

*Skripsi*

**PRODUKSI BIOETANOL DARI BATANG RUMPUT GAJAH MINI  
(*Pennisetum purpureum*) DENGAN METODE *SIMULTANEOUS  
SACCHARIFICATION AND FERMENTATION (SSF)*  
MENGUNAKAN BAKTERI  
*Clostridium acetobutylicum***

**DIONISIUS SANDHI TRI PUTRA  
H311 16 010**



**DEPARTEMEN KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2021**

**PRODUKSI BIOETANOL DARI BATANG RUMPUT GAJAH MINI  
(*Pennisetum purpureum*) DENGAN METODE *SIMULTANEOUS  
SACCHARIFICATION AND FERMENTATION (SSF)*  
MENGUNAKAN BAKTERI  
*Clostridium acetobutylicum***

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

**Oleh:**

**DIONISIUS SANDHI TRI PUTRA**

**H311 16 010**



**MAKASSAR**

**2021**

**LEMBAR PENGESAHAN (TUGAS AKHIR)**

**PRODUKSI BIOETANOL DARI BATANG RUMPUT GAJAH MINI  
(*Pennisetum purpureum*) DENGAN METODE *SIMULTANEOUS*  
*SACCHARIFICATION AND FERMENTATION (SSF)*  
MENGUNAKAN BAKTERI  
*Clostridium acetobutylicum***

Disusun dan diajukan oleh

**DIONISIUS SANDHI TRI PUTRA  
H311 16 010**

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka penyelesaian studi Program Sarjana Program Studi Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin Pada Tanggal 2 Juni 2021 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

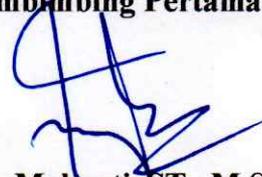
Menyetujui

**Pembimbing Utama**



**Prof. Dr. Ahyar Ahmad, Ph.D**  
NIP. 19671231 199103 1 020

**Pembimbing Pertama**



**Dr. Mahyati, ST., M.Si**  
NIP. 19700929 200212 2 001

Ketua Program Studi



**Dr. Abd. Karim, M.Si**  
NIP. 19620710 198803 1002

## PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Dionisius Sandhi Tri Putra  
NIM : H311 16 010  
Program Studi : Kimia  
Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulisan saya berjudul

**PRODUKSI BIOETANOL DARI BATANG RUMPUT GAJAH MINI  
(*Pennisetum purpureum*) DENGAN METODE *SIMULTANEOUS*  
*SACCHARIFICATION AND FERMENTATION* (SSF)  
MENGUNAKAN BAKTERI  
*Clostridium acetobutylicum***

Adalah karya tulisan saya sendiri dan bukan merupakan pengambil-alihan tulisan orang lain dan bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri.

Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan isi skripsi ini hasil karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut

Makassar ,2 Juni 2021

Yang Menyatakan



Dionisius Sandhi Tri Putra

## LEMBAR PERSEMBAHAN

### *Coretan Sederhana*

*Jiwa Manusia seumpama astadikpala yang senantiasa menjaga mata-angin di perbatasan badai dan riak gelombang*

*Tubuh Manusia tidak lain adalah Astagina yang Esa,  
Ia mengejawantahkan radikal kehampaan dengan eros yang senantiasa menyatukan*

*Takdir manusia selayaknya kuantum yang membagi diri pada percabangan sifat partikel dan gelombang.  
Mebutakan setiap mata manusia,  
Ke arah mana dia akan pergi..?  
Tak satu-pun yang dapat melihat selain Yang Esa itu sendiri*

*Ketidaktahuan adalah Kutukan  
Karena sejatinya itu Kutukan Maka Berbahagialah Yang sedang berproses melepas Belunggu Kutukan*

*Tulisan ini kupersembahkan Kepada Siapapun  
Yang Merasa dikutuk untuk Tidak Tahu*

*Panjang umur niat baik*

## PRAKATA

### SHALOM ALEICHEM

Damai sejahtera bagi segala yang ada di bumi yang tetap mengambil setiap peran dalam kemajuan ilmu pengetahuan dan harmonisasi setiap komponen semesta. Salam dan syukur yang paling tinggi penulis sampaikan ke Tuhan Yang Maha Esa karena kuasanya atas segala yang ada sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik dan sebagai pemenuhan atas tanggung-jawab untuk mendapatkan gelar Sarjana Sains yang berjudul **“Produksi Bioetanol dari Batang Rumput Gajah Mini (*Pennisetum purpureum*) dengan Metode *Simultaneous Saccharification And Fermentation* (SSF) Menggunakan Bakteri *Clostridium acetobutylicum*”**. Penyelesaian skripsi ini tidak terlepas dari keterbatasan pengetahuan penulis, akan tetapi berkat bantuan dan dorongan dari berbagai pihak penulis dapat melewati berbagai macam hambatan dan ujian. Ucapan terima kasih penulis haturkan kepada segenap keluarga besar atas segala doa, dukungan moril, materil, cinta, kasih sayang yang tulus yang senantiasa diberikan kepada penulis. Penulis ucapkan terima kasih kepada yang terhormat:

1. Bapak **Prof. Ahyar Ahmad, Ph.D** selaku pembimbing utama dan Ibu **Dr. Mahyati, S.T., M.Si** selaku pembimbing pertama yang telah banyak membantu dan bersedia meluangkan waktu untuk membimbing dan memotivasi penulis hingga terselesaikannya skripsi ini.
2. Ibu **Dr. Indah Raya, M.Si** dan bapak **Abdur Rahman, M.Si** selaku tim penguji yang telah memberikan saran, kritik, masukan yang bersifat membangun kepada penulis dalam penulisan skripsi ini.
3. Bapak **Dr. Eng. Amiruddin, S.Si, M.Si** selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin.

4. Bapak **Dr. Abd. Karim, M.Si** selaku Ketua Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin.
5. Seluruh dosen Departemen Kimia terkhusus dosen laboratorium biokimia, Staf FMIPA UNHAS, Staf Departemen Kimia, Staf Laboratorium, serta Staf Perpustakaan FMIPA UNHAS atas semua ilmu yang telah diajarkan dan pelayanan yang telah diberikan, serta bantuannya kepada penulis.
6. Teman-teman di lembaga Kemahasiswaan **KMF FMIPA UNHAS** yang selalu menjadi tempat pembelajaran dunia kampus pertama bagi penulis
7. Kanda dan adinda yang terus berproses di **KMK FMIPA Unhas dan HMK FMIPA UNHAS** tempat dimana kepedulian, rasa tanggung-jawab dan kompetisi dalam keilmuan itu hadir sebagai pemenuhan objek kader dalam rangka memanusiaikan manusia.
8. kepada seluruh pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang ikut serta membantu, sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini jauh dari kata sempurna, sehingga dengan segala kerendahan hati penulis sangat mengharapkan kritikan dan saran yang bersifat membangun untuk memperbaiki kekurangan yang ada. Penulis pun tetap berharap agar tulisan ini dapat memberikan manfaat bagi siapapun yang membacanya

Makassar, 2 Juni 2021



Penulis

## ABSTRAK

Selulosa pada batang rumput gajah mini termasuk ke dalam kelompok karbohidrat yang belum dimanfaatkan secara maksimal. Selulosa tersebut dapat dimanfaatkan dengan bantuan mikroba untuk menghasilkan bioetanol. Penelitian ini bertujuan untuk menghasilkan bioetanol dari batang rumput gajah mini (*Pennisetum purpureum*) melalui proses sakarifikasi dan fermentasi simultan (SSF) dengan menggunakan bakteri *Clostridium acetobutylicum*. Metode SSF menggabungkan proses hidrolisis secara enzimatis dan fermentasi. Tahap pertama dalam penelitian ini, batang rumput gajah mini diberi perlakuan awal dengan penambahan NaOH 3% dan *Bleaching* dengan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% untuk menghilangkan lignin dari selulosa. Tahap kedua, selulosa batang rumput gajah mini difermentasikan dengan metode SSF. Hasil penelitian menunjukkan bahwa selulosa batang rumput gajah mini setelah perlakuan pendahuluan sebesar 75,37%. Kondisi optimum fermentasi diperoleh pada pH 6,5 selama 10 hari fermentasi dengan penggunaan batang rumput gajah mini sebanyak 68 gram setelah perlakuan awal mampu menghasilkan 13,5 mL bioetanol dengan kadar 86,25%

**Kata kunci:** Bioetanol, Batang rumput gajah mini (*Pennisetum purpureum*), *Simultaneous Saccharification and Fermentation*

## ABSTRACT

The cellulose of dwarf-late napier grass belongs to the carbohydrate group that has not been utilized optimally. The cellulose can be utilized with the help of microbes to produce bioethanol. This study aims to produce bioethanol from the stems of dwarf-late napier grass (*Pennisetum purpureum*) through the process of saccharification and simultaneous fermentation (SSF) using *Clostridium acetobutylicum* bacteria. The SSF method combines enzymatic hydrolysis and fermentation processes. In the first stage of this study, dwarf-late napier grass stems were pre-treatment with the addition of 3% NaOH and bleaching with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to remove lignin from the cellulose. In the second stage, the dwarf-late napier grass stem cellulose was fermented by the SSF method. The results showed that the dwarf-late napier grass stem cellulose after pretreatment was 75.37%. The optimum condition of fermentation was obtained at pH 6.5 for 10 days of fermentation with the use of dwarf-late napier grass stems as much as 68 grams after pre-treatment was able to produce 13.5 mL of bioethanol with a concentration of 86.25%

**Keywords:** Bioethanol, *Dwarf-Late napier grass stem*, *Simultaneous Saccharification and Fermentation System*.

## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
PRAKATA.....	vi
ABSTRAK.....	viii
ABSTRACT.....	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR .....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN .....	xvii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian .....	5
1.4 Manfaat Penelitian .....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 Rumput Gajah Mini ( <i>Pennisetum purpureum</i> ) .....	7
2.1.1 Klasifikasi Rumput Gajah Mini .....	10
2.2 Lignoselulosa .....	11
2.2.1 Selulosa.....	12
2.2.2 Lignin .....	13
2.3 Bakteri <i>Clostridium acetobutylicum</i> .....	15
2.4 <i>Simoultaneous Saccharification and Fermentation</i> (SSF).....	15
2.5 Etanol .....	21

2.6 Indeks Bias .....	23
<b>BAB III METODE PENELITIAN.....</b>	<b>25</b>
3.1 Bahan Penelitian.....	25
3.2 Alat Penelitian.....	25
3.3 Waktu dan Tempat Penelitian .....	25
3.4 Prosedur Penelitian.....	25
1 Persiapan Sampel .....	25
2 Analisis Selulosa dan Lignin.....	26
3 Perlakuan Pendahuluan .....	27
4 Peremajaan Bakteri <i>Clostridium acetobutylicum</i> .....	27
5 Pembuatan Media Inokulum .....	28
6 Penentuan Kondisi Optimum .....	29
3.4.7 Pembuatan Media Fermentasi untuk Produksi Bioetanol	30
3.4.8 Distilasi Fraksionasi .....	31
3.4.9 Analisis Kuantitatif dengan Menggunakan Refraktometer	31
3.4.10 Analisis Kualitatif dengan Kromatografi Gas.....	31
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>32</b>
4.1 Analisis Lignoselulosa sebelum Perlakuan Pendahuluan .....	32
4.2 Analisis lignoselulosa setelah Perlakuan pendahuluan .....	33
4.3 Penentuan Kondisi Optimum Fermentasi .....	37
4.4 Penentuan Kadar Produksi Bioetanol Batang Rumput Gajah Mini ( <i>P. Purpureum</i> ) menggunakan Metode SHF pada Kondisi Optimum Fermentasi .....	41
4.5 Analisis Kualitatif menggunakan Kromatografi Gas .....	42
4.6 Efektifitas Metode SHF menggunakan Bakteri <i>C.</i> <i>acetobutylicum</i> dengan Bahan baku Tepung Selulosa Batang Rumput Gajah Mini ( <i>P. Purpureum</i> ) .....	44

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	48
5.1 Kesimpulan .....	48
5.2 Saran.....	48
DAFTAR PUSTAKA .....	49
LAMPIRAN .....	54

## DAFTAR TABEL

<b>Tabel</b>	<b>halaman</b>
1. Komposisi kandungan rumput gajah mini .....	7
2. Komposisi bahan untuk media peremajaan bakteri .....	27
3. Komposisi bahan untuk media inokulum.....	28
4. Komposisi bahan untuk media fermentasi .....	29
5. Efektifitas penggunaan substrat dan metode fermentasi simultan terhadap beberapa penelitian dengan metode yang berbeda.....	45

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Tanaman rumput gajah mini .....	10
2. Dinding sel tumbuhan .....	11
3. Struktur Selulosa .....	12
4. Skema reaksi pemecahan selulosa menjadi glukosa .....	16
5. Skema glikolisis tahap persiapan .....	17
6. Skema glikolisis tahap persiapan .....	18
7. Skema keseluruhan pembentukan Etanol.....	19
8. Kadar lignoselulosa pada batang rumput gajah mini ( <i>P. Purpureum</i> ) sebelum Perlakuan pendahuluan .....	32
9. Mekanisme reaksi pemutusan ikatan lignin dengan selulosa dan hemiselulosa (a) dan mekanisme reaksi terbentuknya garam fenolat (b) menggunakan pelarut basa (NaOH) .....	34
10. Reaksi pemutusan rantai karbon lignin pada proses <i>bleaching</i> menggunakan hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) .....	35
11. Kadar lignoselulosa pada batang rumput gajah mini ( <i>P. Purpureum</i> ) setelah perlakuan pendahuluan dengan metode Chesson-Datta.....	36
12. Grafik Pengaruh waktu optimum fermentasi terhadap kadar bioetanol pada pH 6,5 .....	38
13. Grafik pengaruh pH fermentasi terhadap kadar bioetanol pada waktu optimum fermentasi hari ke-10.....	40
14. Grafik hubungan persamaan regresi linear konsentrasi etanol standar dengan indeks bias. ....	42
15. Kromatogram etanol standar .....	43
16. Kromatogram hasil destilasi.....	44
17. Penguraian selulosa menjadi glukosa dengan enzim selulase dengan metode SSF .....	45
18. Jalur pembentukan Bioetanol menggunakan bakteri <i>C.acetobutylicum</i> vs <i>S. cerevisiae</i> .....	47

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Bagan kerja.....	58
1.1 Pembuatan larutan pereaksi.....	58
1.2 Preparasi sampel .....	59
1.3 Analisis selulosa dan lignin .....	60
1.4 Peremajaan bakteri <i>Clostridium acetobutylicum</i> .....	61
1.5 Pembuatan media Inokulum .....	61
1.6 Penentuan kondisi Optimum.....	62
1.7 Produksi bioetanol .....	63
2. Skema Pembuatan Ekstrak daging.....	60
3. Komposisi Media Inokulum.....	61
4. Komposisi Media Fermentasi .....	61
5. Perhitungan.....	62
5.1 Analisis kadar lignoselulosa sebelum delignifikasi.....	62
5.2 Analisis kadar lignoselulosa setelah delignifikasi .....	62
5.3 Perhitungan kadar etanol pada kondisi optimum.....	63
6. Data Pengukuran Produksi Bioetanol .....	66
6.1 Pengukuran indeks bias etanol standar menggunakan refraktometer	66
6.2 Grafik pengukuran indeks bias etanol standar .....	66
6.3 Pengukuran indeks bias dan kadar bioetanol sampel menggunakan persamaan regresi linear.....	67
6.4 Kromatogram etanol standar.....	68
6.7 Kromatogram hasil destilasi .....	68

7. Rangkaian alat.....	69
7.1 Rangkaian alat refluks.....	69
7.2 Rangkaian alat destilasi fraksionasi.....	70
8. Dokumentasi Penelitian .....	71
8.1 Bahan penelitian.....	71
8.2 Proses perlakuan pendahuluan .....	71
8.3 Peremajaan bakteri <i>Clostridium acetobutylicum</i> .....	73
8.4 Proses fermentasi .....	73
8.5 Instrumen analisis .....	74

## DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN

<b>ADP</b>	: Adenosin Difosfat
<b>ATP</b>	: Adenosin Trifosfat
<b>ABE</b>	: Aseton-Butanol-Etanol
<b>DHAP</b>	: Dihidroksi-asetofosfat
<b>GA</b>	: Gliseraldehid
<b>GC</b>	: Kromatografi gas
<b>G3P</b>	: Gliseraldehid 3-fosfat
<b>G6P</b>	: Glukosa 6-Fosfat
<b>NAD<sup>+</sup>,NADH</b>	: Nikotinamid adenin dinukleotida dan bentuk reduksinya
<b>PEP</b>	: Fosfoenol Piruvat
<b>SSF</b>	: <i>Simultaneous Saccharification Fermentation</i>
<b>SHF</b>	: <i>Separate Hydrolysis and Fermentation</i>
<b>X<sub>6</sub></b>	: Variasi waktu fermentasi 6 hari
<b>X<sub>8</sub></b>	: Variasi waktu fermentasi 8 hari
<b>X<sub>10</sub></b>	: Variasi waktu fermentasi 10 hari
<b>X<sub>12</sub></b>	: Variasi waktu fermentasi 10 hari

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang**

Perkembangan zaman yang begitu cepat mendorong pola konsumtif masyarakat yang semakin meningkat. Menurut Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT) pada tahun 2018, Indonesia merupakan negara dengan konsumsi energi terbesar di kawasan Asia Tenggara dan urutan kelima di Asia Pasifik dalam konsumsi energi primer setelah negara China, India, Jepang dan Korea Selatan.

Pertumbuhan Produk Domestik Bruto (PDB) dengan rata-rata 6,04% per tahun selama periode 2017 hingga 2050, diperkirakan akan semakin mendorong peningkatan kebutuhan energi Indonesia di masa depan. Hal ini menyebabkan peran Indonesia dalam pasar energi dunia dan dalam upaya penurunan emisi rumah kaca global bertambah signifikan (BPPT, 2018).

Sumber daya energi berbasis fosil (minyak, gas bumi dan mineral) adalah salah satu sumber daya energi yang tidak dapat diperbarukan. Keterbatasan fosil di bumi merupakan faktor yang menyebabkan meningkatnya harga produksi karena tingginya permintaan konsumtif masyarakat sehingga berdampak pada berkurangnya cadangan energi berbasis fosil dimana dalam neraca kebutuhan energi berbasis fosil menempati urutan pertama konsumsi oleh masyarakat dan diperkirakan Indonesia akan melakukan impor sumber daya ini pada tahun 2032. Adapun dampak negatif efek pemanasan global yang disebabkan emisi dari penggunaan energi ini merupakan permasalahan lingkungan yang perlu dipertimbangkan (BPS, 2018).

Ketersediaan sumber energi konvensional yang terbatas seperti penggunaan bahan bakar berbasis fosil telah menjadi sumber energi utama sepanjang hidup manusia. Melalui sumber energi tersebut industri di dunia ini berkembang dan menopang segala sisi kehidupan. Pola konsumtif yang semakin hari semakin meningkat serta limbah pencemaran lingkungan yang berbanding lurus dengan efek pemanasan global, hal ini tentu menjadi perhatian yang serius bagi masyarakat maupun pemerintah. Sehingga, hal ini pula yang mendorong akademisi atau peneliti untuk menemukan sumber alternatif energi baru yang ramah terhadap lingkungan (Mohanty dan Abdullahi, 2016).

Dewasa ini, perkembangan sumber energi alternatif terbarukan berbasis bahan bakar semakin banyak ditemukan seperti: bio-oil, biodiesel, biogas dan bioetanol. Penelitian yang sering dilakukan untuk memperoleh energi alternatif seperti bioetanol, dapat dilakukan melalui proses pengolahan karbohidrat pada limbah pertanian dimana dalam hal ini meliputi perlakuan awal yang sesuai terhadap selulosa yang selanjutnya dengan enzim selulase akan dihidrolisis secara enzimatik (Jonsson dan Martin, 2016).

Rumput gajah merupakan tanaman yang biasa dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai pakan ternak hewan ruminensia seperti sapi. Dalam penggunaan sebagai pakan ternak yang sangat dibutuhkan dari produksinya adalah bagian daun yang dapat dikonsumsi oleh ternak. Seiring perkembangannya, Indonesia mulai mengenal rumput gajah dengan varietas *dwarf-Late napiergrass* atau biasa disebut rumput gajah mini (*Penissetum purpureum*). Secara bentuk, rumput gajah ini lebih pendek dibandingkan dengan rumput gajah tropis lainnya. Tanaman ini memiliki karakteristik perbandingan rasio daun yang lebih tinggi

dibandingkan batang. kualitas nutrisi rumput ini lebih tinggi pada berbagai tingkat usia dibandingkan jenis rumput tropis lainnya (Lasamadi, 2013).

Pembudidayaan rumput gajah mini cukup mudah dilakukan dalam kondisi tropis seperti yang ada di Indonesia. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Sulistyawati dan Mariyono (2013), rumput gajah mini diklasifikasikan sebagai salah satu rumput unggul yang memiliki kandungan nutrisi yang tinggi dengan tingkat produksi rata-rata rumput gajah mini sekitar 50-150 ton/ha/tahun. Adapun Menurut beberapa penelitian juga menyatakan bahwa batang rumput gajah jenis *dwarf-late napier grass* ini memiliki kandungan berupa protein kasar 18,76%; ADF 38,94%; lignin 4,04%; serat kasar 26,33%; selulosa 29,3% dan hemiselulosa 16,1% (Akbar, 2016; Budiman dkk, 2012; Baihaqi dkk 2014; Khairani, 2013; Suraeni, 2016). Kandungan kimia yang dimiliki rumput gajah sangat dipengaruhi oleh perlakuan yang diberikan pada tanaman tersebut. Beberapa perlakuan yang mempengaruhi komposisi kimia dari berat kering tanaman tersebut ialah: kondisi iklim, pemberian pupuk, usia tanaman dan interval tanaman satu dengan yang lainnya pada saat penanaman (Suraeni, 2016).

Masyarakat pada umumnya kurang menyadari manfaat rumput gajah ini. Selain itu, kurangnya pemahaman tentang nutrisi dan potensi jenis *dwarf-late napier grass* yang memiliki nutrisi yang lebih tinggi sehingga pemanfaatan rumput gajah jenis ini hanya terbatas pada pakan ternak dimana dalam masyarakat masih tersisa sekitar 10% - 15% bagian tidak dikonsumsi atau tersisa oleh ternak ruminansia yang jika dilakukan pengolahan yang benar dapat menghasilkan sumber bahan baku penghasil energi alternatif yang ramah lingkungan (Sirait, 2017).

Pembuatan bioetanol adalah salah satu cara pemanfaatan bagian yang tersisa dari pakan ternak seperti batang rumput gajah mini. Pada penelitian ini proses

pembuatan bioetanol dilakukan dengan sistem fermentasi simultan dimana proses hidrolisis selulosa secara enzimatik menjadi glukosa kemudian glukosa tersebut yang akan diubah menjadi etanol melalui tahapan glikolisis dan pengubahan asam piruvat (Poedjadi, 1994). Adapun penelitian terkait pembuatan bioetanol dengan sistem fermentasi simultan dengan memanfaatkan bakteri yang sama dilakukan oleh Ruso (2014) menggunakan substrat batang rumput gajah (*Pennisetum purpureum* Schumach) menghasilkan kadar bioetanol 96,24% dengan volume destilat sebanyak 22,5 mL. Pembuatan bioetanol pada penelitian ini menggunakan bantuan bakteri *Clostridium acetobutylicum* yang dapat mengubah selulosa menjadi etanol secara simultan dimana tahapan hidrolisis dan fermentasi terjadi dalam satu tahap fermentasi sehingga dapat mengefisiensikan biaya yang diperlukan karena tidak terjadi penambahan enzim maupun asam ke dalam media fermentasi untuk proses hidrolisis (Ruso, 2014).

Berdasarkan latar belakang tersebut, selain untuk memberikan informasi mengenai pengaruh penambahan pupuk organik terhadap kandungan nutrisi rumput gajah mini, penelitian ini bermaksud untuk menentukan kadar bioetanol yang dapat dihasilkan dan efisiensi penggunaan rumput gajah mini (*Pennisetum purpureum*) sebagai substrat dengan sistem fermentasi simultan menggunakan bakteri *Clostridium acetobutylicum* sehingga dapat memiliki nilai jual lebih dimasyarakat.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. berapa kadar selulosa batang rumput gajah varietas *Dwarf-Late Napiergrass* (*Pennisetum purpureum*) setelah dilakukan delignifikasi?
2. bagaimana kondisi waktu dan pH optimum fermentasi bakteri *Clostridium acetobutylicum* dengan substrat batang rumput gajah varietas *Dwarf-Late Napiergrass* (*Pennisetum purpureum*) setelah dilakukan delignifikasi?

3. berapa kadar bioetanol yang dihasilkan pada produksi bioetanol batang rumput gajah varietas *Dwarf-Late Napiergrass (Pennisetum purpureum)* menggunakan kondisi waktu dan pH optimum?

### **1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian**

#### **1.3.1 Maksud Penelitian**

Maksud dari penelitian ini adalah untuk mengetahui kadar produksi bioetanol pada kondisi optimum fermentasi menggunakan bakteri *Clostridium acetobutylicum* dengan substrat batang rumput gajah varietas *Dwarf-Late Napiergrass (Pennisetum purpureum)*

#### **1.3.2 Tujuan Penelitian**

Tujuan dalam penelitian ini adalah:

1. mengetahui kadar selulosa batang rumput gajah varietas *Dwarf-Late Napiergrass (Pennisetum purpureum)* setelah dilakukan delignifikasi
2. mengetahui kondisi pH dan waktu optimum fermentasi bakteri *Clostridium acetobutylicum* dengan substrat batang rumput gajah varietas *Dwarf-Late Napiergrass (Pennisetum purpureum)* setelah dilakukan delignifikasi.
3. menentukan kadar produksi bioetanol pada batang rumput gajah varietas *Dwarf-Late Napiergrass (Pennisetum purpureum)* pada kondisi pH dan waktu optimum

### **1.4 Manfaat Penelitian**

Penelitian ini diharapkan memberikan manfaat sebagai berikut:

1. memberikan pengetahuan umum bagi masyarakat mengenai potensi limbah batang rumput gajah varietas *Dwarf-Late Napiergrass* menjadi bioetanol dengan menggunakan penerapan bioteknologi

2. memberikan informasi kadar selulosa dan lignin pada batang rumput gajah varietas *Dwarf-Late Napiergrass*
3. memberikan informasi kadar produksi bioetanol yang dapat dihasilkan substrat batang rumput gajah varietas *Dwarf-Late Napiergrass* menggunakan metode SSF

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Rumput Gajah Mini (*Pennisetum purpureum*)**

Rumput gajah secara umum merupakan tanaman yang kurang diketahui potensinya oleh masyarakat. Rumput gajah di Indonesia hanya dikenal sebagai pakan ternak ruminansia dan tidak jarang masyarakat menganggap tanaman ini sebagai tanaman pengganggu sehingga rumput gajah di Indonesia termasuk salah satu penyumbang limbah yang mencemari lingkungan di Indonesia. Selain itu, rumput gajah mini merupakan salah satu rumput unggul yang mudah dibudidayakan dengan tingkat produksi rata-rata rumput gajah mini sekitar 50-150 ton/ha/tahun (Sulistyawati dan Mariyono, 2013).

Dewasa ini, rumput gajah khususnya rumput gajah mini yang juga dikenal sebagai *Dwarf Napiergrass* atau *Dwarf Elephant Grass* memiliki kandungan nutrisi yang tinggi. Tanaman yang memiliki nama ilmiah *Pennisetum purpureum* ini berasal dari daerah tropis Afrika, lalu menyebar ke daerah tropika di dunia dan tumbuh alami di seluruh Asia Tenggara yang memiliki curah hujan lebih dari 1.000 mm dengan kondisi iklim musim panas tidak terlalu panjang (Sirait, 2017).

Rumput gajah mini mempunyai produksi yang cukup tinggi. Selain itu rumput gajah mini juga memiliki kandungan nutrisi yang tinggi dan disukai oleh ternak ruminansia. Akan tetapi, kandungan nutrisi dipengaruhi oleh umur tanaman dimana makin tua umur tanaman maka kualitas nutrisi semakin berkurang. Selain banyak faktor yang mempengaruhi kualitas nutrisi yang berkurang, salah satunya adalah menurunnya kandungan unsur hara tanah yang dibutuhkan dalam

pertumbuhan tanaman, sehingga diperlukan pemberian unsur hara tambahan berupa penambahan pupuk pada lahan tanaman ini (Akbar, 2016).

Adapun kandungan nutrisi yang terkandung dalam rumput gajah mini dapat dilihat pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Komposisi kandungan rumput gajah mini

Kandungan	Jenis Rumput	
	Gajah Mini	Gajah
ADF	38,94%	38,80%
NDF	65,24%	70,90%
Lignin	4,04%	10,7%
Serat Kasar	26,33%	34,94%
Protein Kasar	18,76%	9,79%
Abu	14,84%	14,6%
Produksi Bahan Kering	43,58 ton/ha/tahun	51,40 ton/ha/tahun
Produksi Bahan Organik	37,28 ton/ha/tahun	45,39 ton/ha/tahun

Sumber: (Akbar, 2016; Budiman dkk, 2012; Baihaqi dkk, 2015; Halim dkk, 2013; Sirait, 2017).

Rumput gajah jenis *Dwarf-Late Napiergrass (Pennisetum purpureum)* atau yang sering disebut rumput gajah mini adalah jenis rumput gajah yang diberi nama sesuai ukurannya yang kerdil/mini. Menurut Heuze dkk (2016), morfologi batang rumput gajah mini berbuku dengan jarak yang sangat pendek dibandingkan rumput gajah lainnya sehingga tekstur batang rumput gajah mini sedikit lunak dan efektif digunakan sebagai pakan ternak dengan nutrisi tinggi khususnya pada hewan rumenensia.

Rumput gajah yang dikenal masyarakat pada umumnya berjenis *King grass* yang memiliki tinggi 2-4 meter bahkan dapat mencapai 6-7 meter pada perlakuan

khusus (Sari, 2010). Lain halnya pada rumput gajah mini yang hanya memiliki tinggi rata-rata sekitar 1 meter. Namun, tinggi tanaman dari rumput gajah mini ini dapat pula bervariasi sesuai perlakuan yang berbeda. Menurut Lasamadi dkk (2013) dalam penelitiannya mengenai pertumbuhan dan perkembangan rumput gajah mini menjelaskan bahwa tinggi tanaman rumput gajah mini menunjukkan perbedaan yang signifikan berdasarkan pemberian pupuk organik dengan perlakuan yang berbeda. Dari hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa tinggi rumput gajah mini dapat tumbuh hingga 0,2 meter lebih tinggi dengan pemberian pupuk organik pada batas penggunaan optimal pupuk pada tanaman.

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Budiman dkk (2012) menjelaskan bahwa satu rumpun rumput gajah mini dapat mencapai 40-60 anakan apabila dipotong secara teratur dengan kadar nitrogen dari hasil panen yang diadakan secara teratur berkisar antara 2 – 4%. Dalam penelitian ini juga dijelaskan bahwa protein Kasar (PK) selalu diatas 7% dan menurun dengan naiknya umur tanaman. Pada daun muda nilai ketercernaan (TDN) diperkirakan mencapai 70% tetapi angka ini menurun cukup drastis pada usia tua mencapai 55%.

Rumput gajah jenis *dwarf* ini lebih unggul dalam hal nutrisi sebagai pakan ternak jika dibandingkan dengan rumput gajah biasa seperti yang disajikan pada Tabel 1. Protein kasar yang dimiliki oleh rumput gajah mini lebih tinggi dibandingkan dengan rumput gajah biasa serta serat kasar yang lebih rendah membuat rumput gajah mini menjadi salah satu pakan ternak yang mulai dibudidayakan oleh masyarakat maupun akademisi untuk diteliti lebih lanjut.

### 2.1.1 Klasifikasi Rumput Gajah Mini



**Gambar 1.** Tanaman rumput gajah mini (Sari, 2010)

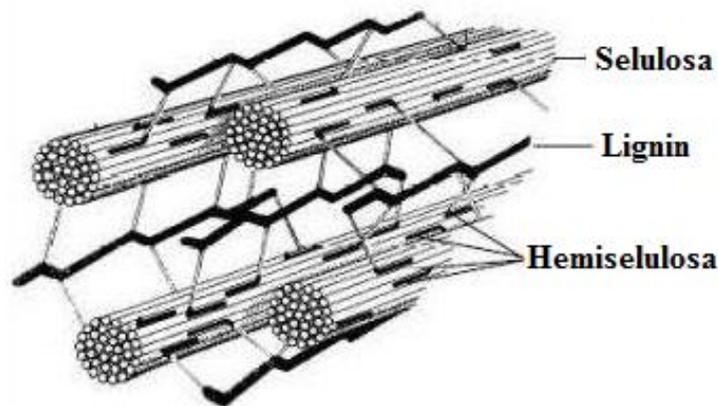
Adapun klasifikasi ilmiah rumput gajah mini sebagai berikut (Chemisquy dkk, 2010; USDA, 2012):

Kingdom : Plantae  
Sub-kingdom : Tracheobionta  
Super-divisi : Spermatophyta  
Divisi : Magnoliophyta  
Kelas : Liliopsida (monokotil)  
Sub-kelas : Commolinidae  
Ordo : Poales  
Famili : Poaceae (suku rumput-rumputan)  
Bangsa : Paniceae  
Genus : Pennisetum  
Spesies : *Pennisetum purpureum*

Selain spesies *Penisetum purpureum* telah diketahui pula berbagai macam kultivar lain dari genus penisetum, seperti (Rengsirikul dkk, 2013): *Bana* (BN), *Taiwan A148* (TW), *Common* (CM), *Wruk wona* (WW), Tifton (TT) dan Kampheng San (KS).

## 2.2 Lignoselulosa

Lignoselulosa merupakan biomassa yang berasal dari tanaman dengan komponen utama lignin, hemiselulosa dan selulosa. Ketersediaannya yang cukup melimpah, terutama sebagai limbah pertanian, perkebunan, dan kehutanan, Lignoselulosa mengandung tiga komponen penyusun utama yaitu lignin (10-25%), hemiselulosa (20-35%), dan selulosa (35-50%) (Lynd dkk, 2002). Komponen lignoselulosa pada tumbuhan membentuk kerangka utama dinding sel dengan selulosa lignin dan hemiselulosa yang saling berikatan (Holtzapple, 2003).

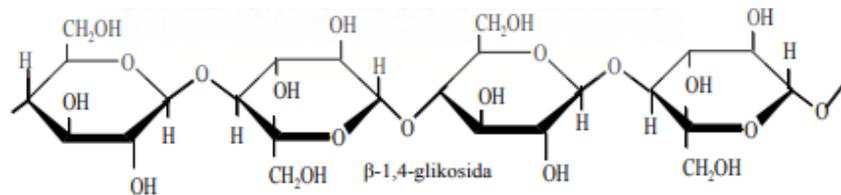


**Gambar 2.** Dinding sel tumbuhan (Holtzapple, 2003)

Menurut Budianto dkk (2018) Hemiselulosa dapat terurai pada suhu 200-260°C, selulosa pada suhu 240-350°C dan lignin terurai pada rentang temperatur yang lebih luas yaitu 280-500°C sehingga pemanasan secara bertahap pada suhu tinggi dapat menguraikan secara termal komponen dari lignoselulosa.

### 2.2.1 Selulosa

Selulosa merupakan senyawa kimia yang berikatan dengan hemiselulosa dan lignin dalam struktur dinding sel tanaman. Senyawa kimia yang banyak terdapat dalam tanaman ini mempunyai rumus kimia ( $C_6H_{10}O_5$ ) dengan berat molekul 162, dan dapat terurai pada suhu 240-350°C (Budianto dkk, 2018; Octaviani, 2017). Struktur selulosa mengandung 3 group alkohol hidroksil dengan struktur selulosa sebagai berikut:



**Gambar 3.** Struktur Selulosa (Poedjadi, 1994).

Selulosa terdiri dari dua bentuk yaitu amorf dan kristal. Bagian amorf jika dihidrolisis akan larut sedangkan bagian kristal tetap utuh dan sebagian lagi larut dalam larutan asam encer. Keadaan inilah yang menyebabkan enzim – enzim ternak monogastrik tidak mampu mencernanya kecuali terdapat mikroorganisme didalam ternak ruminansia yang menghasilkan enzim selulase.

Lynd dkk (2002), menyatakan bahwa selulosa mengandung sekitar 50-90% bagian berkristal dan sisanya bagian amorf. Ikatan  $\beta$ -1,4 glukosida pada serat selulosa dapat dipecah menjadi monomer glukosa dengan cara hidrolisis asam atau enzimatik. Adapun pencernaan selulosa dalam sel merupakan proses yang kompleks yang meliputi penempelan sel mikroba pada selulosa, hidrolisis selulosa dan fermentasi yang menghasilkan asam lemak.

Struktur berkristal dari selulosa serta adanya lignin dan hemiselulosa disekeliling selulosa merupakan hambatan utama dalam menghidrolisis selulosa.

Kristalisasi selulosa dan pengerasan fibril selulosa oleh lignin membentuk suatu senyawa lignoselulosa yang keras sehingga selulosa dan hemiselulosa pada lignoselulosa tidak dapat dihidrolisis oleh enzim selulase dan hemiselulase kecuali lignin yang ada pada substrat dilarutkan, dihilangkan atau dikembangkan terlebih dahulu (Octaviani, 2017).

Selulosa memiliki potensi untuk digunakan sebagai bahan baku dalam pembuatan etanol dengan menggunakan mikroorganisme penghasil enzim yang dapat menghidrolisis selulosa. Selain itu, selulosa yang mudah diperoleh untuk dibuat menjadi bioetanol memiliki peluang untuk menghasilkan energi bahan bakar masa depan dengan memanfaatkan limbah yang ada di lingkungan (Walker, 2010).

Selulosa terdapat hampir di semua material berkayu. Kandungan selulosa dalam bahan berkayu ini dapat mencapai 30-45% bahkan dapat mencapai 70-90% pada kapas. Kandungan selulosa tersebut bervariasi tergantung dari jenis dan bagian tanaman tersebut (Fajariah, 2012).

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Suhardiman (2015) tentang pengaruh penambahan pupuk mikroza terhadap kandungan selulosa rumput gajah mini dapat disimpulkan bahwa dalam rumput gajah mini memiliki rata-rata kandungan selulosa sebesar 34,74% dengan perbedaan yang tidak berpengaruh nyata pada perlakuan penambahan dosis pupuk yang berbeda. Pada rumput gajah jenis *Pennisetum purpureum Schumach* dilaporkan memiliki nilai konversi selulosa batang rumput gajah adalah satu kilogram selulosa menghasilkan 33,30 gram bioetanol dengan kadar 96,24%. (Ruso, 2014).

### **2.2.2 Lignin**

Lignin adalah suatu polimer senyawa aromatik yang sebagian besar tidak larut dalam kebanyakan pelarut organik. Lignin tidak dapat diuraikan menjadi

satuan monomer, karena bila dihidrolisis, monomer sangat cepat teroksidasi dan segera terjadi reaksi kondensasi. Pada suhu tinggi, lignin dapat mengalami perubahan struktur dengan membentuk asam format, metanol, asam asetat, aseton, vanilin dan lainnya (Budiyanto, 2018).

Hidayati dkk (2018) berpendapat bahwa isolasi lignin dengan menggunakan pelarut basa menghasilkan lignin isolat yang cenderung meningkat dengan perlakuan terbaik pada konsentrasi NaOH 30% mendapatkan pH 5,42%, rendemen lignin 5,67%, padatan total lindi hitam 65,11%, kadar metoksil 14,61%, dan bobot ekuivalen lignin 1787,23. Hal ini sesuai dengan pernyataan Budianto (2018) bahwa sangat sedikit lignin yang larut dalam pelarut asam maupun air sehingga analisis kuantitatif kadar lignin dengan asam sulfat 72% merupakan analisis yang sering dilakukan untuk menentukan kadar lignin dalam suatu tanaman.

Lignin secara fisik membungkus mikrofibril dalam suatu matriks hidrofobik dan terikat secara kovalen dengan hemiselulosa, hubungan lignin karbohidrat berperan dalam mencegah hidrolisis selulosa. Lignin yang melindungi selulosa memiliki sifat yang tahan terhadap hidrolisa disebabkan oleh adanya ikatan alkil dan ikatan eter (Budianto, 2018)

Pemecahan ikatan selulosa dan lignin dapat dilakukan dengan teknik delignifikasi. Delignifikasi adalah proses yang bertujuan untuk melarutkan kandungan lignin sehingga mempermudah pemisahan lignin dengan serat (Ruso, 2014). Lebih lanjut Fajariah (2012) menyatakan bahwa Dalam proses degradasi, penggunaan lignoselulosa harus melalui tahapan delignifikasi. Delignifikasi adalah proses pelepasan selulosa dan hemiselulosa dari ikatan kompleks lignin agar dapat diakses lebih lanjut oleh enzim selulase yang dihasilkan oleh mikroorganisme.

### **2.3 Bakteri *Clostridium acetobutylicum***

Bakteri *Clostridium acetobutylicum* merupakan jenis bakteri gram positif yang memiliki kemampuan untuk mendegradasi selulosa. Selain itu, *Clostridium acetobutylicum* bersifat mesofilik dengan suhu optimal 10-65°C dan dapat memecah gula sehingga memiliki potensi untuk menghasilkan sejumlah produk yang berguna secara komersial, seperti aseton, etanol dan butanol (Fajariah, 2012).

Bakteri *Clostridium acetobutylicum* memiliki sifat morfologis spesifik yaitu membentuk endospora. Spora yang dibentuk dari spesies yang berbeda bahan dari strain yang berbeda mempunyai sifat ketahanan terhadap panas dan reagensia. Pembentukan spora terjadi pada saat makanan sel hampir habis atau selnya telah tua. Terbentuknya spora dapat ditunjukkan dengan penambahan bahan kimia tertentu sehingga dapat terlihat pertambahan jumlah DNA sel selama sporulasi. Pembentukan spora terjadi pada interval pH tertentu (Sari, 2010).

Whittman dkk (2009) berpendapat bahwa organisme ini memerlukan kondisi anaerob untuk tumbuh dalam keadaan vegetatifnya karena sifatnya yang tidak tahan terhadap oksigen, bakteri ini hanya dapat bertahan hingga beberapa jam dalam kondisi aerobik. Selain itu, bakteri *C. acetobutylicum* dapat bertahan pada pH rendah, antara 4,5-5 dengan suhu optimum 37°C.

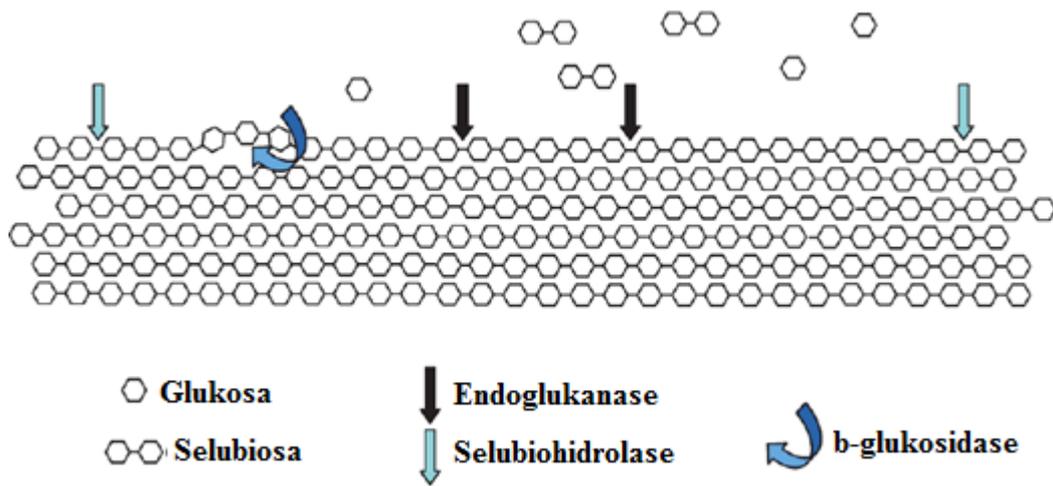
### **2.4 *Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF)***

Fermentasi dapat diartikan sebagai proses penguraian substrat organik dengan menggunakan enzim sebagai katalis biokimia yang dihasilkan oleh jenis mikroba tertentu. Dalam proses produksi bioetanol dari biomassa memiliki dua tahapan yang telah dikenal secara umum, yaitu hidrolisis dan fermentasi. Penelitian terdahulu oleh Yulianto dkk (2009) tentang pengembangan hidrolisis enzimatis

pada biomassa padi menggambarkan proses hidrolisis secara enzimatis yang dilakukan terpisah dari proses fermentasi fungi *Trichordema reseei*.

*Simultaneous Saccharification and Fermentation* (SSF) adalah metode fermentasi dengan menggunakan bantuan mikroba dalam hal ini ialah bakteri *Clostridium acetobutylicum* yang memiliki potensi untuk menghasilkan enzim yang dapat mengubah selulosa menjadi bioetanol secara simultan. Prinsip fermentasi berupa pengaktifan pertumbuhan dan metabolisme dari mikroba pembentuk alkohol dan asam, serta menekan pertumbuhan mikroba proteolitik dan lipolitik yang dapat mengganggu proses fermentasi. Pada fermentasi glukosa oleh bakteri *Clostridium acetobutylicum*, glukosa diubah menjadi larutan aseton-butanol-etanol (ABE), sisa glukosa, gas CO<sub>2</sub>, dan H<sub>2</sub>O (Fajariah, 2012).

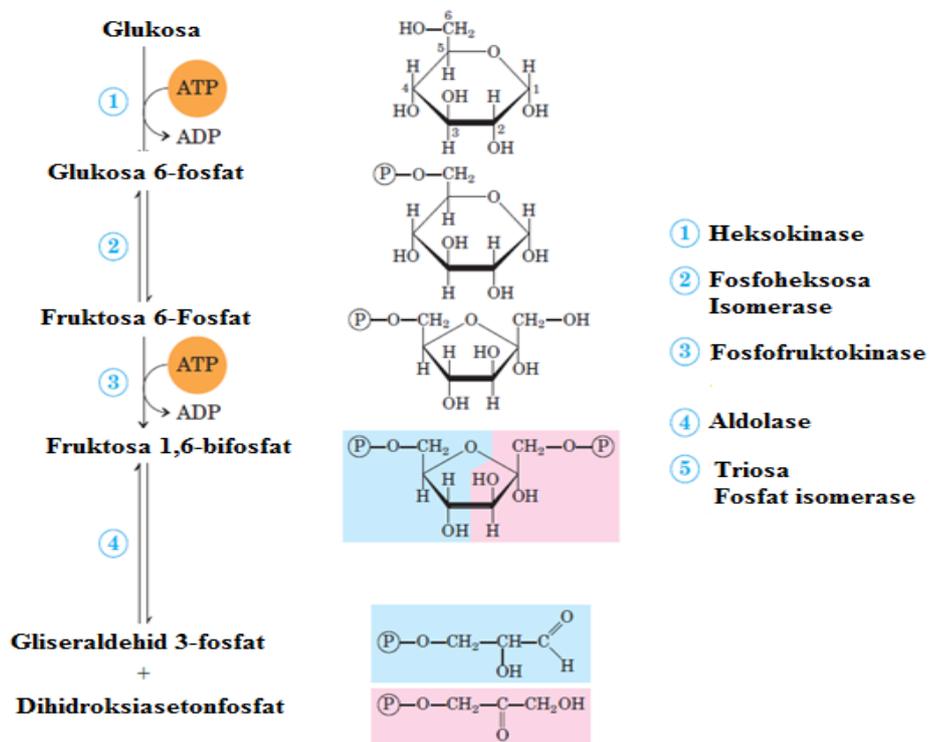
Tahapan yang berlangsung secara simultan tersebut meliputi pemecahan selulosa menjadi glukosa menggunakan enzim selulase yang dihasilkan oleh bakteri. Enzim selulase terdiri dari enzim  $\beta$ -1,4-endoglukanase, enzim  $\beta$ -1,4-eksoglukanase dan enzim  $\beta$ -1,4-endoglukosidase (Sankarraaj dan Gobi, 2017).



**Gambar 4.** Skema reaksi pemecahan selulosa menjadi glukosa (Aro dkk, 2005).

Tahap pemutusan ikatan pertama dimulai dengan pemutusan ikatan oleh enzim  $\beta$ -1,4-endoglukanase. Enzim tersebut akan menghidrolisis pemutusan rantai panjang selulosa pada bagian dalam struktur selulosa yang berbentuk amorf menjadi rantai yang lebih sederhana menghasilkan selobiosa. Tahapan selanjutnya terjadi hidrolisis selubiosa pada posisi  $\beta$ -1,4 dengan bantuan enzim gulosidase menghasilkan monosakarida berupa glukosa (Aro dkk, 2005)

Setelah menjadi glukosa, proses fermentasi secara bersamaan akan dilanjutkan pada proses glikolisis. Adapun proses glikolisis terdiri dari 2 tahap yaitu tahap persiapan dan tahap hasil (Nelson dan Cox, 2013).



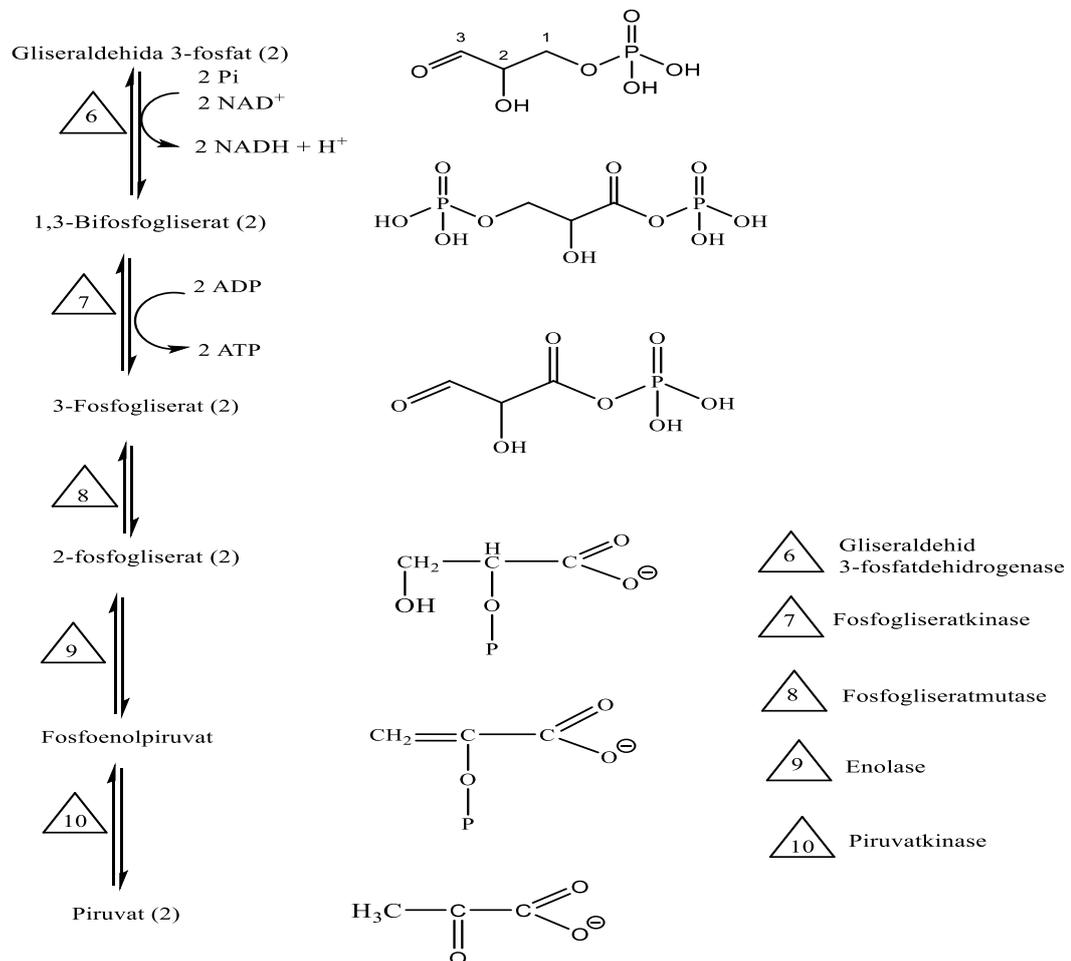
**Gambar 5.** Skema Glikolisis tahap persiapan (Nelson dan Cox, 2013).

Tahapan pada fase persiapan tersebut meliputi (Nelson dan Cox, 2013):

1. Pembentukan senyawa glukosa 6 fosfat dari glukosa. Reaksi membutuhkan energi pemutusan ikatan fosfat dari ATP. Reaksi ini dikatalisis oleh enzim heksokinase atau glukokinase. Pada tahap ini, menggunakan satu mol ATP dan menghasilkan satu mol ADP.

2. Pembentukan isomer fruktosa 6 fosfat dari glukosa 6 fosfat. Reaksi ini dikatalisis oleh enzim fosfoheksosa isomerase.
3. Fruktosa 6 fosfat selanjutnya dikonversi menjadi fruktosa 1,6 difosfat oleh enzim fruktosa fosfokinase. Reaksi ini berjalan spontan dan merupakan *rate limiting step* pada proses glikolisis. Tahap ini molekul ATP digunakan dan satu molekul ADP dihasilkan.
4. Tahap selanjutnya adalah reaksi pemecahan fruktosa 1,6 difosfat oleh enzim aldolase menjadi dihidroksiasetonfosfat (DHAP) dan gliseraldehid 3 fosfat oleh enzim triosefosfat isomerase.

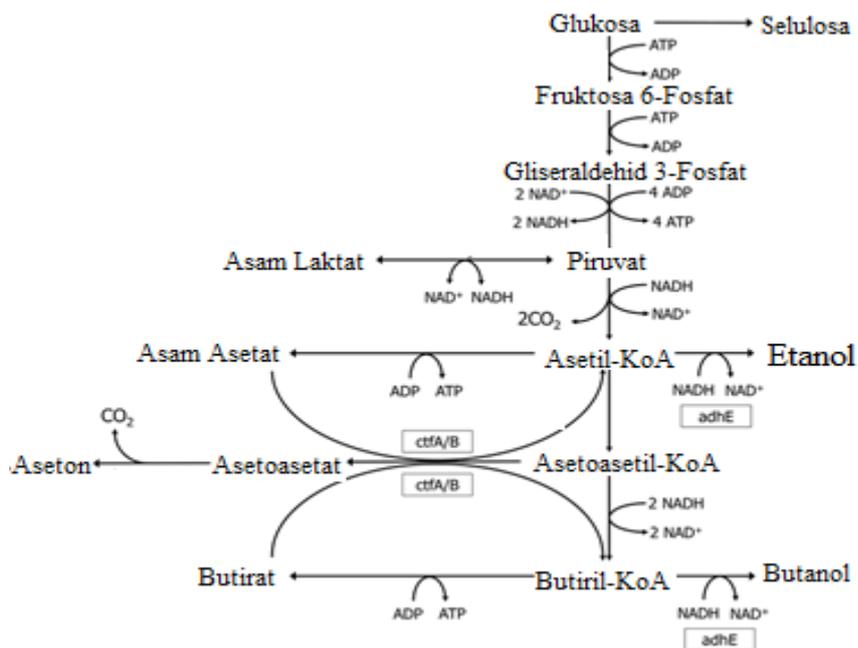
Tahap selanjutnya ialah tahap hasil dimana tahapan ini terjadi proses pengubahan gliseraldehid 3-fosfat menjadi asam piruvat (Nelson dan Cox, 2013).



**Gambar 6.** Skema Glikolisis tahap persiapan (Nelson dan Cox, 2013).

Tahapan pada fase hasil tersebut meliputi (Nelson dan Cox, 2013):

5. Gliseraldehid 3 fosfat (GA 3P) dioksidasi dengan penambahan fosfat inorganis (Pi) menjadi 1,3 difosfoglisarat (1,3 dP GA) oleh enzim gliseraldehid 3 fosfat dehidrogenase.
6. 1,3 difosfoglisarat melepaskan satu grup fosfat untuk membentuk ATP dan ADP kemudian dikonversi menjadi 3 fosfoglisarat (3P GA) oleh enzim phosphoglisarate kinase kemudian dikonversi menjadi 2 fosfoglisarat (2P GA) oleh enzim fosfoglisarat mutase.
7. 2 fosfoglisarat (2P GA) selanjutnya didehidrasi menjadi fosfoenol piruvat oleh enzim enolase.
8. Tahap terakhir dari jalur glikolisis oleh defosforelasi fosfoenol piruvat menjadi piruvat oleh enzim piruvat kinase; pada tahap ini dibentuk sebuah molekul ATP. Setelah penambahan DHAP dan GA 3P selama proses glikolisis berlangsung sebanyak dua kali. Piruvat yang merupakan produk akhir dari tahap glikolisis.



**Gambar 7.** Skema keseluruhan pembentukan etanol (Buehler dan Mezbah, 2016)

Tahapan terakhir dari sistem fermentasi simultan untuk menghasilkan etanol menggunakan bakteri *Clostridium acetobutylicum* ialah melalui jalur pengubahan piruvat yang bereaksi dengan  $\text{NAD}^+$  dan Ko-A membentuk asetil koenzim-A. Dari proses ini, akan dilepaskan  $\text{CO}_2$  dan NADH. Setelah diperoleh asetil koenzim-A, selanjutnya diubah menjadi etanol dengan bantuan enzim alkohol dehidrogenase (Buehler dan Mezbah, 2016). Adapun keseluruhan skema pembentukan etanol terlihat pada Gambar 7.

Sistem fermentasi simultan seperti pada penelitian yang dilakukan oleh Ruso (2014), mengkombinasikan tahapan hidrolisis dan fermentasi yang dilakukan dalam suatu reaktor. Dalam hal ini, polisakarida yang berasal dari rumput gajah terkonversi menjadi monosakarida tidak kembali menjadi polisakarida karena monosakarida langsung difermentasikan menjadi bioetanol.

Proses fermentasi memiliki beberapa faktor yang perlu diperhatikan agar mikroorganisme dapat menghasilkan enzim dalam keadaan optimum. Adapun faktor-faktor yang mempengaruhi proses fermentasi adalah (Walker, 2010):

1. Jumlah Mikroba

Mikroorganisme yang diinokulasikan ke dalam medium fermentasi merupakan salah satu hal yang penting dimana banyaknya mikroba (inokulum/starter) yang ditambahkan berkisar antar 3-10% dari volume medium fermentasi.

2. Kadar air

Dalam fermentasi, kadar air perlu diperhatikan karena mikroorganisme membutuhkan air selain sumber energi, karbon, nitrogen unsur mineral, dan vitamin. Peranan air dalam hal ini juga digunakan untuk melarutkan substrat.

3. pH

Dalam hal ini pH perlu dikondisikan karena enzim-enzim tertentu hanya akan mengurai substrat sesuai dengan aktivitasnya pada pH tertentu yang disebut sebagai

pH optimum. Oleh karena itu, pengaturan pH sangat penting dalam proses fermentasi.

#### 4. Suhu

Suhu fermentasi sangat menentukan jenis mikroba yang dominan tumbuh selama proses fermentasi. Bakteri *Clostridium acetobutylicum* termasuk ke dalam jenis bakteri mesofilik yang memiliki kemampuan untuk bertahan hidup pada suhu optimum sekitar 37 °C (Whitmann dkk, 2009)

#### 5. Substrat (Media)

Substrat dalam hal ini dikenal juga sebagai medium fermentasi, berperan menyediakan nutrisi pertumbuhan yang diperlukan oleh mikroba untuk memperoleh energi dan biosintesa produk-produk metabolisme. Dalam hal ini, bahan-bahan seperti Pati, laktosa, glukosa, sukrosa dan sereal memiliki peran sebagai sumber karbon bagi mikroba, sedangkan asam amino, tepung kedelai, protein, nitrat dan garam ammonium berperan sebagai sumber nitrogen.

### 2.5 Etanol

Etanol adalah cairan kimia dengan rumus  $C_2H_5OH$ , tidak berwarna, larut dalam eter, air, aseton, benzen, dan semua pelarut organik, memiliki bau khas alkohol, bioetanol memiliki berat jenis sebesar 0,7937 g/ dan titik didih sebesar 78,32°C. Di negara Brazil, etanol diproduksi massal dengan fermentasi untuk digunakan sebagai bahan bakar otomotif yang dikenal dengan gasohol. Gasohol dibuat dengan menambahkan 90% gasolin dan 10% etanol (Petrucci dkk, 2011).

Mohanty dan Abdullahi (2013) mendefinisikan bioetanol adalah alkohol yang diproduksi dari tumbuh - tumbuhan dengan menggunakan bantuan

mikroorganisme melalui proses fermentasi. Penggunaan Bioetanol ini dinilai sebagai upaya untuk mengurangi penggunaan bahan bakar minyak di Indonesia. Lebih lanjut Wusnah dkk (2016) menerangkan bahwa tidak ada perbedaan antara etanol biasa dengan bioetanol yang membedakannya hanyalah bahan baku pembuatan dan proses pembuatannya.

Penelitian-penelitian yang berbasis bioteknologi dengan memanfaatkan bantuan mikroorganisme pada proses fermentasi dimulai dengan tahap hidrolisis selulosa yang terdiri dari adsorpsi pada permukaan selulosa, biodegradasi selulosa untuk fermentasi gula dan disorpsi ke dalam permukaan selulase. Degradasi selulosa menjadi glukosa biasanya terjadi karena adanya aksi sinergi dari tiga jenis enzim, yaitu endoglukonase dan ekso-glukanase yang tergabung menjadi enzim selulase, dan  $\beta$ -glukosidase (Wyman, 1999).

Produk lain juga dapat diperoleh pada fermentasi bakteri menggunakan *Clostridium acetobutylicum*. Salah satu produk tersebut ialah biobutanol. Fermentasi ini memungkinkan juga untuk memproduksi biobutanol yang memiliki perbedaan pada proses pemurniannya. Pada produksi bioetanol menggunakan teknik destilasi bertingkat dengan prinsip yaitu uap hasil penguapan pada labu distilat yang mengandung etanol diserap oleh suatu solvent sehingga didapatkan etanol yang berwujud cair. Sedangkan pada pembuatan butanol, dapat dilakukan dengan destilasi sederhana, yaitu dengan memanaskan solvent hingga titik didih  $101^{\circ}\text{C}$  sehingga senyawa-senyawa lain menguap dan didapatkan senyawa butanol dengan kadar tertentu (Steen, 2008).

Penelitian sebelumnya mengenai produksi bioetanol dari rumput gajah dapat diperoleh dengan proses hidrolisis selulosa menjadi glukosa dan selanjutnya menjadi bioetanol berlangsung secara serempak dengan menggunakan bakteri *Clostridium acetobutylicum*. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Ruso (2014) tentang produksi bioetanol pada batang rumput gajah (*Pennisetum purpureum Schumach*) dengan sistem fermentasi simultan menggunakan bakteri *Clostridium acetobutylicum* diperoleh kondisi optimum fermentasi pada pH 6,5 dengan waktu fermentasi selama 10 hari.

## **2.6 Indeks Bias**

Indeks bias dapat diartikan sebagai nilai perbandingan kecepatan cahaya dalam ruang hampa udara dengan cahaya yang merambat dalam medium transparan. Prinsip pengukuran ini ialah jika seberkas cahaya datang dan membentuk sudut terhadap permukaan, maka berkas cahaya tersebut ada yang dibelokkan sewaktu memasuki medium baru tersebut, di mana pembelokan itu disebut dengan pembiasan. Alat yang umum digunakan untuk melakukan pengukuran ini adalah refraktometer (Atkins, 2006).

Pengukuran terhadap indeks bias secara luas telah digunakan antara lain untuk mengetahui konsentrasi larutan dan mengetahui komposisi bahan-bahan penyusun larutan. Sari (2012) mendefinisikan indeks bias sebagai sifat optik yang banyak digunakan untuk mencirikan keadaan suatu material transparan. Indeks bias yang dihasilkan suatu material pada panjang gelombang tertentu akan mengalami perubahan bila komposisi material tersebut mengalami perubahan.

Indeks bias menggunakan refraktometer dilaporkan dalam beberapa penelitian dapat digunakan untuk mengetahui kondisi optimum fermentasi yang menghasilkan kadar bioetanol tertinggi. Salah satu penelitian yang dilaporkan menggunakan nilai indeks bias untuk penentuan kondisi optimum ialah fermentasi menggunakan bakteri *Clostridium acetobutylicum* yang mengubah selulosa dari rumput gajah menjadi etanol. Dalam penentuan kondisi optimum digunakan sesuai prinsip dimana besarnya nilai indeks bias berbanding lurus dengan konsentrasi bioetanol sehingga nilai indeks bias tertinggi menunjukkan kondisi optimum fermentasi (Ruso, 2014).

Pengukuran indeks bias selain menggunakan refraktometer juga telah diketahui beberapa metode untuk mengukur indeks bias suatu bahan. Beberapa diantaranya adalah metode interferometri (interferometri Mach-Zender, interferometri Fabry-Perot dan interferometri Michelson) dan sudut Brewster. Metode tersebut memiliki kelemahan yakni pengoperasian alatnya rumit dan membutuhkan waktu yang lama. Karena alasan ini metode pengukuran *refractive index* dengan menggunakan ABBE refractometer banyak dipakai karena kemudahan pengoperasiannya (Sari, 2012).