

## BIOETHANOL PRODUCTION FROM RICE STRAW BY SINGLE STEP FERMENTATION USING CO-CULTURE CLOSTRIDIUM THERMOPHILIC: A REVIEW

I Gde Adi Suryawan Wangiyana

Forestry Faculty – University of Nusa Tenggara Barat

### Abstract

Bioethanol is a future renewable energy for gasoline substitution. Market need for bioethanol has been increased significantly in a decade. That will lead to unbalance between bioethanol supply and bioethanol demand if bioethanol production only come from starch and sugar source (first generation of bioethanol). Using lignocellulose waste (second generation of bioethanol) which abundant in Indonesia is one of good solution for this problem. Rice Straw production in Indonesia approximately 103.57 million ton in a year which make it is the most abundant lignocellulosa waste in this country. Optimizing bioethanol production using rice straw need two adjustment step. First step is adjustment in pre-treatment which important to breakdown insoluble lignin from the waste. Second step is selecting bioconversion agent that has ability to carry single step fermentation process. Thermophilic clostridium is one of best bioconversion agent for this process which has several advantage compare to others bioconversion agent. This will lead to increase of bioethanol production to balance between bioethanol supply and bioethanol demand.

Keywords : Bioethanol, Rice straw, Thermophilic Clostridium

### PENDAHULUAN

Bioethanol adalah energi terbarukan yang diproduksi dari bahan baku yang mengandung karbohidrat. Di Indonesia, bioethanol kebanyakan diproduksi menggunakan bahan baku gula dan pati yang juga merupakan bahan pangan sehingga produksinya dikhawatirkan dapat mengancam ketahanan pangan nasional. Permintaan pasar terhadap bioethanol yang semakin meningkat menyebabkan pemerintah mulai melirik penggunaan bahan lignicellulosa limbah pertanian sebagai bahan baku bioethanol (Anindyawati, 2009). Limbah pertanian memiliki kelebihan diantaranya: jumlahnya melimpah, belum dimanfaatkan dengan optimal dan yang lebih penting lagi, tidak mengancam ketahanan pangan nasional.

Salah satu limbah pertanian yg melimpah di Indonesia adalah jerami padi karena padi sendiri merupakan komoditi pertanian dengan hasil terbesar di Indonesia. Berdasarkan data Badan Pusat Statistik tahun 2012 produksi padi di Indonesia sebesar 69,05 juta ton gabah kering giling. Dengan asumsi perbandingan gabah : jerami = 2 : 3 maka potensi limbah jerami yang dapat dihasilkan mencapai 103,57 juta ton. Selama ini sebagian besar jerami padi kebanyakan dibakar oleh petani sehingga

berpotensi menyebabkan polusi udara. Oleh karena itu, penggunaannya sebagai bahan baku bioethanol memberikan keuntungan dalam hal optimalisasi sumber daya dan juga meminimalisir pencemaran lingkungan.

Meskipun merupakan bahan baku yang potensial, bahan ligniselulosa tergolong sulit didegradasi dan tidak banyak mikroorganisme yang dapat memanfaatkannya sebagai bahan baku pembuatan bioethanol (Pokhrel et al., 2008). Ligniselulosa merupakan biopolimer kompleks yang terdiri dari Selulosa, hemiselulosa dan lignin. Dengan kandungan yang kompleks maka untuk menghasilkan bioethanol dari bahan ligniselulosa diperlukan proses pretreatment yang sifatnya spesifik agar diperoleh senyawa intermediet yang nantinya diproses menjadi bioethanol melalui fermentasi dengan bantuan mikroorganisme. Oleh karena itu, pemilihan jenis pre-treatment yang sesuai sangat menentukan konsentrasi bioethanol yang diproduksi melalui fermentasi (Mussatto and Teixeira, 2010)

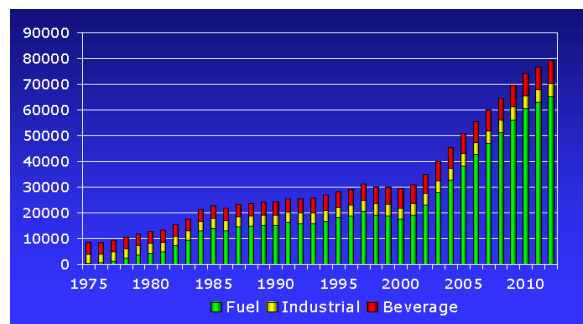
Mikroorganisme pendegradasi selulosa merupakan organisme yang potensial untuk digunakan sebagai pendegradasi bahan lignicelulosa sehingga eklporasi terhadap

organisme ini terus ditingkatkan dalam beberapa tahun belakangan ini (Maki et al., 2009). Clostridium termofilik merupakan salah satu bakteri yang diketahui mampu mendegradasi selulosa menjadi cellubiose untuk kemudian difermentasi menjadi bioethanol melalui proses yang dikenal dengan “*single step fermentation*”. Clostridium tidak membutuhkan suplai oksigen selama proses fermentasi sehingga dapat mengurangi biaya aerasi jika diterapkan dalam skala industri. Karena tumbuh pada lingkungan termofilik, kultur bakteri ini lebih kecil kemungkinan mengalami kontaminasi dibandingkan bakteri mesofilik (Demain et al., 2005). Karena berbagai alasan tersebut, maka Clostridium termofilik merupakan bakteri yang efektif digunakan sebagai agen pengkonversi limbah jerami menjadi bioethanol.

### Kebutuhan Bioethanol Pasar Dunia

Bioethanol adalah bahan bakar alternatif berbasis biomassa yang diproduksi melalui fermentasi dari bahan baku tanaman yang mengandung karbohidrat baik dalam bentuk: pati, gula bahkan konstituen selulosa dan hemiselulosa yang dominan terdapat pada tanaman. (Pokhrel et al., 2008)

Bioethanol memiliki beberapa keunggulan dibandingkan bahan bakar berbasis minyak. Karena diproduksi dari bahan baku biomassa, maka bioethanol merupakan bahan bakar terbarukan dan dapat diproduksi dalam waktu yang jauh lebih singkat dibandingkan dengan bahan bakar minyak. Bioethanol juga diketahui menghasilkan emisi gas rumah kaca 60% lebih sedikit dibandingkan bensin sehingga bahan bakar ini relatif lebih ramah lingkungan. Penggunaan bioethanol sebagai bahan aditif yang ditambahkan pada bahan bakar minyak dapat meningkatkan kualitas pembakaran sehingga mengurangi polutan yang dihasilkan bahan bakar minyak (Meskal, 2007)



Gambar 1. Produksi Bioethanol Dunia dari tahun 1975 – 2010 (Whittington, 2006)

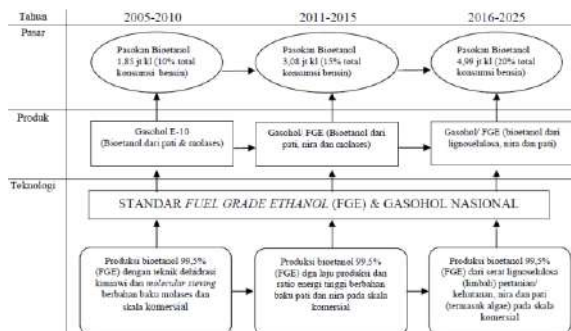
Selama ini Amerika Serikat dan Brazil merupakan 2 negara penghasil bioethanol terbesar di dunia. Produksi bioethanol di Amerika Serikat terutama menggunakan bahan baku jagung, sementara Brazil menggunakan bahan baku sugar cane (Kyritsis, 2010). Selain Amerika Serikat dan Brazil, Negara lainnya yang secara konsisten masuk 7 besar penghasil bioethanol sejak tahun 2004 adalah China, India, Perancis, Kanada dan Jerman. Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Tujuh besar Negara penghasil bioethanol di dunia (Urbanchuk, 2008)

Negara	Produksi bioethanol					Prosentase produksi dunia
	2004	2005	2006	2007	2008	
Amerika Serikat	3.403,9	3.905,1	4.857,2	6.487,7	8.926	43, %
Brazil	3.874	4.244,9	4.710,4	5.958,1	6.895,6	33,9%
China	924,7	924,7	937,9	990,8	1.017,2	5 %
India	325,5	290,6	435,9	647,3	607,7	3%
Perancis	219,3	240,4	237,8	303,8	396,3	1,9%
Kanada	60,8	67,4	150,3	184,9	264,2	1,3%
Jerman	60,8	92,5	199,5	184,9	216,6	1,1%

Pemerintah Indonesia sendiri mencanangkan bahwa produksi bioethanol pada rentang tahun 2005 – 2010 mencapai angka 1,85 juta kilo liter atau 10% dari total konsumsi bensin nasional. Selanjutnya untuk rentang tahun 2011 – 2015 produksi bioethanol diproyeksikan mencapai angka 3,08 juta kilo liter atau 15% dari total konsumsi bensin nasional. Dan untuk jangka panjang yaitu tahun 2016 – 2025 produksi bioethanol nasional diproyeksikan menembus 4,99 juta kilo liter atau setara dengan 20% total konsumsi bensin nasional (Anindyawati, 2009)

Dengan target produksi bioethanol yang dapat dikatakan cukup besar (20% dari total konsumsi bensin), maka produksi bioethanol tidak akan cukup jika hanya menggunakan bahan baku berupa komoditi pertanian yang mengandung pati atau gula seperti yang dilakukan oleh Brazil dan Amerika Serikat. Berdasarkan bahan bakunya bioethanol dapat dibedakan menjadi bioethanol generasi pertama yang menggunakan bahan baku pati, dan bioethanol generasi kedua yang menggunakan bahan baku dari ligniselulosa (Olofsson et al., 2008). Penggunaan ligniselulosa sebagai bahan baku produksi bioethanol merupakan hal yang perlu dilakukan untuk merealisasikan target produksi biotehanol nasional (Najafi et al., 2009)

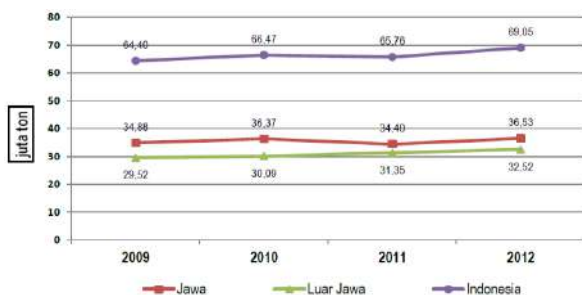


Gambar 2. Road map Produksi Bioethnol Indonesia (Anindyawati, 2009)

**Limbah Ligniselulosa Jerami Padi**

Ligniselulosa merupakan biopolimer paling melimpah di muka bumi ini dan diperkirakan tanaman di seluruh dunia dapat menghasilkan limbah ligniselulosa 150 miliar ton per tahun. Dengan jumlah yang sangat melimpah, limbah ligniselulosa ini menjadi bahan pengotor yang juga paling melimpah. Akan tetapi jika dikelola dengan baik, maka limbah ligniselulosa dapat menghasilkan produk yang sangat bermanfaat, salah satunya adalah bioetanol (Subramanian, 2010)

Limbah pertanian menghasilkan bahan ligniselulosa paling potensial dibandingkan dengan bahan lainnya. Diperkirakan tiap tahunnya diproduksi 1,5 Pg biomassa limbah ligniselulosa yang jika diolah secara optimal dapat digunakan untuk memproduksi sekitar 491 GL etanol per tahunnya. Selain itu, limbah industri sendiri dapat menghasilkan sekitar 79,1 Tg limbah ligniselulosa yang berpotensi untuk memproduksi 49,1 GL etanol per tahunnya. Jika dijumlahkan, maka potensi produksi bioethanol dari limbah pertanian adalah sebesar 491 GL, kurang lebih 16 kali lebih banyak dibandingkan total produksi bioethanol yang ada sampai saat ini (Kim and Dale, 2004).



Gambar 3. Produksi Padi di Indonesia tahun 2009 – 2012 (BPS, 2012)

Indonesia merupakan negara agraris sehingga memiliki komoditi pertanian dengan

jumlah melimpah. Salah satu komoditi pertanian dengan produksi terbesar di Indonesia adalah Padi. Berdasarkan data Badan Pusat Statistik tahun 2012 produksi padi di Indonesia terus mengalami peningkatan sejak tahun 2009 sampai 2012 dengan total produksi tahun 2012 sebesar 69,05 juta ton gabah kering giling. Dengan asumsi perbandingan gabah : jerami = 2 : 3 maka potensi limbah jerami yang dapat dihasilkan mencapai 103,57 juta ton. Selama ini sebagian besar jerami padi kebanyakan dibakar oleh petani sehingga berpotensi menimbulkan polusi udara, sebagian kecil menjadi dicampur dalam makanan ternak. Dengan asumsi bahwa 1 kg jerami padi dapat dikonversi menjadi 0,28 liter bioethanol (Kim and Dale, 2004), jika total jerami padi dikonversi menjadi bioethanol akan dihasilkan sekitar 28,9 juta kilo liter bioethanol. Nilai ini tentu saja jauh melampaui target produksi yang diharapkan oleh pemerintah. Meskipun demikian, angka realistis produksi bioethanol dari bahan baku jerami padi kemungkinan berada jauh dibawah nilai tersebut.

Tabel 2. Komposisi Selulosa: Hemiselulosa: Lignin dari beberapa sampel jerami padi

Selulosa	Konstituen (%berat kering)		Referensi
	Hemiselulosa	Lignin	
40,84	28,06	7,86	Hashem et al. (2013)
40,9	26,8	18,9	Sarkara and Aikata (2012)
36,8	25,8	15,8	Jeya et al. (2009)
36,2	19	9,9	Nigam et al. (2009)
39	27	12	Karimi et al. (2006)

Ligniselulosa didominasi oleh 3 komponen penting yaitu: selulosa, hemiselulosa dan lignin. Selulosa merupakan polimer glukosa yang digabungkan oleh ikatan beta glikosidik yang tersusun dalam rantai lurus dengan banyak ikatan hidrogen diantarnya. Hemiselulosa merupakan polimer dengan struktur rantai bercabang yang umumnya didominasi oleh konstituen xilosa. Dibandingkan selulosa, hemiselulosa umumnya lebih reaktif. Sementara itu, lignin adalah polimer acak dari subunit phenylpropylene yang terikat satu sama lain melalui ikatan eter dan karbon – karbon serta terikat secara kovalen pada hemiselulosa. Diantara ketiga komponen tersebut, selulosa dan hemiselulosa dapat difermentasi menjadi etanol sementara tidak demikian dengan lignin (Lynd, 1996)

Konstituen selulosa umumnya mendominasi proporsi molekul dalam ligniselulosa (35 – 50%) kemudian diikuti oleh hemiselulosa (20 – 35%) dan lignin (10 – 25%).

Namun perbandingan selulosa: hemiselulosa: lignin umumnya berbeda – beda tergantung jenis limbahnya (Mussatto and Teixeira, 2010). Untuk limbah jerami padi sendiri memiliki komposisi Selulosa: Hemiselulosa: lignin yang bervariasi tergantung pada varietas padi yang digunakan.

Berdasarkan data tabel 2, maka dapat dikatakan bahwa konstituen selulosa pada limbah jerami padi cukup tinggi sementara itu konstituen ligninnya cukup rendah. Oleh karena itu penggunaan limbah ligniselulosa jerami padi untuk produksi bioethanol memiliki prospek yang cukup menjanjikan. Beberapa penelitian juga sudah mengaplikasikan limbah jerami padi untuk produksi bioethanol dengan hasil yang cukup menjanjikan.

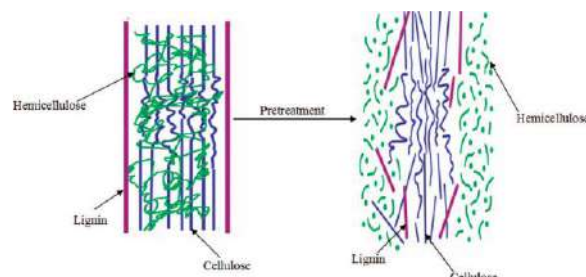
Meskipun merupakan bahan baku yang sangat potensial, produksi bioethanol dari bahan baku ligniselulosa memerlukan penanganan khusus dibandingkan dengan bahan baku pati ataupun gula diantaranya karena: strukturnya yang kompleks dengan asosiasi hemiselulosa dikelilingi oleh lignin yang menutup rapat struktur ini sehingga sulit terakses oleh enzim – enzim pendegradasi. Selain itu terdapat banyak struktur kristalin yang membentuk 6 ikatan hydrogen sehingga menyebabkan struktur ini sangat kompak dan teratur. Untuk itulah dalam proses pengolahan limbah ligniselulosa menjadi ethanol diperlukan tahap pre-treatment (Weil et al., 1994)

### Pretreatment Ligniselulosa

Pre-treatment perlu dilakukan karena struktur ligniselulosa berupa kristalin dan bersifat *recalcitrance* sulit di degradasi ditambah lagi adanya struktur lignin yang mengikat konstituen selulosa menyebabkannya sulit diakses oleh enzim selulase. Selulosa dianggap sebagai substrat paling penting untuk nantinya dikonversi menjadi ethanol melalui fermentasi. Meskipun hemiselulosa juga dapat difermentasi, namun tidak banyak mikroorganisme mampu melakukannya (Sathitsuksanoh et al., 2012)

Tujuan utama Pre-treatment adalah untuk memecah struktur lignin, membuat tidak stabil struktur kristalin selulosa serta meningkatkan sifat *porosity* dari material ligniselulosa. Pre-treatment harus memenuhi beberapa kriteria diantaranya: meningkatkan terbentuknya formasi gula, tidak menimbulkan hilangnya karbohidrat, tidak menyebabkan terbentuknya produk samping yang berperan sebagai inhibitor

pada proses hidrolisis dan fermentasi serta tentu saja relatif ekonomis (Kumar et al., 2009). Untuk lebih jelasnya, struktur ligniselulosa sebelum dan sesudah proses pre-treatment dapat dilihat pada gambar



Gambar 4. Proses Pre-treatment bahan ligniselulosa (Kumar et al., 2009)

Pre-treatment merupakan tahap yang paling mahal secara ekonomis dalam pengolahan limbah ligniselulosa untuk menghasilkan bioethanol. Proses ini memiliki proporsi sekitar 20% dari total biaya produksi. Bahan ligniselulosa umumnya berupa limbah yang harganya tentu sangat murah dibandingkan jika menggunakan bahan baku berbasis zat pati atau gula yang notabene merupakan komoditi dagang, bahkan bahan baku limbah ligniselulosa dapat juga diperoleh secara gratis karena merupakan sampah yang belum dimanfaatkan secara optimal sehingga biaya yang dikeluarkan hanya merupakan biaya transportasi limbah ke tempat pengolahan. Dengan berbagai alasan diatas, maka dapat dikatakan bahwa harga bioethanol dari bahan baku ligniselulosa sangat ditentukan oleh proses pre-treatmentnya. Oleh karena itu pemilihan metode pre-treatment yang tepat juga sangat penting untuk pertimbangan ekonomi agar nantinya bioethanol ligniselulosa dapat bersaing dipasaran. (Yang and Wyman, 2007)

Pemilihan metode pre-treatment juga dapat didasarkan pada substratnya. Karena dua molekul utama yang hendak di hilangkan melalui pre-treatment adalah lignin dan hemiselulosa, maka hasil pre-treatment terhadap substrat lignin akan berbeda dengan pre-treatment terhadap substrat hemiselulosa. Setelah pre-treatment, lignin umumnya berada dalam bentuk fraksi solid yang dipekatkan karena meningkatnya solubilisasi karbohidrat. Sementara itu pada substrat hemiselulosa, hasil pretreatmentnya dapat berupa fraksi cair ataupun solid tergantung dari lama pre-treatment (Chandra et al., 2007)

Secara umum metode pretreatment dapat dibedakan menjadi 3 yaitu: *Physical Pre-*

*treatment*, *Chemical Pre-treatment* dan *Biological Pre-treatment*. *Physical Pre-treatment* tidak menggunakan bahan kimia dan umumnya meliputi penggunaan uap panas, tekanan tinggi, pencacahan secara mekanik, serta energy radiasi. *Chemical Pre-treatment* menggunakan bahan kimia yang dapat meningkatkan biodegradasi selulosa serta menurunkan derajat polimerisasinya. Beberapa contoh diantaranya: Catalyzed steam-explosion, Acid pretreatment, Alkaline pretreatment, Ammonia fiber/freeze explosion (AFEX), Organosolv, pH-controlled liquid hot water, Ionic liquids (ILs) pretreatment. Untuk biological pre-treatment melibatkan mikroorganisme pendegradasi bahan kayu baik itu jamur ataupun bakteri ataupun enzim yang dihasilkannya. Tidak menutup kemungkinan dilakukan kombinasi pre-treatment untuk memperoleh hasil yang optimal. (Zheng et al., 2013)

#### **Pre-Treatment Pada Limbah Jerami Padi**

Produksi bioethanol dari bahan baku jerami padi sudah cukup banyak dilakukan dengan menggunakan metode pre-treatment yang bervariasi. Kebanyakan pretreatment terhadap limbah jerami padi dilakukan secara kimiawi, ataupun menggunakan kombinasi *biological pre-treatment* dan *chemical pre-treatment*. Sementara itu, *Physical pre-treatment* tanpa kombinasi dengan pretreatment lainnya relatif jarang dilakukan pada limbah jerami padi.

Beberapa penelitian dengan chemical treatment terhadap limbah jerami padi kebanyakan menggunakan bahan alkali pretreatment yang dipadukan dengan pemanasan. Roslan et al. (2011) menggunakan larutan NaOH 0,5% untuk merendam Potongan jerami padi kemudian dipanaskan dalam autoklaf dengan temperatur 120°C. Pasha et al. (2012) Merendam potongan jerami dalam larutan KOH 0,2 mol/L selama 24 jam kemudian diautoklaf pada temperatur 120°C. Sarkar and Aikat (2012) menggunakan NaOH dengan konsentrasi 0,1 – 2,5 M dan menyimpulkan bahwa konsentrasi NaOH 0,5 M merupakan yang optimal untuk menghasilkan konstituen selulosa paling banyak dibandingkan konsentrasi NaOH lainnya.

Karimi et al. (2006) menggunakan acid pre-treatment dengan melakukan perendaman potongan jerami padi dalam larutan asam sulfat 0,5% selama 20 jam yang kemudian dilanjutkan dengan pemanasan bertekanan terhadap sampel.

Gabungan antara alkali dan acid pre-treatment juga dapat dilakukan untuk limbah jerami padi seperti yang dilakukan oleh Hashem et al. (2013) dengan menggunakan kombinasi 1% larutan NaOH d, NH<sub>4</sub>Cl, HCl serta asam oksalat dengan hasil yang paling efektif ketika digunakan kombinasi perendaman dalam NaOH yang diikuti oleh HCl.

Yoswathana et al. (2010) menggunakan ketiga jenis pretreatment serta kombinasinya untuk melakukan pengolahan jerami padi. Chemical pretreatment yang dilakukan antara lain: Alkali pre-treatment dengan NaOH 1 – 5%, acid pre-treatment dengan asam sulfat 1 – 9%. Selain itu juga digunakan kombinasi dengan menggunakan enzim yang merupakan biological pre-treatment. Pre-treatment paling kompleks dilakukan dengan menggunakan ultrasonic pre-treatment 40W selama 10 menit yang sebelumnya telah direndam dalam 1% asam sulfat kemudian dilanjutkan dengan penambahan 4% enzim dan ternyata menghasilkan gula tereduksi paling tinggi dibandingkan dengan pre-treatment lainnya

Poornejad et al. (2011) mengatakan bahwa chemical pretreatment dengan menggunakan N-Methylmorpholine-N-oxide (NMMO) lebih efektif dibandingkan dengan acid pretreatment ataupun alkali pretreatment karena dapat mempertahankan komposisi bahan ligniselulosa terutama konstituen hemiselulosanya ditambah lagi NMMO merupakan pelarut yang bagus untuk selulosa. Larutan NMMO yang dapat digunakan sebesar 85% yang dilanjutkan pula dengan pemanasan pada temperature 120°C dalam oil bath.

Yoshimura et al. (2012) menggunakan physical pretreatment dengan mengaplikasikan tekanan mulai dari 10 – 30 MPa terhadap potongan jerami padi pada temperature ruang (25°C). sebagai pembanding juga digunakan kombinasi tekanan tinggi dan aplikasi enzim selulase yang mengindikasikan bahwa aktivitas selulase lebih efektif pada tekanan tinggi. Kombinasi enzim selulase dan tekanan tinggi menghasilkan kadar glukosa lebih tinggi dibandingkan dengan hanya menggunakan tekanan tinggi.

#### **Clostridium Termofilik Sebagai Agen Biokonversi Ligniselulosa**

Mikroorganisme pendegradasi selulosa merupakan organisme yang potensial untuk digunakan sebagai pendegradasi bahan lignicelulosa sehingga eklporasi terhadap

organisme ini terus ditingkatkan dalam beberapa tahun belakangan ini (Maki et al., 2009). Mikroorganisme penghasil selulase dapat berupa bakteri dan jamur dengan karakteristik aktivitas degradasi selulosa yang berbeda (Sukumuran et al., 2005)

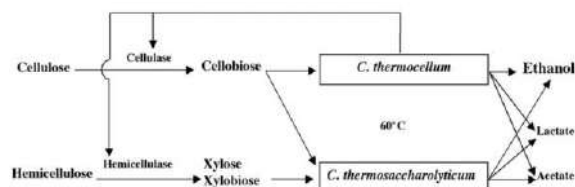
Clostridium merupakan bakteri yang memiliki kemampuan selulolitik dengan mendegradasi bahan selulosa untuk kemudian difermentasi menjadi etanol. Spesies yang paling umum digunakan untuk produksi etanol dari bahan selulosa adalah *Clostridium thermocellum* yang optimum tumbuh pada temperature 60°C (Weimer and Zeikus, 1976). Organisme ini mempunyai kemampuan untuk mendegradasi selulosa dalam bentuk kristalin dengan mekanisme berbeda dengan yang dilakukan oleh fungi (Biosset et al., 1999). Selain *C. thermocellum*, *C. acetobutylicum* juga memiliki kemampuan untuk mengkonversi bioethanol dari bahan ligniselulosa rumput gajah hingga kadar 96,24% dengan produksi bioethanol 33,3 gr per 1 kg substrat (Ruso et al., 2011).

Kemampuan *C. thermocellum* dalam mendegradasi struktur kristalin selulosa terkait dengan kompleks protein pada permukaan selnya yang dikenal dengan cellulosome. Bakteri ini memiliki total 41 protein cellulosome 36 jenis protein type 1 dockerin dengan bagian non-katalitik protein CipA dengan ekspresi aktivitas cellulosome yang berbeda – beda tergantung substratnya, apakah selulosa, hemiselulosa atau selubiosa (Gold and Martin, 2007). Secara bioenergetika, produksi bioethanol menggunakan *C. thermocellum* juga dikatakan efisien karena mikroorganisme ini menghidrolisis selulosa melalui mekanisme yang berbeda dengan mekanisme hidrolisis konvensional yang meningkatkan efisiensi asimilasi oligosakarida hasil pemecahan selulosa serta tidak memerlukan enzim saccharolytic yang dapat mengurangi biaya produksi (Zhang and Lynd, 2005)

Untuk produksi bioethanol dari bahan baku selulosa tidak selalu harus menggunakan kultur murni *Clostridium* karena dapat pula digunakan kumpulan strain *C. thermocellum* ataupun co-culture antara untuk *C. thermocellum* dengan *Clostridium* lainnya untuk mendapatkan hasil yang lebih optimal. Reddy et al. (2010) menggunakan co-culture *C. thermocellum* CT2 dan *C. thermocellum* HG8 untuk memfermentasi bahan ligniselulosa dari limbah perkebunan pisang melalui satu tahap konversi. Ng et al.

(1981) *C. thermocellum* and *C. thermohydrosulfuricum* dengan menggunakan medium Solka Floc cellulose dan termasuk didalamnya adalah: glukosa, cellobiose, xylose dan xylobiose sehingga terjadi fermentasi tidak hanya gula heksosa tapi juga pentosa.

Menurut Demain et al. (2005), terdapat beberapa keuntungan menggunakan kultur *Clostridium* untuk pengolahan limbah ligniselulosa menghasilkan etanol: 1) *Clostridium* memiliki kemampuan untuk memecah selulosa menjadi selubiosa dan seludekstrin yang nantinya dikonversi menjadi etanol, 2) *Clostridium* merupakan organisme anaerobic sehingga tidak membutuhkan oksigen dalam kultur padahal dalam industri fermentasi, transfer oksigen merupakan salah satu proses yang membutuhkan biaya cukup besar, 3) mempunyai temepratur optimum fermentasi yang tinggi (kurang lebih 60°C) sehingga lebih aman terhadap kontaminasi dan juga mengurangi perlunya pendinginan pada bioreactor, 4) pertumbuhan pada temperature tinggi menyebabkan panen etahanol dapat dilakukan secara langsung, 5) memiliki enzim yang relatif stabil, 6) bakteri anaerobic umumnya memiliki pertumbuhan sel yang rendah sehingga substrat lebih banyak dikonversi menjadi produk bukan biomassa.



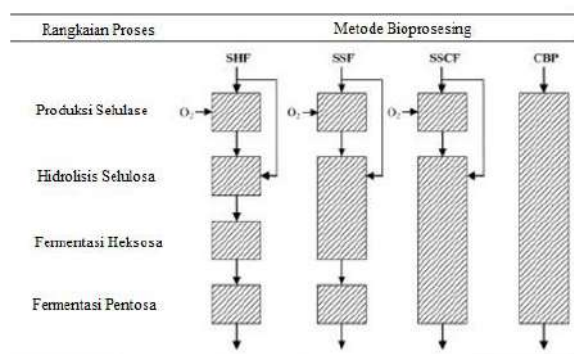
Gambar 5. Skema produksi etanol dengan Co-culture *Clostridium* (Demain et al., 2005)

Karena produksi bioethanol sangat ditentukan oleh agen pengkonversi ligniselulosa menjadi etanol, maka eksplorasi *clostridium* thermofilik penting untuk dilakukan. Eksplorasi bakteri ini dapat dilakukan pada beberapa lokasi, diantaranya: pada kotoran hewan, kompos, tanah sampai pada sumber air panas (Jin et al, 1988), Palm Wine dengan kecenderungan isolat moderately Thermophilic (Anani Soh et al., 1991), saluran pencernaan wood-feeding termite (Hethner et al., 1992), sampel sedimen dari geothermal area (Koskinen, 2007). Selain dengan ekplorasi *Clostridium*, peningkatan kemampuan biodegradasi selulosa serta produksi bioethanol juga dapat dilakukan dengan melakukan rekaya genetika terhadap

*Clostridium* menghasilkan *Clostridium* recombinan yang menghasilkan enzim selulase dengan aktivitas yang menjanjikan (Mutreja et al., 2011)

### Bioprosesing Bioethanol dan Prospek Penggunaan Co-culture *Clostridium*.

Setelah melalui tahap pre-treatment konversi selulosa hasil pre-treatment menjadi bioethanol umumnya melalui serangkaian reaksi diantaranya: hidrolisis selulosa, fermentasi heksosa dan fermentasi pentose. Serangkaian reaksi tersebut dilakukan dengan beberapa bioprosesing diantaranya: Separate Hydrolysis and Fermentation (SHF), Simultaneously Saccharification and Fermentation (SSF), Simultaneously Saccharification and Co-Fermentation (SSCF), dan Consolidated Bioprocessing (CBP) (Zheng et al., 2009). Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada gambar 5.



Gambar 6. Strategi Bioprosesing Ethanol dan tahapan reaksinya (Zheng et al., 2009)

*Separate Hydrolysis and Fermentation* merupakan metode bioprosesing ethanol dengan proses hidrolisis selulosa dan fermentasi hasil hidrolisis tersebut dilakukan secara terpisah. Hidrolisis selulosa dilakukan dengan menggunakan mikroorganisme penghasil enzim selulase, seperti: *Aspergillus* menghasilkan oligosakarida ataupun monosakarida yang dapat difermentasi oleh yeast untuk menghasilkan ethanol (Neagu and Bahrim, 2012).

Sementara itu *Simultaneously Saccharification and Fermentation* (SSF) merupakan penyempurnaan dari metode SHF. Pada proses SSF, hidrolisis secara enzimatik dilakukan bersamaan dengan fermentasi dan tidak dipisahkan sehingga berpotensi mengurangi efek inhibisi produk akhir dari hidrolisis yang dapat menghambat reaksi fermentasi. Selain itu metode SSF juga relatif dapat mengurangi biaya investasi dalam hal

pengadaan bioreaktor karena hanya memisahkan bioreaktor fermentasi pentose saja. Akan tetapi kekurangan metode ini adalah diperlukan kondisi lingkungan yang optimum untuk proses hidrolisis secara enzimatik dan fermentasi (Oloffson et al., 2008)

Hidrolisis secara enzimatik dan co-fermentasi heksosa serta pentosa dapat dilakukan dalam waktu bersamaan yang dikenal dengan *Simultaneously Saccharification and Co-Fermentation* (SSCF). Selain lebih ekonomis dibandingkan SSF karena menggunakan lebih sedikit bioreaktor, SSCF juga lebih efisien karena glukosa (heksosa) dan Xilosa (pentose) dapat difermentasi secara bersamaan sehingga meskipun konsentrasi glukosa rendah tetap didapatkan hasil ethanol yang potensial. Selain itu SSCF juga memiliki fleksibilitas tinggi terhadap pemilihan antara glukosa atau xilosa yang di fermentasi terlebih dahulu (Koppram et al., 2013).

*Consolidated Bioprocessing* (CBP) mengkombinasikan *Simultaneous saccharification ligniselulosa* dengan fermentasi yang menghasilkan gula yang selanjutnya dikonversi menjadi bioethanol hanya dalam satu proses dan menggunakan satu jenis mikroorganisme ataupun konsorsium mikroorganisme. Dalam hal ini biaya produksi ethanol semakin dapat ditekan karena hanya menggunakan satu bioreaktor untuk mengkonversi ligniselulosa langsung menjadi ethanol. Dengan demikian metode ini paling menjanjikan dilakukan untuk menekan harga bioethanol ligniselulosa (Xu et al., 2009).

Penggunaan Co-Culture *C. Thermocellum* dan *C. thermosaccharolyticum* untuk bioprosesing *Saccharification Fermentation* (SSF) dapat menghemat biaya produksi ethanol sekitar 50 cent/ gallon dibandingkan dengan menggunakan *Trichoderma reesei* untuk memproduksi selulase kemudian hasil hidrolisisnya difermentasi oleh *Saccharomyces cerevisiae*. Selain itu. Dengan menggunakan Co-culture *Clostridium*, produksi selulase dapat dilakukan secara in-situ dengan tingkat produksi mencapai 90% (Hogsett et al., 1992). Selain itu dengan menggunakan Co-culture *Clostridium* juga diperoleh konversi substrat 10 – 20 % lebih banyak dibandingkan dengan konversi *T. reesei* – *S. cerevisiae* dengan efisiensi proses kurang lebih 2 – 2,5 kali lebih baik dengan menggunakan substrat optimum pada konsentrasi 5 – 60 g/L dan konsentrasi enzim 7 – 25 U/g (South et al., 1993)

Dengan kemampuan selulolitik ditambah lagi kemampuan memfermentasi etanol, maka Co-culture Clostridium memiliki prospek yang cerah untuk digunakan dalam Consolidated Bioprocessing (CBP) agar produksi bioethanol menjadi lebih efektif dan efisien. Penggunaan Co-Culture memungkinkan pula spesies Clostridium berbeda memanfaatkan gula pentose maupun heksosa hasil degradasi selulosa maupun hemiselulosa untuk kemudian difermentasi menjadi etanol. Selain itu, penggunaan Clostridium recombinant juga menjanjikan untuk melakukan over-production bioethanol (Demain et al., 2005)

## KESIMPULAN

Penggunaan Co-Culture Clostridium dengan pemilihan metode pre-treatment kimiawi maupun kombinasi kimiawi dan biologis serta *bioprosesing* melalui saccharifikasi dan fermentasi yang dilakukan secara simultan merupakan solusi yang menjanjikan untuk produksi bioethanol dari bahan baku ligniselulosa limbah jerami padi yang melimpah di Indonesia dan belum memanfaatkan secara optimal.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anani Soh, L. A, H. Ralambotiana, B. Ollivier, G. Prensier, E. TINE, and J.-L. Garcia. 1991. *Clostridium thermopalmarium* sp. nov., a Moderately Thermophilic Butyrate-Producing Bacterium Isolated from Palm Wine in Senegal. *System. Appl. Microbiol.* 14, 135-139 (1991).
- Anindyawati. T., 2009. *Prospek Enzim Dan Limbah Lignoselulosa Untuk Produksi Bioetanol*. <http://www.bbpk.go.id/main/bbsf/files/vol44no1/9.%20Prospek%20Enzim%20-%20Tri%20santi%20A.pdf>. Diakses: 30 Mei 2018
- Badan Pusat Statistik, 2013. Produksi Jagung, Padi, Kedelai. Berita Resmi Statistik No. 20/03/ Th. XVI, 1 Maret 2013
- Chandra, R. P., R. Bura, W. E. Mabee, · A. Berlin, · X. Pan, ·J. N. Saddler. 2007. Substrate Pretreatment: The Key to Effective Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosics? *Adv Biochem Engin/ Biotechnol* (2007) 108: 67–93.
- Demain. A. L., M. Newcomb and J. H. David Wu., 2005. *Cellulase, Clostridia, and Ethanol*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Mar. 2005, p. 124–154 Vol. 69, No. 1.
- Hethener, P., A. Brauman, and J.L. Garcia. 1992. *Clostridium termitidis* sp. nov., a Cellulolytic Bacterium from the Gut of the Wood-feeding Termite, *Nasutitermes lujae*. *System. Appl. Microbiol.* 15, 52-58 (1992)
- Hogsett, D. A., H. J. Ahn, T. D. Bernardez, C. R. South and L. R. Lynd., 1992. Direct Microbial Conversion Prospects, Progress, and Obstacles. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Vol. 34/35, 1992.
- Jeya, M., Y. W. Zhang, I. W. Kim, and J. K. Lee., 2009. Enhanced Saccharification of Alkali-treated rice Straw by Cellulase from *Trametes hirsuta* and Statistical Optimization of Hydrolysis Conditions by RSM. *Biores. Technol.*, **100**: 5155–5161
- Jin, F. K. Yamasato, and K. Toda. 1988. *Clostridium thermocopriae* sp. nov., 1988. A Cellulolytic Thermophile from Animal Feces, Compost, Soil, and a Hot Spring in Japan. *International Journal of Systematic Bacteriology*, July 1988, p. 279 – 281.
- Karimi, K., G. Emtiazi, M. J. Taherzadeh. 2006. Ethanol production from dilute-acid pretreated rice straw by simultaneous saccharification and fermentation with *Mucor indicus*, *Rhizopus oryzae*, and *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology* 40 (2006) 138–144
- Karimi. K., G. Emtiazi, M. J. Taherzadeh., 2006. Ethanol Production from Dilute-Acid Pretreated Rice Straw by Simultaneous Saccharification and Fermentation with *Mucor Indicus*, *Rhizopus Oryzae*, And *Saccharomyces Cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology* 40 (2006) 138–144
- Koppram, R. F. Nielsen, E. Albers, A. Lambert, S. Wännström, L. Welin, G. Zacchi and L. Olsson. Simultaneous saccharification and co-fermentation for bioethanol production using corncobs at lab, PDU and demo scales. *Biotechnology for Biofuels* 2013, 6:2
- Koskinen, P. E. P., R. Steinar, R. Beck, J. Orlygsson, J. A. Puhakka. 2008. Ethanol and Hydrogen Production by Two Thermophilic, Anaerobic Bacteria Isolated From Icelandic Geothermal Areas. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 9999, No. 9999, 2008



- Kumar, P, D. M. Barrett, M. J. Delwiche, and P. Stroeve. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Ind. Eng. Chem. Res.*, Article ASAP DOI: 10.1021/ie801542g
- Kyritsis, S., 2010. The Emerging importance of the new feedstock for bioethanol production. Agricultural University of Athens. <http://www.crops2industry.eu/images/pdf/winschoten/5.%20KYRITSIS.pdf>. Diakses: 30 Mei 2018
- Lynd, L. R., 1996. Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic Biomass: Technology, Economics, the Environment, and Policy. *Annu. Rev. Energy Environ.* 1996. 21:403–65
- M. Hashem, E. H. Ali, and R. Abdel-Basset. 2013. Recycling Rice Straw into Biofuel Ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia guilliermondii*. *J. Agr. Sci. Tech.* (2013) Vol. 15: 709-721
- Madden R. H., 1983. Isolation and Characterization of *Clostridium stercorarium* sp. nov., Cellulolytic Thermophile. *International Journal of Systematic Bacteriology*. Oct 1983, p 817 – 840. Vol 33, No. 4.
- Maki, M., K. T. Leung, W. Qin., 2009. The Prospects of Cellulase-Producing Bacteria For The Bioconversion Of lignocellulosic Biomass. *International Journal of Biological Sciences*. 5(5):500-516
- Meskal, M. M., 2007. Biomass as a source of renewable energy and its impact on the air quality. [http://www.researchgate.net/publication/228477377\\_Biomass\\_as\\_a\\_Source\\_of\\_Renewable\\_Energy\\_and\\_its\\_Impact\\_on\\_the\\_Air\\_Quality](http://www.researchgate.net/publication/228477377_Biomass_as_a_Source_of_Renewable_Energy_and_its_Impact_on_the_Air_Quality). Diakses: 30 Mei 2018
- Mussatto, S. I. and J. A. Teixeira. Lignocellulose as raw material in fermentation processes. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology.
- Mutreja, R. D. Das, D. Goyal and A. Goyal. 2011. Bioconversion of Agricultural Waste to Ethanol by SSF Using Recombinant Cellulase from *Clostridium thermocellum*. *Enzyme Research* Volume 2011, Article ID 340279, 6 pages
- Najafi, G., B. Ghobadian, T. Tavakoli, T. Yusaf. 2009. Potential of bioethanol production from agricultural wastes in Iran. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 13 (2009) 1418–1427.
- Neagu, C. and G. Bahrim. Comparative study of different methods of hydrolysis and fermentation for bioethanol obtaining from inulin and inulin rich feedstock. *Studii și Cercetări Științifice* 2012, 13 (1), pp. 063 – 068
- Ng, T. K., A. Ben-bassat, and J. G. Zeikus. 1981. Ethanol Production by Thermophilic Bacteria: Fermentation of Cellulosic Substrates by Cocultures of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *Applied and Environmental Microbiology*, June 1981, p. 1337-1343. Vol. 41, No. 6
- Nicholas D. Gold and Vincent J. J. Martin. Global View of the *Clostridium thermocellum* Cellulosome Revealed by Quantitative Proteomic Analysis. *Journal of Bacteriology*, Oct. 2007, p. 6787–6795. Vol. 189, No. 19.
- Nigam P.S, N. Gupta, A. Anthwal. 2009. Pretreatment of agro-industrial residues. In: Nigam PS, Pandey A, eds. *Biotechnology for agro-industrial residues utilization*. 1 ed. Netherlands: Springer; 2009:13-33.
- Olofsson, K. M. Bertilsson and G. Lidén. 2008. A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnology for Biofuels* 2008, 1:7.
- Pasha, C. B. C. Sekhar, B.C. Sekhar, B. Srinivas, K. Balakrishna and N. Hanumalal. 2012. Sequential cellulose production, saccharification and ethanol fermentation using rice straw. *Journal of scientific & industrial research*. Vol. 71. September 2012. pp. 616 – 620.
- Pokhrel, C. P , R. K. P. Yadav and S. Ohga., 2008. *Agricultural Waste Residues as Potential Sources of Bioethanol*. *Scientific World*, Vol. 6, No. 6
- Poornejad, N., S.M. Amin Salehi, K. Karimi1, M.J. Taherzadeh, T. Behzad. 2011. Improvement of enzymatic hydrolysis of rice straw by N methylmorpholine-N-oxide (NMMO) pretreatment. *World Renewable Energy Congress. Bioenergy Technology (BE)* 8 – 13 May 2011, Linköping, Sweden.
- Reddy, H. K. Y., M. Srijana, M. Reddy and G. Reddy. 2010. Coculture fermentation of banana agro-waste to ethanol by cellulolytic thermophilic *Clostridium thermocellum* CT2. *African Journal of*

- Biotechnology Vol. 9 (13), pp. 1926-1934, 29 March, 2010
- Ruso, S., A. Ahmad, N. La Nafie., 2011. *Pembuatan Bioetanol dari Batang Rumpuk Gajah (Pennisetum purpureum Schumacher) Dengan Sistem Fermentasi Simultan Menggunakan Bakteri Clostridium acetobutylicum*. <http://pasca.unhas.ac.id/jurnal>. Diakses: Diakses: 30 Mei 2018
- Sarkar, N and K. Aikat. 2012. Alkali pretreatment of rice straw and enhanced cellulase production by a locally isolated fungus *Aspergillus fumigatus* NITDGPKA3. *J. Microbiol. Biotech. Res.*, 2012, 2 (5):717-726
- Sathitsuksanoh, N. A. George, and Y-H Percival Zhanga, 2012. New lignocellulose pretreatments using cellulose solvents: a review. *J Chem Technol Biotechnol* (2012). DOI 10.1002/jctb.3959
- Sleat, R., R. A. Mah, and R. Robinson., 1984. *Isolation and Characterization of an Anaerobic, Cellulolytic Bacterium, Clostridium cellulovorans sp. nov.* *Applied and Environmental Microbiology*, July 1984, p. 88-93. Vol. 48, No. 1.
- South, C. R., D. A. Hogsett, and A. R. Lynd. 1993. Continuous fermentation of cellulosic biomass to ethanol. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **39/40**:587–600
- Subramanian, K., 2010. Biochemical conversion of rice straw into bioethanol an exploratory investigation. <http://www.crops2industry.eu/images/pdf/winschoten/5.%20KYRITSIS.pdf>. Diakses 30 mei 2018.
- Sukumuran, R. K., R. R. Singhanian and A. Pandey. 2005. Microbial cellulases production, applications and challenges. *Journal of Scientific & Industrial Research*. Vol. 64. November 2005. pp 832 – 844.
- Urbanchuk, J. M., 2008. Impact of ethanol on world oil demand and prices. *F.O. Lichts World Ethanol & Biofuels Report*. Vol. 6, No. 17. May 8, 2008
- Wangiyana, I G. A. S., 2015. Pemanfaatan Medium Alternatif untuk Pertumbuhan Isolat *Fusarium Sp.* Penginduksi Pembentukan Gaharu pada *Gyrinops versteegii* (Gilg) Domke. *Jurnal Sangkareang Mataram*. 1 (3), 54 – 59.
- Wangiyana, I G. A. S., 2016. Phylogenetic Analysis of *Aquilaria* and *Gyrinops* Member Based on trnL-trnF Gene Sequence of Chloroplast. *Jurnal Sangkareang Mataram*, 2 (4), 41 – 46.
- Wangiyana, I. G. A. S., 2017. Interaction of *Fusarium Sp.* with *Gyrinops versteegii* Seedling by Morphological, Anatomical, and Chemical Observation. *Jurnal Sangkareang Mataram*. 3 (3), 19 – 24.
- Weil, J., P. Westgate, K. Kohlmann, and M. R. Ladisch. 1994. Cellulose pretreatments of lignocellulosic substrates. *Enzyme Microb. Technol.* **16**:1002–1004.
- Weimer, P. J. and J. G. Zeikus. 1977. Fermentation of Cellulose and Cellobiose by *Clostridium thermocellum* in the Absence and Presence of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, Feb. 1977, p. 289-297. Vol. 33, No. 2
- Whittington, T. 2006. Ethanol international overview of production and policies. [http://www.agric.wa.gov.au/objtwr/imported\\_assets/content/sust/biofuel/worldethproductiono.pdf](http://www.agric.wa.gov.au/objtwr/imported_assets/content/sust/biofuel/worldethproductiono.pdf). Diakses: 30 Mei 2018
- Xu, Q., A. Singh and M. E. Himmel., 2009. Perspectives and new directions for the production of bioethanol using consolidated bioprocessing of lignocelluloses. *Current Opinion in Biotechnology*, 20:364–371
- Yang, B and C. E. Wyman, 2007. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* 2:26–40 (2008); DOI: 10.1002/bbb
- Yoshimura, T., M. Hatakawa, F. Takahashi and T. Kawashima. Study of bio-ethanol production from cellulosic waste (rice straw). *J. Technology and Education*, Vol.19, No.1, 2012
- Yoswathana, N., P. Phuriphapat, P. Treyawutthiwat and M. N. Eshtiaghi. 2010. Bioethanol Production from Rice Straw. *Energy Research Journal* 1 (1): 26-31, 2010
- Zhang, Y. H. P and L. R. Lynd. 2005. Cellulose utilization by *Clostridium thermocellum*: Bioenergetics and hydrolysis product assimilation. *PNAS*. May 17, 2005. vol. 102 no. 20 \_ 7321–7325
- Zheng, Y. , P. Zhongli, Z. Ruihong. 2009. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol Production. *Int J Agric & Biol Eng.* Vol. 2 No.3
- Zheng, Y., Z. Pan, R. Zhang., 2009. *Overview of Biomass Pretreatment for Cellulosic Ethanol Production*. *Int J Agric & Biol Eng.* Vol. 2 No.3 51. September, 2009