

Skripsi

**OPTIMASI PRODUKSI BIOETANOL DARI KULIT BUAH KAKAO
(*Theobroma cacao* L.) MELALUI HIDROLISIS ENZIMATIK DAN
FERMENTASI MENGGUNAKAN BAKTERI *Zymomonas mobilis***

ST. NAMIRA ANANDA

H031181505



**DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2023**

**OPTIMASI PRODUKSI BIOETANOL DARI KULIT BUAH KAKAO
(*Theobroma cacao* L.) MELALUI HIDROLISIS ENZIMATIK DAN
FERMENTASI MENGGUNAKAN BAKTERI *Zymomonas mobilis***

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

ST. NAMIRA ANANDA

H031181505



MAKASSAR

2023

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

OPTIMASI PRODUKSI BIOETANOL DARI KULIT BUAH KAKAO
(*Theobroma cacao* L.) MELALUI HIDROLISIS ENZIMATIK DAN
FERMENTASI MENGGUNAKAN BAKTERI *Zymomonas mobilis*

Disusun dan diajukan oleh

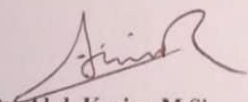
ST. NAMIRA ANANDA

H031 18 1505

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Sidang Sarjana Program Studi
Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Hasanuddin
Pada 16 Februari 2023
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,

Pembimbing Utama


Dr. Abd. Karim, M.Si.
NIP. 19620710 198803 1 002

Pembimbing Pertama


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

Ketua Program Studi


Dr. St Fanziah, M.Si.
NIP. 19720202 199903 2 00202

PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : St. Namira Ananda
NIM : H031181505
Program Studi : Kimia
Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa Skripsi dengan judul “Optimasi Produksi Bioetanol Dari Kulit Buah Kakao (*Theobroma Cacao* L.) Melalui Hidrolisis Enzimatik Dan Fermentasi Menggunakan Bakteri *Zymomonas mobilis*” adalah karya saya sendiri dan tidak melanggar hak cipta pihak lain. Apabila dikemudian hari terbukti bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini adalah hasil karya orang lain yang saya pergunakan dengan cara melanggar hak cipta pihak lain, maka saya bersedia menerima sanksi.

Makassar, 16 Februari 2023



Yang Menyatakan,

St. Namira Ananda

PRAKATA

Bismillahirrahmanirrahim, Alhamdulillahirabbil'alamin, puji dan syukur kita panjatkan kehadirat Allah *Subhanahu Wata'ala*, atas segala limpahan 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 “**Optimasi Produksi Bioetanol Dari Kulit Buah Kakao (*Theobroma Cacao L.*) Melalui 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 mengucapkan terima kasih kepada:

1. Bapak **Dr. Djabal Nur Basir., M.Si**, selaku Penasehat Akademik yang selalu menuntun saya dalam kesulitan yang dihadapi selama perkuliahan.
2. Bapak **Dr. Abd. Karim., 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 masukan yang sangat berharga.

4. Kepada orang tua Ayah dan Ibu tercinta **Ir. Syamsuddin** dan **Hasmi Said**, nenek saya **Hj. Hania**, kakak saya **dr. St. Umrah Hardianti, S.Ked**, dan adik-adik saya **Ahmad Amri Aliyyi** dan **Alkhalifi Dzikra Syam**, serta Keluarga Besar saya yang telah memberikan bantuan, motivasi dan segenap do'a untuk penulis.
5. Kepada Seluruh Analis Laboratorium Biokimia, Laboratorium Kimia Fisika, Laboratorium Kimia Organik, Laboratorium Kimia Analitik Departemen Kimia Fakultas MIPA, dan Laboratorium Bioteknologi Fakultas Peternakan yang telah membantu penulis selama melakukan penelitian.
6. Seluruh Staf Departemen Kimia dan Fakultas MIPA yang senantiasa membantu penulis dalam hal administrasi.
7. **Teman-Teman Kimia 2018, Rencana Masa Depan dan Pejuang S.Si** yang telah membantu dan menemani pada masa kuliah, serta paksaan do'anya hingga penelitian ini bisa berakhir. Terimakasih telah membantu mengukir cerita masa kuliah.
8. Sahabat **Biochemistry Resercher : Eka, Anti, Viny, Wahdah, Ijul, Nining, Jeje, Ilham, Fatimah** yang selalu memberikan bantuan, saran dan paksaan do'anya hingga penelitian berakhir.
9. Kepada orang-orang baik yang tidak saya tuliskan namanya satu persatu yang sering memberikan dukungan dan mendoakan saya selama mengerjakan tugas akhir.

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

Penulis

2023

ABSTRAK

Menurut data dari Badan Pusat Statistik (BPS), produksi kakao (*Theobroma cacao* L) di Indonesia pada tahun 2020 mencapai 720,66 ribu ton mengakibatkan banyaknya pula limbah kakao yang dihasilkan. Penanganan limbah kakao dapat diatasi dengan pembuatan bioetanol sebagai salah satu cara untuk mengurangi kelimpahan limbah yang telah dihasilkan. Penelitian ini bertujuan untuk memanfaatkan senyawa selulosa dari limbah kulit buah kakao dalam menghasilkan bioetanol melalui beberapa tahap, yaitu delignifikasi menggunakan NaOH 14%, hidrolisis secara enzimatik oleh enzim selulase dan proses fermentasi dengan bantuan bakteri *Zymomonas mobilis*. Optimasi pada tahap hidrolisis dan fermentasi menggunakan metode RSM (*Response Surface Methodology*). Hasil penelitian yang diperoleh pada proses delignifikasi ialah terjadi penurunan kandungan senyawa lignin dari 39,73% menjadi 19,78% dan hemiselulosa dari 15,04% menjadi 8,21% serta peningkatan kandungan selulosa dari 21,42% menjadi 48,87%. Tahap hidrolisis diperoleh kondisi optimum pada pH 2 dan suhu 30°C dengan kandungan glukosa sebesar 21,703 mg/mL. Kondisi optimum tahap fermentasi adalah dilakukan inkubasi selama 168 jam dan media optimum pada pH 10. Kadar bioetanol dianalisis menggunakan alat Refraktometer dan *Gas Chromatography* (GC) maka perolehan kadar sebesar 8,43% (v/v).

Kata Kunci: Bioetanol, Delignifikasi, *Gas Chromatography*, Kulit Buah Kakao, Optimasi, *Response Surface Methodology*, *Zymomonas mobilis*

ABSTRACT

According to data from the Central Statistics Agency (BPS), Cocoa (*Theobroma cacao* L) production in Indonesia in 2020 reached 720.66 thousand tons, resulting in a lot of cocoa waste. Cocoa waste handling can be overcome by making bioethanol as a way to reduce the amount of waste that has been produced. This study aims to utilize cellulose compounds from cocoa pod waste in producing bioethanol through several stages, namely delignification using 14% NaOH enzymatically hydrolyzed by cellulase enzymes and the duration of the fermentation process with the help of *Zymomonas mobilis* bacteria. Optimization of the hydrolysis and fermentation stages uses the RSM (Response Surface Methodology) method. The research results obtained in the delignification process were a decrease in the content of lignin compounds from 39.73% to 19.78% and hemicellulose from 15.04% to 8.21% and an increase in cellulose content from 21.42% to 48.87%. The optimum conditions for the hydrolysis stage were pH 2 and temperature 30°C with a glucose content of 21.703 mg/mL. The optimum conditions for the fermentation stage were incubation for 168 hours and the optimum media at pH 10. Measurement of bioethanol concentration was analyzed using a Refractometer and Gas Chromatography (GC) so that the obtained concentration was 8.43% (v/v).

Keywords : Bioethanol, Delignification, Gas Chromatography, Cocoa Fruit Peel, Optimazion, Response Surface Methodology, *Zymomonas mobilis*

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN KEASLIAN.....	iv
PRAKATA.....	v
ABSTRAK	vii
ABSTRACT.....	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN.....	xv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian.....	5
1.3.1 Maksud Penelitian.....	5
1.3.2 Tujuan Penelitian	6
1.4 Manfaat Penelitian	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.).....	7
2.2 Senyawa Lignoselulosa.....	10
2.2.1 Hemiselulosa dan Selulosa	10

2.2.2 Lignin.....	11
2.3 Bioetanol.....	12
2.3.1 <i>Pretreatment</i> (Delignifikasi).....	14
2.3.2 Hidrolisis.....	16
2.3.3 Fermentasi.....	17
2.3.4 Distilasi	19
2.4 <i>Zymomonas mobilis</i>	19
2.5 Enzim Selulase.....	22
2.6 Refraktometer	23
2.7 <i>Gas Chromatography</i> (GC)	23
BAB III METODE PENELITIAN.....	25
3.1 Alat Penelitian.....	25
3.2 Bahan Penelitian	25
3.3 Waktu dan Tempat Penelitian.....	25
3.4 Prosedur Penelitian	26
3.4.1 Persiapan Bahan Kulit Buah Kakao.....	26
3.4.3 Tahap Delignifikasi.....	26
3.4.2.1 Analisis Kadar Hemiselulosa, Selulosa, dan Lignin.....	27
3.4.2.2 Penentuan Kadar Air	27
3.4.3 Optimasi Proses Hidrolisis Secara Enzimatis	29
3.4.3.1 Analisis Metode <i>Dinitro Salicylic Acid</i> (DNS).....	29
3.4.4 Pembuatan Larutan dan Media Fermentasi	30
3.4.4.1 Persiapan Media <i>Luria Broth</i>	30

3.4.4.2 Persiapan Media Medium Fermentasi	30
3.4.5 Peremajaan Bakteri <i>Zymomonas mobilis</i>	30
3.4.6 Optimasi Proses Fermentasi Produksi Bioetanol dengan <i>Respon Surface Methodology</i> (RSM)	31
3.4.7 Tahap Pemurnian Menggunakan Distilasi	32
3.4.8 Tahap Pengujian	32
3.4.8.1 Analisis Kuantitatif Menggunakan Refraktometer	32
3.4.8.2 Analisis Kuantitatif Menggunakan GC	33
3.4.13 Analisis Data	33
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	34
4.1 Tahap Delignifikasi	34
4.1.1 Analisis Kadar Hemiselulosa, Selulosa dan Lignin	34
4.1.2 Penentuan Kadar Air pada Serbuk Kulit Buah Kakao	37
4.2 Optimasi Hidrolisis Selulosa Secara Enzimatik	38
4.3 Optimasi Produksi Bioetanol dengan Metode <i>Respon Surface Methodology</i> (RSM)	44
4.4 Uji Kuantitatif Bioetanol Menggunakan Kromatografi Gas	50
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	52
5.1 Kesimpulan	52
5.2 Saran	52
DAFTAR PUSTAKA	53

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Komposisi kulit buah Kakao	9
2. Pemanfaatan Kulit Buah Kakao Sebagai Bioetanol.....	9
3. Pengaruh Delignifikasi Pada Kulit Buah Kakao	15
4. Penggunaan Bakteri <i>Zymomonas mobilis</i> pada Pembuatan Bioetanol ..	21
5. Faktorial Metode Optimasi Respon Permukaan	29
6. Faktorial Metode Optimasi Respon Permukaan	31
7. Hasil ANOVA Suhu dan pH Hidrolisis	38
8. Hasil ANOVA Waktu dan pH Fermentasi.....	45

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Tanaman Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.)	7
2. Komponen buah kakao : a. biji dan pulp b. plasenta c. kulit	8
3. Struktur selulosa.....	11
4. Struktur etanol.....	12
5. Skematik dari proses perusakan struktur lignin	15
6. Reaksi fermentasi anaerob	17
7. Bakteri <i>Zymomonas mobilis</i>	20
8. Kandungan Sampel Kulit Buah Kakao	35
9. Reaksi Lignoselulosa dengan basa (a) reaksi hemiselulosa dan selulosa dalam basa (NaOH) (b)	36
10. Hasil Optimasi Kadar Glukosa (a) Plot Kontur dan (b) Plot <i>Surface</i> ..	40
11. Penentuan Titik Optimum Hidrolisis	41
12. Reaksi DNS mereduksi glukosa.....	43
13. Plot Kontur Hasil Optimasi Kadar Bioetanol	47
14. Penentuan Titik Optimum Kadar Bioetanol.....	48
15. Kromatogram Standar Etanol 15%	50
16. Kromatogram Bioetanol Hasil Penelitian	51

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Diagram Alir	61
2. Bagan Kerja.....	62
3. Tempat Pengambilan Sampel.....	71
4. Perhitungan Pembuatan Larutan	72
5. Perhitungan Analisis Kadar Selulosa, Hemiselulosa dan Lignin Sebelum dan Sesudah Delignifikasi	77
6. Perhitungan Kadar Air	79
7. Data Pengukuran Kadar Glukosa Menggunakan Metode DNS.....	80
8. Data Pengukuran Hasil Validasi Kondisi Optimum Kadar Glukosa Menggunakan Metode DNS	85
9. Data Pengukuran Kadar Bioetanol Menggunakan Refraktometer	87
10. Data Pengukuran Validasi Kondisi Optimum Kadar Bioetanol Menggunakan Refraktometer	91
11. Hasil Analisis Bioetanol Menggunakan Kromatografi Gas.....	93
12. Rangkaian Alat.....	94
13. Dokumentasi Penelitian	96
14. Data Hasil ANOVA Proses Hidrolisis	98
15. Data Hasil ANOVA Proses Fermentasi	99

DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN

AOAC = *Association of Official Analytical Chemists*

BPS = Badan Pusat Statistik

GC = *Gas Chromatography*

RSM = *Response Surface Methodology*

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kebutuhan akan etanol untuk berbagai tujuan, seperti pelarut, pembersih, pengawet dan alternatif sumber energi menyebabkan produksi etanol semakin meningkat setiap tahunnya (Ernes dkk., 2014). Etanol dapat dibuat dengan berbagai cara, yaitu pertama melalui sintesis kimia dengan mereaksikan antara gas etilen dan uap air dengan asam sebagai katalis. Cara kedua, yaitu melalui proses fermentasi dari bahan yang mengandung karbohidrat dengan bantuan mikroorganisme, atau yang biasa disebut dengan bioetanol (Utami, 2009). Bahan baku yang digunakan dalam pembuatan bioetanol adalah tanaman yang mengandung pati, sukrosa dan lignoselulosa (Luth dkk., 2020).

Senyawa lignoselulosa terdiri atas tiga komponen utama, yaitu selulosa, hemiselulosa, dan lignin yang merupakan bahan utama penyusun dinding sel tumbuhan. Selulosa banyak terdapat dalam limbah pertanian. Limbah pertanian jika dimanfaatkan dengan baik dapat menjadi sumber energi yang cukup potensial dan merupakan bahan berselulosa yang dapat dikonversi menjadi bioetanol (Puspitasari dkk, 2018). Salah satu limbah pertanian yang dapat digunakan sebagai bahan baku pembuatan bioetanol adalah kulit kakao.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Rambat dkk. (2015), limbah kulit kakao memiliki kandungan senyawa kompleks lignoselulosa yang terdiri atas 24,51% selulosa, 23,36% hemiselulosa dan 30,46% lignin, sedangkan menurut data dari Badan Pusat Statistik (BPS), produksi kakao di Indonesia pada tahun 2020 mencapai 720,66 ribu ton dengan luas perkebunan 1.508.956 Ha.

Produksi kakao semakin meningkat setiap tahunnya mengakibatkan banyaknya pula limbah kakao yang dihasilkan, sehingga pemanfaatan selulosa pada limbah kulit buah kakao sebagai pembuatan bioetanol merupakan salah satu cara untuk mengurangi banyaknya limbah yang telah dihasilkan.

Pembuatan bioetanol terdiri atas beberapa tahap, diantaranya adalah tahapan *pretreatment* (delignifikasi), hidrolisis, fermentasi, dan distilasi. *Pretreatment* atau delignifikasi bertujuan untuk menghilangkan sisa lignin yang dapat menghambat kerja enzim, karena struktur lignin yang kompleks dapat menjadi penghambat enzim dalam menghidrolisis selulosa (Jayus dkk., 2017). Delignifikasi dapat dilakukan secara kimia maupun secara fisik. Delignifikasi secara fisik adalah dengan menggunakan temperatur dan tekanan tinggi, penggilingan, radiasi, atau pendinginan, sedangkan delignifikasi secara kimia yang umum menggunakan larutan basa (Dayatmo dan Hartini, 2015). Hasil penelitian yang dilakukan oleh Mardina dkk. (2013) menyatakan bahwa proses delignifikasi menggunakan larutan NaOH sebagai perlakuan awal sebelum hidrolisis mampu meningkatkan reaktivitas katalis dalam mengubah selulosa menjadi glukosa.

Hidrolisis merupakan tahap kedua setelah proses delignifikasi yang bertujuan untuk mengkonversi selulosa menjadi glukosa yang dapat digunakan sebagai substrat dalam proses fermentasi. Hidrolisis dapat dilakukan secara kimiawi dan enzimatik. Hidrolisis secara kimiawi menggunakan larutan asam yang akan memotong ikatan secara acak sedangkan hidrolisis enzimatik dapat dilakukan menggunakan enzim α -amilase, selulase, dan xilanase (Jayus dkk., 2017). Metode yang baik digunakan untuk menghidrolisis selulosa yang terkandung dalam kulit buah kakao adalah dengan hidrolisis enzimatik, yaitu

menggunakan enzim selulase. Keuntungan hidrolisis enzimatik, yaitu memiliki proses yang lebih ramah lingkungan, cara kerja yang spesifik, dan berpotensi untuk memberikan hasil yang lebih tinggi dan efektif jika dibandingkan katalis asam (Setyoko dan Utami, 2016).

Tahap selanjutnya, ialah fermentasi bertujuan untuk mengubah glukosa menjadi etanol dengan bantuan mikroorganisme (Amus dkk., 2020). Adapun mikroorganisme yang sering digunakan dalam proses fermentasi adalah ragi atau khamir (*Saccharomyces cereviceae*), namun kekurangan pada mikroorganisme ini adalah tidak tahan terhadap bioetanol konsentrasi tinggi yang dihasilkan (Pasaribu, 2016). Selain *Saccharomyces cereviceae* adapula bakteri yang memiliki potensi sama dalam memproduksi bioetanol, yaitu bakteri *Zymomonas mobilis*.

Bakteri *Zymomonas mobilis* dapat ditemukan pada tumbuh-tumbuhan yang mengandung banyak gula. Bakteri ini merupakan bakteri anaerob fakultatif. Pemakaian bakteri *Zymomonas mobilis* untuk pembuatan bioetanol mempunyai beberapa keuntungan, diantaranya kemampuan untuk tumbuh secara anaerob dan kemampuan fermentasi lebih spesifik dibandingkan dengan khamir (Albert dkk., 2015). Selain itu pula, kelebihan dari bakteri ini, ialah toleran terhadap suhu tinggi hingga 40°C, mampu bertahan pada pH 3,5-7,5, serta tahan terhadap bioetanol dengan konsentrasi yang tinggi dan dapat menghasilkan bioetanol lebih cepat dibandingkan dengan *Saccharomyces cerevisiae* (Kusumaningati dkk., 2013).

Penelitian terkait pembuatan bioetanol yang telah dilakukan diantaranya oleh Pratiwi dkk. (2010), dimana bahan yang digunakan adalah kulit buah kakao menggunakan hidrolisis asam dan fermentasi dengan *Saccharomyces cereviciae*, maka didapatkan kadar glukosa terbaik dari hasil hidrolisis untuk proses fermentasi, yaitu 25,5% dan proses fermentasi kondisi terbaik diperoleh pada

waktu fermentasi selama 6 hari sehingga menghasilkan kadar bioetanol sebesar 10,9%. Penelitian yang dilakukan oleh Sandi dkk. (2016), bahan baku rumput laut dengan hidrolisis enzim dan fermentasi menggunakan *Saccharomyces cereviciae* menghasilkan kadar glukosa terbaik, yaitu 48,25% dan proses fermentasi kondisi terbaik diperoleh pada waktu fermentasi selama 5 hari yang menghasilkan kadar etanol sebesar 8,92%.

Pada penelitian Yatim (2010), bahan baku yang digunakan dari limbah kulit kopi dengan hidrolisis asam dan fermentasi menggunakan bakteri *Zymomonas mobilis*, sehingga didapatkan kadar glukosa terbaik, yaitu 10,04% dan proses fermentasi kondisi terbaik diperoleh pada waktu fermentasi selama 7 hari yang menghasilkan kadar bioetanol sebesar 38,68%. Penelitian yang dilakukan oleh Albert dkk. (2015), dengan bahan baku yang digunakan ialah limbah tongkol jagung dan fermentasi menggunakan *Zymomonas mobilis* sehingga didapatkan kadar etanol terbaik pada hari ke-5 dengan pH 5 sebesar 20%.

Optimasi parameter hidrolisis dan fermentasi memegang peranan yang penting dalam keberhasilan suatu industri bioproses, disamping jenis mikroorganisme yang digunakan (Ernes dkk., 2014). Proses optimalisasi pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode analisis statistik yaitu *Response Surface Methodology* (RSM). Metode RSM merupakan sekumpulan teknik matematika dan statistika yang berguna untuk menganalisis permasalahan dimana beberapa variabel independen mempengaruhi variabel respon dan tujuan akhirnya adalah untuk mengoptimalkan respon (Kusumaningrum dkk., 2019). Keunggulan metode ini 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 paling optimal dalam suatu bioproses serta memprediksi suatu respon (Ernes dkk., 2014).

Berdasarkan uraian tersebut, maka peneliti berusaha memanfaatkan limbah kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.) sebagai sumber selulosa yang menjadi bahan utama pada pembuatan bioetanol melalui hidrolisis enzimatis dan proses fermentasi menggunakan bakteri *Zymomonas mobilis*.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini, yaitu

1. berapakah kadar lignin, hemiselulosa dan selulosa yang dihasilkan dari kulit buah kakao dengan sebelum dan setelah melakukan proses delignifikasi menggunakan NaOH 14%?
2. bagaimanakah pengaruh suhu dan pH terhadap kadar glukosa yang dihasilkan pada proses hidrolisis menggunakan enzim selulase?
3. berapakah kadar bioetanol yang dihasilkan dari kulit buah kakao pada waktu dan pH fermentasi optimum dengan menggunakan bakteri *Zymomonas mobilis*?

1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian

1.3.1 Maksud Penelitian

Maksud dilaksanakan penelitian ini adalah, untuk mengetahui kadar bioetanol yang dihasilkan dari kulit buah kakao melalui proses hidrolisis secara enzimatis dan fermentasi menggunakan bakteri *Zymomonas mobilis*.

1.3.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dalam penelitian ini adalah:

1. menentukan kadar lignin, hemiselulosa dan selulosa yang dihasilkan dari kulit buah kakao sebelum dan sesudah proses delignifikasi menggunakan NaOH 14%,
2. menganalisis pengaruh suhu dan pH terhadap kandungan glukosa yang dihasilkan pada proses hidrolisis menggunakan enzim selulase,
3. menentukan kadar bioetanol yang dihasilkan dihasilkan dari kulit buah kakao pada waktu dan pH fermentasi optimum dengan menggunakan bakteri *Zymomonas mobilis*.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini, diharapkan dapat memberikan informasi terkait pemanfaatan limbah kulit buah Kakao (*Theobroma cacao* L.) yang dapat menghasilkan bioetanol menggunakan enzim selulase pada proses hidrolisis untuk menghasilkan glukosa dan dilanjutkan dengan fermentasi menggunakan bakteri *Zymomonas mobilis*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kakao (*Theobroma cacao* L.)

Kakao (*Theobroma cacao* L.) merupakan salah satu komoditas ekspor Indonesia yang cukup penting sebagai penghasil devisa negara selain minyak dan gas. Indonesia merupakan negara produsen dan eksportir kakao terbesar ketiga dunia setelah Ghana dan Pantai Gading. Selama periode tahun 2016 sampai dengan 2020 areal perkebunan kakao tersebar hampir seluruh provinsi di Indonesia, kecuali DKI Jakarta. Pada tahun 2020, Provinsi Sulawesi Selatan merupakan provinsi yang memiliki areal perkebunan kakao urutan ketiga terluas di Indonesia setelah Sulawesi Tenggara dan Sulawesi Tengah dengan luas, yaitu 195,049 ribu hektar (BPS, 2020). Tanaman kakao dapat dilihat pada Gambar 1 di bawah ini.



Gambar 1. Tanaman Kakao (*Theobroma cacao* L.)

Tanaman kakao pada Gambar 1, merupakan salah satu anggota genus *Theobroma* dari familia *Sterculiaceae* yang banyak dibudidayakan (Purwati, 2016). Menurut Poedjiwidodo (1996) sistematika pada tanaman kakao sebagai berikut:

Divisi : Spermatophyta
Anak divisi : Angiospermae
Kelas : Dicotyledonea
Anak kelas : Dialypetalae
Bangsa : Malvales
Suku : Sterculiaceae
Marga : *Theobroma*
Jenis : *Theobroma cacao*, L



Gambar 2. Komponen buah kakao : a. biji dan pulp b. plasenta c. kulit

Komponen dari buah kakao berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan diantaranya, terdiri atas bagian pod (kulit buah) 75,7%, biji dan pulp (lapisan lender biji kakao) 21,18% dan plasenta 2,6% sebagaimana yang terdapat pada Gambar 2. Komponen terbesar dari buah kakao terdapat pada bagian kulitnya. Petani pada umumnya hanya menjual produk berupa biji kakao sebagai pendapatan utama usahatani kakao, sedangkan bagian kulitnya merupakan komponen terbesar dari buah kakao yang pemanfaatannya belum optimal sehingga menjadi limbah di kebun dan dapat menjadi sumber hama dan penyakit

(Listyati, 2015). Kulit buah kakao yang tersedia melimpah di sentra-sentra produksi kakao dapat diolah agar menjadi lebih berguna karena didalamnya masih terkandung berbagai senyawa kimia seperti yang terdapat dalam tabel 1 di bawah ini (Listyati, 2015).

Tabel 1. Komposisi kulit buah kakao (Listyati, 2015)

No	Komponen	Jumlah (%)
1	Kadar air	12,96
2	Abu	11,10
3	Lemak	1,11
4	Protein	8,75
5	Karbohidrat	16,27
6	Lignin	20,11
7	Seluosa	31,25
8	Hemiselulosa	48,64

Tabel 1 menunjukkan banyaknya kandungan selulosa yang terdapat dalam kulit buah kakao, dimana menurut Luth dkk. (2020) bahan baku yang digunakan dalam pembuatan bioetanol adalah tanaman yang mengandung pati, sukrosa dan lignoselulosa. Pada senyawa lignoselulosa terdiri atas tiga komponen utama, yaitu selulosa, hemiselulosa, dan lignin (Puspitasari dkk., 2018). Tabel 2 merupakan beberapa penelitian terkait pemanfaatan kulit buah kakao pada pembuatan bioetanol.

Tabel 2. Pemanfaatan Kulit Buah Kakao Sebagai Bioetanol

No	Penelitian	Jumlah Sampel (g)	Mikroba	Lama Fermentasi (hari)	Kadar Bioetanol (%)
1	Uyun, 2019	10	<i>Saccharomyces Cerevisiae</i>	3	1,07
2	Pratiwi dkk, 2010	25	<i>Saccharomyces cereviciae</i>	6	10,9

Tabel 2 menunjukkan, bahwa kulit buah kakao dapat diolah menjadi bioetanol dengan bantuan mikroba. Lama fermentasi dan jumlah sampel berpengaruh terhadap kadar bioetanol yang di dapatkan, dimana konsentrasi tertinggi terdapat pada penelitian Pratiwi dkk. (2010) dengan konsentrasi kadar sebesar 10,9% dan jumlah sampel sebanyak 25 g.

2.2 Senyawa Lignoselulosa

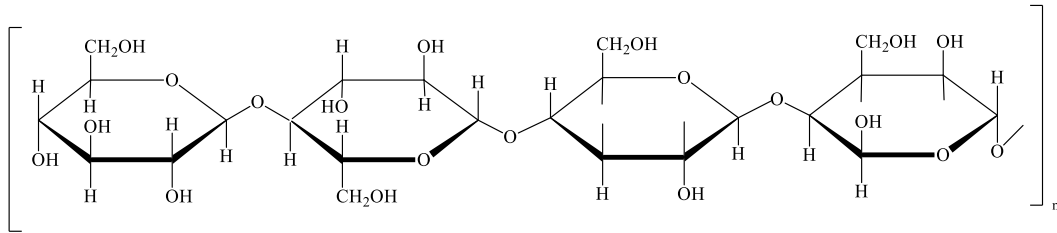
Lignoselulosa merupakan biomassa yang berasal dari tanaman yang mengandung tiga komponen utama, yaitu lignin, selulosa, dan hemiselulosa. Ketersediaan lignoselulosa cukup melimpah, terutama pada limbah pertanian, perkebunan, dan kehutanan, sehingga bahan ini memiliki potensi sebagai salah satu sumber energi melalui proses konversi, baik proses fisika, kimia maupun biologis (Wiratmaja dkk, 2011).

2.2.1 Hemiselulosa dan Selulosa

Hemiselulosa merupakan istilah umum bagi polisakarida yang larut dalam alkali. Hemiselulosa sangat dekat asosiasinya dengan selulosa dalam dinding sel tanaman, karena hemiselulosa berada diantara serat-serat selulosa. Hemiselulosa merupakan polisakarida yang mempunyai berat molekul lebih kecil daripada selulosa. Berbeda dengan selulosa yang hanya tersusun atas glukosa, hemiselulosa tersusun dari bermacam-macam jenis gula, diantaranya glukosa, mannosa, galaktosa, xilosa, dan arabinosa (Wiratmaja dkk, 2011).

Selulosa merupakan bagian yang terpenting dari dinding sel tumbuh-tumbuhan, karena selulosa mendominasi karbohidrat yang berasal dari tumbuh-tumbuhan hampir mencapai 50% (Wiratmaja dkk, 2011). Selulosa ditemukan terikat kuat dengan hemiselulosa dan dilapisi oleh lignin membentuk

kompleks lignoselulosa (Kartikasari dkk., 2013). Selulosa berfungsi sebagai bahan struktur dalam jaringan tumbuhan dalam bentuk campuran polimer homolog dan biasanya disertai polisakarida lain serta lignin dalam jumlah yang beragam, molekul selulosa memiliki molekul yang panjang dan kaku, sebagaimana yang terdapat pada Gambar 3 (Sari dan Ernawati, 2017).



Gambar 3. Struktur Selulosa

Karakteristik dari selulosa, yaitu tidak berwarna, tidak mempunyai rasa dan bau, tidak larut dalam air maupun basa, relatif stabil terhadap panas, tidak meleleh jika dipanaskan, mulai terurai (dekomposisi) pada suhu 260 – 270°C, stabil terhadap oksidasi tetapi selulosa akan larut dalam larutan asam mineral dengan konsentrasi tinggi, selulosa baru mengalami hidrolisis dalam asam mineral encer pada suhu yang tinggi (>100°C) (Darmodjo, 2020). Selulosa dapat dimanfaatkan sebagai pembuatan bioetanol. Selulosa ditemukan terikat kuat dengan hemiselulosa dan dilapisi oleh lignin membentuk kompleks lignoselulosa sehingga untuk membebaskan ikatan tersebut diperlukan tahapan awal yang penting, yaitu delignifikasi (Kartikasari dkk., 2013).

2.2.2 Lignin

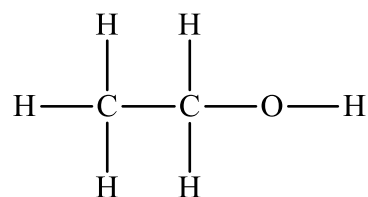
Lignin adalah bagian utama dari dinding sel tanaman yang merupakan polimer terbanyak setelah selulosa (Sari dan Ernawati, 2017). Lignin atau zat kayu adalah salah satu zat komponen penyusun tumbuhan. Komposisi bahan penyusun ini berbeda-beda bergantung jenisnya. Lignin tersusun atas jaringan polimer

fenolik yang berfungsi merekatkan serat selulosa dan hemiselulosa sehingga menjadi sangat kuat (Wiratmaja dkk, 2011).

Struktur kimia lignin mengalami perubahan di bawah kondisi suhu yang tinggi dan asam. Pada reaksi dengan temperatur tinggi ligin dapat terpecah menjadi partikel yang lebih kecil dan terlepas dari selulosa. Saat ini, biomassa lignoselulosa banyak dikembangkan dalam pembuatan bioetanol. Kandungan lignin merupakan salah satu penghambat utama biokonversi lignoselulosa menjadi bioetanol. Hal tersebut dikarenakan lignin yang berfungsi sebagai pelindung selulosa, sehingga selulosa sulit untuk dihidrolisis menjadi glukosa. Cara untuk memecah struktur lignin, yaitu diperlukan adanya proses *pretreatment* atau delignifikasi, sehingga dapat memudahkan pada saat proses hidrolisis selulosa menjadi glukosa (Wiratmaja dkk, 2011).

2.3 Bioetanol

Bioetanol merupakan salah satu *biofuel* yang dapat digunakan sebagai bahan bakar alternatif dan lebih ramah lingkungan. Bioetanol adalah cairan biokimia yang diperoleh dari proses fermentasi gula dari sumber karbohidrat menggunakan bantuan mikroorganisme. Bioetanol dapat bersifat multi-guna, karena jika dicampur dengan bensin pada konsentrasi berapapun dapat memberikan dampak yang positif (Winda, 2015). Struktur etanol dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Struktur Etanol

Gambar 4 merupakan struktur dari etanol yang merupakan senyawa alkohol yang terdiri atas gugus hidroksil (OH), dua atom karbon (C), dengan rumus kimia C_2H_5OH , yang dapat dibuat dengan cara fermentasi gula menggunakan khamir atau bakteri. Senyawa tersebut juga dapat diperoleh dengan cara sintetik, yang lebih sering disebut etanol. Sementara itu, etanol dengan bahan baku gula disebut bioetanol karena gula berasal dari sumber-sumber hayati (Subrimobdi, 2016).

Bioetanol secara umum dapat digunakan sebagai bahan baku industri dan campuran bahan bakar untuk kendaraan. Konsentrasi bioetanol yang akan digunakan harus berbeda sesuai dengan penggunaannya. Bioetanol yang mempunyai konsentrasi 90% - 96% digunakan pada industri, konsentrasi 90% - 96% digunakan dalam campuran untuk miras dan bahan farmasi. Besarnya konsentrasi bioetanol yang dimanfaatkan sebagai campuran bahan bakar untuk kendaraan, harus kering dan tidak dapat menyebabkan korosi, sehingga bioetanol harus mempunyai konsentrasi sebesar 99,5% - 100%. Perbedaan besarnya konsentrasi akan berpengaruh terhadap proses konversi karbohidrat menjadi glukosa (Sulaiman, 2016).

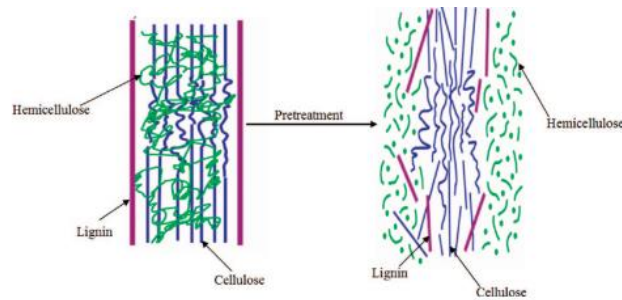
Pemanfaatan bioetanol sebagai bahan campuran (aditif) dari bensin sering disebut dengan gasohol ED10. Gasohol ED10 merupakan campuran antara bensin dengan 10% bioetanol murni. Gasohol ED10 memiliki angka oktan 92 yang hampir setara dengan pertamax yang memiliki nilai oktan 92-95 (Arifwan dkk., 2016). Tingginya angka oktan pada bioetanol dapat digunakan untuk mengurangi *knocking* atau ketukan pada mesin selama proses pembakaran. Bioetanol juga lebih ramah lingkungan karena mengandung 34,7% oksigen yang tidak terdapat

pada bensin, sehingga efisiensi pembakaran bioetanol 15% lebih tinggi dibandingkan dengan bensin (Susmiati, 2018).

Bioetanol dapat diproduksi dari beberapa jenis media yang mengandung gula, pati, selulosa, dan bahan berserat (lignoselulosa). Pada pembuatan bioetanol berbahan lignoselulosa seperti limbah kulit buah kakao terdiri atas beberapa tahap, diantaranya adalah tahapan *pretreatment* (delignifikasi), hidrolisis, fermentasi dan pemurnian. Proses delignifikasi bertujuan untuk menghilangkan sisa lignin yang dapat menghambat kerja enzim. Proses hidrolisis bertujuan untuk mengkonversi selulosa dan hemiselulosa menjadi glukosa yang dapat digunakan sebagai substrat dalam proses fermentasi. Proses hidrolisis dapat dilakukan secara kimiawi dan enzimatis (Jayus dkk., 2017). Proses fermentasi bertujuan untuk mengubah glukosa menjadi bioetanol dengan bantuan mikroorganisme, sedangkan tahap terakhir adalah pemurnian hasil dengan destilasi (Amus dkk., 2020).

2.3.1 Pretreatment (Delignifikasi)

Hidrolisis selulosa dalam lignoselulosa jauh lebih sulit dibandingkan hidrolisis selulosa yang bebas, hal tersebut karena lignoselulosa merupakan bahan yang amat rapat sehingga pada kondisi biasa bersifat inert dan tak bisa ditembus oleh air apalagi enzim (Darmodjo, 2020). Tahap pertama yang harus dilakukan dalam pembuatan bioetanol dari biomassa berupa limbah pertanian ataupun sampah organik, yaitu dengan menghilangkan lignin. Lignin dapat menjadi penghalang penetrasi enzim ke selulosa, sehingga pemisahan lignin merupakan hal yang harus dilakukan jika ingin didapatkan kondisi hidrolisis yang optimal. Proses pemisahan struktur lignin dapat dilihat pada Gambar 5 (Susmiati, 2018).



Gambar 5. Skematik dari proses pemisahan struktur lignin (Kumar dkk., 2009)

Pretreatment (delignifikasi) bertujuan untuk mengubah atau merusak struktur lignin yang merupakan komponen penyusun pada biomassa tersebut sehingga memudahkan enzim untuk menghidrolisis menjadi monomer-monomer gula sebagaimana yang terdapat pada Gambar 5 (Susmiati, 2018). Proses yang umum dilakukan untuk merusak struktur lignin adalah proses hidrolisis basa atau disebut proses delignifikasi.

Proses delignifikasi menyebabkan kerusakan terhadap struktur lignin dan melepaskan senyawa karbohidrat (Mardina dkk, 2013). Delignifikasi yang umum dilakukan menggunakan larutan NaOH karena larutan ini dapat merusak struktur lignin sehingga membebaskan selulosa tanpa merusak karbohidrat. Semakin besar konsentrasi NaOH yang digunakan untuk bahan baku pembuatan bioetanol maka semakin tinggi juga nilai kadar bioetanol yang diperoleh. Semakin tinggi konsentrasi basa yang digunakan maka selulosa yang terhidrolisis akan semakin banyak (Darmodjo, 2020). Pengaruh delignifikasi pada sampel kulit buah kakao dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Pengaruh Delignifikasi Pada Kulit Buah Kakao (Sucihati dkk., 2014)

Kandungan Senyawa	Sebelum Delignifikasi (%)	Setelah Delignifikasi (%)
Lignin	24,32	0,60
Hemiselulosa	21,59	9,54
Selulosa	15, 59	35,05

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Sucihati dkk. (2014), yang terdapat pada Tabel 3 bahwa proses delignifikasi sebagai perlakuan awal sangat berpengaruh terhadap perubahan kandungan senyawa lignoselulosa yang dihasilkan dari kulit buah kakao, dimana kondisi optimum perlakuan awal kulit kakao didapatkan pada perlakuan konsentrasi NaOH 1,5% dengan suhu 121°C selama 30 menit.

2.3.2 Hidrolisis

Hidrolisis adalah salah satu tahapan dalam pembuatan bioetanol berbahan baku limbah lignoselulosa. Hidrolisis bertujuan untuk memecah selulosa dan hemiselulosa menjadi monosakarida (glukosa) yang selanjutnya akan difermentasi menjadi bioetanol. Secara umum teknik hidrolisis dibagi menjadi dua, yaitu hidrolisis menggunakan larutan asam dan hidrolisis dengan menggunakan enzim (Syam dkk., 2009).

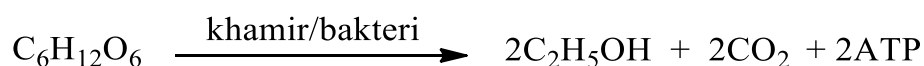
Proses hidrolisis asam dapat dikatakan sederhana dan langsung diketahui hasilnya, namun memiliki beberapa kekurangan. Proses hidrolisis asam sering menghasilkan produk campuran glukosa, selobiosa, serta degradasi produk dari pemecahan monomer gula menjadi aldehid dan keton. Proses hidrolisis dapat dilakukan dengan penambahan asam, seperti asam sulfat dan asam klorida. Selain itu, hidrolisis dapat dilakukan dengan menggunakan enzim yang sering disebut hidrolisis enzimatis. Enzim tersebut merupakan enzim selulase atau lainnya yang dapat memecah selulosa menjadi monomer-monomernya. Keuntungan dari hidrolisis enzimatis yaitu dapat mengurangi penggunaan asam sehingga dapat meminimalisir efek negatif terhadap lingkungan (Syam dkk, 2009). Hidrolisis enzim menghasilkan konversi yang lebih besar jika dibandingkan dengan

hidrolisis asam. Hidrolisis enzim juga dapat mencegah adanya reaksi efek samping karena sifat katalis enzim sangat spesifik (Risnoyatiningih, 2011).

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Nugahini dkk (2016) Hidrolisis enzim terbukti meningkatkan kadar glukosa dari hidrolisis kimia 74,55 mg/L menjadi 85,66 mg/L yang merupakan kadar glukosa terkecil pada proses hidrolisis enzimatik. Sedangkan proses hidrolisis enzimatis dengan konsentrasi enzim 1% selama 124 jam mampu menghasilkan kadar glukosa tertinggi yaitu 187 mg/L.

2.3.3 Fermentasi

Fermentasi merupakan metabolisme mikroba untuk mengubah bahan baku menjadi produk yang bernilai lebih tinggi. Gula adalah bahan baku yang umum digunakan pada proses fermentasi (Sulaiman, 2016). Prinsip dasar pada fermentasi adalah mengaktifkan kegiatan mikroba tertentu dengan tujuan mengubah sifat bahan agar menghasilkan suatu bahan yang bermanfaat (Albert dkk., 2015). Pada proses fermentasi terjadi pemecahan, dimana 1 molekul glukosa akan menghasilkan 2 molekul etanol, 2 molekul CO₂ dan energi. Proses fermentasi dilakukan dengan menambahkan bakteri atau khamir pada bahan yang mengandung karbohidrat, seperti, anggur, molase, kentang dan padi untuk mengkonversi glukosa menjadi bioetanol yang bersifat anaerob (tidak memerlukan oksigen) (Sulaiman, 2016). Rumus reaksi fermentasi dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Reaksi fermentasi anaerob (Wiratmaja dkk, 2011)

Beberapa faktor yang dapat mempengaruhi pembuatan bioetanol dalam

proses fermentasi antara lain sebagai berikut: (Wardani, 2018).

1. pH

Pengukuran pH, merupakan parameter yang mempengaruhi pertumbuhan dan pembentukan produk. Mikroba tertentu dapat tumbuh pada kisaran pH yang sesuai untuk pertumbuhannya. Bakteri dapat tumbuh pada pH 4-8 dan khamir pada pH 3-6 (Wardani, 2018). Jika nilai pH sudah sesuai, maka pertumbuhan mikroorganisme akan semakin optimal (Nuraini dkk, 2021).

2. Suhu

Suhu yang digunakan selama fermentasi akan mempengaruhi mikroba yang berperan dalam proses fermentasi (Wardani, 2018). Beberapa mikroorganisme dapat tumbuh pada kisaran suhu yang luas. Untuk pertumbuhan mikroba cocok pada suhu kamar sekitar 25-37°C (Subrimobdi, 2016). Berkaitan dengan suhu pertumbuhan dikenal suhu minimum, maksimum dan optimum. Suhu minimum adalah suhu yang paling rendah dimana kegiatan mikroba masih berlangsung. Suhu optimum adalah suhu yang paling baik untuk kehidupan mikroba, sedangkan suhu maksimum adalah suhu tertinggi yang masih dapat menumbuhkan mikroba tetapi pada tingkat kegiatan fisiologi yang paling rendah (Yatim, 2010).

3. Substrat

Mikroba memerlukan substrat yang mengandung nutrisi sesuai dengan kebutuhan untuk pertumbuhannya.

4. Oksigen

Oksigen diperlukan untuk pertumbuhan bakteri atau khamir, namun tidak diperlukan dalam proses pembentukan bioetanol, karena proses fermentasi yang digunakan ialah anaerob. Jika terlalu banyak udara, maka mikroba

hanya bekerja untuk memperbanyak jumlah sel sehingga produksi bioetanol sedikit (Subrimobdi dkk., 2016).

5. Waktu Fermentasi

Waktu fermentasi merupakan faktor yang dapat mempengaruhi proses fermentasi. Dimana semakin lama waktu yang digunakan maka semakin banyak pula kadar bioetanol yang didapat. Namun jika waktu fermentasi terlalu lama, maka akan berpengaruh buruk terhadap pertumbuhan mikroorganisme (Wardani, 2018). Karena siklus kehidupan mikroba diperkirakan sudah mencapai bagian akhir fase stasioner dan mikroba diperkirakan sudah mulai memasuki fase kematian. Hal ini disebabkan oleh berkurangnya nutrisi pada medium (Riswanto dkk., 2017).

2.3.4 Distilasi

Distilasi atau penyulingan merupakan suatu metode pemisahan bahan kimia berdasarkan perbedaan kecepatan, kemudahan menguap, atau volatilitas suatu zat. Dalam proses metode ini, suatu campuran zat dididihkan hingga terjadilah penguapan, kemudian uap ini didinginkan kembali menjadi bentuk cairan. Zat yang memiliki titik didih lebih rendah akan lebih dulu mengalami penguapan. Penerapan proses ini didasarkan pada teori bahwa pada suatu larutan, masing-masing komponen akan menguap jika telah mencapai titik didihnya. Etanol atau etil alkohol merupakan senyawa kimia yang memiliki titik didih pada suhu 70 - 78°C (Subrimobdi, 2016).

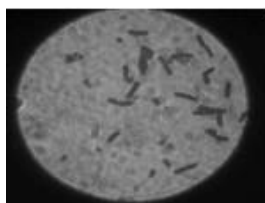
2.4 *Zymomonas mobilis*

Mikroorganisme yang banyak digunakan dalam proses fermentasi adalah khamir dan bakteri. Saat ini, *Saccharomyces cerevisiae* dari golongan khamir

digunakan sebagai mikroorganisme penghasil bioetanol utama di seluruh dunia. *Saccharomyces cerevisiae* memiliki beberapa kekurangan, diantaranya adalah tidak tahan dengan konsentrasi tinggi dari bioetanol yang dihasilkan, sehingga bakteri memiliki potensi dalam memproduksi bioetanol lebih efektif dan efisien. Salah satu bakteri berpotensi untuk menghasilkan bioetanol dalam proses fermentasi, yaitu bakteri *Zymomonas mobilis* (Bagaskara dkk., 2020).

Bakteri ini merupakan bakteri anaerob fakultatif, yaitu bakteri yang dapat bertahan hidup dan berkembang ditempat yang terdapat oksigen maupun yang tidak terdapat oksigen. Bakteri ini merupakan bakteri gram negatif yang dapat ditemukan pada tumbuh-tumbuhan yang kaya akan gula, umumnya mempunyai panjang 2-6 μm dan lebar 1-1,4 μm (Albert dkk., 2015). Bakteri ini berbentuk batang, tidak membentuk spora, dan merupakan bakteri yang dapat bergerak, sebagaimana yang terdapat pada Gambar 7. *Zymomonas mobilis* mempunyai klasifikasi ilmiah (Yatim, 2010) sebagai berikut :

Kerajaan	: Bakteri
Filum	: Proteobacteria
Kelas	: Alpha Proteobacteria
Order	: Sphingomonadales
Keluarga	: Sphingomonadaceae
Genus	: <i>Zymomonas</i>
Spesies	: <i>Zymomonas mobilis</i>



Gambar 7. Bakteri *Zymomonas mobilis* (Ernes dkk., 2014)

Bakteri *Zymomonas mobilis* banyak digunakan oleh perusahaan bioetanol, karena memiliki kelebihan yang lain dibandingkan ragi dalam beberapa aspek, diantaranya yaitu mempunyai toleransi terhadap suhu tinggi hingga 40°C, tahan terhadap kadar bioetanol yang tinggi dihasilkan, memiliki pH pada kisaran pH 4-7 (Wardani, 2018). Toleran terhadap kadar gula tinggi, dan waktu fermentasi yang lebih cepat. Bakteri ini memerlukan gula untuk makan dalam mempertahankan hidupnya dan bereproduksi (Albert dkk., 2015). Berikut merupakan beberapa penelitian terkait pembuatan bioetanol yang telah dilakukan menggunakan bakteri *Zymomonas mobilis* dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Penggunaan Bakteri *Zymomonas mobilis* pada Pembuatan Bioetanol

No	Penelitian	Sampel	Lama Fermentasi (hari)	Kadar Bioetanol (%)
1	Wardani, 2018	<i>Sargassum sp</i>	6	19,61
2	Albert dkk., 2015	Limbah tongkol jagung	5	20
3	Septiany, 2013	Alga merah	7	23,01

Tabel 4 di merupakan pemanfaatan bakteri *Zymomonas mobilis* pada pembuatan bioetanol. Berdasarkan beberapa data penelitian pada Tabel 4 menunjukkan bahwa semakin lama proses fermentasi maka semakin banyak pula kadar bioetanol yang dihasilkan.

2.5 Enzim Selulase

Enzim merupakan biomolekul berupa protein yang memiliki fungsi sebagai katalis pada proses biokimia. Salah satu jenis enzim yang memiliki

peranan penting dalam biokonversi limbah-limbah organik adalah enzim selulase (Kusumaningum dkk., 2019). Enzim selulase merupakan enzim yang mampu memutuskan ikatan glikosidik β (1,4) pada selulosa, selodekstrin, selobiosa, dan turunan selulosa lainnya. Enzim selulase terdiri dari endoglukanase, eksoglukanase, dan β -glukosidase. Endoglukanase memiliki fungsi untuk memecah polisakarida selulosa menjadi rantai yang lebih pendek, yaitu oligosakarida. Endoglukanase bekerja pada wilayah serat selulosa yang mempunyai kristalinitas rendah untuk memecah selulosa secara acak dan membentuk ujung rantai yang bebas. Eksoglukanase (*cellobiohidrolase*) berfungsi mengubah satuan oligosakarida menjadi molekul-molekul disakarida. Sedangkan β -glukosidase berfungsi untuk mengkonversi atau memecah satuan disakarida menjadi dua molekul glukosa yang merupakan gula sederhana yang dapat diubah menjadi etanol (Putri dan Utami, 2017).

Aktivitas enzim selulase dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain ialah suhu, pH, konsentrasi substrat, konsentrasi enzim serta keberadaan inhibitor. Suhu dan pH merupakan faktor utama yang harus diketahui karena setiap enzim akan berfungsi secara optimal pada suhu dan pH tertentu. Kecepatan reaksi akan menurun tajam di atas suhu optimal karena enzim merupakan protein yang akan terdenaturasi pada suhu tinggi (Setyoko dan Utami, 2016). Sebagian besar enzim selulase memiliki aktivitas optimal pada rentang suhu 20 – 50°C. Disamping itu, jika terjadi sedikit pergeseran pH dari pH optimum juga akan menyebabkan perubahan besar pada reaksi yang dikatalisis enzim (Kusumaningum dkk, 2019). Aktivitas enzim selulase akan berjalan optimum pada kondisi optimum dan diharapkan dapat diperoleh suatu produk glukosa yang

maksimal, sehingga akan dihasilkan bioetanol yang maksimal pada proses selanjutnya dari hidrolisis selulosa biomassa (Setyoko dan Utami, 2016).

2.6 Refraktometer

Indeks bias merupakan salah satu dari beberapa sifat optis yang penting dari suatu medium. Pengukuran indeks bias suatu zat cair penting dalam penilaian sifat dan kemurnian cairan, konsentrasi larutan, dan perbandingan komponen dalam campuran dua zat cair atau kadar yang diekstrakkan dalam pelarutnya. Salah satu metode yang dapat digunakan untuk dapat mengukur indeks bias zat cair, ialah dengan menggunakan Refraktometer, hal tersebut karena dalam pengaplikasiannya tidak membutuhkan waktu yang lama dan tidak membutuhkan sampel yang banyak dalam penggunaannya (Novestiana dan Hidayanto, 2015).

2.7 Gas Chromatography (GC)

Kromatografi gas merupakan jenis kromatografi yang digunakan untuk pemisahan dan analisis senyawa-senyawa organik yang mudah menguap. Selain itu kromatografi gas juga dapat digunakan untuk memisahkan berbagai campuran dari komponen. Pada analisis kromatografi gas, fase yang bergerak ialah sebuah gas pembawa, biasanya gas murni seperti helium atau yang tidak reaktif biasanya gas nitrogen, sedangkan pada fase diam berupa padatan yang mendukung gas murni di dalam bagian dari sistem pipa-pipa kaca atau logam (Wahyudiono dkk, 2018). Pada sistem kromatografi gas, senyawa yang memiliki titik didih rendah akan keluar terlebih dahulu menuju detektor karena titik didih yang lebih rendah mengakibatkan senyawa lebih mudah menguap sehingga waktu retensinya lebih cepat. Waktu retensi masing-masing senyawa ditentukan oleh titik didih senyawa tersebut (Sipahelut, 2019).

Prinsip kerja kromatografi gas, yaitu sampel yang berupa cairan diinjeksikan ke dalam injektor untuk selanjutnya diuapkan. Sampel yang telah diuapkan kemudian dibawa oleh gas pembawa menuju kolom untuk melakukan proses pemisahan, kemudian komponen-komponen tersebut terdistribusi dalam kesetimbangan antara fase diam dan fase gerak. Setelah melewati kolom, komponen yang keluar dari kolom ditangkap oleh detektor dan direkam oleh komputer sebagai kromatogram (Yanti, 2018).