

PENGARUH PRA PERLAKUAN BASA PADA AMPAS TEBU TERHADAP KARAKTERISASI PULP DAN PRODUKSI GULA PEREDUKSI

EFFECTS OF ALKALINE PRETREATMENT OF SUGARCANE BAGASSE ON PULP CHARACTERIZATION AND REDUCING SUGAR PRODUCTION

Triyani Fajriutami, Widya Fatriasari, dan Euis Hermiati
Pusat Penelitian Biomaterial, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia
Jl. Raya Bogor km. 46, Cibinong, Bogor 16911
E-mail: triyani@biomaterial.lipi.go.id

ABSTRAK

Ampas tebu merupakan limbah lignoselulosa yang cukup strategis dan menjanjikan sebagai bahan baku bioetanol yang berkelanjutan di Indonesia karena kandungan karbohidrat yang tinggi dan ketersediaannya yang melimpah. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pra perlakuan basa pada karakterisasi pulp ampas tebu serta gula pereduksi yang dihasilkan dengan metode hidrolisis enzimatis sebagai bahan baku bioetanol. Ampas tebu diberikan pra perlakuan dengan dua pelarut basa, yaitu masing-masing larutan alkali atau NaOH (1%, 2%, 3%) dan larutan kapur atau Ca(OH)_2 (0,1, 0,2, 0,3 g Ca(OH)_2 /g bahan) pada suhu 121°C selama 30, 60 dan 90 menit. Pra perlakuan NaOH lebih efektif dalam menurunkan kadar lignin dibandingkan Ca(OH)_2 yang berperan dalam meningkatkan rendemen gula pereduksi yang diperolehnya. Meskipun demikian, kondisi pra perlakuan yang relatif keras dapat berkontribusi terhadap menurunkan rendemen gulanya. Hal ini kemungkinan berkaitan dengan kerusakan struktur serat dan terjadinya rekristalisasi selulosa. Rendemen gula pereduksi tertinggi yang dihasilkan dari proses hidrolisis enzimatis selama 48 jam setelah pra perlakuan NaOH adalah 45,69%, sedangkan setelah pra perlakuan Ca(OH)_2 adalah 28,42%.

Kata kunci: *Lignoselulosa, alkali, kapur, gula pereduksi, hidrolisis enzimatis*

ABSTRACT

Sugarcane bagasse is lignocellulosic waste that has been considered as promising source for bioethanol production in Indonesia because of its abundant carbohydrate resources. The objective of this research is to study effects of alkaline pretreatment followed by enzymatic hydrolysis on pulp characterization and reducing sugar production as raw material for bioethanol. Sugarcane bagasse was pretreated by two kind of alkaline solution; alkali or NaOH (1%, 2%, 3%) and lime or Ca(OH)_2 (0,1, 0,2, 0,3 g Ca(OH)_2 /g biomass) at 121°C for 30, 60 and 90 minutes. Alkali more effective to remove lignin than lime pretreatment so the result showed alkali pretreatment produce highest reducing sugar yield than lime. But, harsher conditions would contribute to decrease the sugar which is caused by cell damage and recrystallization of cellulose. Highest reducing sugar yield was resulted from 48 hours of enzymatic hydrolysis after NaOH and Ca(OH)_2 pretreatment were 45,69% and 28,42%, respectively.

Keywords: *Lignocellulose, alkali, lime, reducing sugar, enzymatic hydrolysis*

PENDAHULUAN

Solusi untuk menghadapi kelangkaan energi fosil pada masa mendatang adalah pengembangan bioenergi. Kebijakan Energi Nasional (KEN) 2012-2050 menetapkan bahwa peran energi baru dan terbarukan tahun 2025 dan 2050 masing-masing minimal sebesar 25% dan 40%. Sedangkan peranan minyak bumi akan dikurangi menjadi kurang dari 25% di tahun 2025 dan kurang dari 20% di tahun 2050 (ESDM, 2012). Salah satu penelitian bioenergi yang

ditekuni saat ini adalah bioetanol dari biomassa lignoselulosa yang merupakan bioetanol generasi kedua. Generasi pertama bioetanol bersumber dari pati yang umumnya merupakan bahan pangan bagi penduduk dunia. Pengembangan generasi pertama dapat menimbulkan permasalahan diantaranya terganggunya ketersediaan pangan dan kenaikan harga pangan dunia. Oleh karena itu, agar tidak terjadi kompetisi kebutuhan pangan dan energi maka pengembangan bioetanol diarahkan untuk mengkonversi bahan lignoselulosa menjadi

bioetanol. Penggunaan bioetanol dari bahan lignoselulosa untuk transportasi dapat mengurangi 91% emisi gas rumah kaca dibandingkan bahan bakar fosil, sedangkan bahan bakar bioetanol dari pati jagung hanya mengurangi 22% emisi gas rumah kaca (Menon and Rao, 2012).

Harga bioetanol yang masih mahal menjadi permasalahan utama saat ini. Untuk skala besar produksi bioetanol, bahan baku yang melimpah dan murah akan lebih disukai oleh industri. Biomassa lignoselulosa dapat digunakan sebagai alternatif bahan baku untuk produksi bioetanol. Ketika menggunakan pati atau molase, bahan baku tersebut menghabiskan sekitar 40-70% biaya produksi (Dalgaard et al., 2006; Sendelius, 2005; Quintero et al., 2008). Limbah industri pertanian yang digunakan dalam penelitian ini adalah ampas tebu dimana diharapkan mampu menjadi salah satu bahan baku yang melimpah dan murah sehingga dapat mengurangi biaya produksi bioetanol. Di Indonesia, produksi tebu nasional adalah 33 juta ton/tahun dan terdapat 58 pabrik gula dengan kapasitas giling total 195.622 ton tebu per hari (TTH). Sementara itu, data P3GI pada tahun 2009 menunjukkan bahwa terdapat 15 perusahaan dengan 62 pabrik gula dengan jumlah tebu yang digiling 29,911 juta ton. Berdasarkan data P3GI tersebut, dilakukan perhitungan mengikuti metoda Badger dengan asumsi ampas tebu kering 10% dari tebu giling, kadar selulosa (glukan) dan hemiselulosa (xilan) ampas tebu masing-masing sebesar 40% dan 20%. Pada kondisi ini, efisiensi sakarifikasi glukan dan xilan masing-masing 76% dan 90%, dengan efisiensi fermentasi glukosa dan xilosa masing-masing 75% dan 50%. Hasil perhitungan menunjukkan bahwa potensi etanol yang dapat dihasilkan berkisar 467-112.552 kL/tahun dan potensi total untuk seluruh Indonesia adalah 614.827 kL/tahun (Hermiati et al., 2010).

Proses konversi bahan lignoselulosa menjadi bioetanol memerlukan beberapa tahap, yaitu pra perlakuan, hidrolisis selulosa menjadi gula sederhana dan fermentasi gula sederhana menjadi etanol. Pra perlakuan bertujuan untuk menghilangkan lignin, mengurangi kristalinitas selulosa, dan meningkatkan porositas bahan. Tahap ini

merupakan tahap yang paling mahal. Oleh karena itu, pra perlakuan merupakan tantangan utama dalam proses konversi lignoselulosa menjadi bioetanol (Hermiati et al., 2010). Keberagaman jenis bahan lignoselulosa menyebabkan peluang penelitian pra perlakuan masih terbuka lebar. Pada dasarnya, pra perlakuan dapat dilakukan secara mekanik, kimia, biologi, dan kombinasi antara dua atau tiga metode tersebut (Sun and Cheng, 2002).

Beberapa penelitian sudah dilakukan tentang keunggulan basa NaOH sebagai metode pra perlakuan bahan berlignoselulosa. Sudiyani et al., (2010) melaporkan bahwa pra perlakuan alkali (NaOH 1N) pada tandan kosong kelapa sawit (TKKS) lebih mampu menghilangkan lignin dibandingkan dengan asam dengan tingkat kehilangan lignin yang optimal adalah 45,8%. Nlewem and Thrash Jr. (2010) membandingkan beberapa pra perlakuan terhadap *switchgrass*, yaitu dengan 0,5-10% NaOH, 80-90°C selama 1 jam; dengan asam sulfat 0,5-6%, 121°C selama 1 jam; dan dengan air panas 100°C selama 1 jam yang menyimpulkan bahwa konsentrasi gula lebih tinggi diperoleh pada pra perlakuan NaOH 0,5% dibandingkan dengan lainnya. McIntosh and Vancov (2011) melaporkan bahwa kisaran delignifikasi jerami gandum sebesar 33-72% pada suhu 121°C selama 30-90 menit dengan menggunakan konsentrasi 0,75-2% NaOH. Asgher et al., (2013) juga telah melaporkan bahwa perlakuan 4% NaOH selama 30 menit pada suhu 121°C pada ampas tebu menghasilkan delignifikasi sebesar 48,7%. Di sisi lain, pra perlakuan Ca(OH)_2 menawarkan tiga keuntungan, yaitu tingkat degradasi selulosa dan hemiselulosa yang relatif rendah, harga yang tidak mahal, serta aman untuk digunakan (Sierra et al., 2009). Kondisi optimum pra perlakuan Ca(OH)_2 pada *switchgrass* dilaporkan pada kisaran suhu 100–120°C selama 2 jam (Chang et al., 1997), sedangkan pada *corn stover* pada suhu 120°C selama 4 jam (Kaar and Holtzapple, 2000). Kim dan Holtzapple (2005) juga melaporkan bahwa delignifikasi *corn stover* sampai dengan 57,8%, 66,2%, 80,9%, dan 87,5% dihasilkan selama 16 minggu pra perlakuan Ca(OH)_2 pada suhu 25, 35, 45, dan 55°C.

Terdapat berbagai macam metode hidrolisis untuk bahan-bahan berlignoselulosa, namun hidrolisis asam dan hidrolisis enzimatis merupakan dua metode utama yang banyak digunakan, khususnya untuk bahan-bahan berlignoselulosa dari limbah pertanian dan serpihan kayu (Badger, 2002). Sedikitnya ada tiga kelompok enzim yang terlibat dalam proses hidrolisis enzimatis pada selulosa, yaitu 1) endoglukanase yang bekerja pada wilayah serat selulosa yang mempunyai kristalinitas rendah untuk memecah selulosa secara acak dan membentuk ujung rantai yang bebas, 2) eksoglukanase atau selobiohidrolase yang mendegradasi lebih lanjut molekul tersebut dengan memindahkan unit-unit selobiosa dari ujung-ujung rantai yang bebas, dan 3) β -glukosidase yang menghidrolisis selobiosa menjadi glukosa (Hermiati et.al., 2010)

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pengaruh pra perlakuan basa NaOH dan basa $\text{Ca}(\text{OH})_2$ terhadap perubahan komponen kimia dan morfologi pulp ampas tebu serta gula pereduksi yang dihasilkan dengan metode hidrolisis enzimatis sebagai bahan baku bioetanol.

METODE

Persiapan Bahan Baku

Ampas tebu diperoleh dari pabrik gula di Subang, Jawa Barat yang kemudian dikeringkan, digiling, dan disaring sehingga berukuran 40-60 mesh. Sebelum digunakan untuk proses selanjutnya, ampas tebu tersebut disimpan dalam wadah yang tertutup rapat.

Pra Perlakuan Basa

Pra perlakuan pertama diawali dengan persiapan larutan NaOH dengan variasi konsentrasi 1%, 2% dan 3% (b/v). Selanjutnya 10 g (berat kering oven) ampas tebu dimasukkan kedalam labu erlenmeyer 250 mL dan ditambahkan larutan NaOH dengan rasio substrat: larutan adalah 1:1,15. Untuk pra perlakuan kedua dengan $\text{Ca}(\text{OH})_2$ juga dilakukan dengan menimbang 10 g (berat kering oven) ampas tebu yang

dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer 250 mL. Konsentrasi $\text{Ca}(\text{OH})_2$ yang digunakan adalah 0,1, 0,2, dan 0,3 g/g ampas tebu. Oleh karena itu, serbuk $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ditimbang sebanyak 1 g, 2 g dan 3 g untuk dicampurkan bersama ampas tebu yang sudah ditimbang sebelumnya. Kemudian ditambahkan air sebanyak 15 g/g ampas tebu atau 150 g air. Diasumsikan berat jenis air adalah 1 g/mL, sehingga air yang ditambahkan ke dalam campuran adalah 150 mL. Proses pemanasan kedua pra perlakuan tersebut dilakukan pada suhu 121°C selama 30, 60, dan 90 menit dalam pemanas bertekanan (*autoclave*). Setelah pemanasan selesai, sampel disaring untuk memisahkan pulp ampas tebu dengan limbah cairnya. Pulp ampas tebu dibilas beberapa kali dengan air suling sampai pH-nya netral. Sebagian pulp ampas tebu yang sudah netral dikeringkan di oven 60°C selama 3 hari untuk analisa kimia, dan sebagian lainnya tetap disimpan basah dalam lemari pembeku untuk hidrolisis enzimatis. Sebagai pembanding pra perlakuan tanpa basa, pra perlakuan dilakukan hanya dengan menambahkan air suling sebanyak 150 mL pada ampas tebu yang dilakukan dengan parameter berat substrat, suhu pemanasan dan waktu yang sama dengan kedua pra perlakuan basa.

Hidrolisis Enzimatis

Hidrolisis enzimatis pada penelitian ini menggunakan enzim selulase komersial (Meicellase dari Meiji Seika, Jepang) dengan aktifitas enzim 200 fpu/g. Larutan buffer sodium sitrat 0,05 M dengan pH 5 disiapkan sebagai pelarut enzim selulase. Sebanyak 1 g Meicellase dilarutkan dalam larutan buffer sodium sitrat hingga volume 100 mL, sehingga mencapai konsentrasi larutan stok enzim selulase 2 fpu/mL. Proses hidrolisis enzimatis dilakukan terhadap ampas tebu setelah proses pra perlakuan NaOH maupun $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Sebanyak 0,1 g (berat kering) pulp ampas tebu hasil pra perlakuan ditimbang dalam botol vial volume 20 mL. Kemudian ditambahkan 5 mL larutan buffer sodium sitrat dan 0,1 mL larutan sodium azide 20 mg/mL. Setelah itu, ditambahkan larutan stok enzim selulase 0,5 mL (untuk konsentrasi enzim 10 fpu/g) atau 1 mL (untuk konsentrasi enzim 20 fpu/g).

Larutan buffer sodium sitrat ditambahkan kembali sampai dengan berat total campuran mencapai 10 g. Persiapan yang sama dilakukan juga untuk kontrol buffer (tanpa substrat dan tanpa penambahan enzim selulase) dan kontrol enzim (tanpa substrat). Proses hidrolisis dilakukan dalam *shaking incubator* dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 50°C selama 48 jam. Posisi vial diletakkan secara horisontal untuk memperluas kontak substrat dengan enzim.

Analisa Komponen Kimia, Gugus Fungsi dan Morfologi Serat

Ampas tebu diukur kadar airnya berdasarkan TAPPI T12 os-75, kemudian diekstrak dengan etanol-benzene (1:2). Setelah itu ditentukan kadar lignin tidak larut asam (TAPPI T13 os-54) dan kadar holoselulosa (TAPPI T9m-54). Sampel hasil uji holoselulosa digunakan untuk analisa kadar alfa selulosa dengan metode Mokushitsu Kagaku Jiken Manual (2000). Hemiselulosa dihitung dari pengurangan kadar holoselulosa dengan alfa selulosa. Setelah itu dilakukan penghitungan kehilangan berat dan kehilangan lignin.

Morfologi serat ampas tebu sebelum dan setelah pra perlakuan dianalisa menggunakan *Scanning Electron Microscope* (SEM) dengan perbesaran 2000 kali (15kV, WD 11 mm). Analisa gugus fungsi ampas tebu sebelum dan setelah pra perlakuan dilakukan dengan *Fourier Transform Infrared* (FTIR) *Spectrometric*. Persiapan analisa FTIR dilakukan dengan mencampur 4 mg serbuk ampas tebu yang dicampur dengan 200 mg KBr (kalium bromida) kemudian dimasukkan dalam tempat pembuat pelet dan selanjutnya diberi tekanan 5000 psi. Spetrum direkam menggunakan ABB FTIR MB3000 dengan resolusi 16 cm⁻¹ dan 5 scan tiap sampel dengan kisaran frekuensi 4000-500 cm⁻¹.

Filtrat hasil hidrolisis dianalisa gula pereduksinya menggunakan metode Nelson-Somogyi. Gula pereduksi substrat dihitung setelah dikurangi dengan gula pereduksi pada kontrol buffer dan kontrol enzim. Penghitungan rendemen gula pereduksi dan rendemen gula teoritis mengacu pada metode Fatriasari et al. (2014a). Rendemen

gula pereduksi dihitung berdasarkan berat kering ampas tebu sebelum pra perlakuan.

Data kehilangan berat, kehilangan lignin, dan rendemen gula pereduksi dianalisa dengan menggunakan analisa ragam ANOVA. Program statistik yang digunakan adalah *IBM SPSS Statistics version 21*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Komposisi Kimia Ampas Tebu

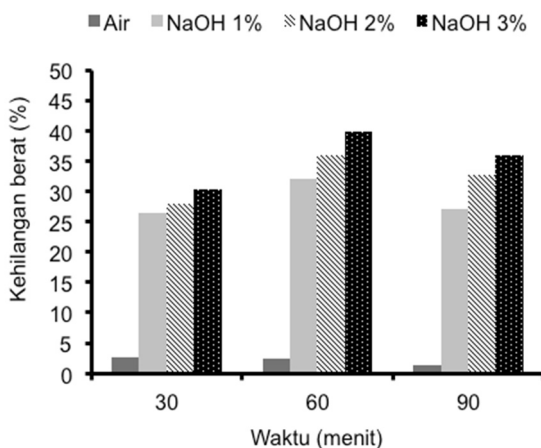
Analisa komposisi kimia bahan baku ampas tebu sebelum pra perlakuan bertujuan untuk mengetahui komponen utama penyusun dinding sel ampas tebu berdasarkan basis kering bahan. Fraksi karbohidrat (holoselulosa) dari ampas tebu adalah 61,96% yang terdiri dari 34,48% alfaselulosa dan 27,48% hemiselulosa. Dengan demikian, komponen terbesar pada ampas tebu adalah alfaselulosa yang merupakan polimer glukosa yang menjadikan ampas tebu berpotensi besar sebagai sumber gula untuk produksi bioetanol. Komponen terbesar ketiga ampas tebu adalah lignin, yaitu 22,45% yang termasuk dalam kisaran kandungan lignin kayu daun lebar (18-25%) (Sudiyani et al., 2010). Ketiga komponen utama ampas tebu ini mirip dengan hasil analisa ampas tebu di penelitian lainnya (Wallace et al., 2016). Komponen lainnya yang terdapat pada ampas tebu yang digunakan dalam penelitian ini adalah abu (2,13%) dan ekstraktif (1,58%).

Pengaruh Pra Perlakuan Basa terhadap Kehilangan Berat Pulp Ampas Tebu

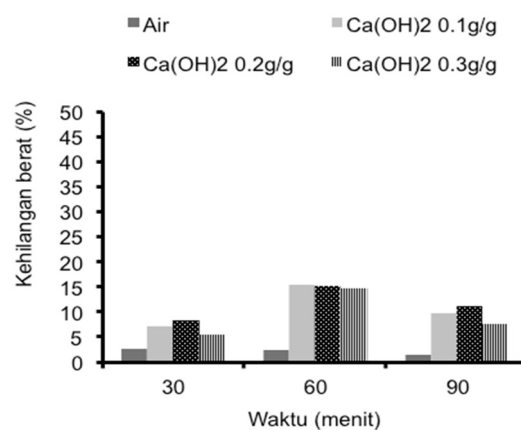
Pada dasarnya pra perlakuan bahan berlignoselulosa bertujuan untuk menghilangkan lignin, mengurangi kristalinitas selulosa, dan meningkatkan porositas bahan (Hermiati et al., 2010). Pelarut air pada ampas tebu digunakan sebagai pembanding pada pra perlakuan basa. Hasil analisa statistik menunjukkan bahwa konsentrasi NaOH maupun Ca(OH)₂ serta waktu pemanasan mempengaruhi kehilangan berat ampas tebu ($p < 0.05$). Penggunaan larutan NaOH mengurangi

berat ampas tebu sebanyak 10-16 kali lipat pada proses pra perlakuan, sedangkan penggunaan Ca(OH)_2 mengurangi berat ampas tebu sebanyak 2-7 kali lipat dibandingkan pra perlakuan dengan pelarut air. Hal ini berarti bahwa aktivitas delignifikasi yang lebih intensif dengan pra perlakuan NaOH menyebabkan kehilangan berat ampas tebu yang lebih besar dibandingkan dengan Ca(OH)_2 .

Kehilangan berat paling besar diantara berbagai variasi kondisi pra perlakuan sebesar 39,74% yang terjadi setelah pra perlakuan NaOH 3% dan 60 menit autoklaf (Gambar 1a). Kehilangan berat ampas tebu akibat pra perlakuan Ca(OH)_2 dapat dilihat pada Gambar 1b dengan kehilangan berat tertinggi 15,39% terjadi setelah pra perlakuan Ca(OH)_2 0,1 g/g ampas tebu dan 60 menit autoklaf. Kehilangan berat ampas tebu tersebut tidak sebanyak yang dihasilkan oleh pra perlakuan NaOH karena pra perlakuan Ca(OH)_2 tidak banyak mendegradasi lignin (Irfan et al., 2011), serta selulosa dan hemiselulosa (Sierra et al., 2009) sehingga tidak banyak terjadi kehilangan berat. Peningkatan waktu pemanasan dan konsentrasi NaOH cenderung meningkatkan kehilangan berat pada ampas tebu. Sedangkan pengaruh peningkatan kehilangan berat ampas tebu pada pra perlakuan Ca(OH)_2 hanya terjadi sampai konsentrasi sampai 0,2 g/g dan waktu pemanasan 60 menit.

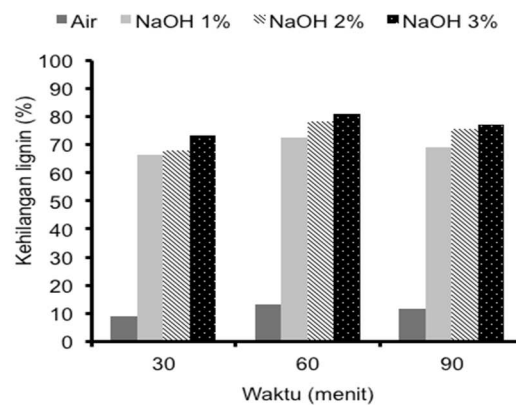


(a)

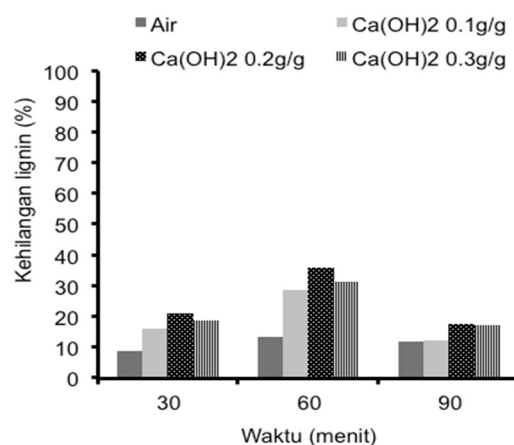


(b)

Gambar 1. Kehilangan berat ampas tebu setelah diberi perlakuan (a) NaOH dan (b) Ca(OH)_2 dengan pemanas bertekanan pada suhu 121°C



(a)



(b)

Gambar 2. Kehilangan lignin ampas tebu setelah diberi perlakuan (a) NaOH dan (b) Ca(OH)_2 dengan pemanas bertekanan pada suhu 121°C

Pengaruh pra perlakuan basa terhadap kehilangan lignin

Gambar 2a memperlihatkan pengaruh konsentrasi larutan NaOH dan waktu pemanasan terhadap kehilangan lignin ampas tebu. Kehilangan lignin tertinggi di antara berbagai variasi pra perlakuan terjadi setelah pra perlakuan NaOH 3% selama autoklaf 60 menit, yaitu sebesar 80,70%. Hal ini pula yang menyebabkan kehilangan berat tertinggi pada kondisi yang sama (Gambar 1a). Kehilangan lignin oleh pra perlakuan alkali terutama disebabkan oleh kurang stabilnya ikatan ester antara selulosa dan kompleks lignin. Lignin yang terlepas kemudian berikatan dengan alkali membentuk kompleks lignin-alkali yang larut dalam air (Gunam et al., 2011). Selain itu larutan NaOH berperan dalam memecah polimer lignin menjadi monomer-monomernya yang terlarut dalam filtrat cairnya.

Kehilangan lignin akibat pengaruh $\text{Ca}(\text{OH})_2$ dapat dilihat pada Gambar 2b. Kehilangan lignin tertinggi, yaitu 35,69% terjadi setelah pra perlakuan $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 0,2 g/g ampas tebu selama autoklaf 60 menit. Pada kondisi ini tingkat kehilangan berat yang terjadi juga yang tertinggi (Gambar 1b). Kehilangan lignin ini tidak sebesar dengan perlakuan NaOH karena $\text{Ca}(\text{OH})_2$ cukup selektif dalam mendegradasi lignin, walaupun degradasi beberapa jenis karbohidrat juga terjadi. Namun, pada pra perlakuan jangka pendek, telah dibuktikan bahwa karbohidrat masih banyak yang bisa dipertahankan pada pra perlakuan $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (Sierra et al., 2009).

Pengaruh pra perlakuan basa terhadap struktur pulp ampas tebu

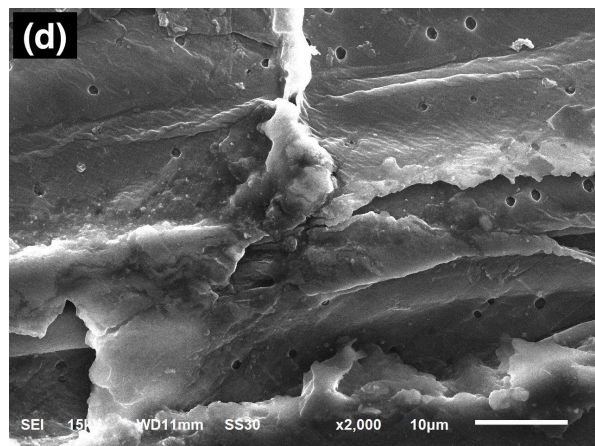
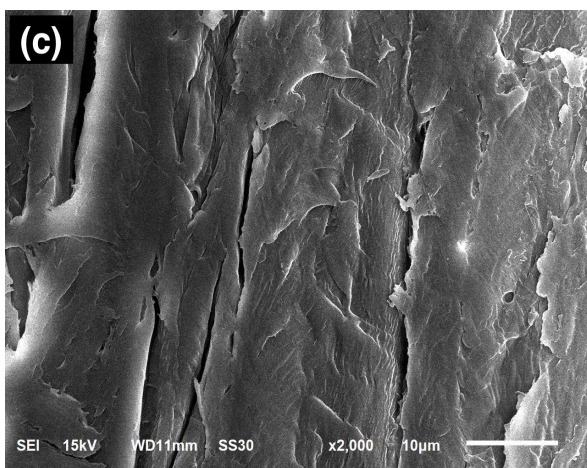
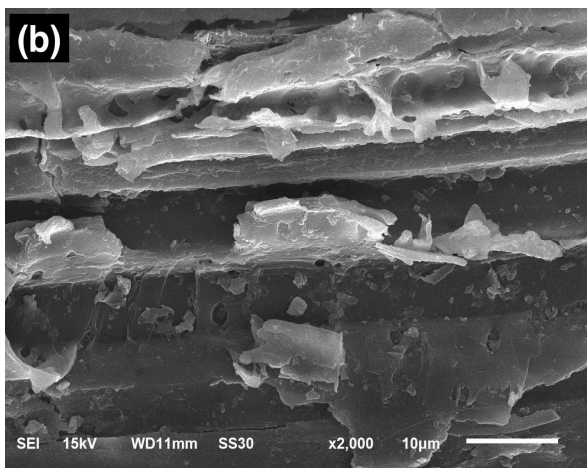
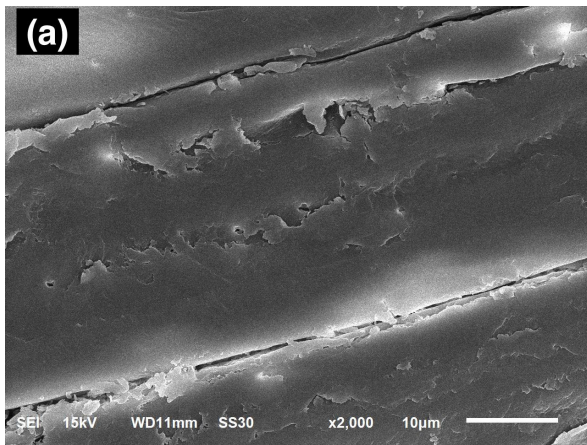
Beberapa teknik analisa, termasuk SEM dan FTIR, sudah digunakan secara luas untuk mengevaluasi perubahan struktur yang disebabkan oleh variasi pra perlakuan terhadap ampas tebu (Pereira et al., 2016) dan juga bahan lignoselulosa lain seperti bambu (Fatriasari et al., 2014b; Fatriasari et al., 2015; Fatriasari et al., 2016). Pada penelitian ini, analisa SEM dilakukan sebelum dan setelah pra perlakuan. Bahan baku ampas tebu terlihat permukaannya

sedikit terkoyak akibat proses penggilingan (Gambar 3a). Namun lignin masih berikatan dengan karbohidrat sehingga serat ampas tebu masih dominan terlihat rata dan utuh. Penggilingan yang dilakukan untuk mendapatkan ukuran serat ampas tebu 40-60 mesh merupakan pra perlakuan fisik. Penggilingan berperan meningkatkan luas daerah kontak dan porositas bahan sehingga diharapkan terjadi peningkatan efektifitas proses pra perlakuan dan hidrolisis.

Kemudian serat ampas tebu memperlihatkan pola yang berbeda setelah diberi perlakuan dengan air, NaOH maupun $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Dengan menggunakan pelarut air, serat ampas tebu hanya menerima perlakuan panas bertekanan, oleh karena itu permukaan ampas tebu yang makin terkoyak dan pecah (Gambar 3b). Pada pra perlakuan dengan air menyebabkan perubahan komposisi kimia ampas tebu karena peranan panas bertekanan dapat merusak ikatan dalam lignin (Gambar 2) dan kemudian melarutkannya ataupun karbohidrat terutama hemiselulosa. Pengaruh perlakuan ini pernah dilaporkan untuk pra perlakuan air pada bambu dengan iradiasi gelombang mikro (Fatriasari et al., 2016) dan pra perlakuan *liquid hot water* (LHW) pada kayu jabon (Amin et al., 2014). Sedangkan pra perlakuan NaOH memperlihatkan bahwa kerusakan serat ampas tebu dimulai dari permukaan ke dalam sehingga ikatan struktur lignoselulosa mulai terbuka dan menyediakan permukaan yang semakin luas untuk reaksi hidrolisis enzimatis berikutnya (Gambar 3c).

Pengaruh pra perlakuan NaOH pada tandan kosong kelapa sawit juga menyebabkan pengembangan serat, perbesaran diameter lumen sel dan penipisan dinding sel (Roliadi dan Fatriasari, 2002) sebagai bentuk terlarutnya lignin dari dinding sel. Kehilangan lignin ampas tebu setelah pra perlakuan NaOH telah dibuktikan sebelumnya (Gambar 2a). Lubang-lubang yang terdapat pada struktur serat ampas tebu setelah pra perlakuan $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (Gambar 3d) mengindikasikan kemungkinan terjadi degradasi hemiselulosa selain degradasi lignin (Gambar 2b), akibat dari rusaknya ikatan lignin dan hemiselulosa yang mulai terjadi. Amin et al. (2014) telah melaporkan pengembangan struktur serat,

kerusakan serat kayu jabon, dan terbentuknya pori akibat perlakuan $\text{Ca}(\text{OH})_2$ pada berbagai suhu. Diharapkan dengan rusaknya serat ampas tebu dengan pra perlakuan air dan alkali ini akan menyebabkan struktur selulosa terekspos sehingga lebih mudah bereaksi secara langsung dengan enzim pada reaksi hidrolisis.



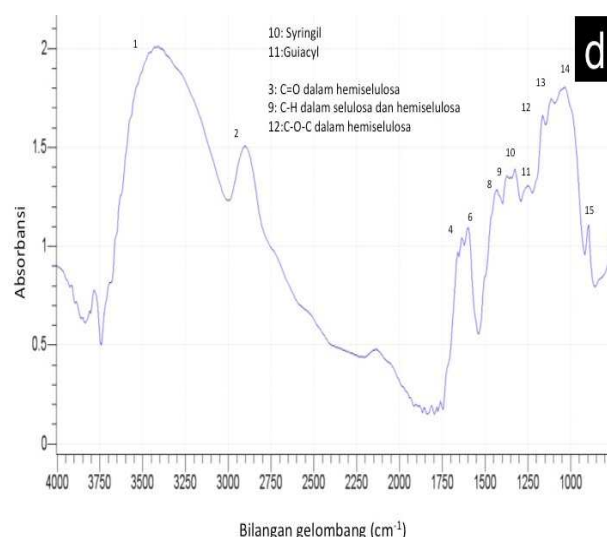
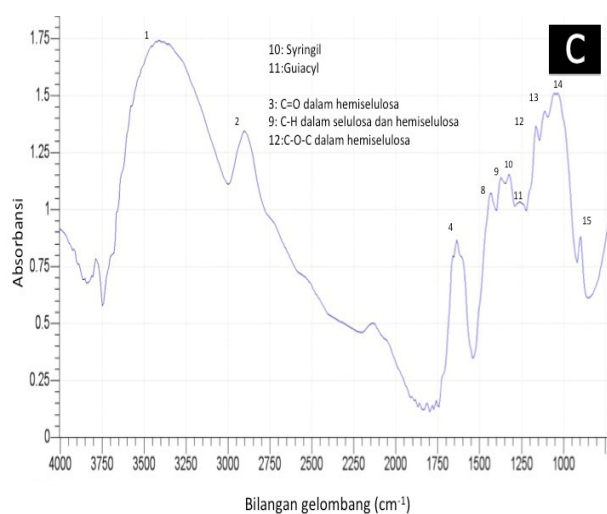
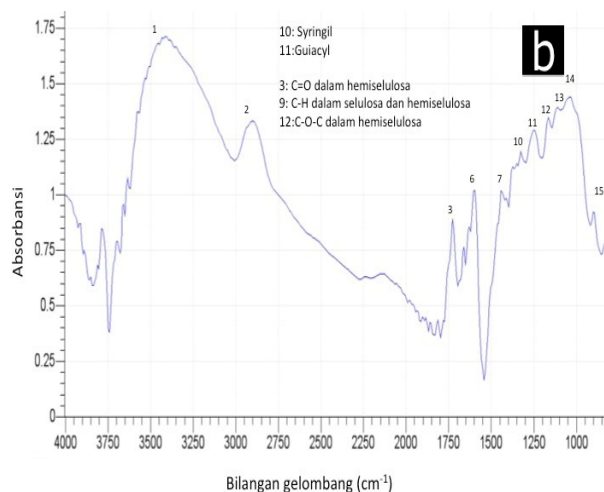
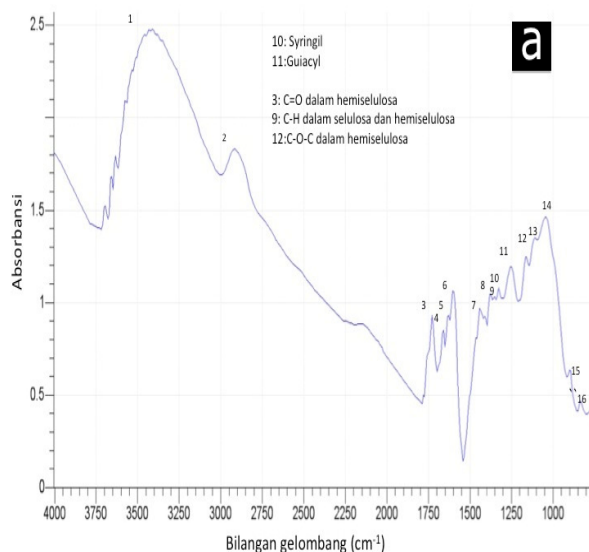
Gambar 3. Hasil analisa SEM (*Scanning Electron Microscope*) penampang melintang ampas tebu: (a) sebelum pra perlakuan, setelah pra perlakuan dengan (b) air, (c) NaOH, (d) $\text{Ca}(\text{OH})_2$ pada suhu 121°C

Analisa FTIR sebelum dan sesudah pra perlakuan dilakukan untuk mengevaluasi perubahan gugus fungsional yang disebabkan oleh pra perlakuan basa dengan cara menganalisa perubahan pita absorbansi komponen utama lignoselulosa (selulosa, hemiselulosa, lignin). Gambar 4a menunjukkan spektrum FTIR ampas tebu awal. Sedangkan Gambar 4b, Gambar 4c, dan Gambar 4d menunjukkan spektrum FTIR setelah pra perlakuan air, NaOH, dan $\text{Ca}(\text{OH})_2$ secara berurutan.

Sifat kristalinitas selulosa dapat didekati dengan nilai LOI (*Lateral Order Index*). Nilai LOI merupakan rasio antara jumlah selulosa kristalin dan amorf yang merupakan sifat terpenting pada lignoselulosa yang menyebabkan serat selulosa resisten terhadap enzim selulosa. Absorbansi pada bilangan gelombang 1427 dan 898 cm^{-1} sebagai ciri selulosa dapat digunakan untuk mempelajari perubahan kristalinitas selulosa. Tabel 1 memperlihatkan terjadinya penurunan LOI ampas tebu setelah diberi perlakuan dengan air, NaOH dan $\text{Ca}(\text{OH})_2$ pada suhu 121°C . Hal ini mungkin disebabkan oleh terjadinya kerusakan daerah kristalin selulosa serta pembesaran rasio pori-pori dan bagian dalam daerah permukaan, dimana akan memperbaiki digestibilitas enzim dalam proses hidrolisis. Pembesaran pori-pori tersebut akibat dari aktifitas pemecahan

gugus ester pada ikatan silang antara lignin dan xylan (Tarkow and Feist, 1969). Penurunan LOI pada pra perlakuan air (39,36%) lebih besar dibandingkan dengan pra perlakuan NaOH (33,51%) dan pra perlakuan $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (36,74%) yang mengindikasikan pola degradasi yang berbeda dimana pra perlakuan dengan air mungkin lebih bersifat mengkonversi struktur kristalin pada selulosa dibandingkan dengan basa. Hal ini karena pra perlakuan basa lebih menyerang polimer lignin dibandingkan dengan selulosa.

Umumnya, bilangan gelombang 1509, 1464 dan 1422 cm^{-1} pada spektrum FTIR identik dengan struktur lignin (Sun et al., 2003). Ampas tebu yang termasuk dalam kelompok rumput-rumputan mengandung tiga kelompok lignin yaitu unit guaiasil propana yang mengandung satu gugus metoksil, unit siringil propana dengan dua gugus metoksil dan para-coumaryl alkohol tanpa gugus metoksil. Besar kandungan unit lignin tersebut pada umumnya adalah 40% guaiasil, 40% siringil dan 20% para-coumaryl alkohol. Berdasarkan spektrum FTIR tersebut tampak jelas bahwa karakteristik puncak lignin dapat ditemukan di sampel tanpa dan dengan perlakuan pada bilangan gelombang 1250 cm^{-1} (11) untuk unit guaiasil dan 1327 cm^{-1} (10) untuk unit siringil.



Gambar 4. Spektrum FTIR pada ampas tebu: (a) sebelum pra perlakuan, setelah pra perlakuan dengan (b) air, (c) NaOH, (d) $\text{Ca}(\text{OH})_2$ pada suhu 121°C

Tabel 1. *Lateral order indeks* (LOI) ampas tebu sebelum dan sesudah pra perlakuan

Bahan	A ₁₄₂₇ (kristalin)	A ₈₉₇ (amorf)	LOI
Ampas tebu	0,640	0,350	1,829
Ampas tebu dengan pra perlakuan air	1,020	0,920	1,109
Ampas tebu dengan pra perlakuan NaOH	1,070	0,880	1,216
Ampas tebu dengan pra perlakuan Ca(OH) ₂	1,290	1,110	1,162

Perbandingan siringil dan guaiasil (Rasio S/G) dapat digunakan untuk melihat pola degradasi unit penyusun polimer lignin lebih dalam dimana makin tinggi rasio S/G menunjukkan peningkatan laju delignifikasi. Jumlah gugus metoksil pada unit siringil yang menyebabkan proses substitusi dengan gugus lain terjadi lebih mudah. Tabel 2 menunjukkan bahwa Rasio S/G terbesar

pada pra perlakuan ampas tebu adalah dengan pra perlakuan NaOH, disusul oleh pra perlakuan Ca(OH)₂ dan pra perlakuan air. Hal ini membuktikan bahwa pra perlakuan basa meningkatkan laju delignifikasi pada ampas tebu, terutama pra perlakuan NaOH yang menunjukkan hasil delignifikasi lebih besar dibandingkan dengan Ca(OH)₂ (Gambar 2).

Tabel 2. Rasio siringil/guaiasil ampas tebu sebelum dan sesudah pra perlakuan

Unit Propana Lignin	Tinggi Puncak			
	Ampas tebu	Ampas tebu-air	Ampas tebu-NaOH	Ampas tebu-Ca(OH) ₂
Siringil (10)	0,70	1,20	1,15	1,39
Guaiasil (11)	0,78	1,29	1,03	1,30
Rasio S/G	0,89	0,93	1,12	1,07

Tabel 3. Karakterisasi bilangan gelombang FTIR pada ampas tebu

No	Ampas Tebu	Pra Perlakuan			Gugus Fungsi	Referensi
	Air	NaOH	Ca(OH) ₂			
	Bilangan gelombang (cm ⁻¹)					
1	3410	3410	3410	3410	Regangan ikatan hidrogen (O-H), Vibrasi O(3)H-O(3) dalam selulosa	Pandey and Pitman (2003); Isroi et al. (2012); Lai and Idris (2013); Nomanbhay et al. (2013); Corrales et al. (2012)
2	2916	2901	2901	2901	Deformasi C-H aksial	Corrales et al. (2012)
					Regangan C-H dalam gugus metil dan metilen	Nomanbhay et al. (2013)
3	1728	1728	-	-	C=O tak terkonjugasi dalam xylan (hemiselulosa)	Pandey and Pitman (2003)
4	1659	1651	1636	1636	C=O, C=C, O-H yang terserap dan C=O terkonjugasi	Lai and Idris (2013)
					Aril keton terkonjugasi dalam lignin	Isroi et al. (2012)
5	1605	-	-	-	Vibrasi C-Ph	Corrales et al. (2012)
6	-	1597	-	1597	Vibrasi kerangka aromatik dalam lignin dan regangan C=O	Pandey and Pitman (2003); Nomanbhay et al. (2013)
					S > G; Guaiasil terkondensasi > Guaiasil tereterifikasi	Isroi et al. (2012)

Tabel 3. (lanjutan)

7	1443	1443	-	-	Pita serapan cincin C=O	Lai and Idris (2013)
8	-	-	1435	1427	Deformasi C-H alifatik, deformasi C-H dalam lignin dan karbohidrat	Corrales et al. (2012); Pandey and Pitman (2003); Lai and Idris (2013)
9	1381	-	1373	1373	Deformasi C-H dalam selulosa dan hemiselulosa	Lai and Idris (2013); Pandey and Pitman (2003)
10	1327	1327	1327	1327	Vibrasi C-H dalam selulosa	Pandey and Pitman (2003)
					Vibrasi C ₁ -O dalam turunan lignin (siringil)	Lai and Idris (2013)
11	1250	1250	1257	1250	C-O dari unit guaiasil dan regangan C-O dalam lignin dan xylan	Pandey and Pitman (2003); He et al. (2008)
					Regangan C-O dari fenol	Corrales et al. (2012)
12	1165	1165	1165	1165	Regangan O-H dari alkohol sekunder	Corrales et al. (2012)
					Vibrasi C-O-C dalam bidang anomerik pada hemiselulosa, C-C dan C-O	He et al. (2008); Isroi et al. (2012)
13	1111	1111	1111	1111	Regangan C-O-C, β -xylan	Corrales et al. (2012); He et al. (2008)
14	1041	1041	1034	1034	Regangan C-O dalam selulosa dan hemiselulosa	Pandey and Pitman (2003)
15	903	903	895	895	Deformasi C-H dalam selulosa	Nelson and O'Connor (1964); Pandey and Pitman (2003)
					Ikatan β -glicosidic antara unit-unit gula	Lai and Idris (2013); Corrales et al. (2012); Nomanbhay et al. (2013)
16	833	-	-	-	Vibrasi C-H	Cheng et al. (2013)

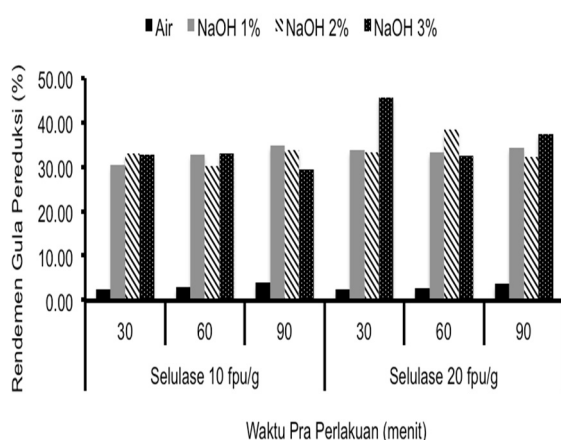
Gugus fungsional yang teridentifikasi pada ampas tebu sebelum dan sesudah pra perlakuan dapat dilihat pada Tabel 3. Tampak bahwa pra perlakuan air dan basa menyebabkan kehilangan beberapa gugus fungsional. Selain itu terjadi perbedaan intensitas pada masing-masing gugus fungsional yang teridentifikasi. Absorbansi yang lebar pada bilangan gelombang 3394-3390 cm^{-1} berkaitan dengan gugus OH, sedangkan bilangan gelombang 2900-2800 cm^{-1} menunjukkan regangan O-H (Wang et al., 2007). Pra perlakuan dengan air, NaOH, maupun $\text{Ca}(\text{OH})_2$ menyebabkan peningkatan absorbansi dan luas area dan lebar puncak pada bilangan gelombang 3410 cm^{-1} yang berkaitan dengan regangan dari gugus OH. Hal ini mengindikasikan pelemahan ikatan intra dan intermolekul pada gugus OH dan menurunnya kristalinitas (Goshadrou et al., 2011). Pra perlakuan NaOH dan $\text{Ca}(\text{OH})_2$ menyebabkan terjadinya kehilangan gugus fungsi C=O pada hemiselulosa, sedangkan pra perlakuan

dengan air berpengaruh terhadap kehilangan gugus fungsi C-H pada selulosa dan hemiselulosa. Gugus fungsi C-O-C dalam hemiselulosa dan C-H dalam selulosa tetap ada dalam ampas tebu setelah pra perlakuan air dan $\text{Ca}(\text{OH})_2$, hanya terjadi perbedaan tingkat intensitas diantara perlakuan. Hal ini karena dalam aktifitas penyerangan polimer lignin, pra perlakuan juga menyebabkan terjadinya kehilangan karbohidrat terutama hemiselulosa. Struktur rantai bercabang pada hemiselulosa dan derajat polimerisasi yang lebih rendah pada hemiselulosa menyebabkan polimer ini lebih mudah terdegradasi dibandingkan dengan selulosa yang didominasi struktur kristalin.

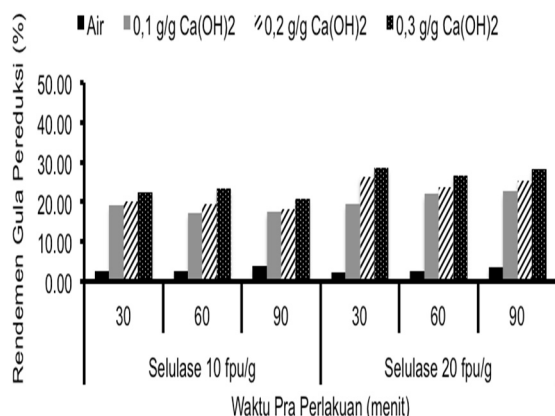
Pengaruh pra perlakuan basa terhadap rendemen gula pereduksi

Rendemen gula pereduksi meningkat dengan penggunaan pelarut basa ($p < 0.05$). Delignifikasi ampas tebu oleh NaOH yang menghasilkan kehilangan lignin 66,21–

80,70% (Gambar 2a) diikuti proses hidrolisis enzimatis selama 48 jam menghasilkan rendemen gula pereduksi 29,31 – 45,69% (Gambar 5). Sedangkan delignifikasi ampas tebu oleh $\text{Ca}(\text{OH})_2$ yang menghasilkan kehilangan lignin 12,13–29,6% (Gambar 2b) diikuti proses hidrolisis enzimatis selama 48 jam menghasilkan rendemen gula pereduksi 17,51–35,69% (Gambar 6). Delignifikasi tanpa pelarut basa menghasilkan kehilangan lignin 8,81 – 11,83% dengan rendemen gula pereduksi yang rendah, yaitu 2,32 – 3,87%.



Gambar 5. Pengaruh pra perlakuan NaOH terhadap rendemen gula pereduksi setelah hidrolisis menggunakan konsentrasi selulase 10 fpu/g dan 20 fpu/g selama 48 jam pada suhu 50°C



Gambar 6. Pengaruh pra perlakuan $\text{Ca}(\text{OH})_2$ terhadap rendemen gula pereduksi setelah hidrolisis dengan konsentrasi selulase 10 fpu/g dan 20 fpu/g selama 48 jam pada suhu 50°C

Rendemen gula pereduksi tertinggi dihasilkan oleh pra perlakuan NaOH. Hal ini disebabkan karena NaOH merupakan katalis basa terkuat yang efektif meningkatkan laju hidrolisis enzimatis dibandingkan pelarut basa lainnya (Kim et al., 2016). NaOH efektif menyerang ikatan antara lignin dan hemiselulosa dalam kompleks lignin-karbohidrat terutama memutus ikatan eter dan ester pada kompleks tersebut. Walaupun demikian, pra perlakuan dengan $\text{Ca}(\text{OH})_2$ yang sederhana dan murah tetap menarik sebagai alternatif pra perlakuan basa. Peranan $\text{Ca}(\text{OH})_2$ dalam proses pra perlakuan adalah menghilangkan sebagian besar gugus asetil hemiselulosa dan sepertiga lignin dari biomassa lignoselulosa. Konsentrasi lignin yang rendah dalam bahan inilah yang merupakan faktor utama dalam meningkatkan derajat hidrolisis enzimatis (Kim et al., 2016; Sun et al., 2016). Hasil penelitian ini membuktikan bahwa kehilangan lignin setelah pra perlakuan alkali merupakan faktor kunci pendorong untuk memproduksi gula pereduksi yang tinggi.

Penambahan waktu pemanasan sampai dengan 90 menit pada kedua proses pra perlakuan serta peningkatan konsentrasi NaOH sampai dengan 3% tidak berpengaruh nyata terhadap rendemen gula pereduksi ($p > 0.05$). Hal ini disebabkan oleh hilangnya fraksi hemiselulosa ampas tebu yang dipengaruhi kerasnya kondisi pra perlakuan (Cai et al., 2016). Hemiselulosa sebagai sumber gula dengan rantai karbon 5 (C_5) sendiri dapat berkontribusi dalam memproduksi gula pereduksi. Meskipun kehilangan lignin cenderung meningkat dengan penambahan konsentrasi alkali (Gambar 2) namun kehilangan lignin sedikitnya 50% sudah efektif meningkatkan efektifitas proses hidrolisis enzimatis pada pulp kayu jabon. Sedangkan kehilangan lignin 94% diperlukan untuk mencapai produksi etanol yang tinggi pada pulp kayu jabon (Wistara et al. 2016). Kemungkinan lainnya adalah dengan makin kerasnya bahan kimia yang digunakan pada pra perlakuan, maka terjadi kolaps struktur pori atau rekristalisasi selulosa yang mempengaruhi hidrolisis enzimatis (Cai et al., 2016). Sedangkan peningkatan konsentrasi $\text{Ca}(\text{OH})_2$ sampai dengan 0.3 g/g ampas tebu meningkatkan rendemen gula

pereduksi ($p < 0.05$). Hal ini disebabkan karena delignifikasi terjadi secara perlahan dengan pra perlakuan Ca(OH)_2 (Sun et al., 2016), sehingga peningkatan konsentrasi Ca(OH)_2 dapat mengkatalisisasi proses delignifikasi yang akan berpengaruh pada hidrolisis enzimatis. Peningkatan konsentrasi enzim (dari 10 fpu/g ke 20 fpu/g) pada proses hidrolisis meningkatkan rendemen gula yang dihasilkan setelah kedua pra perlakuan basa ($p < 0.05$). Pada Gambar 5 dan 6 dapat dilihat bahwa rendemen gula pereduksi tertinggi dihasilkan setelah pra perlakuan NaOH dan Ca(OH)_2 yang kemudian dilanjutkan hidrolisis enzimatis dengan konsentrasi enzim selulase 20 fpu/g, yaitu 45.69% dan 28.42%, berturut-turut. Peningkatan jumlah enzim dalam volume hidrolisis enzimatis yang sama berkontribusi terhadap produksi gula yang lebih tinggi.

Secara teori, konversi ampas tebu menjadi gula pereduksi dengan 100% derajat hidrolisis dapat menghasilkan 68,8 g gula pereduksi/100 g ampas tebu kering. Oleh karena itu, berdasarkan penghitungan gula pereduksi teoritis tersebut, pra perlakuan NaOH pada penelitian kali ini menghasilkan 66,4% gula pereduksi, sedangkan pra perlakuan Ca(OH)_2 menghasilkan sekitar 41,3% gula pereduksi dari jumlah maksimal gula pereduksi yang bisa dikonversi dari ampas tebu.

KESIMPULAN

Kehilangan lignin tertinggi pada proses pra perlakuan lignoselulosa tidak selalu setara dengan gula pereduksi yang dihasilkan setelah proses hidrolisis enzimatis, karena pra perlakuan yang bertujuan menghilangkan lignin seringkali bersifat keras dan memungkinkan terjadinya rekristalisasi selulosa yang mempengaruhi proses hidrolisis enzimatis. Kerusakan morfologi permukaan dan struktur serat ampas tebu setelah pra perlakuan berkontribusi memperbaiki efektifitas hidrolisis enzimatis yang terjadi. Oleh karena itu, untuk mengefisienkan produksi gula pereduksi dengan metode hidrolisis enzimatis maka pra perlakuan ampas tebu dapat dilakukan dengan pelarut basa NaOH 1% maupun Ca(OH)_2 0,3 g/g ampas tebu pada suhu 121°C selama 30 menit.

Konsentrasi enzim selulase yang dipilih adalah 20 fpu/g untuk proses hidrolisis selama 48 jam. Pra perlakuan NaOH pada penelitian kali ini menghasilkan 66,4% gula pereduksi, sedangkan pra perlakuan Ca(OH)_2 menghasilkan sekitar 41,3% gula pereduksi dari jumlah maksimal gula pereduksi yang bisa dikonversi dari ampas tebu.

DAFTAR PUSTAKA

- Amin, Y., W. Syafii, N.J. Wistara, dan B. Prasetya. 2014. Peningkatan rendemen gula pereduksi dari kayu jabon dengan pra perlakuan air kapur Ca(OH)_2 . *J. Ilmu Teknol. Kayu Tropis* 12(2):196-206.
- Asgher, M., Z. Ahmad, and H.M.N. Iqbal. 2013. Alkali and enzymatic delignification of sugarcane bagasse to expose cellulose polymers for saccharification and bio-ethanol production. *Industrial Crops and Products* 44: 488–495.
- Badger, P.C. 2002. Ethanol from Cellulose: A General Review. *Trends in New Crops and New Uses*. J. Janick and A. Whipkey (eds.). Alexandria: ASHS Press.
- Cai, D., P. Li, Z. Luo, P. Qin, C. Chen, Y. Wang, Z. Wang, and T. Tan. 2016. Effect of dilute alkaline pretreatment on the conversion of different parts of corn stalk to fermentable sugars and its application in acetone–butanol–ethanol fermentation. *Bioresource Technology* 211: 117–124.
- Chang, V.S., B. Burr, and M.T. Holtzapple. 1997. Lime pretreatment of switchgrass. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 63-65:3-19.
- Cheng, D., S. Jiang, and Q. Zhang. 2013. Effect of hydrothermal treatment with different aqueous solutions on the mold resistance of Moso bamboo with chemical and FTIR analysis. *BioResources* 8(1):371-382.
- Corrales, R.C.N.R., F.M.T. Mendes, C.C. Perrone, C. Santana, W. de Souza, Y. Abud, E. da Silva Bon and V. Ferreira-Leitao. 2012. Structural

- evaluation of sugar cane bagasse steam pretreated in presence of CO₂ and SO₂. *Biotechnology for Biofuel* 5(36):1-8.
- Dalgaard, T., U. Jorgensen, J.E. Olesen, E.S. Jensen, and E.S. Kristensen. 2006. Looking at biofuels and bioenergy. *Science* 312: 1743.
- ESDM. 2012. 10 Jawaban Kenaikan Harga BBM. <http://prokum.esdm.go.id/Lain-lain/10%20Jawaban%20Kenaikan%20Harga%20BBM.pdf> [26 Oktober 2012].
- Fatriasari, W., W. Syafii, N.J. Wistara, K. Syamsu, and B. Prasetya. 2014a. Digestibility of Betung Bamboo Fiber Following Fungal Pretreatment. *Makara Journal of Technology*. 18(2): 51-58
- Fatriasari, W., W. Syafii, N. Wistara, K. Syamsu, and B. Prasetya. 2014b. Characteristic changes of betung bamboo (*Dendrocalamus asper*) pretreated by fungal pretreatment. *International Journal of Renewable Energy Development* 3(2): 133-43.
- Fatriasari, W., W. Syafii, N. Wistara, K. Syamsu, B. Prasetya, S.H. Anita, L. Risanto. 2015. Fiber disruption of betung bamboo (*Dendrocalamus asper*) by combined fungal and microwave pretreatment. *Biotropia* 22 (2): 81– 94.
- Fatriasari, W., Syafii, W., Wistara, N., Syamsu, K., Prasetya, B. 2016. Lignin and cellulose changes of betung bamboo (*Dendrocalamus asper*) pretreated microwave heating. *International Journal on Advanced Science Engineering Information Technology*. 6(2):186-195.
- Goshadrou, A., K.Karimi, and M.J. Taherzadeh. 2011. Improvement of sweet sorghum bagasse hydrolysis by alkali and acidic pretreatment. *In Proceedings of Wood Renewable Energy Congress – Sweden 8-13 May 2011*. 374-380.
- Gunam, I.B.W., N.M. Wartini, A.A.M.D. Anggreni, dan P.M. Suparyana. 2011. Delignifikasi ampas tebu dengan larutan natrium hidroksida sebelum proses sakarifikasi secara enzimatik menggunakan enzim selulase kasar dari *Aspergillus niger* fnu 6018. *Teknologi Indonesia*, 34(Edisi Khusus): 24-32.
- He, Y., Y. Pang, Y. Liu, X. Li, and K. Wang. 2008. Physicochemical characterization of rice straw pretreated with sodium hydroxide in the solid state for enhancing biogas production. *Energy and Fuel* 22(4):2775–2781.
- Roliadi, H., dan W. Fatriasari. 2002. Kemungkinan pemanfaatan tandan kosong kelapa sawit sebagai bahan baku pembuatan papan serat berkerapatan sedang (MDF). *Jurnal Penelitian Hasil Hutan* 25(2):101-109.
- Hermiati, E, D. Mangunwidjaja, T.C. Sunarti, O. Suparno, dan B. Prasetya. 2010. Pemanfaatan Biomassa Lignoselulosa Ampas Tebu untuk Produksi Bioetanol. *Jurnal Litbang Pertanian* 29(4): 121-130.
- Irfan, M., M. Gulsher, S. Abbas, Q. Syed, M. Nadeem, and S. Baig. 2011. Effect of various pretreatment conditions on enzymatic saccharification. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 33 (4): 397-404.
- Isroi, M.M. Ishola, R. Milati, S. Syamsiah, M.N. Cahyanto, C. Niklason and M.J. Taherzadeh. 2012. Structural changes of oil palm empty fruit bunch (OPEFB) after fungal and phosphoric acid pretreatment. *Molecules* 17(12):14995-15012.
- Kaar, W.E and M.T. Holtzapple. 2000. Using lime pretreatment to facilitate the enzyme hydrolysis of corn stover. *Biomass and Bioenergy* 18(3): 189-199.
- Kim, S. and M.T. Holtzapple. 2005. Lime pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover. *Bioresource Technology* 96(18):1994–2006.
- Kim, J.S., Y.Y. Lee, and T.H. Kim. 2016. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 199: 42–48.

- Lai, L. and A.Idris. 2013. Disruption of oil palm trunks and fronds by microwave-alkali pretreatment. *BioResources* 8(2):2792-2804.
- McIntosh, S. and T. Vancov. 2011. Optimisation of dilute alkaline pretreatment for enzymatic saccharification of wheat straw. *Biomass and Bioenergy* 35(7): 3094-3103.
- Menon, V. and M. Rao. 2012. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Progress in Energy and Combustion Science* 38(4): 522-550.
- Mokushitsu Kagaku Jiken Manual. 2000. Japan Wood Research Society Publisher.
- Nelson, M.L., and R.T. O'Connor. 1964. Relation of certain infrared bands to cellulose crystallinity and crystal lattice type. Part II a new infrared ratio for estimation of crystallinity in celluloses I and II. *Journal of Applied Polymer Science* 8(3): 1325-1341.
- Nlewem, K.C. and M.E. Thrash Jr. 2010. Comparison of different pretreatment methods based on residual lignin effect on the enzymatic hydrolysis of switchgrass. *Bioresource Technology* 101 (14): 5426–5430.
- Nomanbhay, S.M., R.Hussain, and K.Palanisamy. 2013. Microwave-assisted alkaline pretreatment and microwave assisted enzymatic saccarification of oil palm empty fruit bunch fiber for enhanced fermentable sugar yield. *Journal of Sustainable Bioenergy System* 3:7-17.
- Pandey, K.K. and A.J. Pitman. 2003. FTIR studies of the changes in wood chemistry following decay by brown-rot and white-rot fungi. *International Biodeterioration and Biodegradation* 52(3):151-160.
- Pereira, S.C., L. Maehara, C.M.M. Machado, and C.S. Farinas. 2016. Physical – chemical–morphological characterization of the whole sugarcane lignocellulosic biomass used for 2G ethanol production by spectroscopy and microscopy techniques. *Renewable Energy* 87(1): 607-617.
- Quintero, J.A., M.I. Montoya, O.J. Sánchez, O.H. Giraldo, and C.A. Cardona. 2008. Fuel ethanol production from sugarcane and corn: Comparative analysis for a Colombian case. *Energy* 33(3): 385–399.
- Sendelius, J. 2005. Steam Pretreatment Optimisation for Sugarcane Bagasse in Bioethanol Production. Master of Science Thesis. Department of Chemical Engineering, Lund University. Sweden.
- Sierra, R., C.B. Granda, and M.T. Holtzaple. 2009. Chapter 9: Lime Pretreatment. *Biofuels: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology*. Volume 581. Jonathan R. Mielenz (ed.). Humana Press.
- Sudiyani, Y., K.C. Sembiring, H. Hendarsyah dan S. Alawiyah. 2010. Pengolahan awal dengan basa NaOH dan sakarifikasi enzimatis serat tandan kosong kelapa sawit (TKKS) untuk produksi etanol. *Menara Perkebunan* 78(2): 73-77.
- Sun, Y. and J. Cheng. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology* 83(1): 1–11.
- Sun, J.X., X.F. Sun, R.C. Sun, F. Paul, and S.B. Mark. 2003. Inhomogeneities in the chemical structure of sugarcane bagasse lignin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(23):6719-6725.
- Sun, S., S. Sun, X. Cao, and R. Sun. 2016. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. *Bioresource Technology* 199: 49–58.
- Tarkow, H. and W. Feist. 1969. A mechanism for improving the digestibility of lignocellulosic materials with dilute alkali and liquid ammonia. *In Cellulases and Their Applications*. G.J. Hajny and E.T.

- Reese (eds.). Advances in Chemistry 95:197-218.
- Wallace, J., M. Brienzo, M.P. Garcia-Aparicio, and J.F. Gorgens. 2016. Lignin enrichment and enzyme deactivation as the root cause of enzymatic hydrolysis slowdown of steam pretreated sugarcane bagasse. *New Biotechnology* 33 (3): 361-371.
- Wang, L.L., G.T. Han, and Y.M. Zhang. 2007. Comparative study of composition, structure and properties of *Apocynum venetum* fibers under different pretreatments. *Carbohydrate Polymer* 69 (1):391-397.
- Wistara, N.J., R. Palawi, and W.Fatriasari. 2016. The effect of lignin content and freeness of pulp on the bioethanol productivity of jabon wood. *Waste and Biomass Valorisation*. Published online 26 February 2016. DOI.10.1007/s12649-016-9510-8.