circ$ (80 bar, 150°C). Nilai index kristalin setelah pretreatment meningkat dari 39,75% sebelum SCW menjadi 52,79% setelah SCW pada variabel 80 bar dan 150°C . Hal ini dikarenakan *amorf* pada hemiselulosa dan beberapa lignin dihilangkan sehingga menyebabkan nilai kristalin selulosa meningkat. Seperti yang dilaporkan oleh Ciftci dkk (2015) dimana kristalin index hasil pretreatment SCW untuk sweet blue lupin meningkat menjadi 58,6% dari kristalin index unpretreatment 11,5%. Mohan dkk (2015) melaporkan nilai kristalin setelah pretreatment 65,83% mengalami peningkatan dari unpretreatment 50,55%.

Pengaruh pretreatment SCW dengan temperatur dan tekanan yang tinggi lebih besar pada daerah *amorf* daripada pada daerah kristalin sehingga dapat menghilangkan hemiselulosa dan sebagian lignin. Hal ini yang menyebabkan nilai kristalin selulosa meningkat setelah pretreatment (Mohan dkk, 2015).

4.5 Analisa Konsentrasi, Massa dan Yield Gula Reduksi setelah Hidrolisis Enzimatik

4.5.1 Persiapan dan Pembuatan Enzim Selulase dan Xilanase Murni

Sebelum melakukan hidrolisis enzimatik yang pertama disiapkan adalah kurva standar glukosa dan xilosa dengan menggunakan metode DNS. Kurva standar pada

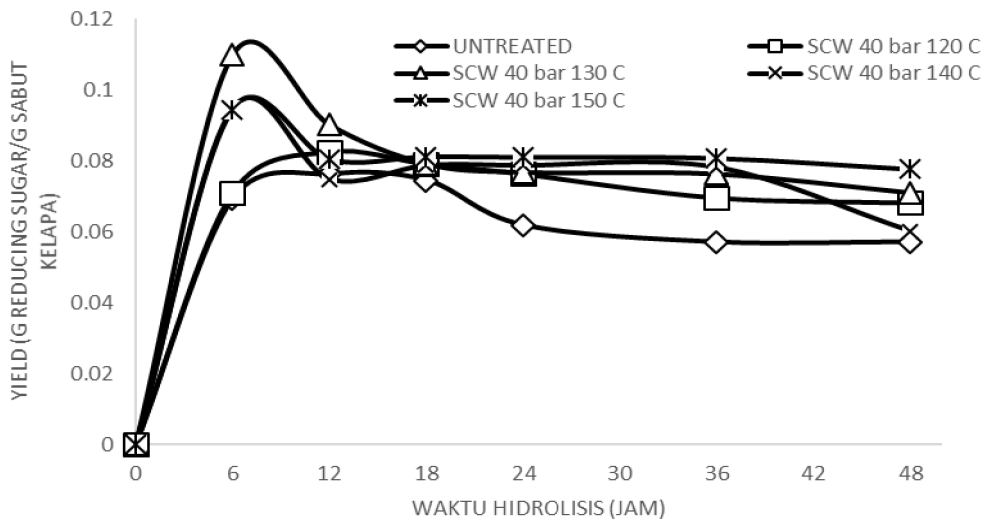
lampiran F1- F2 digunakan untuk menentukan aktifitas enzim yang nantinya akan digunakan untuk menghitung kebutuhan enzim saat hidrolisis.

Kurva standar glukosa menggunakan CMC karena CMC dapat dihidrolisis oleh enzim selulase menghasilkan glukosa. Sedangkan untuk kurva standar xilosa menggunakan xylan karena xylan dapat dihidrolisis oleh xilanase menjadi xilosa.

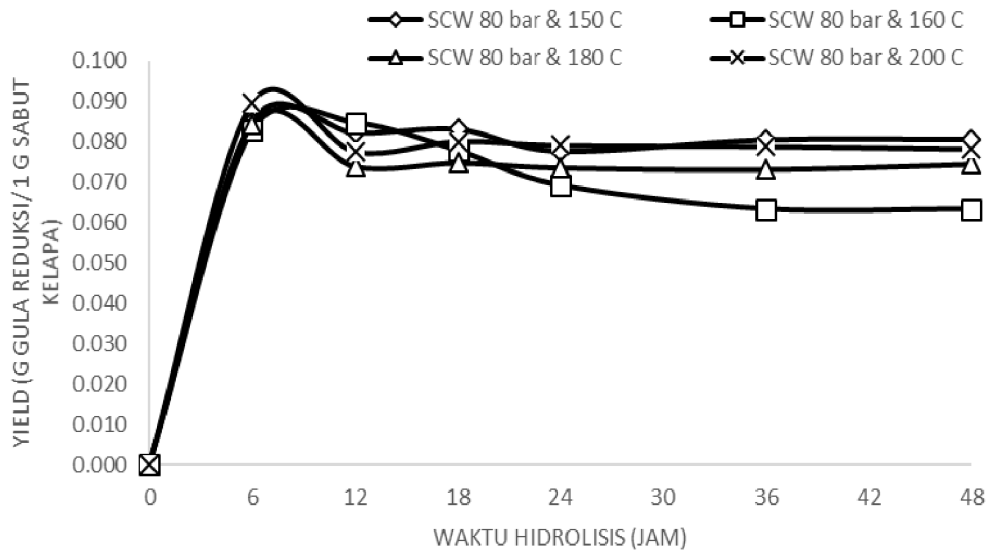
Setelah kurva standar glukosa dan xilosa dibuat selanjutnya menghitung aktivitas enzim yang digunakan. Dalam penelitian ini digunakan enzim murni selulase dari *Aspergillus niger* dan xilanase murni dari *Trichoderma longibrachiatum*. Larutan enzim yang telah direaksikan dengan DNS, masing-masing diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm. Seperti hitungan pada lampiran G1-G2 didapatkan kebutuhan enzim selulase 16.065 mL dan xilanase 5.305 mL sehingga total enzim yang dibutuhkan 21.37 mL

4.5.2 Hidrolisis Enzimatik pada Padatan Hasil Pretreatment SCW

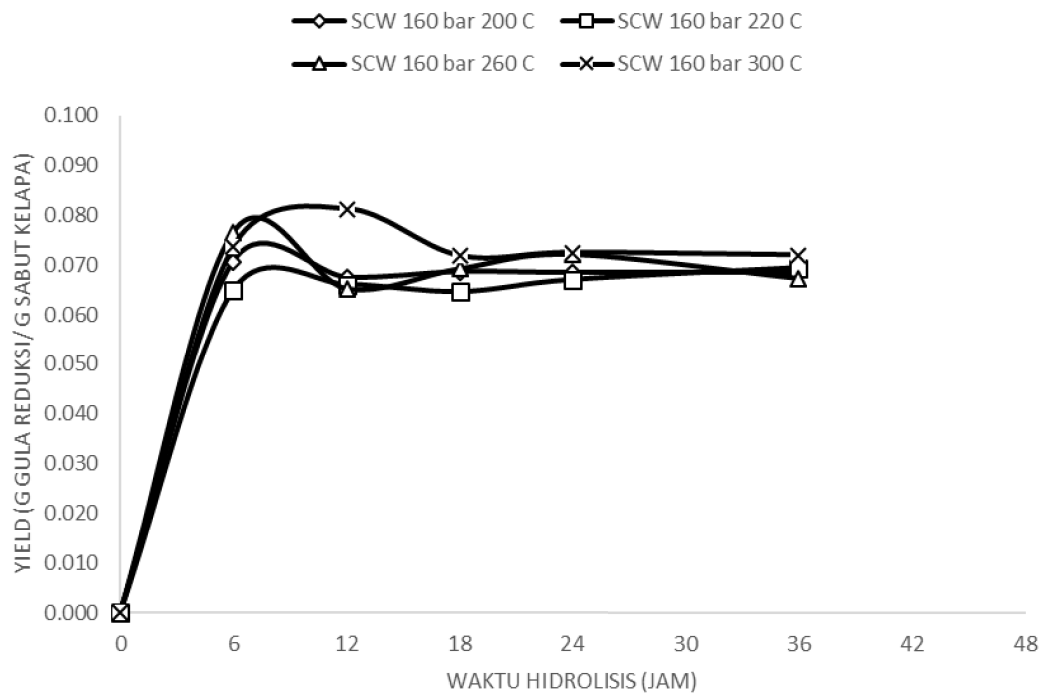
Padatan hasil pretreatment dari SCW dalam berbagai variabel diambil 1 gram kemudian ditambahkan dengan enzim campuran selulase dan xilanase sesuai dengan kebutuhan enzim yang telah diketahui. Setelah itu ditambahkan dengan buffer sitrat pH 3 sampai volume 30 mL. Kondisi operasi untuk hidrolisis dilakukan pada 60°C, pH 3, dan 125 rpm. Kondisi hidrolisis ini didasarkan pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Anwar dkk (2011) dimana aktivitas optimum enzim pada temperatur dan pH tersebut. Hidrolisis enzimatik ini dilakukan selama 48 jam dimana tiap selang waktu dianalisa konsentrasi gula reduksinya. Dalam menentukan konsentrasi gula reduksi digunakan metode DNS. Gula reduksi hasil hidrolisis pada berbagai variabel dalam selang waktu tertentu dapat dilihat pada lampiran H.1 dan pada Gambar 4.8- 4.10.



Gambar 4.8 Yield Gula Reduksi Hidrolisis Enzimatik Produk SCW 40 bar



Gambar 4.9 Yield Gula Reduksi Hidrolisis Enzimatik Produk SCW 80 bar



Gambar 4.10 Yield Gula Reduksi Hidrolisis Enzimatik Produk SCW 160 bar.

Pada Gambar 4.8 menunjukkan hidrolisis enzimatik produk SCW pada tekanan 40 bar dengan variabel temperatur 120-150°C. Yield tertinggi 0,111 g didapat pada variabel 130°C dengan waktu hidrolisis 6 jam. Hal ini dipengaruhi oleh jumlah hemiselulosa dan selulosa tertinggi pada tekanan 40 bar yaitu pada variabel 130°C sekitar 1,9266 g dengan 0,4432 g hemiselulosa dan 1,4834 selulosa. Pada variabel 130°C kandungan lignin paling kecil sekitar 1,8761 g dibandingkan dengan variabel lain pada tekanan 40 bar. Kandungan lignin yang kecil mempermudah enzim selulase dan xilanase untuk mendegradasi selulosa dan hemiselulosa menjadi gula reduksi. Pada Gambar 4.8 yield gula reduksi mengalami penurunan setelah waktu hidrolisis 6 jam. Hal ini dikarenakan jumlah substrat yang semakin berkurang saat pengambilan sampel, dan bisa juga dikarenakan diameter dari rantai selulosa meningkat dan menjadikan tidak sesuai dengan luas enzim sehingga daya cerna enzim berkurang setelah jangka waktu tertentu.

Gambar 4.9 menunjukkan hidrolisis enzimatik produk SCW pada tekanan 80 bar dengan variabel temperatur 150-200°C. Yield tertinggi didapat pada variabel 200°C pada waktu hidrolisis 6 jam sekitar 0,090 g/g sampel pretreated sabut kelapa. Hal ini dikarenakan massa hemiselulosa tertinggi pada tekanan 80 bar yaitu

0.2408 gram pada variabel 200°C. Selain itu pada variabel 80 bar dan 200°C massa ligninnya terkecil yaitu 2,145 gram dibandingkan dengan variabel lain pada isobar 80 bar. Seperti halnya pada hidrolisis enzimatis 40 bar, yield gula reduksi mengalami penurunan setelah waktu hidrolisis 6 jam.

Gambar 4.10 menunjukkan yield gula reduksi pada tekanan 160 bar dengan variabel temperatur 200-300°C. Yield tertinggi didapatkan pada variabel 300°C dengan waktu hidrolisis 12 jam yaitu 0,081 g/g sampel pretreated sabut kelapa. Hal ini disebabkan pada variabel 300°C massa ligninnya terkecil dibandingkan dengan variabel yang lain. Kandungan lignin yang kecil memudahkan enzim selulase dan xilanase mendegradasi selulosa menjadi glukosa dan hemiselulosa menjadi xilosa.

Kemampuan enzim menghidrolisis dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya kandungan hemiselulosa, porositas, kristalin/amorf selulosa, kandungan lignin pada sampel, aktivitas enzim, pH dan konsentrasi substratnya sendiri. Pada Tabel H.2 konsentrasi gula reduksi meningkat dari temperatur 120 °C ke 130 °C pada tekanan 40 bar masing-masing 2.782 g/L dan 3.709 g/L. Setelah 130°C, konsentrasi gula reduksi cenderung menurun dengan meningkatnya temperatur. Hal ini karena kadar hemiselulosa dan selulosa yang cenderung menurun dengan meningkatnya temperatur dan pada kondisi operasi 40 bar dan 130°C kadar lignin lebih rendah dan kadar selulosa lebih tinggi dibandingkan dengan variabel yang lain seperti yang ditunjukkan pada Tabel 4.3 dimana kadar lignin yang rendah mempermudah enzim selulase dan xilanase untuk menghidrolisis selulosa dan hemiselulosa menjadi gula reduksi (glukosa dan xylose). Seperti yang telah dilaporkan oleh Zhang dan Wu (2013) pada hidrolisis enzimatis hasil pretreatment SCW dimana pada tekanan yang sama, 50 bar dengan waktu reaksi 100 menit dan variasi temperatur dari 140-180°C. Massa xylose menurun dengan meningkatnya temperatur namun hal sebaliknya pada massa glukosa meningkat dengan meningkatnya temperatur. Pada 140°C, yield total gula reduksi 16,33 g/100 g sampel yang terdiri dari xylose :4,95 g/100 g sampel dan glukosa 11,43g/100 g sampel. Sedangkan pada 180°C total gula reduksi 39,35 g/100 g sampel (1,26 g xylose dan 37,99 g glukosa)

4.5.3 Massa Total Gula Reduksi

Massa total gula reduksi merupakan jumlah massa gula reduksi yang didapatkan pada pretreatment SCW dan hidrolisis enzimatis. Maksimum total gula

reduksi yang didapat akan digunakan dalam fermentasi untuk memproduksi hidrogen. Pada Tabel 4.6, konsentrasi gula reduksi tertinggi pada pretreatment SCW adalah 7.481 g/L pada 80 bar dan 150°C sedangkan pada hidrolisis enzimatik konsentrasi tertinggi 3.709 g/L pada 40 bar dan 130°C. Konsentrasi gula reduksi untuk variabel pada 80 bar dan 150°C berkurang dari 7,481 g/L pada pretreatment SCW menjadi 2.922 g/L pada hidrolisis enzimatik. Berkurangnya konsentrasi karena sebagian besar hemiselulosa dan selulosa telah terdegradasi menjadi gula reduksi pada pretreatment SCW sehingga pada hidrolisis enzimatik hanya sebagian kecil hemiselulosa dan selulosa yang terdegradasi oleh enzim selulase dan xilanase. Pada Tabel 4.6 juga dapat dilihat hubungan antara massa lignoselulosa dengan gula reduksi pada SCW dan hidrolisis Enzimatik.

Pada Tabel 4.6 ditunjukkan total massa hemiselulosa dan selulosa tertinggi pada variabel 40 bar dan 130°C yaitu 1.9213 gram. Total massa ini memberikan pengaruh pada massa gula reduksi hasil hidrolisis enzimatik dimana massa gula reduksi tertinggi didapat pada variabel yang sama dengan massa total hemiselulosa dan selulosa tertinggi yaitu 40 bar dan 130°C. Selain massa selulosa dan hemiselulosa, massa lignin juga memberikan pengaruh terhadap hasil gula reduksi terutama untuk hidrolisis enzimatik. Pada Tabel 4.6 massa lignin terkecil pada variabel 40 bar dan 130°C. Hal ini merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi massa gula reduksi pada variabel 40 bar dan 130°C lebih tinggi dibandingkan yang lain. Kecilnya massa lignin memberikan kemudahan akses enzim terhadap selulosa dan hemiselulosa.. Pada penelitian ini massa total gula reduksi terbaik didapatkan pada variabel 80 bar dan 150°C yaitu 1.254 g dan variabel ini yang akan digunakan untuk tahap fermentasi.

Tabel 4.6 Perbandingan Massa Gula Reduksi Hasil Pretreatment SCW, Hidrolisis Enzimatik dan Total Gula Reduksi dengan Massa lignoselulosa Sabut Kelapa pada Berbagai Variabel

Variabel		(Massa Lignoselulosa) (gr)				Pretreatment SCW			Hidrolisis Enzimatik			Massa Total Gula Reduksi (gr)
P (bar)	T (°C)	Massa Hemi selulosa	Massa Selulosa	Massa Lignin	Massa Total (H+S)	Gula Reduksi (g/L)	Volume (mL)	Gula Reduksi (gr)	Gula Reduksi (g/L)	Volume (mL)	Massa (gr)	(Massa SCW + Enzimatik)
40	120	0.667	1.255	2.270	1.9213	2.528	120	0.303	2.782	30	0.395	0.698
	130	0.443	1.483	1.876	1.9266	3.891	120	0.467	3.709	30	0.517	0.984
	140	0.344	1.460	2.150	1.8036	5.337	120	0.64	3.148	30	0.429	1.07
	150	0.399	1.079	2.075	1.4777	5.272	120	0.633	3.305	30	0.384	1.017
80	150	0.207	1.261	2.262	1.4679	7.481	120	0.897	2.922	30	0.357	1.254
	160	0.156	1.186	2.165	1.3422	4.782	120	0.574	3.359	30	0.33	0.904
	180	0.239	1.135	2.162	1.3746	3.197	120	0.384	3.041	30	0.331	0.715
	200	0.241	1.023	2.145	1.2636	2.2	120	0.264	3.041	30	0.351	0.615
160	200	0.248	0.911	1.766	1.1597	2.35	120	0.282	2.388	30	0.265	0.547
	220	0.306	0.746	1.607	1.0518	1.607	120	0.193	2.329	30	0.241	0.434
	260	0.368	0.570	1.446	0.9378	1.439	120	0.173	2.582	30	0.223	0.396
	300	0.343	0.384	1.264	0.7271	2.151	120	0.258	2.744	30	0.211	0.469

Keterangan:

- H : Hemselulosa - S : Selulosa

4.6 Perbandingan Hasil Gula Reduksi pada Penelitian ini dengan Penelitian Terdahulu

Tabel 4.7 Perbandingan Hasil Gula Reduksi pada Penelitian ini dengan Penelitian Terdahulu

No	Peneliti	Jenis Substrat	Kondisi Operasi	Hasil Penelitian
1.	Junianti F, 2016	Sabut Kelapa (120 mesh; 6 gram sampel; 120 mL aquades)	1. SCW: - T = 120-300°C; P = 40,80,160 bar; waktu reaksi = 60 menit 2. Enzimatik T = 60°C; 125 rpm; pH 3; 48 jam	Massa gula reduksi tertinggi pada SCW: 0.897 g (80 bar; 150°C & 60 menit); Enzimatik: 0.517 g (40 bar & 130°C); dan massa total gula reduksi 1.254 g (80 bar dan 150°C)
2.	Susanto F dan Kurniawan C, 2015	Sabut Kelapa (100-120 mesh: 6 g Sampel; dan 120 mL aquadest	1. SCW: - T = 150°C; P = 80 bar ; waktu reaksi = 0,20, 40, 60 menit) 2. Enzimatik T = 60°C; 125 rpm; pH 3; 24 jam	Massa gula reduksi tertinggi pada SCW: 0.78 g (80 bar; 150°C & 40 menit); Enzimatik: 1.04 g (80 bar; 150°C; 0 menit); dan massa total gula reduksi 1.74 g (80 bar; 150°C; 0 menit).
3.	Sangian dkk, 2014	Sabut Kelapa 70-120 mesh (4 gram) : 75 mL akuades	1. SCW: T (110-170°C); P (20,30, dan 40 bar); & 60 menit 2. Enzimatik; T = 60°C; 125 rpm; pH 3; 48 jam	- SCW: Kadar gula reduksi tertinggi sebesar 4,96 g/L, <i>yield</i> sebesar 0,09 g.gula reduksi/g. Sabut kelapa - Enzimatik: <i>yield</i> sebesar 0,13 g.gula reduksi/g sabut kelapa
4.	Zhang dan Wu ,2013	Bagas tebu (45g sampel: 300 mL	1. SCW: - T = 140-180°C; P = 0-7 Mpa;	Yield gula reduksi tertinggi pada Subkritis.CO ₂ : 16.26 g/100g sampel (5 Mpa; 160°C

		akuades)	time= 20-100 menit 2. Enzimatik T = 50°C; 150 rpm; pH 4.8; 60 jam	& 80 menit); Enzimatik: 37.99 g/100 g sampel (5 Mpa, 100 menit & 180°C); dan yield total gula reduksi 52.95 g/ 100 g sampel (5 Mpa; 100 menit dan 160°C)
5.	Zhang dan Wu, 2014	Bagas Tebu	1. SCW: - T = 20-180° C; P = 0-7 Mpa; waktu reaksi = 20-100 menit 2. Enzimatik T = 50°C; 150 rpm; pH 4.8; 6, 12, 24, 48, dan 72 jam	Yield glukosa tertinggi pada Subkritis.CO ₂ : 54.1 % (5 Mpa; 180°C & 100 menit); Enzimatik: 38.5 g/ 100 g sampel (5 Mpa, 100 menit & 180°C dan waktu hidrolisis 72 jam)

Pada Tabel 4.7 dapat dilihat perbandingan penelitian ini dengan beberapa penelitian terdahulu dengan jenis pretreatment yang sama yaitu SCW dan enzimatik dengan bahan baku dan kondisi operasi yang berbeda. Zhang dan Shubin pada tahun 2013 dengan sampel bagas tebu dengan pretreatment SCW pada kondisi operasi T = 140-180°C; P = 0-7 Mpa; waktu reaksi= 20-100 menit didapat yield total gula reduksi 0,5295 g/g sampel pada kondisi operasi 5 Mpa, 100 menit, dan 160°C. Zhang dan Wu (2014) mengembangkan penelitian mereka dengan menambahkan waktu hidrolisis enzimatik 6-72 jam dengan kondisi operasi SCW yang divariabelkan dari 20-180°C. yield gula tertinggi yang didapat Zhang dan Shubin untuk SCW 54,1 % pada 5 Mpa, 100 menit dan 180°C sedangkan untuk enzimatnya yield tertinggi 0,385 g pada 5 Mpa, 100 menit dan 180°C dan waktu hidrolisis 72 jam. Hasil yang didapat oleh Zhang dan shubin berbeda dengan hasil yang didapat dalam penelitian ini dimana massa gula reduksi tertinggi pada

penelitian ini untuk SCW: 0.897 g pada 80 bar; 150°C dan 60 menit, sedangkan enzimatik: 0,517 g pada 40 bar, 130°C, 60 menit dan waktu hidrolisis 6 jam; dan massa total gula reduksi 1.254 g pada 80 bar, 60 menit dan 150°C. Perbedaan hasil yang didapat dengan yang diperoleh oleh Zhang dan Shubin dipengaruhi oleh jenis bahan baku yang digunakan dan kondisi operasi yang berbeda. Namun pada ketiga penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pada pretreatment SCW dengan temperatur sekitar 150-180°C didapatkan yield tertinggi. Hal ini sama dengan yang didapatkan oleh Sangian dkk (2014) yield tertinggi pada SCW yaitu 0.09 g pada 40 bar, 160°C, dan 60 menit.

4.7 Fermentasi Gula Reduksi Hasil Pretreatment SCW

Variabel yang digunakan dalam proses fermentasi ini adalah variabel 150 °C; 80 bar dan waktu reaksi 60 menit. Dalam proses fermentasi ini digunakan bakteri *Enterobacter Aerogenes* yang bersifat anaerob yang dapat menghasilkan hidrogen dari glukosa dan xilosa yang menjadi bahan baku fermentasi (Lin dkk, 2008). Sebelum dilakukan fermentasi, dibuat kurva standar pertumbuhan sel seperti pada lampiran J.1 Kurva standar sel ini nantinya akan digunakan untuk melihat pertumbuhan sel dalam selang waktu tertentu selama proses fermentasi.

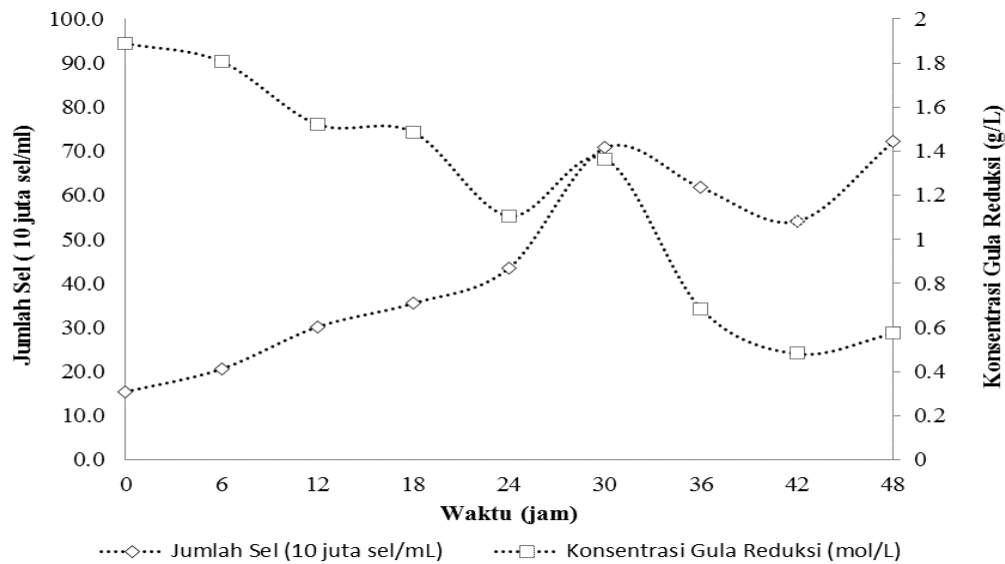
Bakteri *E.Aerogenes* diregenerasi pada agar miring (PDA) selama 1 hari, selanjutnya diinokulasi pada hidrolisat lalu diaklimatisasi selama 16 jam pada 35°C dan 125 rpm. Hidrolisat yang telah diaklimatisasi dipindahkan ke dalam fermentor. Proses fermentasi dipertahankan pada 37°C; 125 rpm; dan pH 7 dengan menggunakan 4 M NaOH. pH merupakan faktor penting dalam proses fermentasi karena pH mempengaruhi proses metabolisme sel dalam memproduksi hidrogen. Peningkatan pH mampu meningkatkan aktifitas sel dalam memproduksi hidrogen, namun bila kondisi pH terlalu tinggi justru akan menurunkan aktivitasnya dan apabila nilai pH dalam larutan fermentasi menurun, akan mengakibatkan pertumbuhan sel dan produksi hidrogen terhambat (Wang dkk., 2009).

Volume hidrogen diukur menggunakan sistem pemindahan air dan kadar hidrogen diukur menggunakan *Gas Chromatograph* (GC SHIMADZU, 2010). Untuk tekanan yang dipakai dalam perhitungan mol gas hidrogen di kondisikan pada kondisi ruangan yaitu 1 atm dan temperatur 37°C sesuai temperatur didalam fermentor. Penentuan kondisi operasi yang mendasari perhitungan mol hidrogen berdasarkan penelitian (Yusnica, 2014). Pada penelitian ini, fermentasi dilakukan secara terpisah antara liquid hasil enzimatik dengan liquid hasil SCW.

4.7.1 Fermentasi Liquid SCW dan Liquid Enzimatis

4.7.1.1. Fermentasi Liquid SCW

Berikut konsentrasi gula reduksi yang diukur menggunakan metode DNS dan pertumbuhan sel dalam selang waktu selama 48 jam fermentasi.



Gambar 4.11 Konsentrasi Gula Reduksi dan Jumlah Sel terhadap Waktu Fermentasi pada Hidrolisat Sabut kelapa 80 bar dan 150°C

Pada Gambar 4.11 dapat dilihat jumlah sel cenderung meningkat dengan menurunnya konsentrasi gula reduksi. Metabolisme sel menyebabkan penurunan konsentrasi substrat. Hidrogen dihasilkan pada fasa logaritmik pertumbuhan bakteri *E.Aeoregenes*. Pada jam 12 – 30 jam, terjadi pembiakan yang cepat dan jumlah sel meningkat secara logaritma sesuai dengan penambahan waktu serta semakin menurunnya konsentrasi gula reduksi. Pada jam 30-42 mulai memasuki fase kematian, ditandai dengan menurunnya jumlah sel secara cepat. Hal ini menunjukkan adanya akumulasi produk di dalam media yang berperan sebagai produk inhibitor sehingga menghambat proses degradasi gula dan menyebabkan metabolisme sel tidak berjalan dengan baik (Argun dkk.,2008). Pada jam ke 42- 48 seharusnya pertumbuhan selnya mengalami penurunan namun mengalami kenaikan. Jumlah sel yang meningkat seharusnya diikuti dengan menurunnya konsentrasi glukosa dan meningkatnya jumlah hidrogen yang dihasilkan namun pada penelitian ini hal yang

sebaliknya diperoleh jumlah sel meningkat tapi konsentrasi glukosa meningkat. Penyimpangan ini kemungkinan karena adanya kontaminasi saat pengenceran bakteri sebelum pengukuran absorbansi yang menyebabkan larutan semakin keruh. Kekeruhan ini berpengaruh terhadap nilai absorbansi yang semakin tinggi sehingga semakin tinggi juga jumlah sel yang didapatkan.

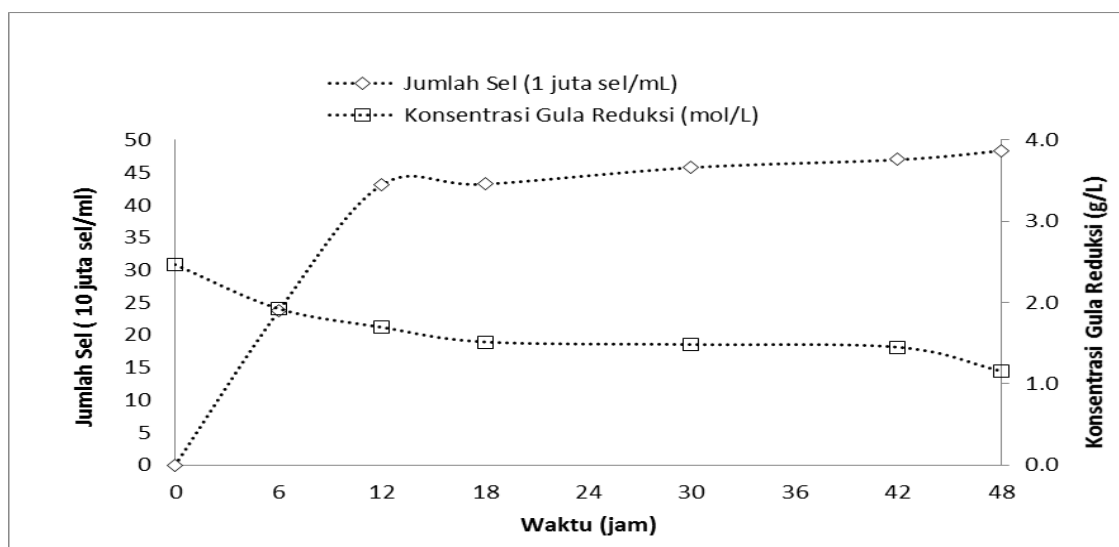
Konsentrasi gula reduksi yang menurun dengan meningkatnya jumlah sel mengidentifikasi adanya gas hidrogen yang terbentuk selama proses fermentasi. Hal ini dapat dilihat pada Gambar 4.11. Gas hidrogen yang dihasilkan selama fermentasi dianalisa menggunakan GC. Data yang diperoleh berupa luas area kromatogram kemudian dihitung lebih lanjut dengan kalibrasi gas hidrogen. Kurva kalibrasi H₂ ditunjukkan pada Gambar J.2 di lampiran J. Dari Tabel 4.8 didapatkan *yield* hidrogen hasil fermentasi sabut kelapa sebesar 0,175 mol H₂/mol gula reduksi terkonsumsi pada jam ke-48.

Tabel 4.8 Data Hasil Perhitungan Analisa GC Hidrolisat SCW Sabut Kelapa 80 bar, 150°C

Jam	V. gas (mL)	∑ V. Gas (mL)	Area H ₂	V. H ₂ syringe (mL)	V. total H ₂ (mL)	H ₂ (mmol)	∑ H ₂ (mmol)	Glukosa (mol/L)	Yield (mol H ₂ /mol TRS.)
6	64	64	5.072	0,0017	0,541	0,0213	0,0213	0,0100	0,039
12	136	200	4.010	0,0013	0,909	0,0358	0,0570	0,0085	0,104
18	38,4	238,4	4.756	0,0016	0,304	0,0120	0,0690	0,0083	0,126
24	11,2	249,6	3.005	0,0010	0,056	0,0022	0,0712	0,0061	0,130
30	33,28	282,88	3.221	0,0011	0,179	0,0070	0,0782	0,0076	0,143
36	30,08	312,96	3.624	0,0012	0,182	0,0072	0,0854	0,0038	0,156
42	21,12	334,08	3.046	0,0010	0,107	0,0042	0,0896	0,0027	0,163
48	32,16	366,24	3.035	0,0010	0,163	0,0064	0,0960	0,0032	0,175

4.7.1.2 Fermentasi Liquid Enzimatik

Solid sabut kelapa hasil pretreatment SCW kemudian dihidrolisis selama 6 jam kemudian disaring setelah itu liquidnya di fermentasi. Hasil konsentrasi gula reduksi dan pertumbuhan sel selama fermentasi ditunjukkan pada Gambar 4.12



Gambar 4.12 Produksi Hidrogen dan Konsumsi Gula Reduksi terhadap Waktu Fermentasi pada Hidrolisat Enzimatis Sabut Kelapa *Treated* 80 bar dan 150°C

Produksi gas hidrogen dapat dilihat dengan berkurangnya konsentrasi gula reduksi dan meningkatnya jumlah sel selama waktu fermentasi seperti pada Gambar 4.12. Hasil fermentasi yang didapat dari hidrolisat enzimatis ditunjukkan pada Tabel 4.9. Yield hidrogen yang didapat dari hidrolisat enzimatis lebih kecil dibandingkan dengan hidrogen dari hidrolisat SCW. Pada fermentasi hidrolisat SCW *yield* hidrogen 0,175 mol H₂/mol gula reduksi terkonsumsi pada jam ke-48. Sedangkan pada fermentasi hidrolisat enzimatis *yield* hidrogen 0,104 mol H₂/mol gula reduksi terkonsumsi pada jam ke-48. Tingginya *yield* hidrogen dipengaruhi oleh banyaknya konsumsi gula reduksi oleh bakteri *E.Aeoregenes* yang ditandai dengan meningkatnya jumlah sel selama fermentasi. Pada fermentasi hidrolisat SCW jumlah sel selama fermentasi lebih banyak daripada fermentasi hidrolisat Enzimatis. Hal ini yang menyebabkan *yield* hidrogen dari hidrolisat SCW lebih tinggi dari hidrolisat enzimatis.

Total *yield* hidrogen pada penelitian ini merupakan total *yield* hidrogen dari hidrolisat SCW 0,175 dan *yield* dari hidrolisat enzimatis 0,104 mol/mol gula reduksi terkonsumsi sehingga total *yield* hidrogen keseluruhan dari variabel 80 bar dan 150°C adalah 0,279 mol H₂/mol gula reduksi terkonsumsi. *Yield* hidrogen yang didapatkan pada penelitian ini lebih kecil bila dibandingkan dengan yang dilaporkan Anwar

(2012) sekitar 0.356 mol H₂/ mol gula dikonsumsi dari bahan baku jerami padi dengan pretreatment awal basa NaOH. Yusnica S (2014) yaitu 0.463 mol H₂/ mol gula reduksi dikonsumsi dari bahan baku bagas tebu dengan pretreatment awal NaOH dan Ionik *Liquid*. Perbedaan hasil ini dipengaruhi dari beberapa faktor diantaranya perbedaan bahan baku dan pretreatment awal sebelum hidrolisis enzimatis dan fermentasi. Walaupun yield didapatkan pada penelitian ini lebih rendah dibandingkan dengan yield yang didapatkan Anwar dan Yusnica, namun penelitian ini lebih ramah lingkungan karena tidak menggunakan bahan kimia sebagai pelarutnya pada pretreatment awalnya.

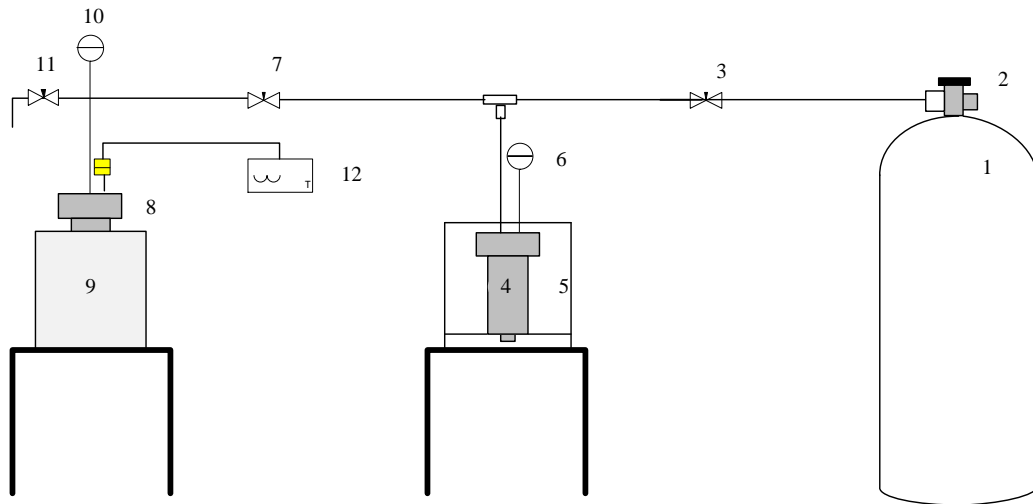
Tabel 4.9 Data Hasil Perhitungan Analisa GC Hidrolisat Hasil Enzimatis Sabut Kelapa 80 bar, 150°C

Jam	Σ V. Gas	Area H ₂	V. H ₂ syringe	V. total H ₂	H ₂	Σ H ₂	Konsentrasi Glukosa	Yield
	(mL)		(mL)	(mL)	(mmol)	(mmol)	(mol/L)	(mol H ₂ /mol TRS.)
0	0	0	0	0	0	0	0.0192	0
6	10	2,501	0.0008	0.0417	0.002	0.002	0.0107	0.003
12	35	2,854	0.0010	0.1684	0.007	0.008	0.0094	0.013
18	49	2,091	0.0007	0.1715	0.007	0.015	0.0084	0.024
30	71	2,308	0.0008	0.2731	0.011	0.026	0.0082	0.040
42	106	2,480	0.0008	0.4398	0.017	0.043	0.0081	0.068
48	136	2,562	0.0009	0.5824	0.023	0.066	0.0064	0.104

Halaman ini sengaja dikosongkan

LAMPIRAN
PROSEDUR KERJA DAN HASIL PERHITUNGAN ANALISA

A. Skema Rangkaian Alat untuk Hidrolisis Air Subkritis



- Keterangan:
- | | |
|--------------------------------|-----------------------------------|
| 1 = Tabung gas CO ₂ | 6, 10 = <i>Pressure Indicator</i> |
| 2, 3, 7, 11 = Valve Tekanan | 8 = Reaktor pemanas |
| 4 = Reaktor pendingan | 9 = <i>Heater</i> |
| 5 = <i>Cooler bag</i> | 12 = Termokopel |

Gambar A.1 Rangkaian Peralatan Hidrolisis Air Subkritis

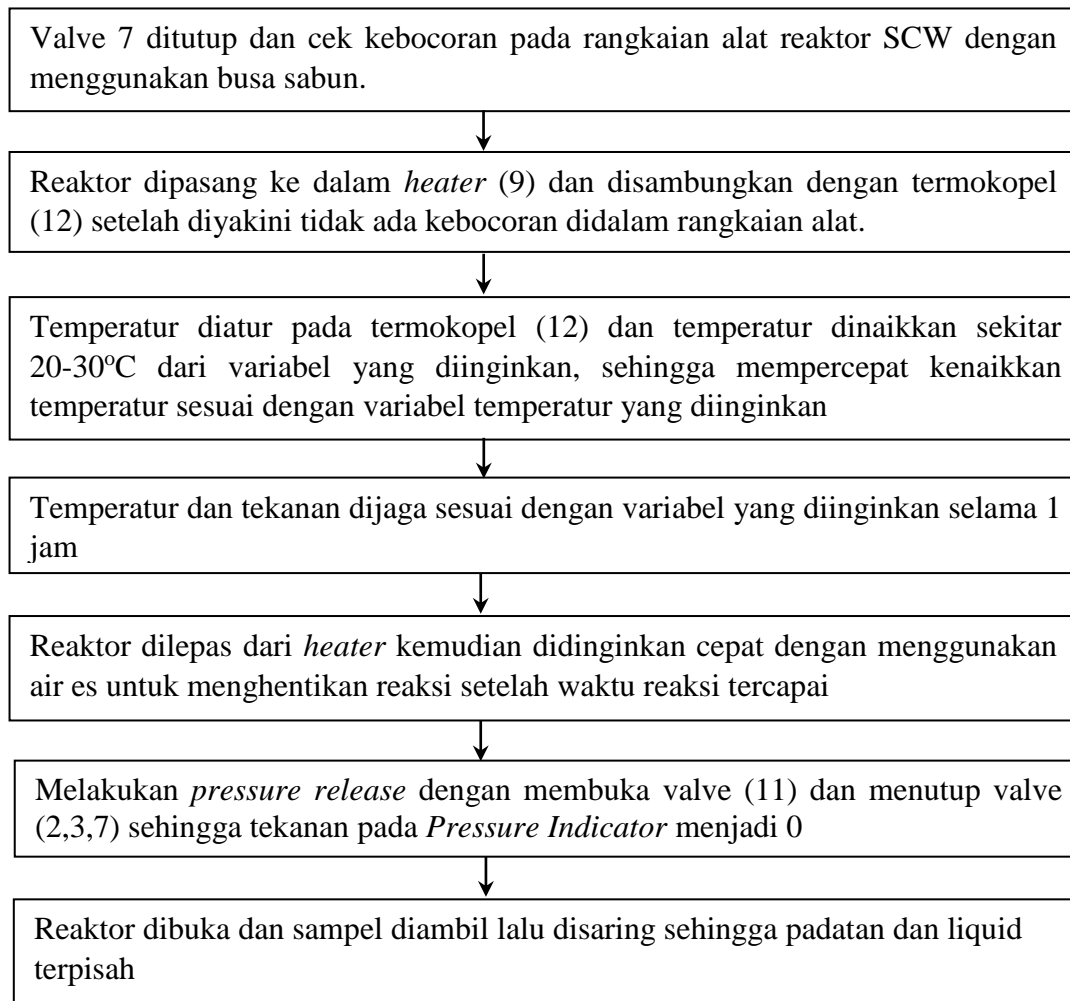
Adapun prosedur pemakaian rangkaian reaktor Air Subkritis yaitu sebagai berikut:

A.1 Pemakaian Reaktor untuk Tekanan 40 dan 80 bar

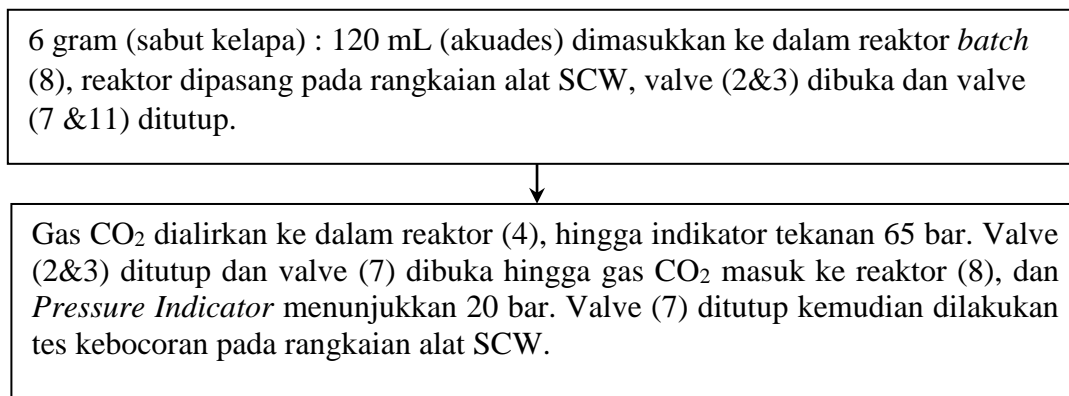
6 gram (sabut kelapa) : 120 mL (akuades) dimasukkan ke dalam reaktor *batch* (8), reaktor dipasang pada rangkaian alat SCW, valve (2&3) dibuka dan valve (7 & 11) ditutup.

Gas CO₂ dialirkan ke dalam reaktor (4), hingga indikator tekanan 65 bar. Valve (2&3) ditutup dan valve (7) dibuka hingga gas CO₂ masuk ke reaktor (8), dan *Pressure Indicator* menunjukkan 20 bar

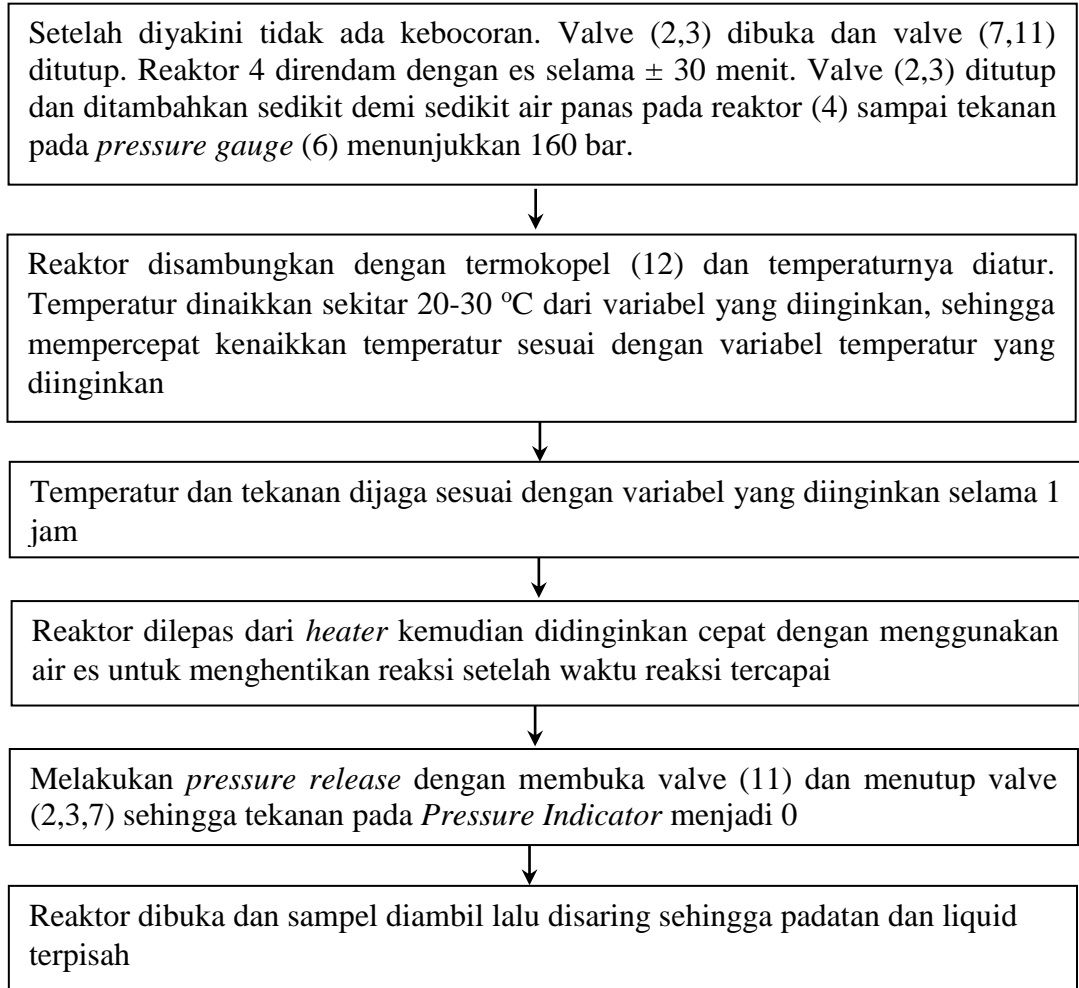
Lanjutan A.1 Pemakaian Reaktor untuk Tekanan 40 dan 80 bar



A.2 Pemakaian Reaktor untuk Tekanan 160 bar



Lanjutan A.2 Pemakaian Reaktor untuk Tekanan 160 bar



B. Hasil Pretreatment Autoclave

Tabel B.1 Massa Sebelum dan Sesudah Pretreatment Autoclave

Variabel				Waktu Pengkondisian Autoclave (Menit)		Liquid		Massa Sabut Kelapa (gram)	
No	Tekanan (bar)	Suhu (°C)	Waktu Reaksi (Menit)	Pemanasan	Pendinginan	pH	Volume Akhir (mL)	Awal	Akhir
I	1	121	15	26.32	21.16	5	59	6.0890	5.0092
II			30	24.8	24.21	5	56	6.0681	5.2893
III			45	25.15	25.05	5	79	6.0075	4.9673
IV			60	27.15	28.44	5	61	6.0098	4.9198

C. Hasil Pretreatment SCW

Tabel C.1 Perhitungan Massa Sabut Kelapa Sebelum dan Sesudah SCW

Variabel				Waktu Pengkondisian Reaktor		Liquid		Massa Sabut Kelapa (gram)	
No	Tekanan (bar)	Suhu (°C)	Waktu (Menit)	Pemanasan (Menit)	Pendinginan (Menit)	pH	Volume Akhir (mL)	Awal	Akhir
I	40	120	60	66.02	21.36	5	86	6.0208	4.7903
II		130	60	71.01	25.44	5	83	6.0124	4.7042
III		140	60	81.15	24.51	5	80	6.003	4.5696
IV		150	60	71.23	11.38	5	88	6.0041	4.0653
V	80	150	60	82.49	31.01	5	90	6.0132	4.2076
VI		160	60	83.26	20.4	5	84	6.0282	3.9004
VII		180	60	81.43	31.37	5	79	6.0123	3.9266
VIII		200	60	105.08	38.44	5	89	6.0222	3.9157
IX	160	200	60	93.08	35.54	5	85	6.0113	3.749
X		220	60	103.23	37.42	5	83	6.015	3.4806
XI		260	60	116.01	38.45	5	80	6.0215	2.9159
XII		300	60	154.12	41.54	4	76	6.0136	2.6023

D. Perhitungan Komposisi Lignoselulosa Sebelum dan Setelah SCW dengan menggunakan Metode Gravimetri berdasarkan yang dilakukan oleh Datta dan Rathin (1981)

1. Perhitungan Kadar Selulosa

$$\begin{aligned} \text{Kadar Selulosa} &= \left[\frac{c-d}{a} \right] \times 100\% \\ &= \frac{0,7632-0,4850}{1,0011} \times 100\% \\ &= 27,79\% \end{aligned}$$

2. Perhitungan Kadar Hemiselulosa

$$\begin{aligned} \text{Kadar Hemiselulosa} &= \left[\frac{b-c}{a} \right] \times 100\% \\ &= \frac{0,9058-0,7632}{1,0011} \times 100\% \\ &= 14,24\% \end{aligned}$$

3. Perhitungan Kadar Lignin

$$\begin{aligned} \text{Kadar Lignin} &= \left[\frac{d-e}{a} \right] \times 100\% \\ &= \frac{0,4850-0,0131}{1,0011} \times 100\% \\ &= 47,14\% \end{aligned}$$

Tabel D.1 Perhitungan Kadar Selulosa, Hemiselulosa, dan Lignin Sebelum dan Setelah Hidrolisis dengan Metode Air Subkritis

Variabel	Massa (gram)					Komponen					
	a	b	c	d	e	Hemiselulosa %	Selulosa %	Lignin %	Abu %	Ekstrak + Air %	
KOLOM	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
							$(3-4)/2$	$(4-5)/2$	$(5-6)/2$	$6/2$	$100-(7+8+9+10)$
Unpretreatment	Run 1	1.0011	0.9058	0.7632	0.4850	0.0131	14,24	27,79	47,14	1.31	9.52
	Run 2	1.0055	0.9042	0.7872	0.5297	0.0473	11,64	25,61	47,98	4,70	10.07
	Run 3	1.0100	0.8999	0.6974	0.5267	0.0085	20,05	16,90	51,30	0.84	10.91
	Rata-rata						15.31	23.43	48.81	12.45	10.17
Variabel I (40,120)	Run 1	1.0022	0.7363	0.5899	0.4169	0.0340	14.61	23.50	38.21	3.39	20.30
	Run 2	1.0147	0.8362	0.8084	0.5050	0.0008	2.74	36.28	49.69	0.08	11.21
	Run 3	1.0078	0.9985	0.7525	0.5649	0.0179	24.41	18.79	54.28	1.78	0.75
	Rata-rata						13.92	26.19	47.39	1.75	10.75

Variabel	Massa (gram)					Komponen					
	a	b	c	d	e	Hemiselulosa %	Selulosa %	Lignin %	Abu %	Ekstrak + Air %	
KOLOM	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
							(3-4)/2	(4-5)/2	(5-6)/2	6/2	100-(7+8+9+10)
Variabel II (40,130)	Run 1	1.0041	0.7839	0.6274	0.4168	0.0333	15.59	26.87	38.19	3.32	16.04
	Run 2	1.0057	0.8172	0.7339	0.4831	0.0533	8.28	30.69	42.74	5.30	12.99
	Run 3	1.0033	0.7604	0.7163	0.4346	0.0462	4.40	37.05	38.71	4.60	15.24
	Rata-rata						9.42	31.53	39.88	4.41	14.76
Variabel III (40,140)	Run 1	1.0040	0.8518	0.7880	0.5402	0.0845	6.35	29.09	45.39	8.42	10.75
	Run 2	1.0217	0.8936	0.8085	0.5102	0.0232	8.33	33.38	47.67	2.27	8.35
	Run 3	1.0051	0.8744	0.7952	0.5034	0.0200	7.88	33.37	48.09	1.99	8.66
	Rata-rata						7.52	31.95	47.05	4.23	9.26
Variabel IV (40,150)	Run 1	1.0026	0.8672	0.7199	0.5160	0.0236	14.69	23.51	49.11	2.35	10.33
	Run 2	1.0093	0.8492	0.7797	0.5749	0.0197	6.89	24.12	55.01	1.95	12.04
	Run 3	1.0042	0.8831	0.8044	0.5218	0.0297	7.84	32.00	49.00	2.96	8.20
	Rata-rata						9.80	26.54	51.04	2.42	10.19

Variabel	Massa (gram)					Komponen					
	a	b	c	d	e	Hemiselulosa %	Selulosa %	Lignin %	Abu %	Ekstrak + Air %	
KOLOM	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
							$(3-4)/2$	$(4-5)/2$	$(5-6)/2$	$6/2$	$100-(7+8+9+10)$
Variabel V (80,15)	Run 1	1.0135	0.9022	0.8573	0.5524	0.0251	4.43	33.80	52.03	2.48	7.27
	Run 2	1.0052	0.8623	0.8078	0.5825	0.0245	26.13	55.51	2.44	10.50	5.42
	Run 3	1.0046	0.9500	0.8799	0.5789	0.0260	6.98	31.68	55.04	2.59	3.71
	Rata-rata						4.93	29.96	53.77	2.46	8.89
Variabel VI (80,160)	Run 1	1.0153	0.8838	0.8347	0.5802	0.0281	4.84	28.80	54.38	2.77	9.22
	Run 2	1.0142	0.9070	0.8757	0.6001	0.0213	3.09	30.39	57.07	2.10	7.36
	Run 3	1.0168	0.9000	0.8587	0.5701	0.0100	4.06	32.07	55.08	0.98	7.80
	Rata-rata						3.99	30.42	55.51	1.95	8.13
Variabel VII (80,180)	Run 1	1.0266	0.9723	0.9462	0.6662	0.0170	2.54	28.80	63.24	1.66	3.77
	Run 2	1.0146	0.8716	0.8496	0.6023	0.0148	2.17	28.37	57.90	1.46	10.10
	Run 3	1.0402	0.8796	0.7384	0.4783	0.0206	13.57	29.57	44.00	1.98	10.87
	Rata-rata						6.09	28.91	55.05	1.70	8.25
Variabel VIII (80,200)	Run 1	1.0320	0.9120	0.8485	0.6122	0.0343	6.15	25.91	56.00	3.32	11.94
	Run 2	1.0157	0.9017	0.8565	0.6183	0.0162	4.45	26.42	59.28	1.59	9.07
	Run 3	1.0093	0.8110	0.7318	0.5207	0.0255	7.85	26.03	49.06	2.53	16.25
	Rata-rata						6.15	26.12	54.78	2.48	12.42

Variabel	Massa (gram)					Komponen					
	a	b	c	d	e	Hemiselulosa %	Selulosa %	Lignin %	Abu %	Ekstrak + Air %	
KOLOM	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
							$(3-4)/2$	$(4-5)/2$	$(5-6)/2$	$6/2$	$100-(7+8+9+10)$
Variabel IX (160,200)	Run 1	1.0059	0.8531	0.7692	0.5602	0.0315	8.34	24.50	52.26	3.13	14.60
	Run 2	1.0085	0.7052	0.6838	0.5530	0.0194	2.12	18.55	52.91	1.92	25.70
	Run 3	1.0204	0.6838	0.5877	0.3834	0.0174	9.42	29.88	35.87	1.71	24.06
	Rata-rata						6.63	24.31	47.11	2.25	21.45
Variabel X (160, 220)	Run 1	1.0275	0.9050	0.8243	0.5580	0.0154	7.85	29.43	52.81	1.50	9.91
	Run 2	1.0060	0.5648	0.4908	0.4361	0.0338	7.36	9.68	39.99	3.36	42.11
	Run 3	1.0323	0.8066	0.6916	0.4884	0.0167	11.14	25.19	45.69	1.62	17.17
	Rata-rata						8.78	21.43	46.16	2.16	23.06
Variabel XI (160, 260)	Run 1	1.0080	0.8730	0.7720	0.5678	0.0223	10.02	23.39	54.12	2.21	12.47
	Run 2	1.0089	0.7783	0.6248	0.5026	0.04833	15.21	15.70	45.03	4.79	23.22
	Run 3										
	Rata-rata						12.62	19.55	49.57	3.50	17.85
Variabel XII (160,300)	Run 1	1.002	0.756	0.624	0.512	0.02526	13.17	14.77	48.57	2.52	23.49

Tabel D.2 Perhitungan Massa Selulosa, Hemiselulosa, dan Lignin Sebelum dan Setelah Hidrolisis dengan Metode Air Subkritis

	Hemiselulosa	Selulosa	Lignin
Kadar (%)	15.31	23.43	48.81

Variabel	Massa Sabut Kelapa		Kadar Lignoselulosa Setelah SCW (%)			Massa Sebelum SCW (gram)			Massa Setelah SCW (gram)		
	Awal	Akhir	Hemiselulosa	Selulosa	Lignin	Hemiselulosa	Selulosa	Lignin	Hemiselulosa	Selulosa	Lignin
KOLOM	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
						$(1 \times \text{Unpretred}) / 100$	$(1 \times \text{Unpretred}) / 100$	$(1 \times \text{Unpretred}) / 100$	$(1 \times 3) / 100$	$(1 \times 4) / 100$	$(1 \times 5) / 100$
I (40, 120)	6.0208	4.7903	13.92	26.19	47.39	0.9218	1.4107	2.9388	0.6668	1.2545	2.2702
II (40, 130)	6.0124	4.7042	9.42	31.53	39.88	0.9205	1.4087	2.9347	0.4432	1.4834	1.8761
III (40, 140)	6.003	4.5696	7.52	31.95	47.05	0.9191	1.4065	2.9301	0.3437	1.4599	2.1500
IV (40, 150)	6.0041	4.0653	9.80	26.54	51.04	0.9192	1.4068	2.9306	0.3986	1.0791	2.0750
V (80, 150)	6.0132	4.2076	4.93	29.96	53.77	0.9206	1.4089	2.9350	0.2073	1.2607	2.2624
VI (80,160)	6.0282	3.9004	3.99	30.42	55.51	0.9229	1.4124	2.9424	0.1558	1.1864	2.1651
VII (80, 180)	6.0123	3.9266	6.09	28.91	55.05	0.9205	1.4087	2.9346	0.2393	1.1353	2.1615
VIII (80, 200)	6.0222	3.9157	6.15	26.12	54.78	0.9220	1.4110	2.9394	0.2408	1.0227	2.1450
IX (160, 200)	6.0113	3.749	6.63	24.31	47.11	0.9203	1.4084	2.9341	0.2484	0.9113	1.7663
X (160, 220)	6.015	3.4806	8.78	21.43	46.16	0.9209	1.4093	2.9359	0.3057	0.7460	1.6068

Variabel	Massa Sabut Kelapa		Kadar Lignoselulosa Setelah SCW (%)			Massa Sebelum SCW (gram)			Massa Setelah SCW (gram)		
	Awal	Akhir	Hemiselulosa	Selulosa	Lignin	Hemiselulosa	Selulosa	Lignin	Hemiselulosa	Selulosa	Lignin
KOLOM	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
						$(1 \times \text{Unpretred}) / 100$	$(1 \times \text{Unpretred}) / 100$	$(1 \times \text{Unpretred}) / 100$	$(1 \times 3) / 100$	$(1 \times 4) / 100$	$(1 \times 5) / 100$
XI (160, 260)	6.0215	2.9159	12.62	19.55	49.57	0.9219	1.4108	2.9391	0.3679	0.5699	1.4455
XII (160, 300)	6.0136	2.6023	13.17	14.77	48.57	0.9207	1.4090	2.9352	0.3427	0.3844	1.2639

E. Analisa Konsentrasi dan Yield Gula Reduksi dari Hasil Pretreatment Autoclave dan Air Subkritis dengan Analisa DNS

E.1 Pengukuran Kurva Standar Glukosa

Massa glukosa = 0,367 gram

Volume buffer sitrat pH 5,5 = 100 mL

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi glukosa awal} &= \frac{\text{massa glukosa}}{\text{volume buffer sitrat pH 5,5}} \\ &= \frac{0,367 \text{ gram}}{100 \text{ mL}} = 3,67 \text{ gram/L} \end{aligned}$$

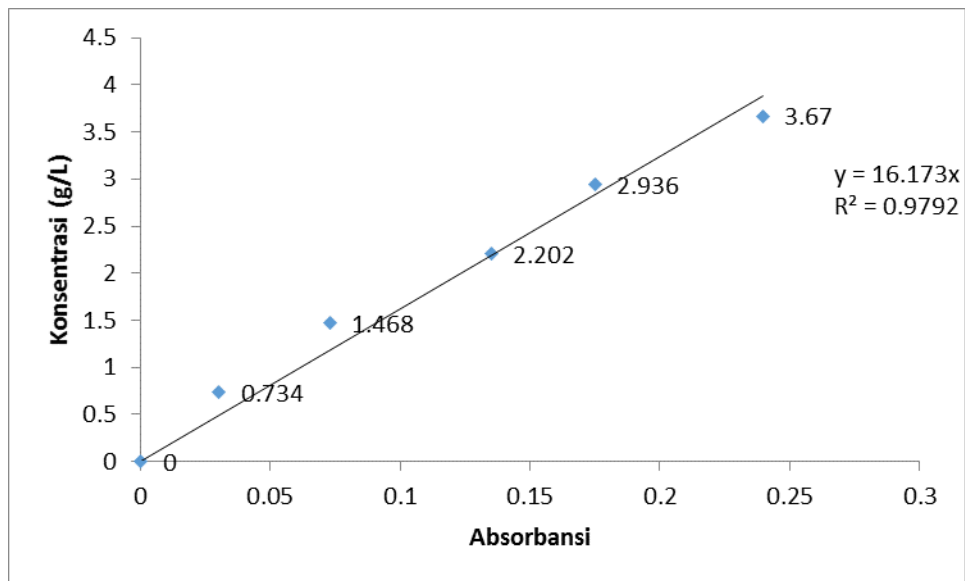
Misalkan pada pengenceran 1:4 (glukosa : buffer sitrat)

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi ditabung reaksi} &= \frac{\text{konsentrasi glukosa awal} \times \text{larutan glukosa}}{\text{volume total}} \\ &= \frac{3,67 \frac{\text{gram}}{\text{L}} \times 1 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} = 0,734 \text{ gram/L} \end{aligned}$$

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 didapat persamaan $y = 16,173x$ dengan sumbu x sebagai absorbansi dan sumbu y sebagai konsentrasi larutan glukosa (g/L).

Tabel E.1 Perhitungan Kurva Standar Glukosa untuk Menguji Konsentrasi Gula Reduksi

Larutan Glukosa (mL)	Buffer Sitrat pH 5 (mL)	Diambil (mL)	Aquades (mL)	DNS (mL)	Volume akhir (mL)	Konsentrasi (g/L)	Absorbansi			
							A1	A2	A3	Rata2
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
					(3+4+5)	(3 x Konsentrasi Glukosa)/6				
0	5	0.2	1.8	3	5	0	0	0	0	0
1	4	0.2	1.8	3	5	0.7340	0.0300	0.0300	0.0310	0.0303
2	3	0.2	1.8	3	5	1.4680	0.0730	0.0730	0.0730	0.0730
3	2	0.2	1.8	3	5	2.2020	0.1350	0.1350	0.1350	0.1350
4	1	0.2	1.8	3	5	2.9360	0.1760	0.1750	0.1740	0.1750
5	0	0.2	1.8	3	5	3.6700	0.2410	0.2400	0.2380	0.2397



Gambar E.1 Kurva Standar Glukosa untuk Analisa Gula Reduksi

Slope yang didapatkan pada gambar E.1 yaitu 16.173 kemudian digunakan untuk menghitung konsentrasi gula reduksi pada pretreatment autoclave, SCW, hidrolisis enzimatis dan pada fermentasi.

E.2 Perhitungan Konsentrasi, Massa dan Yield Gula Reduksi pada pretreatment Autoclave

VARIABEL			Massa Awal DSK (gr)	Volume (mL)	Absorbansi				Konsentrasi Gula Reduksi (g/L)	Massa Gula Reduksi (gr)/1000	Yield (/DSK)
P (bar)	T (°C)	Waktu (Menit)			A1	A2	A3	Rata-rata			
KOLOM			1	2	3	4	5	6	7	8	9
			Perhitungan						(6*SLOPE)	(7*2)/1000	(8/1)
1	121	15	6.0890	120	0.0970	0.0960	0.0980	0.0970	1.5687	0.1882	0.0309
		30	6.0681	120	0.0910	0.0910	0.0920	0.0913	1.4771	0.1773	0.0292
		45	6.0075	120	0.1070	0.1060	0.1060	0.1063	1.7197	0.2064	0.0344
		60	6.0098	120	0.1300	0.1280	0.1290	0.1290	2.0863	0.2504	0.0417

E.3 Massa dan Yield Gula Reduksi dari Pretreatment SCW

Variabel				Massa SCW	Volume SCW	Absorbansi				Konsentrasi Gula Reduksi	Massa Gula Reduksi	Yield
VARIABEL	P (bar)	T (°C)	t (menit)	(gram)	(mL)	A1	A2	A3	Rata-rata	(g/L)	(gr)/1000	(berat/berat)
Kolom	Perhitungan									(9 x slope)*	(10 x 5)*	(11/4)*
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
I	40	120	60	6.0208	120	0.158	0.156	0.155	0.156	2.528	0.303	0.05
II	40	130	60	6.0124	120	0.237	0.237	0.237	0.285	3.891	0.467	0.078
III	40	140	60	6.003	120	0.331	0.329	0.33	0.33	5.337	0.64	0.107
IV	40	150	60	6.0041	120	0.326	0.326	0.326	0.326	5.272	0.633	0.105
V	80	150	60	6.0132	120	0.456	0.455	0.456	0.456	7.481	0.897	0.149
VI	80	160	60	6.0282	120	0.294	0.297	0.296	0.296	4.782	0.574	0.095
VII	80	180	60	6.0123	120	0.197	0.198	0.198	0.198	3.197	0.384	0.064
VIII	80	200	60	6.0222	120	0.135	0.136	0.137	0.136	2.2	0.264	0.044
IX	160	200	60	6.0113	120	0.145	0.146	0.145	0.145	2.35	0.282	0.047
X	160	220	60	6.015	120	0.099	0.1	0.099	0.099	1.607	0.193	0.032
XI	160	260	60	6.0215	120	0.088	0.09	0.089	0.089	1.439	0.173	0.029
XII	160	300	60	6.0136	120	0.091	0.091	0.091	0.091	1.472	0.177	0.029

F. Perhitungan Kurva Standar Glukosa dan Xilosa untuk Mengukur Aktivitas Enzim

F.1 Perhitungan Kurva Standar Glukosa

$$\begin{aligned} \text{Massa glukosa} &= 0,367 \text{ gram} \\ \text{Volume buffer sitrat pH 5,5} &= 100 \text{ ml} \\ \text{BM glukosa} &= 180 \text{ gram/mol} \\ \text{Mol glukosa} &= \text{massa glukosa/BM} \\ &= 0,367 \text{ gram} / 180 \text{ gram/mol} \\ &= 2,03889 \times 10^{-3} \text{ mol} = 2038,89 \mu\text{mol} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi glukosa awal} &= \text{mol glukosa/ volume buffer sitrat pH 5,5} \\ &= 2038,89 \mu\text{mol} / 100 \text{ ml} \\ &= 20,3889 \mu\text{mol/ml} \end{aligned}$$

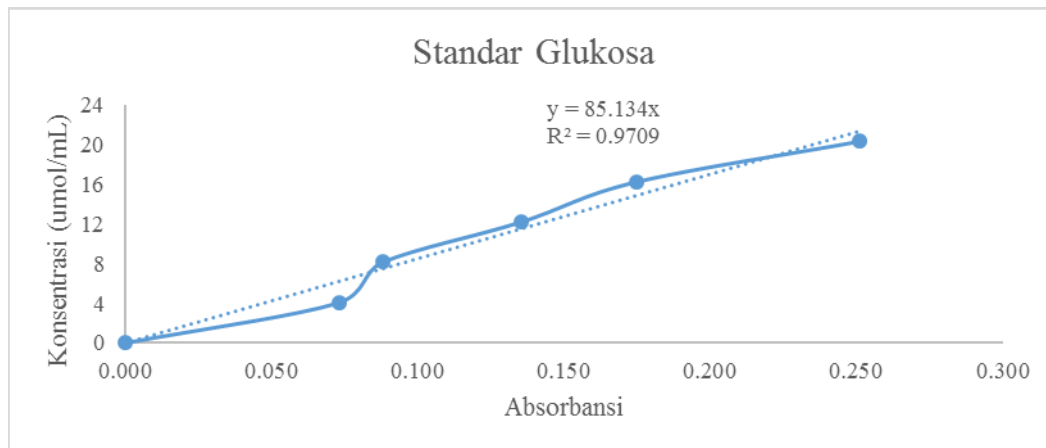
Misalkan pada pengenceran 1:4 (glukosa : buffer sitrat)

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi di tabung reaksi} &= \frac{\text{konsentrasi glukosa} \times \text{larutan glukosa}}{\text{volume total}} \\ &= \frac{20,3889 \frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}} \times 1 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \\ &= 4,0778 \mu\text{mol/ml} \end{aligned}$$

Untuk konsentrasi yang lain, perhitungan dapat dilakukan dengan langkah yang sama. Berikut tabel perhitungan untuk kurva standar glukosa

Tabel F.1 Perhitungan Kurva Standar Glukosa untuk perhitungan aktivitas enzim

Glukosa (mL)	Buffer (mL)	Diambil (mL)	CMC (mL)	V total (mL)	Konsentrasi	Absorbansi			
					$\mu\text{mol/ml}$	A1	A2	A3	Rata2
0	5	0.2	1.8	5	0	0	0	0	0
1	4	0.2	1.8	5	4.0778	0.073	0.073	0.073	0.073
2	3	0.2	1.8	5	8.1556	0.088	0.088	0.088	0.088
3	2	0.2	1.8	5	12.2333	0.135	0.135	0.136	0.135
4	1	0.2	1.8	5	16.3111	0.175	0.175	0.175	0.175
5	0	0.2	1.8	5	20.3889	0.251	0.251	0.251	0.251



Gambar F.1 Kurva Standar Glukosa untuk Perhitungan Aktivitas Enzim

Kemudian diplot antara konsentrasi glukosa vs absorbansi untuk tiap pengenceran, lalu dilakukan regresi linier dan didapat persamaan $y = 85.134x$ dengan y sebagai konsentrasi glukosa ($\mu\text{mol/ml}$) dan x sebagai absorbansi.

F.2 Perhitungan Kurva Standar Xilosa

Massa xilosa = 0,3678gram

Volume buffer sitrat pH 5,5 = 100 ml

BM xilosa = 50 gram/mol

Mol xilosa = massa xilosa/BM xilosa
 = 0,3678 gram / 150 gram/mol
 = 0,0025 mol
 = 2452 μmol

Konsentrasi xilosa awal = mol xilosa/ volume buffer sitrat pH 5,5
 = 2452 $\mu\text{mol}/100$ ml
 = 24,52 $\mu\text{mol/ml}$

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

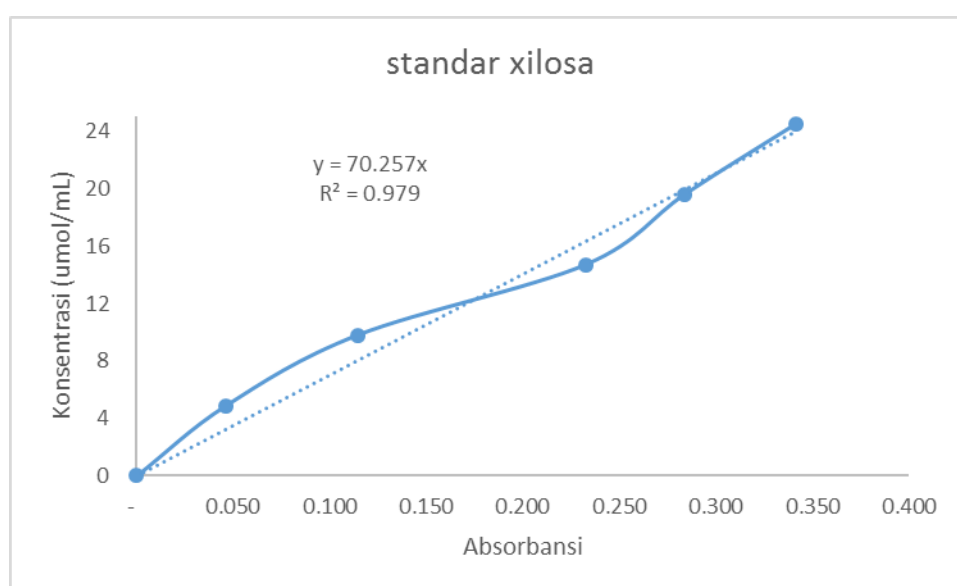
Konsentrasi di tabungreaksi = $\frac{\text{konsentrasi xilosa awal} \times \text{larutan xilosa}}{\text{volume total}}$
 = $\frac{24,52 \mu\text{mol/ml} \times 1 \text{ ml}}{5 \text{ ml}}$
 = 4,904 $\mu\text{mol/ml}$

Untuk konsentrasi yang lain, perhitungan dapat dilakukan dengan langkah yang sama. Berikut tabel perhitungan untuk kurva standar xylosa.

Tabel F.2 Perhitungan Kurva Standar Xilosa untuk Perhitungan Aktivitas Enzim

Larutan Xylosa (mL)	Buffer (mL)	Diambil (mL)	Xylan (mL)	V Total (mL)	Konsentrasi	Absorbansi (Blanko =0:5)			
						$\mu\text{mol/ml}$	Sampel 1		
					A1		A2	A3	Rata2
0	5	0.2	1.8	5	0.000	0	0	0	0
1	4	0.2	1.8	5	4.904	0.046	0.047	0.046	0.046
2	3	0.2	1.8	5	9.808	0.114	0.114	0.115	0.114
3	2	0.2	1.8	5	14.712	0.232	0.233	0.232	0.232
4	1	0.2	1.8	5	19.616	0.284	0.283	0.284	0.284
5	0	0.2	1.8	5	24.520	0.341	0.342	0.341	0.341

Kemudian diplot antara konsentrasi xilosa vs absorbansi untuk tiap pengenceran, lalu dilakukan regresi linier dan didapat persamaan $y = 70.257x$ dengan y sebagai konsentrasi xilosa ($\mu\text{mol/ml}$) dan x sebagai absorbansi.



Gambar F.2 Kurva Standar Xilosa untuk Perhitungan Aktivitas Enzim

G. PERHITUNGAN ENZIM

G.1. Pengukuran aktivitas enzim selulase *aspergillus niger*:

Pengukuran aktivitas enzim selulase

Absorbansi larutan sebelum koreksi (A1) = 0,962

Absorbansi larutan koreksi (A2) = 0,826

Absorbansi larutan setelah koreksi (A) = A1 - A2 = 0,136

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi glukosa} &= A \times \text{slope kurva standar glukosa} \\ &= 0,136 \times 85.134 \\ &= 11.5782 \mu\text{mol/ml} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas enzim selulase (U/ml)} &= \text{Konsentrasi glukosa/ Waktu inkubasi} \\ &= 11.5782 \mu\text{mol} / 10 \text{ menit} \\ &= 1.158 \text{ U / volume enzim} \end{aligned}$$

G.2. Pengukuran aktivitas enzim xilanase

$$\text{Absorbansi larutan sebelum koreksi (A1)} = 0.711$$

$$\text{Absorbansi larutan koreksi (A2)} = 0,212$$

$$\begin{aligned} \text{Absorbansi larutan setelah koreksi (A)} &= A1 - A2 \\ &= 0,499 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi xilosa} &= A \times \text{slope kurva standar xilosa} \\ &= 0.499 \times 70.257 \\ &= 35.506 \mu\text{mol/ml} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas enzim xilanase (U/ml)} &= \text{Konsentrasi xilosa/ waktu inkubasi} \\ &= 35.506 \mu\text{mol} / 10 \text{ menit} \\ &= 3.506 \text{ U/ml} \end{aligned}$$

G.3 Perhitungan Kebutuhan Enzim

Dari hasil perhitungan aktivitas enzim ini selanjutnya dilakukan perhitungan untuk kebutuhan enzim campuran selulase dan xilanase. Konsentrasi enzim selulase dan xilanase yang digunakan dalam hidrolisis ini masing-masing 18,6 U/ 1 gram sampel. Berikut perhitungan untuk mendapatkan kebutuhan enzim campuran:

$$\begin{aligned} \text{Kebutuhan Enzim Campuran} &= \text{Kebutuhan enzim selulase} + \text{kebutuhan enzim} \\ &\quad \text{xilanase} \\ &= \frac{18,6 \text{ U}}{1.158 \text{ U/mL}} + \frac{18,6 \text{ U}}{3.506 \text{ U/mL}} \\ &= 16.065 \text{ mL} + 5.305 \text{ mL} = 21.37 \text{ mL} \end{aligned}$$

H. Perhitungan Gula Reduksi Hidrolisis Enzimatik

Tabel H.1 Konsentrasi, Massa dan Yield Gula Reduksi Hasil Hidrolisis Enzimatik

Jam Ke-	VARIABEL											
	Untreated						SCW 40 bar & 120					
	MH (gram)	VH (mL)	A	K (g/L)	MG (gram)/1000	Y	MH (gram)	VH (mL)	A	K (g/L)	MG (gram)/1000	Y
				(3 x Slope)	(4 x 2)	(5/ 1)				(3 x Slope)	(4 x 2)	(5/ 1)
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	1.1152	30	0.159	2.572	0.077	0.069	1.0126	30	0.148	2.394	0.072	0.071
12	1.1152	30	0.175	2.830	0.085	0.076	1.0126	30	0.172	2.782	0.083	0.082
18	1.1152	30	0.171	2.766	0.083	0.074	1.0126	30	0.165	2.663	0.080	0.079
24	1.1152	30	0.142	2.297	0.069	0.062	1.0126	30	0.159	2.577	0.077	0.076
36	1.1152	30	0.131	2.119	0.064	0.057	1.0126	30	0.147	2.372	0.071	0.070
48	1.1152	30	0.131	2.119	0.064	0.057	1.0126	30	0.142	2.291	0.069	0.068

Keterangan:

MH = Massa Awal Hidrolisis Enzimatik

VH = Volume Hidrolisis Enzimatik

A = Absorbansi

K = Konsentrasi Gula Reduksi

MG = Massa Gula Reduksi

Y = Yield

Slope = Slope pada kurva standar Glukosa (E.4)

Jam Ke-	Variabel																	
	SCW 40 bar & 130						SCW 40 bar & 140						SCW 40 bar & 150					
	MH (gram)	VH (mL)	A	K (g/L)	MG (gram)	Y	MH (gram)	VH (mL)	A	K (g/L)	MG (gram)	Y	MH (gram)	VH (mL)	A	K (g/L)	MG (gram)/ 1000	Y
				(3 x Slope)	(4 x 2)/ 1000	(5/ 1)				(3 x Slope)	(4 x 2)/ 1000	(5/ 1)				(3 x Slope)	(4 x 2)	(5/ 1)
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.05	0	0	0	0	0
6	1.0126	30	0.229	3.709	0.111	0.110	1.0126	30	0.195	3.148	0.094	0.093	1.05	30	0.204	3.305	0.099	0.094
12	1.0126	30	0.188	3.035	0.091	0.090	1.0126	30	0.154	2.496	0.075	0.074	1.05	30	0.174	2.809	0.084	0.080
18	1.0126	30	0.136	2.205	0.066	0.065	1.0126	30	0.162	2.625	0.079	0.078	1.05	30	0.175	2.836	0.085	0.081
24	1.0126	30	0.160	2.588	0.078	0.077	1.0126	30	0.163	2.631	0.079	0.078	1.05	30	0.175	2.830	0.085	0.081
36	1.0126	30	0.159	2.572	0.077	0.076	1.0126	30	0.161	2.604	0.078	0.077	1.05	30	0.174	2.819	0.085	0.081
48	1.0126	30	0.148	2.388	0.072	0.071	1.0126	30	0.124	2.011	0.060	0.060	1.05	30	0.168	2.712	0.081	0.077

Jam Ke-	Variabel																	
	SCW 80 bar & 150°C						SCW 80 bar & 160°C						SCW 80 bar & 180°C					
	MH (gram)	VH (mL)	A	K (g/L)	MG (gram)	Y	MH (gram)	VH (mL)	A	K (g/L)	MG (gram)	Y	MH (gram)	VH (mL)	A	K (g/L)	MG (gram)/1000	Y
				(3 x Slope)	(4 x 2)/1000	(5/ 1)				(3 x Slope)	(4 x 2)/1000	(5/ 1)				(3 x Slope)	(4 x 2)	(5/ 1)
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.05	0	0	0	0	0
6	1.0321	30	0.181	2.922	0.088	0.085	1.1908	30	0.203	3.283	0.098	0.083	1.0821	30	0.190	3.041	0.091	0.084
12	1.0321	30	0.175	2.825	0.085	0.082	1.1908	30	0.207	3.359	0.101	0.085	1.0821	30	0.165	2.663	0.080	0.074
18	1.0321	30	0.177	2.857	0.086	0.083	1.1908	30	0.191	3.084	0.093	0.078	1.0821	30	0.166	2.696	0.081	0.075
24	1.0321	30	0.165	2.669	0.080	0.078	1.1908	30	0.170	2.744	0.082	0.069	1.0821	30	0.164	2.652	0.080	0.074
36	1.0321	30	0.171	2.766	0.083	0.080	1.1908	30	0.155	2.512	0.075	0.063	1.0821	30	0.162	2.636	0.079	0.073
48	1.0321	30	0.171	2.771	0.083	0.081	1.1908	30	0.155	2.512	0.075	0.063	1.0821	30	0.166	2.685	0.081	0.074

Jam Ke-	Variabel																	
	SCW 80 bar & 200°C						SCW 160 bar & 200°C						SCW 160 bar & 220°C					
	MH (gram)	VH (mL)	A	K (g/L)	MG (gram)	Y	MH (gram)	VH (mL)	A	K (g/L)	MG (gram)	Y	MH (gram)	VH (mL)	A	K (g/L)	MG (gram)/1000	Y
				(3 x Slope)	(4 x 2)/1000	(5/ 1)				(3 x Slope)	(4 x 2)/1000	(5/ 1)				(3 x Slope)	(4 x 2)	(5/ 1)
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	1.019	30	0.190	3.041	0.091	0.090	1.014	30	1.014	2.388	0.072	0.071	1.007	30	0.135	2.178	0.065	0.065
12	1.019	30	0.163	2.631	0.079	0.077	1.014	30	1.014	2.280	0.068	0.067	1.007	30	0.137	2.216	0.066	0.066
18	1.019	30	0.168	2.717	0.082	0.080	1.014	30	1.014	2.318	0.070	0.069	1.007	30	0.134	2.167	0.065	0.065
24	1.019	30	0.166	2.685	0.081	0.079	1.014	30	1.014	2.313	0.069	0.068	1.007	30	0.139	2.248	0.067	0.067
36	1.019	30	0.165	2.674	0.080	0.079	1.014	30	1.014	2.313	0.069	0.068	1.007	30	0.144	2.329	0.070	0.069
48	1.019	30	0.165	2.652	0.080	0.078												

Jam Ke-	Variabel											
	SCW 160 bar & 260°C						SCW 160 bar & 300°C					
	MH (gram)	VH (mL)	A	K (g/L)	MG (gram)	Y	MH (gram)	VH (mL)	A	K (g/L)	MG (gram)	Y
				(3 x Slope)	(4 x 2)/1000	(5/ 1)				(3 x Slope)	(4 x 2)/1000	(5/ 1)
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	1.012	30	0.160	2.582	0.077	0.077	1.0137	30	0.154	2.485	0.075	0.074
12	1.012	30	0.136	2.200	0.066	0.065	1.0137	30	0.170	2.744	0.082	0.081
18	1.012	30	0.144	2.334	0.070	0.069	1.0137	30	0.150	2.426	0.073	0.072
24	1.012	30	0.150	2.431	0.073	0.072	1.0137	30	0.151	2.448	0.073	0.072
36	1.012	30	0.140	2.270	0.068	0.067	1.0137	30	0.150	2.431	0.073	0.072

Keterangan:

MH = Massa Awal Hidrolisis Enzimatik

VH = Volume Hidrolisis Enzimatik

A = Absorbansi

K = Konsentrasi Gula Reduksi

MG = Massa Gula Reduksi

Y = Yield

Slope = Slope pada kurva standar Glukosa (E.4)

Hasil gula reduksi terbaik pada tiap variabel dengan selang waktu tertentu yang ditunjukkan pada Tabel H.1 kemudian digunakan untuk menentukan massa total yang didapatkan dari hidrolisis enzimatik.

$$\text{Massa Total Gula reduksi} = \text{Massa gula reduksi dalam 1 gram massa akhir SCW} \times \frac{\text{total massa akhir SCW}}{\text{massa awal enzimatik}}$$

Contoh perhitungan pada variabel 40 bar; 130°C

Massa gula reduksi = 0.083 gram

Massaa akhir SCW = 4.7042 gram

Massa awal hidrolisis = 1.013 gram

$$\begin{aligned} \text{Massa Total Gula reduksi} &= 0.111 \text{ gram} \times \frac{4.7042 \text{ gram}}{1.013 \text{ gram}} \\ &= 0.517 \text{ gram} \end{aligned}$$

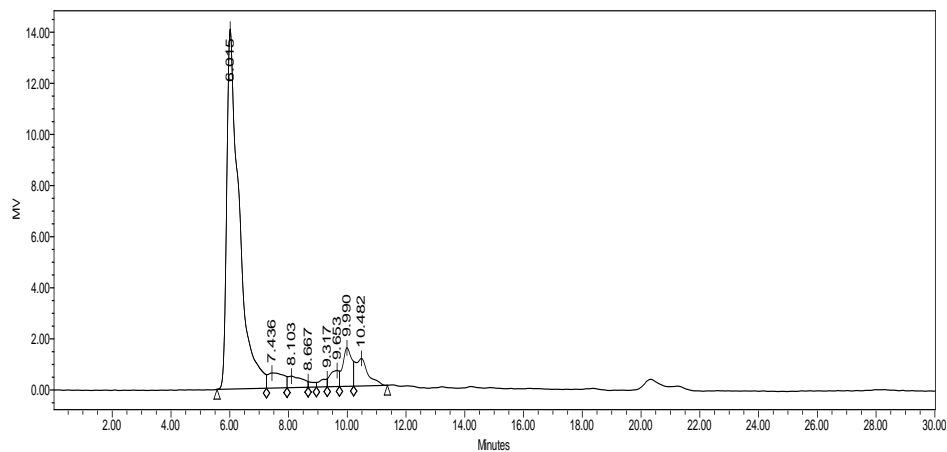
Untuk perhitungan massa total gula reduksi hasil enzimatik dapat dilakukan dengan perhitungan yang sama. Hasil perhitungan massa total gula reduksi ditunjukkan pada Tabel H.2

Tabel H.2 Maksimum Konsentrasi dan Massa Gula Reduksi Hasil Hidrolisis Enzimatik

NO	Variabel		Gula Reduksi (g/L)	Massa Gula Reduksi /gram hidrolisat	Massa Total Gula Reduksi Enzimatik (gram)
	P (bar)	T °C			
1	40	120	2.782	0.083	0.395
2		130	3.709	0.111	0.517
3		140	3.148	0.094	0.429
4		150	3.305	0.099	0.384
5	80	150	2.922	0.088	0.357
6		160	3.359	0.101	0.330
7		180	3.041	0.091	0.331
8		200	3.041	0.091	0.351
9	160	200	2.388	0.072	0.265
10		220	2.329	0.070	0.241
11		260	2.582	0.077	0.223
12		300	2.744	0.082	0.211

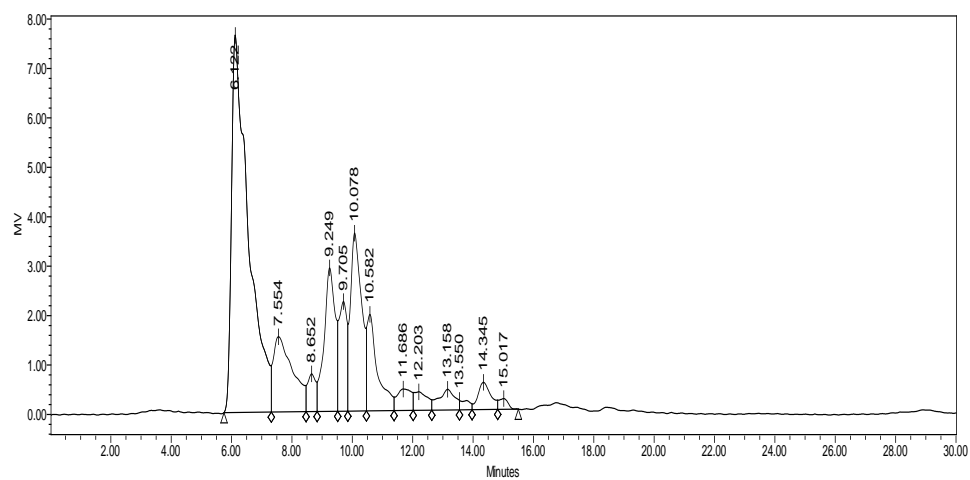
I. Hasil Analisa HPLC

Gambar I.1 Analisa HPLC Hasil Pretreatment SCW 40 bar dan 130°C



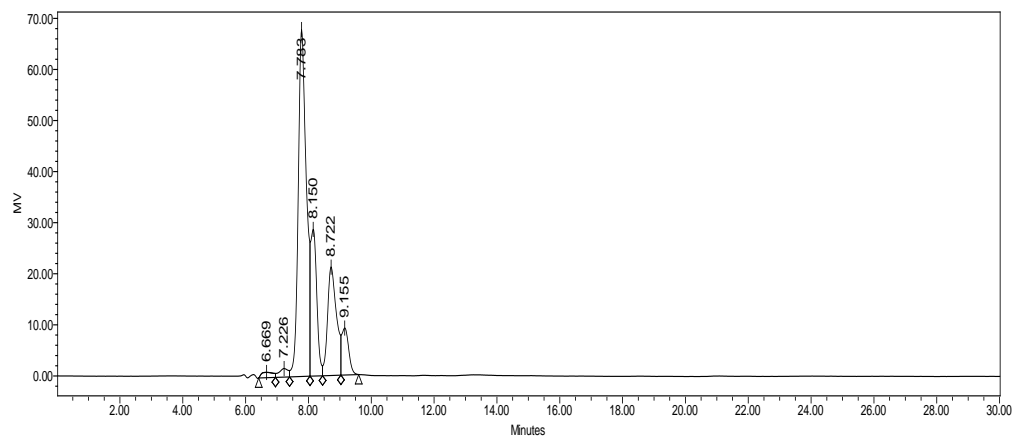
No	Name	Retention Time	Area	% Area	Height
1	glukosa	8,667	3213	0.60	219
2	xylosa	9,317	5573	1.04	314

Gambar I.2 Analisa HPLC Hasil Pretreatment SCW 80 bar dan 150°C



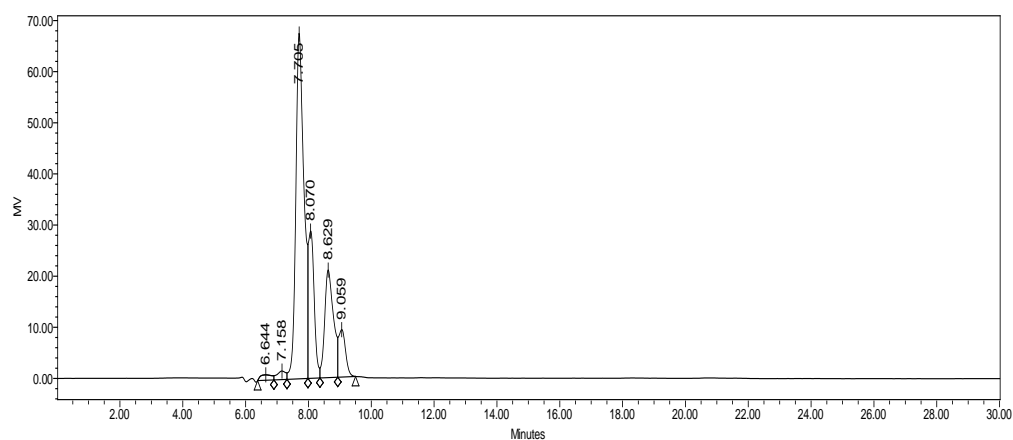
No	Name	Retention Time	Area	% Area	Height
1	glukosa	8,652	14498	2.06	764
2	xylosa	9,249	74217	10.54	2905

Gambar I.3 Analisa HPLC Hasil Pretreatment Enzimatik 40 bar dan 130°C



No	Name	Retention Time	Area	% Area	Height
1	glukosa	8,722	420715	18.80	21275
2	xylosa	9,155	143687	6.42	9217

Gambar I.4 Analisa HPLC Hasil Enzimatik SCW 80 bar dan 150°C



No	Name	Retention Time	Area	% Area	Height
1	glukosa	8,629	410091	18.61	21080
2	xylosa	9,059	144875	6.57	9305

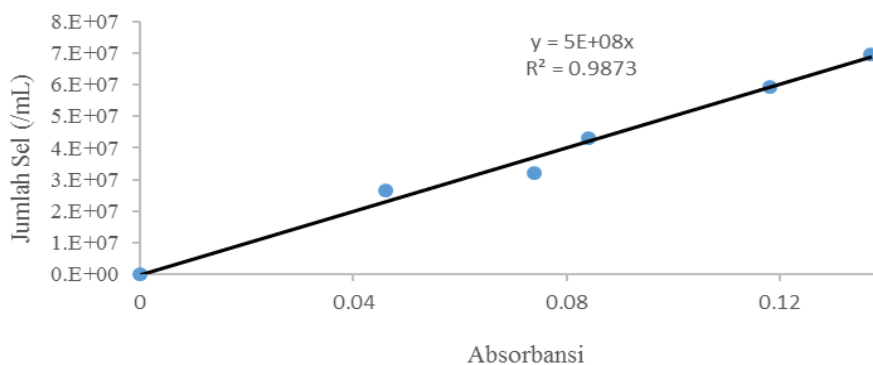
J. Fermentasi Gula Reduksi

J.1 Fermentasi Liquid Hasil Pretreatment Air Subkritis

Tabel J.1 Kurva Standar Jumlah Sel dan Gas H₂

Data Absorbansi dan Jumlah Sel *Enterobacter aerogenes* untuk Kurva Kalibrasi Jumlah Sel

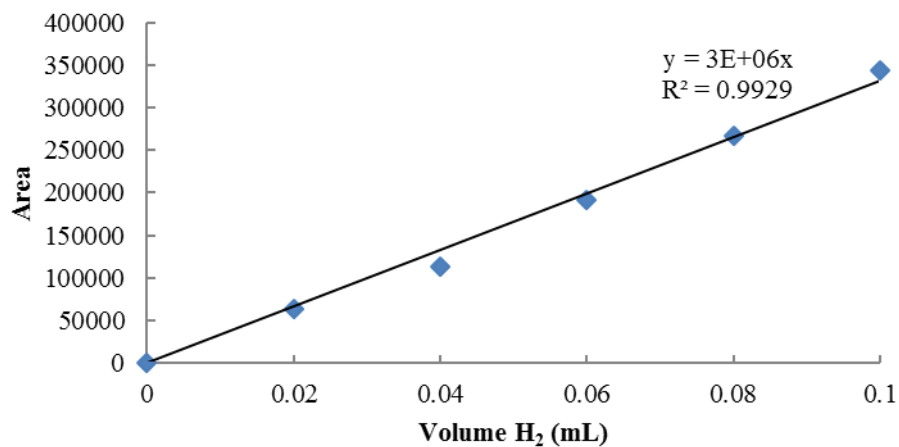
Jumlah Sel (/mL)	Absorbansi
0	0
26.500.000	0,0460
32.000.000	0,0740
43.000.000	0,0840
59.500.000	0,1180
69.500.000	0,1370



Gambar J.1 Kurva Kalibrasi Jumlah Sel *Enterobacter aerogenes*

Tabel J.2 Konsentrasi Gula Reduksi dan Jumlah Sel Hasil Fermentasi Liquid SCW 150°C & 80 bar

Jam	Glukosa ($\lambda = 540$ nm)			Bakteri ($\lambda = 600$ nm)	
	Absorbansi	Konsentrasi (g/L)	Konsentrasi (mol/L)	Absorbansi	Jumlah Sel (10 juta sel/mL)
0	0,124	1,89	0,0105	0,3	15,4
6	0,119	1,81	0,0100	0,4	20,5
12	0,100	1,52	0,0085	0,6	30,1
18	0,098	1,49	0,0083	0,7	35,5
24	0,073	1,11	0,0061	0,9	43,5
30	0,090	1,37	0,0076	1,42	70,8
36	0,045	0,69	0,0038	1,24	61,8
42	0,032	0,482	0,0027	1,08	54,1
48	0,038	0,573	0,0032	1,44	71,1



Gambar J.2 Kurva Kalibrasi H₂ untuk Analisa *Gas Chromatograph*

J.1.2 Perhitungan Yield Hidrogen Liquid Hasil Pretreatment Air Subkritis

Tabel J.3 Data Hasil Perhitungan Analisa GC Hidrolisat SCW Sabut Kelapa
80 bar, 150°C

Jam	V. gas (mL)	Σ V. Gas (mL)	Area H ₂	V. H ₂ syringe (mL)	V. total H ₂ (mL)	H ₂ (mmol)	Σ H ₂ (mmol)	Glukosa (mol/L)	Yield (mol H ₂ /mol TRS.)
6	64	64	5.072	0,0017	0,541	0,0213	0,0213	0,0100	0,039
12	136	200	4.010	0,0013	0,909	0,0358	0,0570	0,0085	0,104
18	38,4	238,4	4.756	0,0016	0,304	0,0120	0,0690	0,0083	0,126
24	11,2	249,6	3.005	0,0010	0,056	0,0022	0,0712	0,0061	0,130
30	33,28	282,88	3.221	0,0011	0,179	0,0070	0,0782	0,0076	0,143
36	30,08	312,96	3.624	0,0012	0,182	0,0072	0,0854	0,0038	0,156
42	21,12	334,08	3.046	0,0010	0,107	0,0042	0,0896	0,0027	0,163
48	32,16	366,24	3.035	0,0010	0,163	0,0064	0,0960	0,0032	0,175

J.2 Fermentasi Liquid Hasil Hidrolisis Enzimatik

Tabel J.4 Konsentrasi Gula Reduksi dan Jumlah Sel Hasil Fermentasi Produk Enzimatik

Jam	Gula Reduksi selama Fermentasi		Perhitungan Jumlah Sel (per 10 juta sel)	
	Absorbansi	Gula reduksi (g/L)	Absorbansi	Jumlah Sel
0	0.150	2.471	0.000	0.0
6	0.117	1.927	0.592	23.69
12	0.103	1.697	1.079	43.15
18	0.092	1.516	1.082	43.28
30	0.090	1.483	1.146	45.84
42	0.088	1.450	1.176	47.04
48	0.070	1.153	1.210	48.40

Tabel J.4 Data Hasil Perhitungan Analisa GC Hidrolisat Hasil Enzimatik Sabut Kelapa 80 bar, 150°C

Jam	$\Sigma V.$ Gas	Area H_2	V. H_2 syringe	V. total H_2	H_2	ΣH_2	Konsentrasi Glukosa	Yield
	(mL)		(mL)	(mL)	(mmol)	(mmol)	(mol/L)	(mol H_2 /mol TRS.)
0	0	0	0	0	0	0	0.0192	0
6	10	2,501	0.0008	0.0417	0.002	0.002	0.0107	0.003
12	35	2,854	0.0010	0.1684	0.007	0.008	0.0094	0.013
18	49	2,091	0.0007	0.1715	0.007	0.015	0.0084	0.024
30	71	2,308	0.0008	0.2731	0.011	0.026	0.0082	0.040
42	106	2,480	0.0008	0.4398	0.017	0.043	0.0081	0.068
48	136	2,562	0.0009	0.5824	0.023	0.066	0.0064	0.104

Keterangan Tabel J.4:

1. V gas : volume gas dalam sampling bag, diukur menggunakan sistem pemindahan air.
2. ΣV gas : volume gas kumulatif
3. Area : area peak dari kromatogram
4. V di syringe : volume sampel gas yang disuntikkan ke GC (0,2ml)
5. H_2 di syringe dihitung dari persamaan kurva kalibrasi,

$$H_2 = \frac{\text{area}}{\text{slope} (3 \times 10^6)}$$

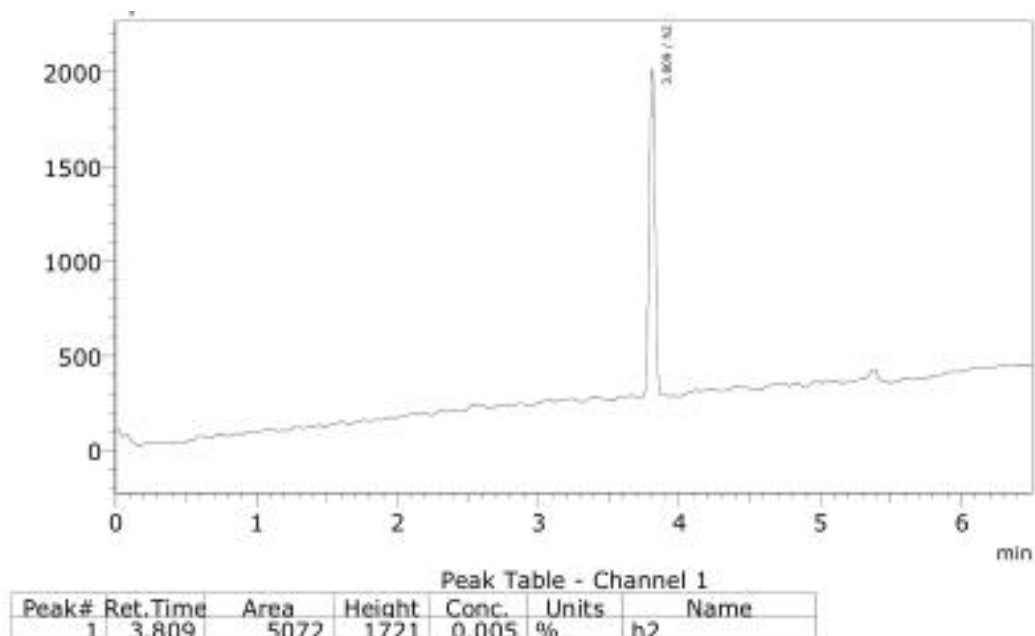
6. Volume H₂ dalam *sampling bag* dihitung sebagai berikut :

$$H_2 = \frac{\text{vol H}_2 \text{ disyringe}}{\text{Volume gas dalam syringe}} \times \text{volume gas dalam sampling bag}$$

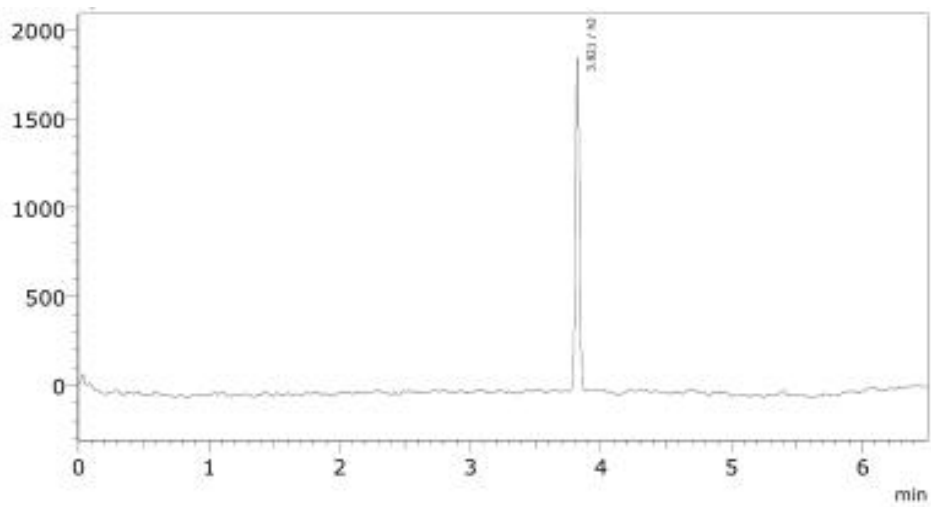
$$\text{mol H}_2 = \frac{P \times \text{Vol H}_2}{R \times T}, \text{ dimana } P = 1 \text{ atm, } R = 0.082 \text{ atm.L/mol.K, } T = 310 \text{ K}$$

J. Kromatogram dari Hasil Analisa Gas Menggunakan *Gas Chromatography* (GC)

Kromatogram pada jam ke 6 Fermentasi :



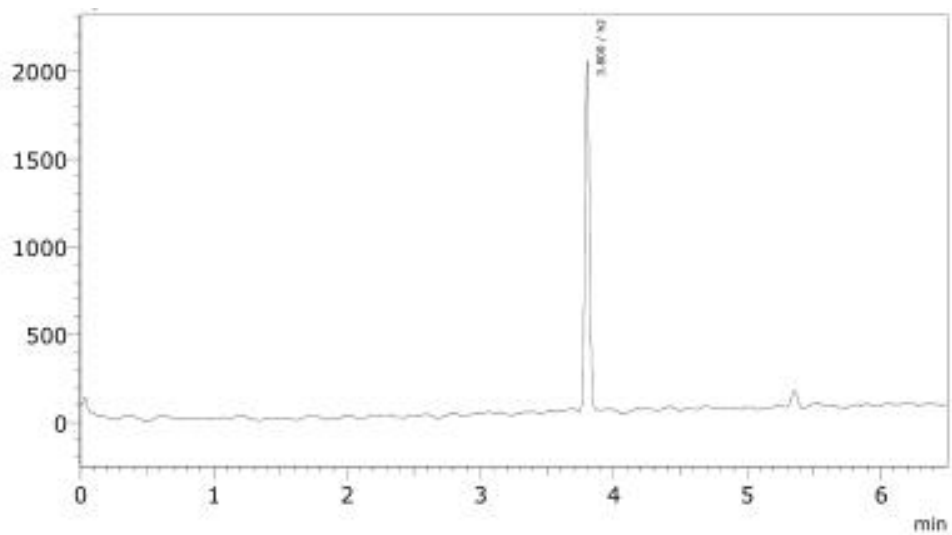
Kromatogram pada jam ke 12 Fermentasi :



Peak Table - Channel 1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Units	Name
1	3.821	4010	1798	0.004	%	h2

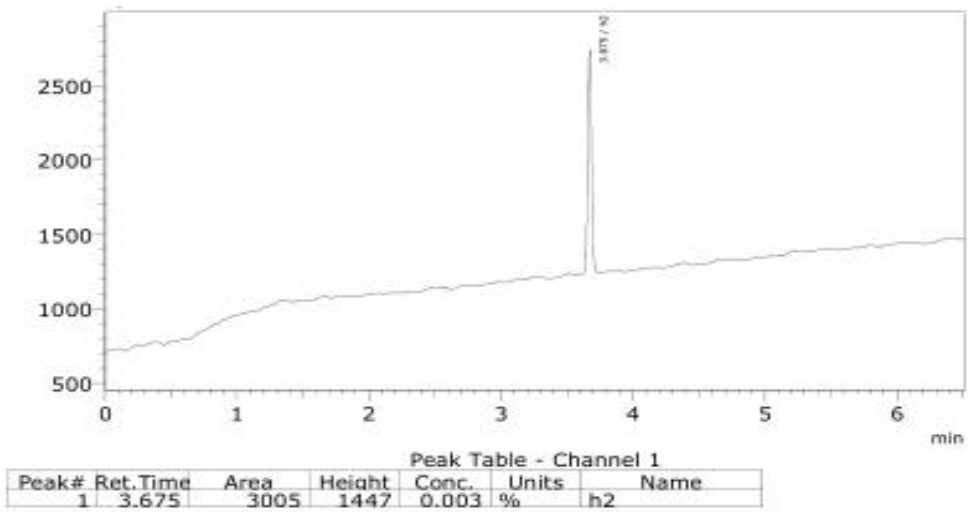
Kromatogram pada jam ke 18 Fermentasi :



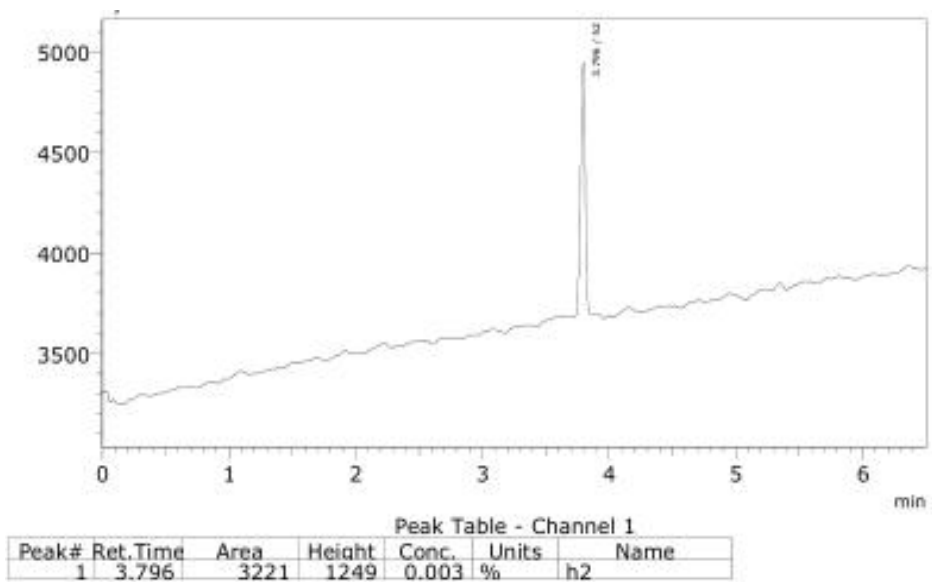
Peak Table - Channel 1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Units	Name
1	3.800	4756	1974	0.005	%	h2

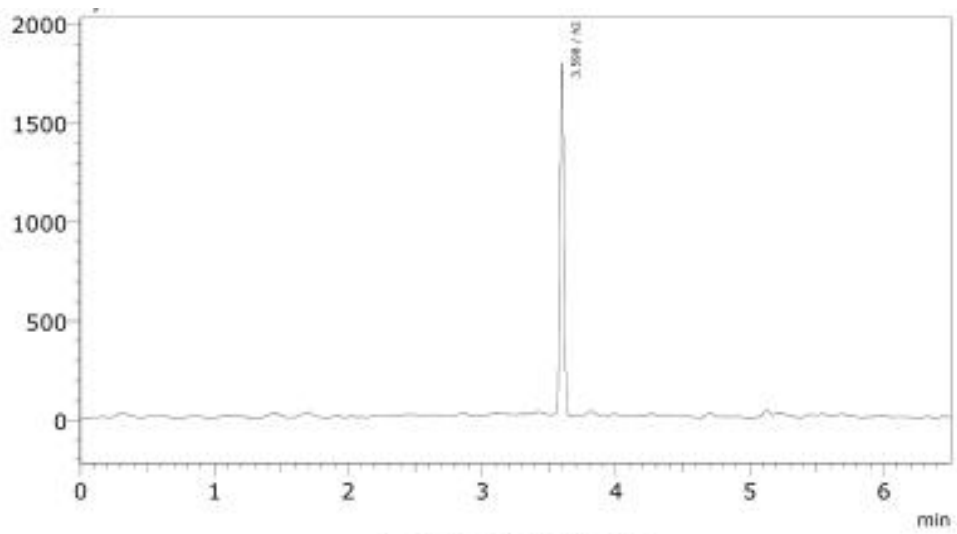
Kromatogram pada jam ke 24 Fermentasi :



Kromatogram pada jam ke 30 Fermentasi :



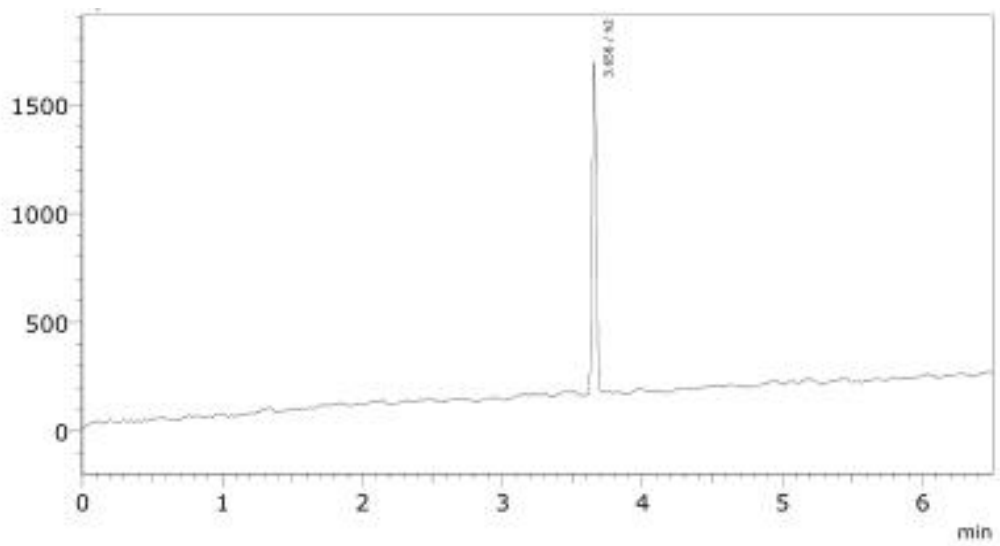
Kromatogram pada jam ke 36 Fermentasi :



Peak Table - Channel 1

Peak#	Ret.Time	Area	Height	Conc.	Units	Name
1	3.598	3624	1767	0.003	%	h2

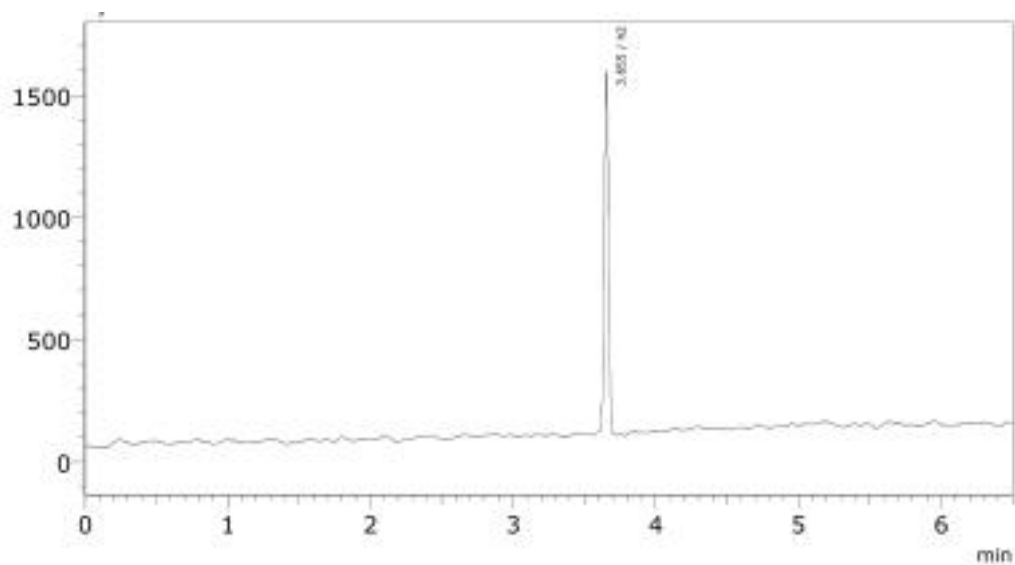
Kromatogram pada jam ke 42 Fermentasi :



Peak Table - Channel 1

Peak#	Ret.Time	Area	Height	Conc.	Units	Name
1	3.656	3046	1513	0.003	%	h2

Kromatogram pada jam ke 48 Fermentasi :



Peak Table - Channel 1

Peak#	Ret.Time	Area	Height	Conc.	Units	Name
1	3.655	3035	1463	0.003	%	h2

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian dan analisa yang dilakukan maka diperoleh hasil sebagai berikut:

1. Sabut kelapa sebagai bahan berlignoselulosa dapat didegradasi menjadi gula reduksi dengan menggunakan pretreatment air subkritis (SCW). Massa gula reduksi tertinggi pada pretreatment SCW sebesar 0.897 g pada kondisi operasi 150°C; 80 bar dan waktu reaksi 60 menit.
2. Massa gula reduksi setelah hidrolisis enzimatis tertinggi pada 40 bar; 130°C; dengan waktu reaksi 60 menit yaitu 0.517 g.
3. Yield total hidrogen dari variabel 80 bar dan 150°C sebesar 0,279 mol H₂/mol gula reduksi terkonsumsi yang didapatkan dari yield hidrogen dari hidrolisat SCW 0,175 dan yield dari hidrolisat enzimatis 0,104 mol/mol gula reduksi terkonsumsi.

1.2 Saran

Saran untuk penelitian selanjutnya yaitu:

1. Sebaiknya menggunakan gas penekan N₂ dan membandingkannya dengan hasil penelitian ini yang menggunakan gas penekan CO₂ untuk melihat pengaruh CO₂ selama pretreatment SCW.
2. Sebaiknya ditambahkan kondisi operasi pada temperatur yang konstan dengan variabel tekanan sehingga dapat dibandingkan konsentrasi gula reduksi yang didapatkan pada tekanan konstan dan variasi temperatur.

Halaman ini sengaja dikosongkan

DAFTAR PUSTAKA

- Ahamed, A. P., dan Vermette (2008), "Culture-based Strategies to Enhance Cellulase Enzyme Production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in Bioreactor Culture Conditions", *Biochemical Engineering Journal* 40, 399–407.
- Aida, T.M., Shiraishi, N., Kubo, M., Watanabe, M., Smith Jr., R.L., 2010, "Reaction kinetics of D-xylose in sub- and super critical water". *The Journal of Supercritical Fluids* 55, 208–216.
- Alexander M., D.A. Hopwood, B.H. Iglewski, and A.I. Laskin, 1992, *Encyclopedia of Microbiology*, 1, Academic Press, Inc., New York.
- Anam K., 2010, "Pemanfaatan Biomassa untuk Produksi Biohidrogen", *Bioteknologi*, Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Angelidaki I., L. Ellegaard, A. H. Sorensen, dan J. E. Schmidt., 2002, *Anaerobic Processes*, Copenhagen.
- Anwar, N., Widjaja, A., Winardi, S. 2011, "Study of The Enzymatic Hydrolysis of Alkaline Pretreated Rice Straw Using Cellulase of Various Sources and Compositions", *International Review of Chemical Engineering*, 3, 2
- Arai, K., 2002, "Supercritical Fluid Molecular Interaction, Physical Properties and New Application", Springer, Berlin.
- Bailey J.E., D.F. Ollis. 1986, "Biochemical Engineering Fundamentals", 2nd Ed., McGraw-Hill International Edition, Singapore.
- Benneman J., 1997, "The Technology of biohydrogen Proceedings of Internasional Conference on Biological Hydrogen Production, . 18-30.
- Bilba K., Arsene, M-A., and Ouensanga A., 2007, "Study of banana and coconut Wbers Botanical composition, thermal degradation and textural observations", *Bioresource Technology*, 98:58–68.
- Bossel U., 2003, "Well-to-Wheel Studies, Heating Values, and the Energy Conservation Principle", European Fuel Cell Forum.
- Broll D., Claudia K., Alexander K., Petra K., Thomas R., Matthias J., Herbert V., Peter Z., 1999, "Chemistry in Supercritical Water. Review", *Angew Chem Int*, . 38, . 2998 – 3014.
- Campbell R., 2010, "Biologi Edisi 8 Jilid 1 (Terjemahan)", Erlangga, Jakarta.

- Chen C.Y., Yang, M.H., Yeh, K.L., Liu, C.H., Chang, J.S., 2008, Biohydrogen Production using Sequential two-stage dark and photo fermentation processes, *Int. J. Hydrogen Energy*, 33, 4755–4762.
- Cheng J. J., & Timilsina, G. R., 2011, “Status And Barriers Of Advanced Biofuel Technologies: A Review”, *Renewable Energy*, . 36, . 3541-3549.
- Cheng J., Song, W., Xia, A., Su, H., Zhou, J., Cen, K., 2012, Sequential generation of hydrogen and methane from xylose by two-stage anaerobic fermentation, *Int. J. Hydrogen Energy*, 37, 13323–13329.
- Cheng J., Lingkan, D., Ao Xia., Yuyou L., Junhu,Z., Kefa C., 2014, “Hydrogen Production Using Amino Acids Obtained By Protein Degradation In Waste Biomass By Combined Dark- And Photo-Fermentation”, *Bioresource. Technology*, 179, 13-19.
- Ciftci D., Marleny D.A., Saldaña., 2015, “Hydrolysis of sweet blue lupin hull using subcritical water technology”, *Bioresource. Technology*, 194, 75-82
- Dahot M.U., dan M.H. Noomrio, 1996, “Microbial Production of Cellulases by *Aspergillus Fumigatus* Using Wheat Straw as A Carbon Source”, *Journal of Islamic Academy of Sciences*, 9:4, 119-124.
- Dashtban M., Schraft, H., Qin, W., 2009, Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residue, *Bioresource Technology*. 578-595.
- Datta and Rathin, 1981, “Acidogenic Fermentation of Lignocellulose- Acid Yield and Conversion of Components”, *Biotechnology and Bioengineering*, 23:2167-2170.
- Douglas B. Rivers & George H. Emert, 1988, “Factor Affecting The Enzymatic Hydrolysis of Bagasse and Rice Straw”, *Biological Waste* 26:58-95, Auburn University Press, Alabama, USA.
- Fengel D. & Wegener G. 1984. *Wood: Chemistry, Ultrastructure and Reactions*. De Gruyter. Berlin, pp.217-20.
- Fessenden dan Fessenden, 1986, “Organic Chemistry” California; Wadsworth, Inc
- Fox, P.F. 1991. *Food Enzymology*, 1, Elsevier Applied Science Ltd., New York
- Gerhartz W. 1990. *Enzymes in Industry : Production and Applications*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, D. 6940 Weinheim p. 81-82.
- Girio F.M., Fonseca, C, Carvalheiro, F., Duarte, L.C., Marques, S., Lukasik, R.B., 2010, “Hemicellulose for fuel ethanol: A review”, *Bioresource Technology*, . 101, . 4775-4800.

- Gunasekaran K., Annadurai R., and Kumar P. S., 2012, "Long Term Study On Compressive And Bond Strength Of Coconut Shell Aggregate Concrete". *Journal of Applied Polymer Science*, 104, 208–215.
- Hendriks A.T.W.M, dan Zeeman, 2009, "Pretreatments to Enhance The Digestibility of Lignocellulosic Biomass", *Bioresource Technology*, 100, 10–18.
- Hsu T.A., Ladisch M.R., dan Tsao G.T., 1980, "Alcohol from Cellulose", *Chemical Technology*, 10 (5), 315-319.
- Ibrahim, M., 1998, Clean Fractionation of Biomass Steam Explosion and Extraction, *Faculty of The Virginia Polytechnic Institute and State University*.
- Indriati F.T., 2012, *Produksi Etanol dari Jerami Padi melalui Hidrolisa Enzimatik dan Fermentasi*, Tesis Magister, Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya.
- Iranmahboob J., Nadim F., Monemi S., 2002, "Optimizing Acid-Hydrolysis: A Critical Step For Production Of Ethanol From Mixed Wood Chips", *Biomass and Bioenergy*, 22, 401–404.
- Ju, Y.H., Huynh, L.H., Kasim, N.S., Guo, T.J., Wang, J.H., 2011, "Analysis Of Soluble And Insoluble Fraction Of Alkali And Subcritical Water Treated Sugarcane Bagasse", *Carbohydrate Polymer*, 83, 591-599.
- Juhasz, T., K. Kozma, Z. Szengyel, K. Reczey 2003, Production of β -Glucosidase in Mixed Culture of *Aspergillus niger* BKMF 1305 and *Trichoderma reesei* RUT C30, *Food Technol. Biotechnol.* 41 (1) 49–53.
- Khuwijitjaru P., Kumutakan W., Shuji A., 2012, "Carbohydrate and Composition of Product From Subcritical Water treatment of Coconut Meal, *Industrial and Engineering Chemistry*, 18, 225-229.
- King J.W., Srinivas K., Guevara O., Lu Y.W., Zhang D., Wang Y.J., 2012, "Reactive High Pressure Carbonated Water Pretreatment Prior To Enzymatic Saccharification Of Biomass Substrate", *The Journal of Supercritical Fluids*, 66, 221-231.
- Kumar R., dan Wyman C.E., 2009, "Cellulase Adsorption and Relationship to Feature of Corn Stover Solid Produce by Leading Pretreatment", *Biotechnology and Bioengineering*, 103, 252-267.
- Kumar, S., Guptha, R., Lee, Y.Y., Gupta, R.B., 2010, "Cellulose Pretreatment In Subcritical Water: Effect Of Temperature On Molecular Structure And Enzymatic Reactivity", *Bioresource Technology*. 101, 1337–1347.

- Kodri B.D. A., Rini Y., 2013, "Utilization Enzymes Cellulase from *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* For Enzymatic Hydrolysis of Rice Straw Catalyst with Microwave Pretreatment", *Jurnal Bioproses Komoditas Tropis*, . 1, No. 1.
- Lee James M., 1992, "Biochemical Engineering", *Prentice-l Inc*, Washintong.
- Lehninger, M. Thenawijaya, 1982, *Dasar-Dasar Biokimia*, Jakarta, Erlangga
- Li D., Yuan, Z., Sun, Y., Kong, X., Zhang, Y., 2009, Hydrogen production characteristics of the organic fraction of municipal solid wastes by anaerobic mixed culture fermentation, *Int. J. Hydrogen Energy*, 34, 812–820.
- Lin, C.Y., C.C Wu, J.H. Wu, F.Y, Chang, 2008, Effect of Cultivation Temperature on Fermentative Hydroge Production from Xylose by a Mixed Culture, *Biomass and Bioenergy*, 32, 1109-1105
- Lin R, J. Cheng, L.Ding, W.Song, F.Qi, J. Zhou, Kefa Cen, 2015, Subcritical Water Hydrolysis of Rice Straw For Reducing Sugar Production with Focus Degradation by-Products and Kineti Analysis, *Bioresource Tecnology*, 186, 8-14.
- Lu X dan Saka S, 2010, Hydrolysis of *Japanese Beech* by Batch and Semi-Flow Water Under Subcritical Temperatures and Pressures, *Biomassa an Bioenergi*, 34, 1089-1097.
- Lu Y., L. Wanga, K. Ma , G. Li, C. Zhang , H. Zhao , Q. Lai , H.P. Li, X.H. Xing, 2011, "Characteristics of Hydrogen Production of an *Enterobacter aerogenes* Mutant Generated by A New Atmospheric and Room Temperature Plasma (ARTP)", *Biochemical Engineering Journal*, 55, 17–22.
- Mahmud Z. Dan Ferry Y., 2005, "Prospek Pengolahan Hasil Samping Buah Kelapa", *Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan*, Indonesia Center for Estate Crops and Development, 4(2), 55-63.
- Manikkandan TR dkk, 2009, Microbial Production of Hydrogen from Sugarcane Bagasse using *Bacillus Sp*, *ChemTech Research*, 2, 344-348
- Martins, L.F., D. Kolling, M. Camassola, A.J.P. Dillon, L.P. Ramos, 2008, "Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* Cellulases in Relation to Their Activity Against Various Cellulosic Substrates", *Bioresource Technology*, 99, 1417–1424
- Maryana R., Dian M., A. Wheni I., Satriyo K.W. W., Angga R., 2014, "Alkaline Pretreatment on Sugarcane Bagasse for Bioethanol Production", *Energy Procedia*, . 47, 250-254.

- Miller, G.L., 1959, "Use Of Dinitrosalicylic Acid Reagent For Determination of Reducing Sugar, *Analytical Chemistry*, 31(3): 426-428. Miyake J., 1998, "The Technology of Biohydrogen. Proceedings of International Conference on Biological Hydrogen Production", . 7-18.
- Mohan M, T. Banerjee, V.V. Goud, 2015, Hydrolysis of Bamboo Biomass by Subcritical Water Treatment, *Bioresource Tecnology*, 191, 244-252
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple, M., dan Ladisch, M., 2005, Features of Promising Technologies for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass, *Bioresource Technology*, 96, 673-686.
- Muljana H., Tony, H., Lesty, M., Gisca, W., 2013, "Pengaruh Media Sub-dan Superkritik CO₂ Dalam Proses Hidrolisis Enzymatic Terhadap Perolehan Glukosa", Lembaga Penelitian dan Pengaduan Kepada Masyarakat, Univesitas Katolik Parahyangan.
- Octavia S., Tatang, H.S., Ronny, P., I.D.G. Arsa P., 2011, "Review: Pengolahan Awal Lignoselulosa Menggunakan Amoniak Untuk Meningkatkan Perolehan Gula Frementasi", Yogyakarta, ISSN 1693-4393.
- Orchidea R., Andi, K.W., Dedy R.P., Lisa F.S., Khoir L., Reza P., Cakra, D.M., 2010, "Pengaruh Metode *Pretreatment* Pada Bahan Lignoselulosa Terhadap Kualitas Hidrosilat Yang Dihasilkan", *Makalah Seminar Nasional Teknik Kimia Soebardjo Brotohardjono "Ketahanan Pangan dan Energi"*, Surabaya, ISSN 1978-0427.
- Poletto, M., Zatera, Ademir J., Forte, Maria M C., Santana, Ruth M C., 2012. "Thermal Decomposition of Wood Components and Cellulose Crystallite Size", *Bioresource Technology*, 109, 148-153
- Park Jung-Nam, Tai-Sun S, Joo-Hee L, Byung-Soo C, 2012, Production of Reducing Sugars from *Laminaria japonica* by Subcritical Water Hydrolysis, *APCBEE Procedia*, 2 17 – 21.
- Park S, John O,B., Michael H., Philip P, David K,J., 2010, Cellulose Crystallinity Index: Measurement Techniques and their Impact on Interpreting Cellulase Performance, *Biotechnology for Biofuels*, 3, 1-10.
- Pigman, W., dan D. Hirton, 1970, *The Carbohydrates Chemistry and Biochemistry*, 2nd edition, Academic Press, London.
- Perez J., J.M. Dorado, T. Rubia, J. Martinez, 2002, "Biodegradation and Biological treatments of Cellulose, Hemicellulose and Lignin: An Overview", *Int. Microbiol.*, 5, 53-63.

- Peterson, A.A., Vogel, F., Lachance, R.P., Fröling, M., Antal, M.J., Tester, J.W., 2008, "Thermochemical biofuel production in hydrothermal media: A review of sub- and supercritical water technologies". *Energy Environ. Sci.*, 1, 32-65.
- Prado J.M., Luis A.F.R., Tania F.C., Mauricio A.R., Fransisco M.F., M.Angela. A.M., 2014a, "Hydrolysis Of Sugarcane Bagasse In Subcritical Water", *The Journal of Supercritical Fluids*, . 86, . 15-22.
- Prado, J.M., Luis,A.F.R., Tania,F.C., Mauricio, A.R., Fransisco, M.F., M.Angela. A.M., 2014b, "Obtaining Sugars from Coconut Husk, Defatted Grape Seed, and Pressed Palm Fiber by Hydrolysis with Subcritical Water", *The Journal of Supercritical Fluids*, . 89, . 89-98.
- Prado, J.M., Daniel L.P., Tania, F.C., Mauricio A.R., 2016, Sub and Supercritical Water Hydrolysis of Agricultural and Food Industry Residues for The Production of Fermentable Sugars: A review, 98, 95-123
- Raghavendra B. Havnnavar dan G.S. Geeta. 2007. "Pre-treatment of Agroresidues for Release of Maximum Reducing Sugar", *Karnataka J. Agric, Sci.*, 20, 771-772.
- Ramadhan, A.G.G, dan Hendrawan A.D., 2013, "Perbandingan Pretreatment Degradasi Enzimatik Bagas Tebu untuk Produksi Hidrogen". Tekni Kimia ITS, Surabaya.
- Ren Y dkk, 2009, Hydrogen production from the manomeric sugar hydrolyze from hemicellulose by *Enterobacter aerogenes*, *Renewable Energy*, ume 34 2774-2779.
- Reungsang, A., S. Sangyoka, T. Imai P. Chairasert, 2004, "Bio Production from Cassava Starch Manufacturing Wastewater", The Joint International Conference on "Sustainable Energy and Environment (SEE)" 1-3 Desember, Hua Hin, Thailand.
- Richana Nur, 2002, "Produksi dan Prospek Enzim Xilanase dalam Pengembangan Bioindustri", *Buletin AgroBio*, 5(1), . 29-36.
- Saha, B.C., Iten, L.B., Cotta, M.A., Wu, Y.V., 2005, "Dilute Acid Pretreatment, Enzymatic Saccharification, and Fermentation of Rice Hulls to Ethanol", *Biotechnology Progress*, 21, 816-822.
- Sánchez, Ó. J., dan Cardona, C. A., 2008, "Review: Trends of Biotechnological Production of Fuel Ethanol from Different Feedstocks", *Bioresource Technology*, . 99, . 5270-5295.
- Sangian H.F, Dian R., Galih M.G., Ageng A., Setiyo G., Arief W., 2014, "Study of the Preparation of Sugar From High-Lignin Lignocellulose Applying

- Subcritical Water and Enzymatic Hydrolysis; Synthesis and Consumable Cost Evaluation”, *Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry*, 14.
- Sasaki M., Adschiri T., Arai K., 2004, “Kinetics of cellulose conversion at 25Mpa in sub and supercritical water”, *AIChE JOURNAL*, 50, 192-202.
- Singh, R., Ashish, S., Sapna, T., Monika, S., 2014, “A Review On Delignification Of Lignocellulosic Biomass For Enhancement Of Ethanol Production Potential”, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 32, 713-728.
- Su H., Cheng J., Zhou J., Song W., Cen K., 2009, “Combination Of Dark- And Photofermentation To Enhance Hydrogen Production And Energy Conversion Efficiency”, *Int. J. Hydrogen Energy*, 34, 8846–8853.
- Subramaniyan S. dan Prema, P., (2002), “Biotechnology of Microbial Xylanases: Enzymology”, *Molecular biology*, Sunggyu, L., Speight, J.G., dan Loyalka, S.K., (2007).
- Sun S, Shaolong S., Xuefei Cao, and Runcang S., 2015, “The Role of Pretreatment in Improving the Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosic Materials” *Bioresource Technology*, .199, . 49-58.
- Sun Y., dan Cheng, J.J., 2005, “Dilute Acid Pretreatment of Rye Straw and Bermudagrass for Ethanol Production”, *Bioresource Technology*, .96, . 1599-1606.
- Toor S.S., Rosendahl, L., Rudolf, A.A., 2011, “Review Of Subcritical Water Technologies”, *Energy*, . 36, . 2328-2342.
- Toro FP., Tania FC., Mauricio AR., Ademir JP., Francisco MF., M.Angea AM., 2014, “Integrate Supercritical Fluid Extraction and Subcritical Water Hydrolysis for the Recovery of Bioactive Compounds from Pressed Palm Fiber”, *Supercritical Water*, . 93, 42-48.
- Ul-Haq, I.; M. M. Javed; T. S. Khan; and Z. Siddiq, 2005, Cotton Saccharifying Activity of Cellulases Produced by Co-culture of *Aspergillus Niger* and *Trichoderma Viride*, *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 1(3): 241-245.
- U.S.DOE.2001, “Hydrogen Fuel Cell Engines and Related Technologies. Module 1: Hydrogen Properties.
- Wang, Jianlong., Wei Wan, 2009, “Kinetic Models for Fermentative Hydrogen Production :A review”, *International Journal of hydrogen energy*, 30,1-11.

- Widjaja A., 2009, “Aplikasi Bioteknologi pada Industri Pulp dan Kertas”, itspress, Surabaya.
- Wen, D., Jiang, H., Zhang, K., 2009, “Supercritical fluids technology for clean biofuel production”. *Progress in Natural Science*, 19, 273-284.
- Wu FC, Jane YW, Yi JL, Man YW, Ing-Lung S, 2014, “Sequential Acid And Enzymatic Hydrolysis In Situ And Bioethanol Production From Gracilaria Biomass”, . 156, 123-131
- Xia A., Cheng J., Lin R., Liu J., Zhou J., Cen K., 2013, “sequential generation of hydrogen and methane from glutamic acid through combined photofermentation and methanogenesis”, *Bioresource. Technology*, 131, 146–151.
- Yusnica S.A., Hanny F.S., Setiyo G., Arief W., 2014, “Application of Ionic Liquid [DMIM]DMP Pretreatment in the Hydrolysis of Sugarcane Bagasse for Biofuel Production.
- Yu Q, Xinshu Z, Shuangliang L, Minchao H, Yu Z, Zhenhong Y, Wei Q, Qiong W, Wen W, Xuesong T, 2013., “Liquid hot water pretreatment of sugarcane bagasse and its comparison with chemical pretreatment methods for the sugar recovery and structural changes”, *Bioresource Technology*, .129, , 592–598.
- Zhang H., dan Shubin Wu, 2013, “Subcritical CO₂ Pretreatment of Surgarcane Bagasse and Its Enzymatic Hydrolysis for Sugar Production”, *Bioresource Technology*, 149, 546-550.
- Zhang H., dan Shubin Wu, 2014, “Enhanced Enzymatic Cellulose Hydrolysis By Subcritical Carbon Dioxide Pretreatment of Sugarcane Bagasse”, *Bioresource Technology*, 158, 161-165.
- Zhao Y., Lu, W.J., Wang H.T., Yang J.L., 2009, “Fermentable Hexose Production From Corn Stalks And Wheat Straw With Combined Supercritical And Subcritical Hydrothermal Technology”, *Bioresource Technology*, . 100, 5884-5889
- Zhao Y., Wen-Jing L., Hua-Yong W., Jin-Wen L., Hong-Tao W., 2012, “Optimization of supercritical phase and combined supercritical/subcritical conversion of lignocellulose for hexose production by using a flow reaction system”, *Bioresource Tecnology*.
- Zhu L., O’Dwyer J.P., Chang V.S., dan Granda C.B., 2008, “Structure Features Affecting Biomass Enzymatic Digestibility”, *Bioresource Technology*, . 99, . 3817-3828.

BIODATA PENULIS



Fitri Junianti dilahirkan di Madining pada tanggal 12 Juni 1988. Penulis telah menempuh jenjang pendidikan formal mulai dari SDN 56 Madining (1994-2000), SLTPN 1 Marioriawa (2000-2003), SMAN 1 Donri-Donri (2003-2006). Pada Tahun 2010, penulis telah menyelesaikan pendidikan S1 di Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar. Untuk memperdalam aplikasi ilmu kimia, penulis melanjutkan pendidikan S2 di Jurusan Teknik Kimia dengan bidang keahlian Teknologi Proses, Fakultas Teknologi Industri, Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya. Penulis menjalankan penelitian di Laboratorium Teknologi Biokimia dengan judul penelitian “Produksi Hidrogen dari Sabut Kelapa melalui Pretreatment Air Subkritis dan Hidrolisis Enzimatik. Penulis berharap semoga melalui laporan tesis dapat bermanfaat bagi setiap pihak yang tidak kenal kata lelah untuk belajar. Penulis juga berharap agar kedepannya melalui pendidikan yang penulis telah peroleh dapat bermanfaat bagi diri sendiri maupun banyak pihak lainnya.

DATA PRIBADI PENULIS

Nama	: Fitri Junianti
Tempat/tanggal lahir	: Madining, 12 Juni 1988
Alamat	: Madining Kel. Attang Salo Soppeng
Telp	: 085397089836
Email	: fitri_junianti@yahoo.com