

*Skripsi*

**POTENSI LIMBAH KULIT SINGKONG (*Manihot esculenta* C.) DALAM  
PRODUKSI BIOETANOL SECARA HIDROLISIS ENZIMATIK DAN  
FERMENTASI MENGGUNAKAN BAKTERI *Zymomonas mobilis***

**EKA SRY WAHYUNI**

**H031181033**



**DEPARTEMEN KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2022**

**POTENSI LIMBAH KULIT SINGKONG (*Manihot esculenta* C.) DALAM  
PRODUKSI BIOETANOL SECARA HIDROLISIS ENZIMATIK DAN  
FERMENTASI MENGGUNAKAN BAKTERI *Zymomonas mobilis***

*Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat  
untuk memperoleh gelar sarjana sains*

Oleh

**EKA SRY WAHYUNI**

**H031 18 1033**



**MAKASSAR**

**2022**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

POTENSI LIMBAH KULIT SINGKONG (*Manihot esculenta* C.) DALAM PRODUKSI  
BIOETANOL SECARA HIDROLISIS ENZIMATIK DAN FERMENTASI MENGGUNAKAN  
BAKTERI *Zymomonas mobilis*

Disusun dan diajukan oleh

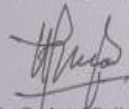
EKA SRY WAHYUNI

H031 18 1033

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Sidang Sarjana Program Studi  
Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Hasanuddin  
Pada 19 Desember 2022  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

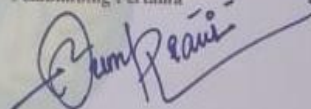
Menyetujui,

Pembimbing Utama



Dr. Sehiwati Dali, M.Si  
NIP. 19581231 198803 2 003

Pembimbing Pertama



Dr. Nur Umriani Permatasari, M.Si  
NIP. 19811209 200604 2 003

Ketua Program Studi



Dr. St. Fauziah, M.Si  
NIP. 19720202 199903 2 002



## PERNYATAAN KEASLIAN DOKUMEN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Eka Sry Wahyuni  
Nomor Mahasiswa : H031 18 1033  
Program Studi : Kimia  
Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa Skripsi yang berjudul **Potensi Limbah Kulit Singkong (*Manihot Esculenta C.*) dalam Produksi Bioetanol secara Hidrolisis Enzimatik dan Fermentasi Menggunakan Bakteri *Zymomonas mobilis*** adalah karya saya sendiri dan tidak melanggar hak cipta orang lain. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini hasil karya orang lain, penulis bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 22 Desember 2022

Menyatakan,

  
Eka Sry Wahyuni

## PRAKATA

*Bismillahirrahmanirrahim...*

*Assalamualaikum warahmatullahi wabarakatuh...*

Alhamdulillah robbilalamin, puji dan syukur kita panjatkan kehadiran Allah Subhanahu Wata'ala, atas segala rahmat dan hidayah-Nya yang kami mohon perlindungan dan hanya kepada-Nya lah kami berharap. Segala doa dan usaha yang telah mengantar penulis hingga mampu menyelesaikan penulisan skripsi dengan judul "**Potensi Limbah Kulit Singkong (*Manihot Esculenta C.*) dalam Produksi Bioetanol secara Hidrolisis Enzimatik dan Fermentasi Menggunakan Bakteri *Zymomonas Mobilis***" disusun sebagai salah satu persyaratan akademik yang harus di penuhi untuk menyelesaikan program strata satu (S1) pada Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengentahuan Alam, Universitas Hasanuddin.

Keberhasilan penulis sampai pada tahap penulisan skripsi ini tak lepas dari bantuan, baik material maupun spiritual dari orang-orang dilingkungan penulis. Karena itu penulis menghanturkan terima kasih kepada:

1. Ibunda **Dr. Seniwati Dali, M.Si**, selaku Penasehat Akademik yang selalu menuntun saya dalam kesulitan yang dihadapi selama perkuliahan.
2. Ibunda **Dr. Seniwati Dali, M.Si**, selaku dosen pembimbing utama, dan **Ibunda Dr. Nur Umriani Permatasari, M.Si**, selaku dosen pembimbing pertama yang telah berkenaan meluangkan waktu, tenaga dan pikiran dalam membimbing dan memberikan arahan yang begitu berharga bagi saya dapat menyelesaikanya dengan baik.
3. Bapak **Dr. Yusafir Hala, M.Si** dan Bapak **Dr. Djabal Nur Basir, M.Si**, sebagai penguji yang telah meluangkan waktunya untuk memberi saran dan masukkan yang sangat berharga.

4. Kepada orang tua Ayah dan Ibu tercinta **Muhammad Siri** dan **Rosmiati**, adik-adik saya **Aisyah Oktaviani** dan **Muhammad Ikram**, yang telah memberikan motivasi, dukungan dan segenap doa untuk penulis.
5. Kepada om dan tante tercinta, **Muhammad Agus** dan **Muliyawati** dan adik-adik saya **Intan, Fairuz, Afiqah, Khaula, Shafiyah** yang telah membantu, memberi pembelajaran dan menghibur penulis
6. Seluruh staf Departemen Kimia dan Fakultas MIPA yang senantiasa membantu penulis dalam hal administrasi.
7. **Teman-teman Hibridisasi 2018** yang telah membantu dan menemani pada masa kuliah, teman gibah, teman bercanda dan teman di segala suka dan duka. Terimakasih telah membantu mengukir cerita masa kuliah.
8. Sahabat **Biokim Research: Feni, Namira, Jeje, Wahda, Namira, Nining, Fatimah, Anti, Vini, Ilham** yang selalu menemani perjalanan panjang selama bekerja di laboratorium, teman pendengar yang baik disegala keluhan kesah penulis hingga penelitian berakhir.

Terima kasih atas kritikan dan saran yang bersifat membangun bagi penulis dalam penulisan selanjutnya.

Penulis

2022

## ABSTRAK

Singkong merupakan salah satu produk pertanian yang banyak dihasilkan di Indonesia dengan 20% limbah yang berupa kulit singkong. Kulit singkong mengandung karbohidrat yang cukup tinggi dan menyimpan kandungan selulosa yang cukup besar sehingga sangat potensial untuk dimanfaatkan menjadi bioetanol karena memiliki senyawa lignin, hemiselulosa dan selulosa. Penelitian ini bertujuan untuk memanfaatkan limbah kulit singkong dalam menghasilkan bioetanol melalui metode *pretreatment* alkali, hidrolisis enzimatis oleh enzim selulase dan fermentasi dengan bantuan bakteri *Zymomonas mobilis*. *Pretreatment* alkali dilakukan menggunakan NaOH 14% untuk menghidrolisis lignoselulosa. Optimasi hidrolisis secara enzimatis menggunakan metode respon permukaan (RSM) pada penentuan pH direntang 2-10 dan suhu fermentasi 30-70°C dengan analisis kadar gula reduksi metode *Dinitrosalicylic Acid* (DNS) menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Metode respon permukaan (RSM) juga diterapkan untuk mencari kondisi optimum proses fermentasi pada penentuan pH direntang 2-10 dan waktu fermentasi direntang 6-168 jam. Berdasarkan hasil penelitian, maka diperoleh kadar lignin, selulosa dan hemiselulosa berturut-turut 6,68% (b/b), 58,4% (b/b) dan 23,7% (b/b). Kondisi optimum proses hidrolisis memperoleh kadar gula reduksi optimum sebesar 9,22 mg/mL pada pH 2 dan suhu hidrolisis 50°C serta kondisi optimum proses fermentasi menggunakan bakteri *Zymomonas mobilis* memperoleh kadar optimum pada pH 6 dan waktu fermentasi selama 168 jam yang dianalisis dengan refraktometer menghasilkan kadar bioetanol sebesar 37,75% (v/v) dan dianalisis menggunakan kromatografi gas menghasilkan kadar bioetanol sebesar 54,94% (v/v).

Kata Kunci: *pretreatment* alkali; bioetanol; hidrolisis; metode respon permukaan (RSM); limbah kulit singkong; *Zymomonas mobilis*

## **ABSTRACT**

Cassava is one of the most widely produced agricultural products in Indonesia with 20% of waste in the form of cassava peels. Cassava peel contains carbohydrates which are quite high and store a large enough cellulose content so that it is very potential to be used as bioethanol because it has lignin, hemicellulose and cellulose compounds. This study aims to utilize cassava peel waste in producing bioethanol through alkaline pretreatment methods, enzymatic hydrolysis by cellulase enzymes and fermentation with the help of *Zymomonas mobilis* bacteria. Alkaline pretreatment was carried out using 14% NaOH to hydrolyze lignocellulose. Optimization of enzymatic hydrolysis using the surface response method (RSM) at a pH in the range of 2-10 and a fermentation temperature of 30-70°C with an analysis of reducing sugar levels using the Dinitrosalicily Acid (DNS) method using UV-Vis spectrophotometry. The surface response method (RSM) was also applied to find the optimal conditions for the fermentation process at pH in the range of 2-10 and fermentation time in the range of 6-168 hours. Based on the research, the levels of lignin, cellulose and hemicellulose were 6.68% (w/w), 58.4% (w/w) and 23.7% (w/w). The optimum conditions for the hydrolysis process obtained an optimum glucose level of 9.01 mg/mL at pH 2 and a hydrolysis temperature of 50°C and the optimum conditions for the fermentation process using *Zymomonas mobilis* bacteria were using fermentation media at pH 6 and fermented for 168 hours analyzed with a refractometer to produce bioethanol content of 37.75% (v/v).

*Keywords: alkali pretreatment; bioethanol; hydrolysis; response surface methods; cassava peel waste; Zymomonas mobilis*



## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
PRAKATA .....	iv
ABSTRAK .....	vi
ABSTRACT .....	vii
DAFTAR ISI .....	viii
DAFTAR GAMBAR .....	xi
DAFTAR TABEL .....	xii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xiii
DAFTAR SIMBOL .....	xiv
BAB I PENDAHULUAN .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	6
1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian .....	6
1.3.1 Maksud Penelitian .....	6
1.3.2 Tujuan Penelitian .....	6
1.4 Manfaat Penelitian .....	7
BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....	8
2.1 Singkong .....	8
2.2 Kulit Singkong .....	10
2.2.1 Kandungan Kulit Singkong .....	11
2.3 Lignin .....	11
2.4 Selulosa .....	12

2.5	Enzim Selulosa.....	13
2.6	Bakteri <i>Zymomonas mobilis</i> .....	14
2.7	Bioetanol.....	15
2.7.1	Bahan Pembuat Bioetanol.....	18
2.7.2	Proses Pembuatan Bioetanol.....	19
2.8	<i>Response Surface Methodology</i> (RSM).....	23
2.5	Instrumen.....	24
2.5.1	Refraktometer.....	24
2.5.2	Kromatografi Gas.....	27
BAB III METODE PENELITIAN.....		29
3.1	Alat Penelitian.....	29
3.2	Bahan Penelitian.....	29
3.3	Waktu dan Tempat Penelitian.....	29
3.4	Prosedur Penelitian.....	30
3.4.1	Persiapan Bahan.....	30
3.4.2	Pembuatan Larutan dan Media Fermentasi.....	30
3.4.3	Tahap Delignifikasi.....	31
3.4.4	Analisis Kadar Hemiselulosa, Selulosa dan Lignin.....	31
3.4.5	Analisis Kadar Air.....	32
3.4.6	Proses Hidrolisis.....	33
3.4.7	Desain Eksperimen <i>Respon Surface Methodology</i> (RSM).....	33
3.4.8	Analisis Kadar Glukosa Metode DNS.....	34
3.4.9	Produksi Bioetanol pada Medium Fermentasi.....	34
3.4.9.1	Penentuan pH dan Waktu Optimum.....	34

3.4.10 Desain Eksperimen <i>Respon Surface Methodology</i> (RSM) .....	35
3.4.11 Destilasi Hasil .....	36
3.4.12 Analisis Kualitatif Bioetanol.....	36
3.4.13 Analisis Kuantitatif Bioetanol.....	36
3.4.13.1 Analisis Kuantitatif Menggunakan Refraktometer .....	36
3.4.13.2 Analisis Kuantitatif Menggunakan Kromatografi Gas .....	37
3.4.14 Analisis Data .....	37
DAFTAR PUSTAKA .....	55
LAMPIRAN .....	63

## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar</b>	<b>Halaman</b>
1. Ubi Kayu (Singkong) .....	8
2. Kulit Singkong .....	10
3. Struktur Lignin .....	12
4. Struktur Selulosa .....	12
5. Bakteri <i>Zymomonas mobilis</i> .....	14
6. Pembuatan Bioetanol.....	16
7. Selulosa pada Tumbuhan .....	19
8. Reaksi Pembuatan Bioetanol.....	20
9. Proses <i>Pretreatment</i> .....	20
10. Alat Refraktometer.....	25
11. Instrumen Kromatografi Gas dan Skema Bagian Kromatografi Gas	26
12. Kandungan Sampel Kulit Singkong Hasil <i>Pretreatment</i> .....	38
13. Reaksi Lignoselulosa dengan basa dan reaksi hemiselulosa dan selulosa dalam basa (NaOH) .....	40
14. Plot Kontur dan Plot Surface Hasil Optimasi Kadar Gula Reduksi	43
15. Penentuan Titik Optimum Hidrolisis .....	44
16. Reaksi DNS mereduksi glukosa.....	46
17. Plot Kontur dan Plot Surface Hasil Optimasi Kadar Bioetanol .....	49
18. Penentuan Titik Optimum Fermentasi .....	48
19. Kromatogram Bioetanol Hasil Fermentasi.....	53

## DAFTAR TABEL

<b>Tabel</b>	<b>Halaman</b>
1. Kandungan Kulit Singkong.....	11
2. Sifat Fisik Etanol.....	17
3. Standar Nasional Indonesia Kualitas Bioetanol.....	18
4. Faktorial Metode Optimasi Respon Permukaan Hidrolisis.....	35
5. Faktorial Metode Optimasi Respon Permukaan Fermentasi.....	35
6. <i>Analysis of Variant</i> ANOVA Suhu dan pH Hidrolisis.....	42
7. <i>Analysis of Variant</i> ANOVA Waktu dan pH Fermentasi .....	47

## DAFTAR LAMPIRAN

<b>Lampiran</b>	<b>Halaman</b>
1. Diagram Alir .....	63
2. Prosedur penelitian.....	64
3. Peta Tempat Pengambilan Sampel.....	71
4. Perhitungan Pembuatan Larutan .....	72
5. Perhitungan Analisis Kadar Selulosa, Hemiselulosa dan Lignin sebelum Proses Pretreatment.....	76
6. Perhitungan Analisis Kadar Selulosa, Hemiselulosa dan Lignin setelah Proses Pretreatment.....	77
7. Perhitungan Kadar Air .....	78
8. Data Pengukuran Kadar Glukosa dengan Metode DNS .....	79
9. Data Pengukuran Validasi Kondisi Optimum Kadar Gula Reduksi menggunakan Metode DNS .....	83
10. Data Pengukuran Kadar Bioetanol menggunakan Refraktometer ..	85
11. Data Pengukuran Validasi Kondisi Optimum Kadar Bioetanol menggunakan Refraktometer .....	89
12. Hasil Analisis Bioetanol dengan menggunakan Kromatografi Gas	91
13. Rangkaian Alat.....	92
14. Dokumentasi Penelitian .....	94

## DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN

<b>Simbol</b>	<b>Arti</b>
SHF	<i>Separated Hydrolysis and Fermentation</i>
SSF	<i>Simultaneous Saccharification And Fermentation</i>
GC	<i>Gas Chromatography</i>
NB	<i>Nutrient Broth</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Z. mobilis</i>	<i>Zymomonas mobilis</i>
$W_0$	berat cawan kosong
$W_1$	berat cawan + sampel awal (sebelum pemanasan dalam oven)
$W_2$	berat cawan + sampel awal (setelah pendinginan dalam deksikator)
y	Absorban Rata-rata
x	Konsentrasi Gula Pereduksi
n	indeks bias
c	kelajuan cahaya di ruang hampa (m/s)
v	kelajuan cahaya di dalam medium (m/s)

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara penghasil singkong terbanyak keempat di dunia. Berturut-turut adalah Nigeria sebanyak 57 juta ton, Thailand 30 juta ton, Brasil 23 juta ton dan Indonesia 19-20 juta ton. Luas areal penanaman singkong tahun 2020 sebesar 628.305 ha dan produksi sebanyak 16,35 juta ton. Singkong merupakan salah satu tanaman yang memiliki sumber pati cukup tinggi. Masyarakat umum mengolah singkong untuk memproduksi tepung tapioka atau untuk dijadikan sebagai pengganti makanan pokok. Selain dari umbinya, kulit singkong juga mengandung karbohidrat yang cukup tinggi dan menyimpan kandungan selulosa yang cukup besar (Abidin dkk., 2014).

Menurut Santoso (2012) bahwa berdasarkan analisis laboratorium diketahui kulit singkong mengandung 56,82% selulosa, lignin 21,72%, glukosa sebesar 8,5% dan panjang serat 0,05 – 0,5 cm. Keunggulan lainnya adalah bahan baku kulit singkong tersedia dalam jumlah yang cukup besar, hal ini karena Indonesia merupakan salah satu negara penghasil singkong terbesar dalam bidang pertaniannya. Penggunaan singkong di Indonesia sebesar 18,9 juta ton per tahun. Oleh karena itu, jumlah limbah tersebut dapat dikatakan sangat banyak dan akan menjadi sangat potensial jika dapat dimanfaatkan secara tepat sebagai salah satu sumber energi alternatif terbarukan. Energi alternatif yang menjanjikan kedepannya salah satunya adalah bioetanol (Osemwengie dkk., 2020). Bahan baku bioetanol salah satunya dapat dihasilkan dari sampah yang kaya akan bahan organik yang tidak terpakai lagi, pemanfaatan limbah organik yang mengandung karbohidrat



seperti kulit singkong sangat dapat diproses untuk menjadi bahan baku bioetanol (Guntama dkk., 2019).

Bioetanol adalah sebuah bahan bakar alternatif yang diolah dari tumbuhan, dimana memiliki keunggulan mampu menurunkan emisi CO<sub>2</sub> hingga 18%. Ada 3 kelompok tanaman sumber bioetanol antara lain (a) tanaman yang mengandung pati (seperti singkong, kelapa sawit, tengkawang, kelapa, kapuk, rambutan, sirsak, malapari, dan nyamplung) (b) tanaman bergula (seperti tetes tebu atau molase, nira aren, nira tebu, dan nira surgum manis) dan (c) tanaman berserat selulosa (seperti batang sorgum, batang pisang, jerami, kayu dan ampas). Bahan yang mengandung pati, glukosa, dan serat selulosa ini bisa dimanfaatkan sebagai bahan bakar alternatif pembuatan bioetanol (Wusnah dkk., 2016).

Bioetanol dari bahan-bahan tersebut tersedia dalam jumlah banyak di Indonesia, tumbuh dilahan kritis, mudah ditanam dan masyarakat telah mengenal baik tanaman ini, sehingga berpeluang untuk digunakan sebagai bahan produksi energi alternatif. Bioetanol berpeluang besar untuk dikembangkan di Indonesia, karena bahan bioetanol mudah diperoleh yaitu dari proses fermentasi biomassa yang mengandung karbohidrat dengan bantuan mikroorganisme (Hidayah, 2018). Namun, pemanfaatan bioetanol masih kurang dimanfaatkan sebagai bahan bakar disebabkan harganya jauh lebih mahal dibanding dengan bahan bakar alam. Harganya yang mahal disebabkan bahwa sebagian besar bahan baku bioetanol bersumber dari tanaman budidaya yang membutuhkan biaya tinggi dan bersaing dengan penyediaan pangan, sehingga dibutuhkan bahan baku lain dalam pembuatan bioetanol yang lebih ekonomis dan bahannya tidak bersaing dengan bahan pangan, salah satunya adalah limbah kulit singkong (Widyastuti, 2019).

Pemanfaatan kulit singkong sebagai alternatif energi terbarukan berupa bioetanol dapat diolah melalui proses *pretreatment* (delignifikasi), hidrolisis, fermentasi dan destilasi. Proses *pretreatment* diperlukan untuk memecah struktur lignin agar selulosa dan hemiselulosa dapat diproses lebih lanjut untuk menghasilkan bioetanol. Proses ini dilakukan dengan NaOH karena larutan ini dapat merusak struktur lignin pada bagian kristalin dan amorf serta memisahkan sebagian hemiselulosa. Selulosa hasil delignifikasi atau disebut juga dengan *pretreatment* akan mudah dihidrolisis dengan asam dan menghasilkan glukosa dalam jumlah maksimal, proses *pretreatment* ini dimaksudkan untuk meningkatkan kemampuan area permukaan selulosa sehingga dapat meningkatkan konversi selulosa menjadi glukosa (gula fermentasi) (Fachry dkk., 2013).

Proses pengubahan selulosa menjadi gula sederhana dapat dilakukan secara kimiawi (asam atau basa) serta secara enzimatik. Proses hidrolisis secara asam dapat dilakukan dengan penambahan asam, seperti asam sulfat dan asam klorida. Proses hidrolisis secara enzimatik dapat digunakan enzim selulase atau enzim lainnya yang dapat memecah selulosa menjadi monomer-monomernya. Hidrolisis enzimatik memiliki beberapa keuntungan dibandingkan hidrolisis asam. Hidrolisis enzimatik tidak terjadi degradasi gula hasil hidrolisis, dapat berlangsung pada suhu rendah, dan memberikan hasil yang tinggi. Pemanfaatan enzim sebagai zat penghidrolisis tergantung pada substrat yang menjadi prioritas. Selulosa dapat dihidrolisis secara enzimatik dengan menggunakan enzim selulase. Proses hidrolisis akan menghasilkan larutan glukosa yang akan difermentasi menggunakan bantuan mikroorganisme sehingga menghasilkan etanol (Fuadi dkk., 2015).

Proses fermentasi bertujuan untuk mengkonversi gula menjadi bioetanol dengan bantuan mikroorganisme, sedangkan tahap terakhir adalah tahap pemurnian yang dilakukan untuk memperoleh kadar bioetanol yang lebih tinggi dari hasil

fermentasi (Sari, 2017). Proses fermentasi dilakukan dengan variasi pH dan waktu fermentasi yang didesain dengan *Response Surface Methodology* (RSM) untuk mengembangkan, meningkatkan dan mengoptimasi proses penentuan optimum bioetanol. Penerapan metode RSM sangat penting terutama di bidang bioteknologi dalam hal pengembangan dan pengaruh respon variabel bebas terhadap proses fermentasi. Keunggulan metode RSM di antaranya tidak memerlukan data-data percobaan dalam jumlah yang besar dan juga tidak membutuhkan waktu lama (Taherzadeh dan Karimi, 2007).

Proses fermentasi dilakukan dengan mikroorganisme diantaranya ragi atau khamir (*Saccharomyces cerevisiae*), namun *S. cerevisiae* telah lama dikenal sebagai mikroorganisme yang umum digunakan dalam pembuatan etanol. Namun selain itu, ditemukan bakteri Gram negatif yang juga memiliki kemampuan sama yang berpotensi sebagai alternatif untuk produksi etanol yaitu bakteri *Zymomonas mobilis*.

Bakteri *Z. mobilis* merupakan bakteri anaerob fakultatif. Pemakaian bakteri *Z. mobilis* untuk industri pembuatan etanol mempunyai beberapa keuntungan antara lain kemampuan untuk tumbuh secara anaerob, hasil produksi lebih tinggi, dan kemampuan fermentasi lebih spesifik dibandingkan dengan khamir. Beberapa penelitian yang menggunakan bakteri *Z. mobilis* yaitu Albert dkk. (2015) memanfaatkan tongkol jagung dengan hidrolisis asam menghasilkan kadar etanol sebesar 20% pada pH 5 dengan waktu optimum 96 Jam, dan Todhanakasem dkk. (2019) memanfaatkan jerami padi dengan hidrolisis asam menghasilkan kadar etanol sebesar 33% dengan waktu fermentasi 5 Hari.

Sabilah (2020) pada penelitiannya memanfaatkan kulit singkong sebagai bahan baku dengan metode hidrolisis enzimatis menggunakan *S. cerevisiae*

menghasilkan 10% etanol dengan waktu fermentasi 12 hari. Begitupun juga dalam penelitian Oyeleke dkk. (2019) memanfaatkan kulit singkong sebagai bahan baku dengan hidrolisis enzimatik dan menggunakan *S. cerevisiae* menghasilkan 17,6% etanol. Hal ini membuktikan bahwa pemanfaatan kulit singkong sebagai bioetanol cukup menjanjikan. Banyaknya kulit singkong sebagai limbah biomassa dihasilkan oleh kegiatan pertanian, sehingga memunculkan upaya baru untuk memanfaatkan limbah biomassa. Oleh karena itu, dalam penelitian ini menggunakan metode *Separated Hydrolysis and Fermentation* (SHF).

Metode *Separated Hydrolysis and Fermentation* (SHF) merupakan metode hidrolisis dan fermentasi yang dilakukan secara terpisah. Bahan baku yang mengandung selulosa mengalami proses hidrolisis secara terpisah dari proses fermentasi. Hal ini dimaksudkan untuk memudahkan pengontrolan terhadap tiap tahap, agar tercapai hasil yang diinginkan (Anaawang dkk., 2017). Keuntungan dari proses ini adalah pada dasarnya proses ini memungkinkan enzim beroperasi pada aktivitas optimal untuk menghasilkan lebih banyak substrat untuk fermentasi (Sudiyana dkk., 2016).

Berdasarkan uraian diatas dilakukan penelitian, dengan memanfaatkan limbah kulit singkong sebagai sumber selulosa dan hemiselulosa melalui metode *pretreatment* alkali dan hidrolisis selulosa dan hemiselulosa menggunakan enzim selulase komersial serta fermentasi menggunakan bakteri *Zymomonas mobilis* untuk menghasilkan bioetanol yang didesain dengan *Response Surface Methodology* (RSM).

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian diatas, dapat dibuat beberapa rumusan masalah sebagai berikut.

1. berapa kadar lignin, hemiselulosa dan selulosa yang dihasilkan dari kulit singkong hasil proses *pretreatment* secara basa menggunakan NaOH 14%?
2. bagaimana pengaruh suhu dan pH terhadap kandungan gula reduksi yang dihasilkan pada proses hidrolisis menggunakan enzim selulase?
3. berapa kadar gula reduksi yang dihasilkan dari limbah kulit singkong pada pH dan suhu hidrolisis optimum menggunakan enzim selulase?
4. bagaimana pengaruh waktu dan pH fermentasi terhadap kadar bioetanol yang dihasilkan dari limbah kulit singkong menggunakan bakteri *Zymomonas mobilis*?
5. berapa kadar bioetanol yang dihasilkan dari limbah kulit singkong pada waktu dan pH fermentasi optimum menggunakan bakteri *Zymomonas mobilis*?

## 1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian

### 1.3.1 Maksud Penelitian

Maksud penelitian ini adalah untuk mengetahui kadar bioetanol dari kulit singkong melalui fermentasi menggunakan bakteri *Zymomonas mobilis* dan menggunakan enzim selulase.

### 1.3.2 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini yaitu:

1. menentukan kadar lignin, hemiselulosa dan selulosa yang dihasilkan dari kulit singkong dengan melakukan proses delignifikasi basa
2. menganalisis pengaruh suhu dan pH terhadap kandungan gula reduksi yang

dihasilkan pada proses hidrolisis menggunakan enzim selulase

3. menentukan kadar gula reduksi yang dihasilkan dari limbah kulit singkong pada pH dan suhu hidrolisis optimum dengan menggunakan enzim selulosa
4. menganalisis pengaruh waktu dan pH fermentasi terhadap kadar bioetanol yang dihasilkan dari limbah kulit singkong menggunakan bakteri *Zymomonas mobilis*
5. menentukan kadar bioetanol yang dihasilkan dari limbah kulit singkong pada waktu dan pH fermentasi optimum dengan menggunakan bakteri *Zymomonas mobilis*.

#### **1.4 Manfaat**

Penelitian ini diharapkan dapat meningkatkan nilai ekonomi limbah kulit singkong yang dapat membantu mengembangkan sektor pertanian di Indonesia, menambah informasi tentang pemanfaatan dan mendapatkan data konsentrasi kulit singkong yang optimum untuk menghasilkan bioetanol yang optimal.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Singkong

Singkong atau ubi kayu (*Manihot Esculenta* Crantz.) merupakan salah satu sumber karbohidrat lokal Indonesia yang menduduki urutan terbesar setelah padi dan jagung. Singkong banyak dikonsumsi oleh masyarakat Indonesia. Singkong umumnya hanya dikonsumsi bagian daun, buah dan batangnya, sedangkan bagian kulitnya akan langsung dibuang begitu saja dan berakhir tidak berguna kemudian pada akhirnya menjadi limbah. Sistematika tanaman singkong termasuk kelas *Dicotyledonae* dan family *Euphorbiaceae* genus *Manihot* yang memiliki 7.200 Spesies (Santoso, 2012).

Singkong atau cassava (*Manihot esculenta* C.) pertama kali dikenal di Amerika Selatan yang dikembangkan di Brasil dan Paraguay pada masa prasejarah. Potensi singkong menjadikannya sebagai bahan makanan pokok penduduk asli Amerika Selatan bagian utara, Mesoamerika, dan Karibia sebelum Columbus datang ke Benua Amerika. Ketika bangsa Spanyol menaklukkan daerah-daerah itu, budidaya tanaman singkong pun dilanjutkan oleh kolonial Portugis dan Spanyol (Bargumono, 2012). Tanaman Ubi kayu dapat dilihat pada Gambar 1.



**Gambar 1.** Ubi kayu (Singkong) (Burgomono, 2012)

Klasifikasi : Singkong  
Kingdom : Plantae (Tumbuhan)  
Subkingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)  
Super Divisi : Spermatophyta (Menghasilkan biji)  
Divisi : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)  
Kelas : Magnoliopsida (berkeping dua/dikotil)  
Ordo : Euphorbiales, keluarga Euphorbiaceae  
Genus : *Manihot*  
Spesies : *Manihot esculenta* Crantz

*Manihot esculenta* C. secara umum adalah tanaman yang memiliki batang berbentuk bulat diameter 2,5-4 cm, berkayu beruas-ruas, dan panjang. Ketinggiannya dapat mencapai 1-4 meter. Warna batang bervariasi tergantung kulit luar, tetapi batang yang masih muda pada umumnya berwarna hijau dan pada saat tua berubah keputih-putihan, kelabu, hijau kelabu atau coklat kelabu. Empulur batang berwarna putih, lunak, dan strukturnya empuk seperti gabus. Singkong memiliki sistem perakaran tunggang atau dikotil. Batang singkong bulat dan bergerigi yang disebabkan dari bekas pangkal tangkai daun, bagian tengahnya bergabus dan termasuk tumbuhan tingkat tinggi (Subandi, 2009).

*Manihot esculenta* C. dapat tumbuh pada suhu udara minimal sekitar 10 °C, apabila suhu di bawah 10 °C menyebabkan pertumbuhan tanaman sedikit terhambat, sehingga menjadikan kerdil karena pertumbuhan bunga yang kurang sempurna. Kelembaban udara optimal untuk tanaman singkong umumnya antara 60-65%. Tanah yang paling sesuai untuk singkong yaitu tanah yang berstruktur remah, gembur, tidak terlalu liat dan tidak terlalu porus serta kaya bahan organik (Saleh dkk., 2016).



Singkong atau cassava (*Manihot esculenta* C.) merupakan salah satu tanaman yang memiliki sumber pati cukup tinggi. Sebagian masyarakat umum mengolah ubi kayu untuk memproduksi tepung tapioka atau untuk dijadikan sebagai pengganti makanan pokok. Selain dari umbinya, limbah kulit ubi kayu juga dapat dimanfaatkan sebagai bahan dasar bioetanol.

## 2.2 Kulit Singkong

Kulit singkong adalah salah satu limbah hasil pertanian yang pengelolaannya masih sangat kurang. Indonesia merupakan salah satu penghasil singkong yang cukup besar dibidang pertaniannya yaitu sebesar 22.677.866 ton. Setiap bobot singkong menghasilkan limbah kulit singkong sebesar 20% dari bobot tersebut, sehingga jumlah kulit singkong yang dihasilkan akan melimpah. Besarnya peningkatan produksi singkong, menyebabkan kulit singkong akan menjadi limbah yang merupakan pencemaran lingkungan bila tidak dimanfaatkan (Nurlaili dkk., 2013). Kulit Singkong dapat dilihat pada Gambar 2.



**Gambar 2.** Kulit Singkong (Firdaus, 2016)

Kulit singkong mengandung karbohidrat cukup tinggi. Hasil analisis awal singkong yaitu mengandung 36,5% pati atau amilum. Kulit singkong merupakan

bagian kulit luar umbi tanaman singkong yang sudah tidak digunakan pada waktu penggunaan umbi singkong melainkan hanya dijadikan untuk bahan pakan ternak (Artiyani dan Soedjono, 2011).

### 2.2.1 Kandungan Kulit Singkong

Adapun kandungan kulit singkong dapat dilihat pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Kandungan Kulit singkong (Sari dan Astili, 2018; Sastri dkk., 2015).

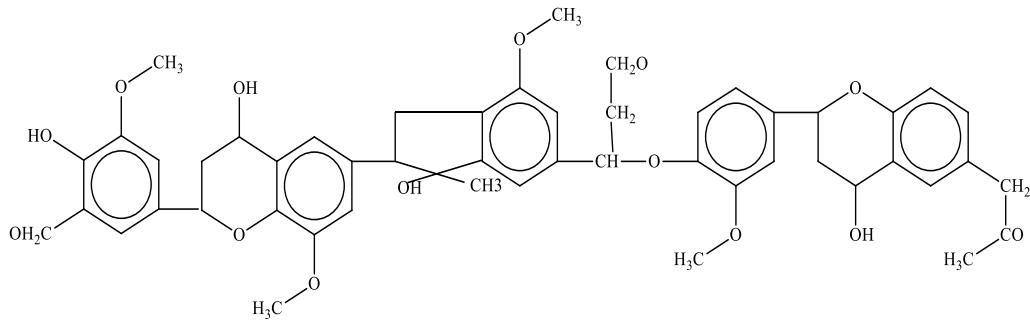
Kandungan Nutrien		Kandungan Lain	
Kalori (kkal)	157	Selulosa	43,63%
Karbohidrat (g)	74,73	Amilum	36,58%
Lemak (g)	1,29	Hemiselulosa	10,38%
Kalsium (g)	9	Lignin	27,65%
Protein (g)	8,11	Air	14%

### 2.3 Lignin

Lignin merupakan bagian dari dinding sel tanaman dengan polimer terbanyak setelah selulosa (Osvaldo dkk., 2012). Lignin sulit didegradasi karena strukturnya yang kompleks dan heterogen yang berikatan dengan selulosa dan hemiselulosa dalam jaringan tanaman. Lebih dari 30% tanaman tersusun atas lignin yang memberikan bentuk yang kokoh dan memberikan proteksi terhadap serangga dan patogen, disamping memberikan bentuk yang kokoh terhadap tanaman, lignin juga membentuk ikatan yang kuat dengan polisakarida yang melindungi dari degradasi mikroba dan membentuk struktur lignoselulosa (Oktavia dkk., 2014).

Lignin juga termasuk polimer aromatik yang berasosiasi dengan polisakarida pada dinding sel sekunder tanaman dan terdapat sekitar 20-40%. Komponen lignin pada sel tanaman (monomer guasil dan siringil) berpengaruh terhadap pelepasan dan hidrolisis polisakarida. Enzim yang dapat mendegradasi

lignin atau lignolitik terdiri dari tiga komponen yaitu lakase atau polifenol *oksidase*, lignin peroksidase (Li-P) dan mangan peroksidase, dengan rumus struktur terlihat pada Gambar 3.

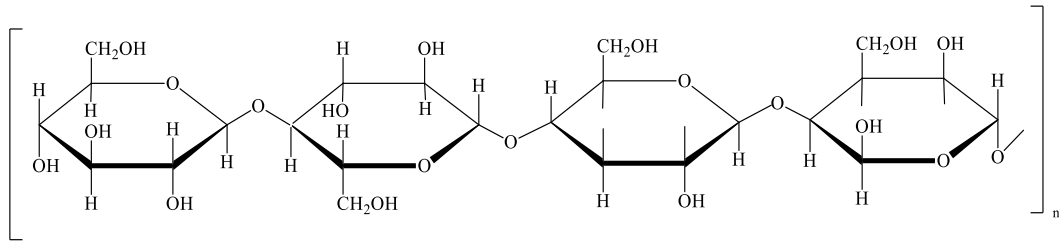


**Gambar 3.** Struktur lignin (Lynd dkk., 2002)

## 2.4 Selulosa

Selulosa merupakan rantai polimer dengan kristalinitas tinggi yang tersusun atas karbon, hidrogen, dan oksigen. Selulosa relatif stabil terhadap panas, tidak larut dalam air maupun larutan basa dan tahan terhadap hidrolisis asam kecuali pada temperatur dan konsentrasi tinggi. Berdasarkan sifat mekanik, selulosa memiliki kekuatan dan modulus regangan yang tinggi. Selulosa juga mudah terdegradasi oleh alam, sehingga dapat mengurangi emisi. Selulosa dapat diaplikasikan dalam berbagai aplikasi yaitu bahan baku pembuatan kertas, bioetanol, nanokomposit, membran, dan biomedis (Tajalla dkk., 2019).

Selulosa berasosiasi dengan hemiselulosa dan lignin membentuk kerangka dari dinding sel tanaman. Selulosa sulit untuk didegradasi baik secara kimia maupun mekanis (Devi dkk., 2019). Struktur kristal dan adanya lignin serta hemiselulosa di sekeliling selulosa merupakan hambatan utama untuk menghidrolisa selulosa. Pada proses hidrolisa sempurna akan menghasilkan glukosa, sedangkan proses hidrolisa sebagian akan menghasilkan disakarida selebiosia dengan rumus struktur yang terlihat pada Gambar 4.



**Gambar 4.** Struktur Selulosa (Lynd dkk., 2002)

Selulosa merupakan komponen terbanyak sebagai penyusun dinding sel. Selulosa merupakan homopolisakarida yang tersusun dari D-glukosa yang saling berikatan pada ikatan  $\beta$ -1,4-glukosidik dengan derajat polimerisasi hingga 10000 atau lebih. Struktur linier selulosa tersusun dari ikatan hidrogen intra dan intermolekul yang menghasilkan rantai agregat yang akan menjadi dasar serabut kristal dari 36 rantai selulosa. Struktur dasar serabut adalah kristalin yang permukaannya terlihat amorf. Perbedaan selulosa dengan hemiselulosa terletak pada rantai samping hemiselulosa. Hemiselulosa memiliki derajat polimerisasi 200, rantai samping yang tersusun atas gula-gula yang berbeda, yaitu monosakarida pentosa (xylosa, ramnosa, dan arabinosa), heksosa (glukosa, manosa, dan galaktosa), dan asam uronat (*4-omethylglukuronat*, *D-glukuronat*, dan *D-asam galaktouronat*) sedangkan lignin merupakan jaringan kompleks yang dibentuk oleh polimerisasi monomer-monomer asam phenolik (monolignol) yang banyak terdapat dalam dinding sel sehingga dapat memberikan struktur yang kuat pada dinding sel, memberikan sifat *impermeable* dan resisten terhadap serangan mikrobia (Perez dkk., 2002).

## 2.5 Enzim Selulase

Enzim selulase adalah enzim yang mampu mendegradasi selulosa dengan produk utamanya yakni glukosa, selobiosa dan selooligosakarida. Selulase memiliki sistem enzim yang terdiri dari endo-1,4- $\beta$ -glukanase, ekso-1,4- $\beta$ -

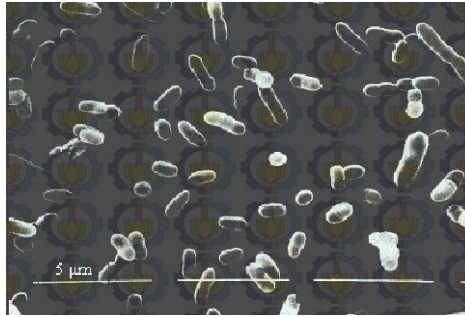
glukanase dan  $\beta$ -D-glukosidase. Ketiga enzim ini bekerja secara sinergis mendegradasi selulosa dan melepaskan gula pereduksi sebagai produk akhirnya. Endo-1,4-  $\beta$ -glukanase memotong ikatan rantai dalam selulosa menghasilkan molekul selulosa yang lebih pendek, ekso-1,4- $\beta$ -glukanase memotong ujung rantai selulosa menghasilkan molekul selobiosa, sedangkan  $\beta$ -D-glukosidase memotong molekul selobiosa menjadi dua molekul glukosa (Purkan dkk., 2015).

Menurut Lynd dkk. (2002) proses degradasi selulosa menjadi glukosa oleh enzim selulase terdapat tiga jenis enzim yang bekerja, yaitu:

1. enzim endoglukanase yang menghidrolisis ikatan glikosidik  $\beta$ -1,4 secara acak dan bekerja terutama pada daerah amorf dari serat selulosa yang menghasilkan oligosakarida yang panjangnya tereduksi, seperti pada *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC). Endoglukanase mempunyai afinitas yang tinggi terhadap substrat CMC (CMC-ase).
2. enzim exoglukanase atau Selebiohidrase menyerang atau memotong residu selebiosis dari rantai selulosa yang ujung rantai selulosanya tidak tereduksi dan menghasilkan selebiosia.
3. enzim  $\beta$ -glukosidase menghidrolisis selebiosia untuk menghasilkan dua unit selulosa.

## **2.6 Bakteri *Zymomonas mobilis***

*Zymomonas mobilis* merupakan bakteri Gram negatif, anaerob fakultatif, tidak berspora, berflagel polar, dan berbentuk batang. *Z. mobilis* mampu beradaptasi pada medium alkoholik. Kemampuan adaptasi ini dikarenakan adanya senyawa hopanoid yang terdapat dalam membran plasma yang berperan dalam memelihara kestabilan membran dengan meningkatkan kekakuan dalam matriks lipid (Lestari, 2019). Bakteri *Z. mobilis* dapat dilihat pada Gambar 5, taksonomi dari bakteri *Z. mobilis* sebagai berikut:



**Gambar 5.** Bakteri *Z. mobilis* (Lestari, 2019)

Kingdom : Bakteria  
Divisi : Proteobacteria  
Kelas : Alpha Proteobacteria  
Ordo : Sphingomonadales  
Genus : *Zymomonas*  
Spesies : *Zymomonas mobilis*

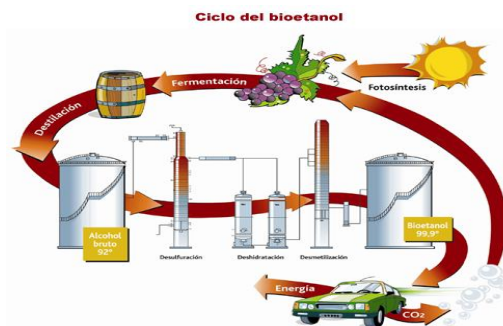
Bakteri dari genus *Zymomonas* memiliki kemampuan memproduksi bioetanol yang luar biasa, yang melampaui ragi dalam beberapa aspek. Bakteri ini dapat ditemukan pada tumbuh-tumbuhan yang kaya gula. Umumnya mempunyai panjang 2-6 μm dan lebar 1-1,4 μm. Pemakaian bakteri *Z. mobilis* untuk industri pembuatan etanol mempunyai beberapa keuntungan antara lain kemampuan untuk tumbuh secara anaerob, hasil produksi lebih tinggi dan kemampuan fermentasi lebih spesifik, konversi yang lebih cepat, toleran terhadap suhu, pH rendah serta tahan terhadap etanol dengan konsentrasi tinggi dibandingkan dengan khamir.

## 2.7 Bioetanol

Bioetanol salah satu bahan bakar alternatif yang mempunyai kelebihan dibandingkan BBM. Berdasarkan siklus karbon, bioetanol dianggap lebih ramah lingkungan karena CO<sub>2</sub> yang dihasilkan akan diserap oleh tanaman, selanjutnya tanaman tersebut digunakan sebagai bahan baku pembuatan bahan bakar, dan

seterusnya sehingga tidak terjadi akumulasi karbon di atmosfer (Ariyani dkk., 2013). Bioetanol memiliki beberapa keuntungan dalam penggunaannya sebagai bahan bakar selain karena sifatnya yang terbarukan bioetanol juga dipercaya dapat menurunkan beberapa emisi kendaraan bermotor (Octaviani, 2010).

Emisi yang dihasilkan dari proses pembakaran kendaraan bermotor adalah gas karbon dioksida (CO<sub>2</sub>) dan uap air, namun kondisi ini jarang terjadi. Semua bahan bakar umumnya mengeluarkan polutan. Polutan yang dihasilkan kendaraan bermotor yang menggunakan fossil fuel antara lain CO, HC, SO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, dan partikulat yang membahayakan kesehatan. Pembuatan bioetanol dapat dilihat pada Gambar 6. Keberlangsungan *supply fossil fuel* dikhawatirkan akan menurun seiring dengan berkurangnya sumber daya alam tak terbarukan (Octaviani, 2010).



**Gambar 6.** Pembuatan Bioetanol (Al-Ridha, 2016)

Bioetanol adalah suatu bahan bakar alternatif yang diolah dari tumbuhan (biomassa) dengan cara fermentasi, memiliki keunggulan mampu menurunkan emisi CO<sub>2</sub> hingga 18%). Etanol yang dihasilkan dari 7 proses fermentasi merupakan senyawa organik yang terdiri dari karbon, hidrogen dan oksigen, turunan senyawa hidrokarbon yang mempunyai gugus hidroksi dengan rumus C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH bersifat cair, tidak berwarna, berbau spesifik, mudah terbakar dan menguap, dapat bercampur dalam air dengan segala perbandingan (Endah, 2007).

Menurut Eni dkk. (2015) bahwa Indonesia sebagai salah satu negara agraris yang memiliki bahan baku melimpah berupa tanaman yang berpotensi untuk menghasilkan etanol yaitu:

- a. Bahan bergula atau bahan yang mengandung glukosa (*sugary materials*) seperti tebu dan sisa produknya (molase, bagase), tapioka, kentang manis, sorgum manis.
- b. Bahan-bahan berpati (*starchy materials*) juga dapat dimanfaatkan, diantaranya tanaman ubi kayu, tanaman jagung, sorgum biji, sagu, tepung tapioka, tepung maizena, barley, gandum, padi, dan kentang.
- c. Bahan-bahan lignoselulosa (*lignosellulosic material*). Sumber selulosa dan lignoselulosa berasal dari limbah hasil industri kehutanan (contohnya serat kayu), limbah hasil industri pertanian (contohnya sekam padi, jerami, tongkol jagung, dsb) serta limbah domestik berupa sampah organik. Lignoselulosa mengandung tiga komponen penyusun utama, yaitu selulosa dengan 30-50% dari beratnya, hemiselulosa dengan 15-35% dari beratnya dan lignin dengan 13-30% dari beratnya.

Berikut ini merupakan tabel sifat fisik dari etanol berdasarkan SNI 06-3565-1994 dan Standar Nasional Indonesia Indonesia Kualitas Bioetanol dapat dilihat pada Tabel 2 dan Tabel 3.

**Tabel 2.** Sifat Fisik Etanol (BSN, 2006)

Parameter	Etanol
Rumus Kimia	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH
Berat Molekul	46
Densitas (gr/mL)	0,7851
Titik Didih (°C)	78,4
Titik Nyala (°C)	13
Titik Beku (°C)	-112,4
Indeks Bias	1,3633
Panas Evaporasi (cal/gr)	204
Viskositas pada 20o (Poise)	0,0122

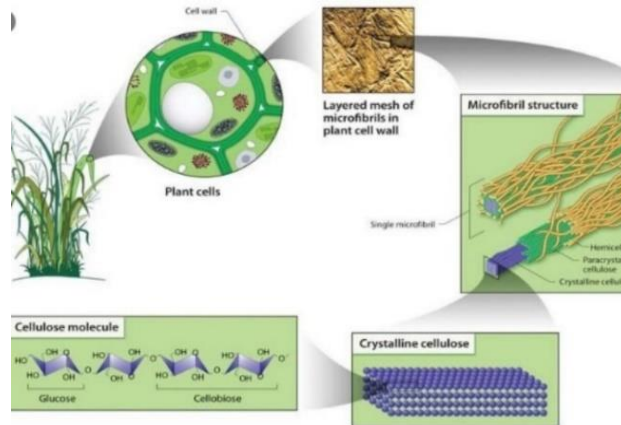


**Tabel 3.** Standar Nasional Indonesia Indonesia Kualitas Bioetanol (SNI 7390-2008)

<b>Parameter</b>	<b>Unit, Min/ Maks</b>	<b>Metode Uji (SNI 7390-2008)</b>
Kadar etanol	%-v, min	95,6 (sebelum denaturasi) 99,5 (setelah denaturasi)
Kadar metanol	mg/L, maks	300
Kadar air	%-v, mks	1
Kadar denaturan	%-v, min, %-v, maks	2,5
Kadar tembaga (Cu)	mg/kg, maks	0,1
Keasaman (asam asetat)	mg/ L, maks	30
Tampakan		Jernih dan terang, tidak ada endapan dan kotoran
Kadar ion klorida (Cl)	mg/L, maks	40
Kandungan belerang (S)	mg/L, maks	50
Kadar getah (gum)	mg/ 100 mL, maks	5,0
Ph		6,5- 9,0
Tampakan		Jernih dan terang, tidak ada endapan dan kotoran

### 2.7.1 Bahan Pembuat Bioetanol

Teknologi pengolahan bioetanol berasal dari limbah pertanian dan sampah organik. Bahan tersebut dipilih berdasarkan jenis bahannya (berlignoselulosa, bergula atau, berpati). Selulosa ( $C_6H_{10}O_5$ ) adalah senyawa polisakarida yang terdiri dari rantai linear dari beberapa ratus hingga lebih dari sepuluh ribu ikatan  $\beta$  (1,4) unit D-glukosa. Selulosa adalah suatu polisakarida yang tidak larut dalam air dan merupakan zat pembentuk kulit sel tanaman. Struktur yang linier menyebabkan selulosa bersifat kristalin dan tidak mudah larut (Osvaldo dkk., 2012). Selulosa pada tanaman dapat dilihat pada Gambar 7 merupakan komponen utama bahan baku pembentuk bioetanol (Susmiati, 2018).



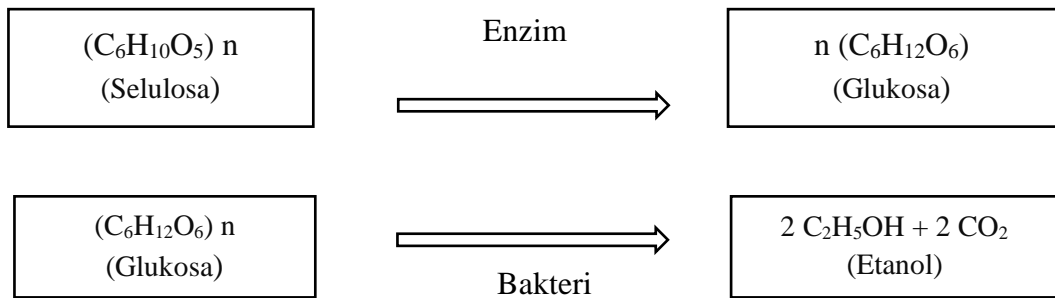
**Gambar 7.** Selulosa pada Tumbuhan (Asror dan Ayu, 2017).

### 2.7.2 Proses Pembuatan Bioetanol

Efisiensi prosesi bioetanol bisa dilakukan secara hidrolisis dan fermentasi terpisah/*Separate hydrolysis and fermentation* (SHF), hidrolisis dan fermentasi dalam satu reaktor *Simultaneous saccharification and fermentation* (SSF) dan hidrolisis dan fermentasi dalam satu reaktor disertai dengan penumbuhan mikroba dalam reaktor tersebut *Consolidated Bioprocessing* (CPB) (Susmiati, 2018).

Penelitian ini metode yang digunakan adalah metode *Separated hydrolysis and fermentation* (SHF) yang merupakan metode hidrolisis dan fermentasi yang dilakukan secara terpisah. Bahan baku yang mengandung selulosa mengalami proses hidrolisis secara terpisah dari proses fermentasi untuk memudahkan pengontrolan terhadap tiap tahap, agar tercapai hasil yang diinginkan (Anaawang dkk., 2017).

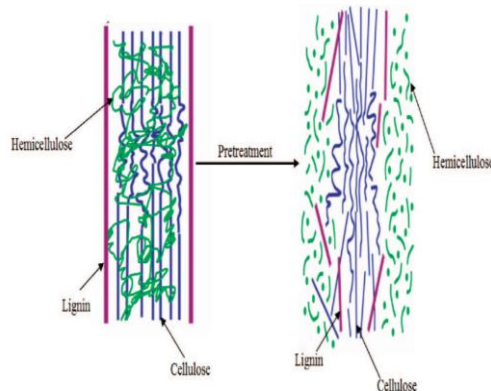
Berdasarkan uraian Puspitasari dkk. (2018) dengan membandingkan metode fermentasi SHF dan SSF dalam produksi bioetanol dari jerami padi dengan menggunakan *yeast* atau ragi. Dari hasil penelitiannya metode SHF dapat menghasilkan produksi etanol dibandingkan metode SSF terdapat masalah yang mengakibatkan tidak menghasilkan kadar etanol. Reaksi Reaksi Pembuatan Bioetanol dapat dilihat pada Gambar 8.



**Gambar 8.** Reaksi Pembuatan Bioetanol

Bioetanol dapat diproduksi dari bahan baku tanaman yang mengandung pati atau karbohidrat yang kemudian dihasilkan dengan cara hidrolisis, fermentasi dan destilasi (Meyrinta dkk., 2018). Adapun proses pembuatan bioetanol yaitu:

1. *Pretreatment*



**Gambar 9.** Proses *Pretreatment* (Kristina dkk., 2012)

*Pretreatment* ini dimaksudkan untuk meningkatkan kemampuan area permukaan (porositas) selulosa sehingga dapat meningkatkan konversi selulosa menjadi glukosa. Proses *pretreatment* diperlukan untuk menghilangkan lignin dan hemiselulosa, menurunkan tingkat kekristalan selulosa sehingga meningkatkan fraksi amorph selulosa, dan meningkatkan porositas material (Sari dan Dira, 2017).

*Pretreatment* atau delignifikasi umumnya menggunakan NaOH dan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. *Pretreatment* bertujuan untuk mengurangi kadar lignin di dalam bahan

berlignoselulosa. Delignifikasi akan membuka struktur lignoselulosa agar selulosa menjadi lebih mudah diakses. Proses delignifikasi akan melarutkan kandungan lignin di dalam bahan sehingga mempermudah proses pemisahan lignin dengan serat. Proses ini dapat dilakukan secara kimiawi, mekanik, dan semikimia.

## 2. Proses Hidrolisis

Proses hidrolisis adalah proses mengubah lignoselulosa (selulosa dan hemiselulosa) menjadi monomer gula penyusunnya.

Jenis proses hidrolisis ada 5 macam yaitu sebagai berikut (Sari dan Dira, 2017):

### a. Hidrolisis murni

Proses Hidrolisis murni tidak dapat menghidrolisis secara efektif karena reaksi berjalan lambat dan hanya mampu menghidrolisis air. Hidrolisis murni biasanya hanya untuk senyawa yang sangat reaktif dan reaksinya dapat dipercepat dengan memakai uap air.

### b. Hidrolisis dengan larutan asam

Proses hidrolisis dengan larutan asam menggunakan larutan asam sebagai katalis. Larutan asam yang digunakan dapat encer atau pekat, seperti  $H_2SO_4$  atau  $HCl$ .

### c. Hidrolisis dengan larutan basa

Proses hidrolisis dengan larutan basa menggunakan larutan basa encer maupun pekat sebagai katalis. Basa yang digunakan pada umumnya adalah  $NaOH$  atau  $KOH$ . Selain berfungsi sebagai katalis, larutan basa pada proses hidrolisis berfungsi untuk mengikat asam sehingga kesetimbangan akan bergeser ke kanan.

### d. Hidrolisis dengan enzim

Proses hidrolisis dengan enzim dilakukan dengan menggunakan enzim sebagai katalis. Enzim yang dapat medegradasi lignoselulosa salah satunya yaitu enzim selulase. Enzim ini berasal dari fungi (*Tricoderma*, *Aspergillus* dan

*Penicillium*), bakteri (*Pseudomonas*, *Cellulomona*, *Z. mobilis* dan *Bacillus*), *T. uridae* dan *S. creviseae*. Enzim yang dihasilkan akan menghidrolisis lignoselulosa menjadi gula monomer penyusunnya.

e. Alkali *fusion*

Proses hidrolisis alkali *fusion* dilakukan tanpa menggunakan air pada suhu tinggi, misalnya dengan menggunakan NaOH padat.

### 3. Proses Fermentasi

Proses fermentasi dipengaruhi oleh nutrisi, pH, suhu, waktu yang dibutuhkan untuk fermentasi, kandungan gula, volume starter. Faktor penting mempengaruhi proses fermentasi adalah jenis mikroba atau karmir. Mikroorganisme yang digunakan untuk fermentasi mempunyai beberapa syarat sebagai berikut:

- a) mempunyai kemampuan untuk fermentasi glukosa secara cepat
- b) mempunyai *genetic* yang stabil (tidak mudah mengalami mutasi)
- c) toleran terhadap alkohol yang tinggi (antara 14-15%)
- d) mempunyai sifat regenerasi yang cepat

Proses fermentasi yang dilakukan adalah proses fermentasi yang tidak menggunakan oksigen (anaerob). Fermentasi pertama dilakukan perlakuan dasar terhadap bibit fermentor/persiapan starter. Starter diinokulasikan sampai benar-benar siap menjadi fermentor, kemudian dimasukkan ke dalam substrat yang akan difermentasi. Hasil fermentasi ini mengubah glukosa menjadi etanol. Proses fermentasi dilakukan dengan variasi waktu bertujuan untuk mengetahui dan memperoleh data bagaimana pengaruh waktu fermentasi terhadap kadar etanol yang dihasilkan (Anggraeni dkk., 2017).

#### 4. Proses Destilasi

Pemisahan secara destilasi pada prinsipnya adalah metode pemisahan yang didasarkan karena adanya perbedaan titik didih antara komponen-komponen yang akan dipisahkan. Secara teoritis bila perbedaan titik didih antar komponen makin besar maka pemisahan dengan cara destilasi akan berlangsung makin baik yaitu hasil yang diperoleh makin murni (Nasution dkk., 2016). Menurut Fachry dkk., (2013) Destilasi adalah memisahkan komponen - komponen yang mudah menguap pada suatu campuran cair dengan cara menguapkannya (*separating agent*-nya panas), yang diikuti dengan kondensasi uap yang terbentuk dan menampung kondensat yang dihasilkan. Uap yang dikeluarkan dari campuran disebut sebagai uap bebas, kondensat yang jatuh sebagai destilat dan bagian campuran yang tidak menguap disebut residu. Untuk memisahkan alkohol dari hasil fermentasi dapat dilakukan dengan destilasi. Destilasi adalah metode pemisahan berdasarkan perbedaan titik didih. Proses ini dilakukan untuk mengambil alkohol dari hasil fermentasi. Destilasi dapat dilakukan pada suhu 80°C, karena titik didih alkohol 78°C sedangkan titik didih air 100°C.

#### **2.8 Response Surface Methodology (RSM)**

Metode respon permukaan merupakan kumpulan teknik matematis dan statistik yang digunakan untuk pemodelan dan analisis masalah dalam suatu respon yang dipengaruhi oleh beberapa variabel. Penggunaan metode ini berfungsi untuk mengembangkan, meningkatkan dan mengoptimalkan proses dengan mengetahui pengaruh variabel bebas terhadap respon (Trihaditia dkk., 2018). *Response surface methodology* (RSM) tidak hanya mendefinisikan pengaruh independen, tetapi juga menghasilkan model matematis, yang menjelaskan proses kimia dan biokimia (Iriawan dan Astuti, 2016).

Penggunaan metode ini adalah untuk mengetahui pengaruh variabel bebas dan respon, serta mendapatkan model hubungan antara variabel bebas dan respon serta mendapatkan kondisi proses yang menghasilkan respon yang baik. *Response surface methodology* dipilih untuk optimasi karena memiliki keunggulan dibandingkan dengan metode konvensional, diantaranya jumlah perlakuan yang lebih sedikit dengan akurasi yang lebih tinggi sehingga lebih efisien dari segi waktu dan biaya. Metode ini mampu mengeksplorasi korelasi antar banyak faktor untuk mendapatkan kondisi produksi optimal dalam suatu bioproses serta memprediksi suatu respon (Iriawan dan Astuti, 2016).

## **2.5 Instrumen**

Pengujian kemurnian suatu sampel hasil destilasi dapat ditentukan dengan kromatografi gas untuk mengidentifikasi adanya kandungan yang diharapkan dalam sampel. Kemudian dapat dilanjutkan dengan uji kualitatif dengan menentukan nilai indeks bias sampel tersebut. Oleh karena itu, perlu diketahui lebih jauh terkait penentuan indeks bias dan prinsip penggunaan kromatografi gas.

### **2.5.1 Refraktometer**

Indeks bias merupakan salah satu dari beberapa sifat optis yang penting dari medium (Rofiq, 2010). Indeks bias merupakan perbandingan (rasio) antara kelajuan cahaya di ruang hampa terhadap kelajuan cahaya di dalam bahan seperti dinyatakan oleh (Young dkk., 2003) pada Persamaan 1:

$$n = \frac{c}{v} \quad (1)$$

dengan,

n = indeks bias

c = kelajuan cahaya di ruang hampa (m/s)

v = kelajuan cahaya di dalam medium (m/s)

Sinar yang melewati dua medium yang berbeda, akan terjadi pembiasan. Jika sinar dilewatkan dari udara melewati zat cair, maka sinar di dalam zat cair itu akan dibelokkan. Peristiwa pembiasan pada bidang batas antara dua medium memenuhi Hukum Snellius (Young dkk., 2003).

Besarnya nilai indeks bias suatu larutan berbanding terbalik dengan besar sudut biasnya. Semakin kecil sudut bias pada larutannya maka indeks biasnya semakin besar yang menandakan sampel tersebut murni. Begitu pula sebaliknya semakin besar sudut bias pada larutannya maka semakin kecil nilai indeks biasnya yang berarti sampel tersebut tidak murni (Kasli dan Rida, 2016).

Menurut (Rofiq, 2010) pengukuran indeks bias dapat dilakukan dengan metode sebagai berikut:

1. metode interferometri seperti Mach-Zender, Jamin, Michelson dan FabryPerot umumnya cenderung rumit dan membutuhkan waktu yang lama, sehingga dibutuhkan suatu alat yang dapat mengukur indeks bias secara lebih mudah dan cepat.
2. metode menggunakan spektrometer. Metode ini juga cukup akurat untuk mengukur indeks bias. Namun demikian, metode ini juga mempunyai kelemahan yaitu selain pengoperasian alat yang rumit, metode ini membutuhkan sampel penelitian dalam jumlah yang banyak dan juga membutuhkan waktu yang lama.
3. metode menggunakan refraktometer. Metode ini merupakan metode yang sederhana. Sampel yang digunakan juga relatif lebih sedikit dibandingkan dengan metode-metode yang lainnya.





**Gambar 10.** Alat Refraktometer

Refraktometer ditemukan oleh Dr. Ernest Abbe seorang ilmuwan dari Jerman pada permulaan abad 20. Refraktometer digunakan untuk mengukur indeks bias cairan, padatan dalam cairan atau serbuk dengan indeks bias dari 1,300 sampai 1,700 dan persentase padatan 0 sampai 95%. Indeks bias zat cair ditentukan oleh kerapatan molekulnya, kerapatan zat cair dipengaruhi oleh suhu, maka suhu berpengaruh terhadap indeks bias zat cair (Supriyana dan Muhammad, 2017).

Ciri khas refraktometer yaitu dapat dipakai untuk mengukur secara tepat dan sederhana karena hanya memerlukan zat yang sedikit yaitu 0,1 mL dan ketelitiannya sangat tinggi. Menurut (Parmitasari dan Eko, 2013) faktor faktor yang mempengaruhi harga indeks bias cairan, yaitu:

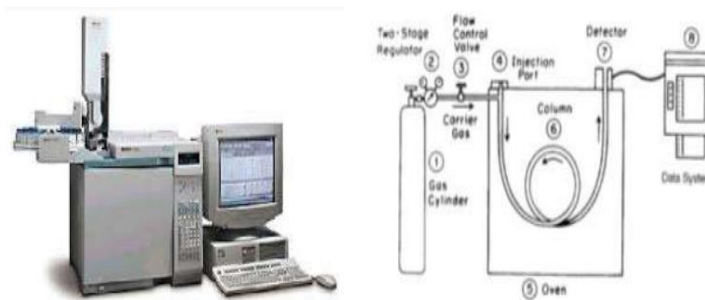
1. berbanding terbalik dengan suhu.
2. berbanding terbalik dengan panjang gelombang sinar yang digunakan
3. berbanding lurus dengan tekanan udara dipermukaan udara
4. berbanding lurus dengan kadar atau konsentrasi larutan

Beberapa faktor yang dapat mempengaruhi penyimpangan hasil pengukuran ini diantaranya temperatur dan kekentalan zat cair (Zamroni, 2013). Prinsip kerja refraktometer adalah pembiasan. Refraktometer adalah alat yang digunakan untuk mengukur kadar atau konsentrasi bahan atau zat terlarut. Metode pengukuran didasarkan pada prinsip bahwa cahaya yang masuk melewati prisma cahaya hanya bisa dilewati bidang batas antara cair dan prisma kerja dengan suatu

sudut yang terletak dalam batas-batas tertentu yang ditentukan oleh sudut batas antara cairan dan alas (Afrizal, 2017).

### 2.5.2 Gas Chromatography (GC)

Analisis kualitatif membuktikan sampel mengandung etanol dapat diuji dengan membandingkan waktu retensi ( $t_R$ ) sampel dengan waktu retensi ( $t_R$ ) etanol dengan menggunakan standar internal. Hal ini dapat ditunjukkan dengan nilai ( $t_R$ ) sampel dengan ( $t_R$ ) baku pembanding sama. Selain menggunakan waktu retensi untuk mengetahui kandungan didalam sample, dapat juga dilakukan dengan analisis kualitatif menggunakan kromatografi gas (Riyanto, 2013).



**Gambar 11.** Instrumen Kromatografi Gas dan Skema Bagian-Bagian Kromatografi Gas (Faricha dkk., 2014)

Prinsip pemisahan dengan metode kromatografi gas berdasar pada perbedaan koefisien partisi dari senyawa yang diuapkan antara fase cair dan fase gas yang dilewatkan dalam kolom dengan bantuan gas pembawa. Kondisi analisis yang perlu diperhatikan yaitu laju alir gas pembawa yang biasanya gas helium, laju alir dari kolom, laju alir nitrogen dan laju udara pengoksida. Gas helium memenuhi syarat sebagai gas pembawa karena tidak reaktif dan murni dan juga memberikan efisiensi kromatografi yang lebih baik (Rizalina dkk., 2018).

Penggunaan kromatografi gas yaitu suhu injektor harus lebih kecil dibanding suhu kolom, dan suhu kolom harus lebih kecil dari suhu detektor. Suhu injektor harus cukup tinggi untuk menguapkan analit dengan cepat sehingga tidak

menghilangkan keefisienan yang disebabkan oleh cara penyuntikan. Sebaliknya, suhu injektor harus cukup rendah untuk mencegah peruraian akibat panas. Suhu kolom harus tinggi dengan suhu injektor agar analisis dapat diselesaikan dalam waktu yang cukup layak dan pemisahan yang dikehendaki tercapai. Suhu detektor minimal harus 125°C agar cuplikan tidak mengembun (Rizalina dkk., 2018).

Pemanfaatan kromatografi gas yaitu menganalisa suatu zat dalam suatu bahan seperti pada penelitian Raquel dkk. (2014) yang menganalisa kadar metanol dan etanol dalam beberapa minyak zaitun dari berbagai daerah, dengan menggunakan standar internal propanol diperoleh waktu retensi metanol yaitu 4,417 menit, etanol yaitu 4,850 menit sedangkan propanol 6,522 menit. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Yanti dkk. (2019) bertujuan menentukan optimasi metode kadar etanol dan metanol pada minuman keras oplosan menggunakan kromatografi gas, dari hasil penelitian metode preparasi yang paling tepat adalah metode destilasi dengan hasil validasi uji akurasi yang dinyatakan dalam % *recovery* metanol dan etanol masing-masing 102,79% dan 100,26%.

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Alat Penelitian**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah ayakan 70 mesh, refluks, oven (*Memert*), neraca analitik (*Ohaus*), sentrifugasi (*Hermle Z 366 K*), desikator, alat destilasi, tanur, vortex, inkubator (*Memmeth 40050-IP 20*), *shaker water bath*, *autoclave* (*NAPCO 8000 DES*), Spektrofotometer UV-Vis (*Hitachi UV-25000*), cawan porselen, cawan petri, autoklaf (*NAPCO 8000 DES*), mikro pipet (*Gilson*), kromatografi gas *shimadzu 2010*, refraktometer dan peralatan gelas lainnya yang umum digunakan dalam laboratorium.

#### **3.2 Bahan Penelitian**

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit singkong, akudes, akuabides, kertas saring, kapas,  $H_2SO_4$  p.a, glukosa p.a, NaOH p.a, NaCl p.a, yeast ekstrak, pepton p.a,  $(NH_4)_2SO_4$  p.a, kertas pH, etanol, garam Rochelle  $KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$ ,  $KH_2PO_4$  p.a,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  p.a, aluminium foil, dinitrosalicylic acid (DNS),  $CaCl_2$  p.a,  $NH_4Cl$  p.a,  $Na_3C_6H_5O_7$  p.a,  $NH_3$  p.a,  $K_2Cr_2O_7$  p.a,  $C_6H_8O_7$  p.a,  $Na_3C_6H_5O_7$  p.a, enzim selulase komersial dan bakteri *Zymomonas mobilis*.

#### **3.3 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilakukan mulai bulan Maret 2022 sampai Oktober 2022 di Laboratorium Biokimia, Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin, Laboratorium Bioteknologi Terpadu, Fakultas Peternakan, Universitas Hasanuddin dan Laboratorium Instrumen Teknik Kimia, Politeknik Ujung Pandang.