

*Skripsi*

**PEMANFAATAN LIMBAH BATANG PISANG KEPOK  
(*Musa paradisiaca formatypica*) SEBAGAI BAHAN DASAR  
PEMBUATAN BIOETANOL DENGAN METODE SAKARIFIKASI  
DAN FERMENTASI SIMULTAN (SFS)**

**ILHAM HAIDIR**

**H311 12 016**



**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2017**



**PEMANFAATAN LIMBAH BATANG PISANG KEPOK *Musa paradisiaca formatypica* SEBAGAI BAHAN DASAR PEMBUATAN BIOETANOL DENGAN METODE SAKRAIFIKASI DAN FERMENTASI SIMULTAN (SFS)**

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

Oleh :  
**ILHAM HAIDIR**  
H 311 12 016



**MAKASSAR**

**2017**

**SKRIPSI**

**PEMANFAATAN LIMBAH BATANG PISANG KEPOK *Musa paradisiaca formatopyca* SEBAGAI BAHAN DASAR PEMBUATAN BIOETANOL DENGAN METODE SAKARIFIKASI DAN FERMENTASI SIMULTAN (SFS)**

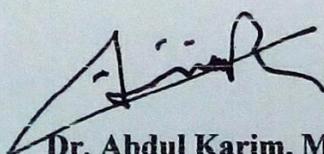
Disusun dan diajukan oleh

**ILHAM HAIDIR**

**H311 12 016**

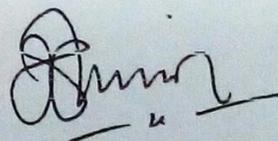
**Skripsi ini telah diperiksa dan disetujui oleh :**

**Pembimbing Utama**



**Dr. Abdul Karim, M.Si**  
**NIP. 19620710 1988 03 1 002**

**Pembimbing Pertama**



**Dr. Hasnah Natsir, M.Si**  
**NIP. 19620320 198711 2 001**

## PRAKATA



Puji syukur kehadiran Allah Subhanahu Wata'ala karena berkat Rahmat, Taufik, dan Hidayah-Nya jualah sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “**Pemanfaatan Limbah Batang Pisang Kepok (*Musa paradisiaca formatipya*) Sebagai Bahan Dasar Pembuatan Bioetanol Dengan Metode Sakaifikasi dan Fermentasi Simultan (SFS)**”. Bukan hal mudah untuk sampai pada titik ini, akan tetapi penulis tetap mensyukuri apa yang telah dianugerahkan kepada kita sebagai hamba-Nya. Setiap usaha yang dibarengi dengan doa akan menghasilkan sebuah karya yang berguna.

Dalam rangkaian pelaksanaan skripsi ini, penulis banyak menghadapi rintangan dan hambatan. Namun berkat dorongan, bantuan, petunjuk, dan arahan dari berbagai pihak maka skripsi ini dapat penulis selesaikan pada waktu yang telah ditentukan.

Pada kesempatan ini penulis secara khusus menyampaikan rasa terima kasih yang mendalam kepada kedua orang tua, ayahanda Haedar dan Farida, atas segala doa yang tulus, kasih sayang, pengorbanan, dan kesabarannya hingga penulis bisa menyelesaikan skripsi ini. Tidak lupa pula, penulis tulus ikhlas dengan segala kerendahan hati dan rasa hormat menghaturkan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada:

1. Bapak **Dr. Abdul Karim, M.Si** selaku pembimbing utama, Ibu **Dr. Hasnah Natsir, M.Si** selaku pembimbing pertama, dan penasehat akademik bapak

**Prof. Dr. Wahid Wahab, M.Sc** yang telah mengarahkan penulis sejak awal semester hingga terselesaikannya penulisan skripsi.

2. Bapak **Prof. Dr. Wahid Wahab, M.Sc** (ketua), bapak **Drs. Frederick Mandey, M.Sc** (sekretaris), bapak **Dr. H. Yusafir Hala, M.Si** (anggota), dan ibu **Dr. St. Fauziah, M.Si** (anggota) sebagai tim penguji yang telah meluangkan waktunya untuk memberi saran dan masukan yang berharga.
3. Analis laboratorium kak Anti, kak Fibi, pak Sugeng, ibu Tini, pak Iqbal, terkhusus untuk kak anti dan kak Linda terima kasih atas bantuan dan kritikan serta sarannya, yang sangat membangun untuk pribadi penulis sendiri.
4. Rekan penelitian penulis, **Sulfiani** yang bersama-sama berjuang dan membantu menyelesaikan tugas akhir di Laboratorium Biokimia.
5. Seluruh kawan-kawanku **kimia angkatan 2012** , terkhusus **Mesomeri 2012** (Fadhiah ,Pram , Widya, Niang, Egi, Rahmad, Edar, Manti, Asta, Mirna, Wiwi, Fani, Usman, Patta, Fian, Audri, Ime, Yunita, Renhard).
6. Teman-teman penelitian di laboratorium biokimia, Khalil, Eki, Yuli, hanung, Darma, Salma, Maret, kak Nice, Suharlina, Desri, Uni, Amirah, Kak Hendra, Kak Ria, Kak Ammang dan adik-adik peneliti biokimia angkatan 2013 (Akbar, Odi, Emmi, Sri, Eka dan Asrul).
7. Saudara-saudaraku di liqo', **Ishak, Kak Ucup, Kak Andri, Kak Ahmad** dan terkhusus untuk murobbi kami kanda **Rustam Taufik** yang telah memberikan nasehat-nasehat yang sangat bermanfaat.
8. Seluruh kawan-kawan **Mipa 2012, LDM Al-Aqsoh, Sc-Locus dan Lentera Negeri.**

9. Teman-teman **KKN Reguler Unhas Gel. 93 posko Tungka, Enrekang** Mukhlis Hamid, Nurlindah Malik , Nursafitra dan Citra Pratiwi. Terima kasih yang sebesar-besarnya atas kerja sama dan dukungan kalian.
10. Serta seluruh kanda-kanda dan adinda-adinda **Kimia FMIPA UNHAS** yang telah mendorong penulis untuk tetap semangat dalam menyelesaikan tugas akhir.

Penulis sadar akan segala kekurangan dalam penulisan skripsi ini, maka penulis sangat menghargai bila ada kritik dan saran demi penyempurnaan isi skripsi ini. Penulis hanya dapat berdoa agar termasuk ke dalam orang-orang yang diridhoi-Nya dan apa yang dikerjakan semoga bernilai ibadah disisi-Nya serta agar tulisan ini dapat bermanfaat bagi penulis dan orang-orang yang membacanya. Amin.

Makassar, Juni 2017

Penulis

## ABSTRAK

Tujuan dari penelitian ini adalah menentukan kadar selulosa yang terdapat pada limbah batang pisang kepok (*Musa paradisiaca formatypica*) serta menentukan kondisi optimum dan kadar bioetanol yang dihasilkan. Pada penelitian ini digunakan selulosa dari limbah batang pisang kepok difermentasi dengan metode sakarifikasi dan fermentasi secara simultan (SFS). proses hidrolisis selulosa menjadi glukosa dan selanjutnya menjadi bioetanol berlangsung secara serempak dengan menggunakan bakteri *Clostridium acetobutylicum*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar selulosa limbah batang pisang kepok sebesar 46,38 % dan kondisi optimum fermentasi pada hari ke-10 dengan pH 6,0 menghasilkan kadar bioetanol sebesar 13,5 %.

Kata kunci : bioetanol, pisang kepok, selulosa, *Clostridium acetobutylicum*, SFS

## ABSTRACT

The purpose of this research is to determine the cellulose level found in stem waste of banana kepok (*Musa paradisiaca formatypica*) and the optimum condition as well as level of bioethanol content that being produced. In this study used Cellulose from stem wastes of banana kepok fermented by simultaneous saccharification and fermentation method (SFS). The process of hydrolysis cellulose into glucose and subsequently become bioethanol held simultaneously by using the bacterium *Clostridium acetobutylicum*. The results showed that the content of banana stem cellulose wastes of 46.38% and the optimum condition of fermentation on the 10th day with pH 6.0 resulted in bioethanol content of 13.5%.

Keywords: Bioethanol, banana kapok, cellulose, *Clostridium acetobutylicum*, SFS

## DAFTAR ISI

	Halaman
PRAKATA .....	iii
ABSTRAK .....	vi
ABSTRACT .....	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR .....	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN .....	xiv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	4
1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian .....	5
1.4 Manfaat Penelitian .....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....	6
2.1 Batang Pisang.....	6
2.2 <i>Pretreatment</i> .....	8
2.3 Selulosa.....	10
2.4 Selulase .....	11
2.5 Bakteri Selulolitik <i>Clostridium acetobutylicum</i> .....	14
2.6 Fermentasi.....	17
2.7 Bioetanol.....	22

BAB III METODOLOGI PENELITIAN .....	24
3.1 Alat Penelitian.....	24
3.2 Bahan Penelitian .....	24
3.3 Waktu dan Tempat Penelitian.....	24
3.4 Prosedur Penelitian .....	25
3.4.1 Persiapan Bahan Baku .....	25
3.4.2 Analisis Lignin dan Selulosa .....	25
3.4.3 Perlakuan Pendahuluan .....	26
3.4.4 Penyiapan Media Untuk Penentuan Kondisi Optimum Fermentasi .....	
3.4.4.1 Peremajaan Bakteri Dengan Media Agar Miring .....	26
3.3.4.2 Pembuatan Inokulum .....	27
3.3.4.3 Pembuatan Media Fermentasi.....	27
3.4.5 Pembuatan Media Fermentasi Untuk Produksi Bioetanol .....	28
3.4.6 Destilasi Bioetanol.....	28
3.4.7 Analisis Kualitatif Bioetanol Dengan Kromatografi Gas .....	29
3.4.8 Analisis Kadar Bioetanol Dengan Refraktometer.....	29
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....	30
4.1 Analisis Kadar Selulosa .....	30
4.2 Analisis Kualitatif <i>Gas Chromatografi</i> (GC) .....	31
4.3 Penentuan Kondisi Optimum Fermentasi Berdasarkan Waktu dan pH Fermentasi.....	32
4.3.1 Penentuan Waktu Optimum Fermentasi .....	33
4.3.2 Penentuan pH Optimum Fermentasi .....	35
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN .....	38

DAFTAR PUSTAKA .....	39
LAMPIRAN-LAMPIRAN .....	45

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Limbah batang pisang ( <i>Musa paradisiaca formatopyta</i> ) .....	7
2. Struktur Selulosa .....	11
3. Aktivitas enzim selulase .....	13
4. Bakteri <i>Clostridium acetobutylicum</i> .....	16
5. Tahap glikolisis melalui jalur Embden-Mayrhopf-Parnas (EMP) .....	21
6. Proses pembentukan etanol dari piruvat .....	22
7. Kromatogram etanol standar (A), Kromatogram sampel limbah batang pisang kepok <i>Musa paradisiaca formatpica</i> (B) .....	32

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Komposisi kimia serat batang pisang .....	8
2. Data analisis kadar selulosa .....	30
3. Data penentuan kondisi optimum fermentasi berdasarkan nilai indeks bias bioetanol dengan variasi waktu fermentasi .....	34
4. Data penentuan kondisi optimum fermentasi berdasarkan nilai indeks bias bioetanol dengan variasi pH .....	36

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Skema kerja analisis kadar selulosa dan lignin .....	45
2. Skema kerja pembuatan media agar miring.....	46
3. Skema kerja peremajaan bakteri.....	46
4. Skema kerja pembuatan media inokulum.....	47
5. Skema kerja pembuatan media fermentasi .....	48
6. Skema kerja pembuatan media produk bioetanol.....	49
7. Komposisi bahan untuk media agar.....	50
8. Komposisi bahan untuk media inokulum .....	50
9. Komposisi bahan untuk media fermentasi.....	51
10. Data penentuan nilai indeks bias etanol standar .....	52
11. Kurva kalibrasi larutan etanol standar .....	52
12. Grafik penentuan waktu optimum fermentasi <i>Musa paradisiaca formatypica</i> .....	53
13. Grafik penentuan pH optimum fermentasi <i>Musa paradisiaca formatypica</i> .....	53
14. Perhitungan analisis kadar selulosa .....	54
15. Perhitungan kadar etanol menggunakan refraktometer .....	55
16. Dokumentasi penelitian .....	56

## DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN

BBM	: Bahan Bakar Minyak
SSF	: <i>Simultaneous Sacharification and Fermentation</i>
SFS	: Sakarifikasi dan Fermentasi Simultan
g	: gram
mL	: mililiter
mm	: milimeter
g/cm <sup>3</sup>	: gram per sentimeter kubik
%	: persen
CO <sub>2</sub>	: Karbon dioksida
°C	: derajat Celcius
NaOH	: Natrium Hidroksida
pH	: potensial hidrogen
rpm	: <i>rotation per minute</i>
cm	: centimeter
N	: Normalitas/Normal
DP	: Derajat Polimerisasi
β	: beta
ABE	: Aseton Butanol Etanol
EMP	: Embden-Meyerhof-Parnas
GC	: <i>Gas Chromatografy</i>

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang**

Sejak tahun 2012, Indonesia mengalami penurunan produksi minyak nasional yang disebabkan menurunnya cadangan minyak bumi, dilain pihak pertambahan jumlah penduduk telah meningkatkan transportasi dan aktivitas industri yang berakibat pada peningkatan kebutuhan konsumsi Bahan Bakar Minyak (BBM). Untuk memenuhi kebutuhan BBM tersebut pemerintah mengimpor sebagian BBM. Menurut Ditjen Migas, impor migas mengalami peningkatan yang cukup signifikan 106,9 barel pada tahun 2002 menjadi 116,2 juta barel pada tahun 2003 dan 154,4 juta barel pada tahun 2004. Jenis BBM yang diimpor, minyak solar (ADO) merupakan volume impor terbesar setiap tahunnya. Pada tahun 2002 impor BBM jenis ini mencapai 60,6 juta barel atau 56,7% dari total, kemudian meningkat menjadi 61,1 juta barel pada tahun 2003 dan 77,6 juta barel pada tahun 2004 (Budi, 2007).

Data Departemen Energi dan Sumber Daya Mineral (2005) menyebutkan bahwa minyak bumi mendominasi 54% penggunaan energi di Indonesia, sedangkan gas bumi sebesar 26,5% dan batu bara hanya 14% dari total penggunaan energi. Selain itu juga disebutkan bahwa cadangan minyak bumi Indonesia hanya cukup untuk 18 tahun ke depan, sementara cadangan gas bumi masih mencukupi untuk 61 tahun ke depan, dan cadangan batu bara baru habis dalam waktu 147 tahun lagi.

Permintaan bahan bakar yang dihasilkan dari sumber daya terbarukan meningkat dalam beberapa tahun terakhir. Akibat semakin menipisnya cadangan sumber-sumber energi yang tidak dapat diperbaharui. Sumber energi terbarukan adalah sumber energi yang dihasilkan dari sumber daya energi yang berkelanjutan jika dikelola dengan baik (Desfrian, 2014). Energi alternatif yang dapat menggantikan minyak bumi salah satunya yaitu bioetanol.

Bioetanol dapat digunakan sebagai bahan bakar untuk pemecahan masalah energi pada saat ini. Pemanfaatan bahan yang mengandung serat kasar dengan karbohidrat yang tinggi, saat ini sedang diusahakan secara intensif dimana semua bahan yang mengandung karbohidrat dapat diolah menjadi bioetanol. Misalnya ubi kayu, ubi jalar, pisang, dan lain-lain. Bioetanol dapat dihasilkan dari tanaman yang banyak mengandung senyawa selulosa dengan menggunakan bantuan dari aktivitas mikroba (Seftian, dkk., 2012).

Pisang merupakan buah yang banyak tumbuh di Indonesia. Produksi pisang di Indonesia mencapai 5 juta ton pada tahun 2008. Buah pisang ini sebagian besar dikonsumsi oleh masyarakat Indonesia. Besarnya konsumsi ini menandakan tingginya kebutuhan masyarakat Indonesia akan buah dan serat. Di sisi lain, hal ini menimbulkan dampak baru, yaitu banyaknya limbah pelepah batang pisang ini (Apriliani, 2013). Pelepah pisang ini oleh sebagian besar masyarakat belum dimanfaatkan dengan baik, sehingga mereka tidak segan-segan untuk membuangnya atau membiarkan begitu saja. Pelepah pisang tersebut mempunyai kandungan selulosa yang tinggi hingga 64% (Lokantara, 2012). Pohon pisang merupakan salah satu tumbuhan yang memiliki kandungan selulosa yang cukup tinggi. Namun saat ini pohon pisang hanya menjadi limbah organik yang belum

dimanfaatkan secara maksimal. Menurut Lokantara (2012), serat batang pisang kepok (*Musa paradisiaca*) memiliki kandungan selulosa 63-64%, hemiselulosa 20%, dan kandungan lignin 5%.

Selulosa merupakan polisakarida melimpah di bumi yang dapat diubah menjadi glukosa dengan cara hidrolisis (Groggins, 1992). Teknologi produksi bioetanol dalam proses hidrolisis biasanya dilakukan dengan metode konvensional yaitu dengan menggunakan asam. Namun metode ini tidak ramah lingkungan karena dapat menimbulkan korosif disamping bahan kimia tersebut relatif mahal. Pengembangan teknologi bioproses dengan menggunakan enzim pada proses hidrolisisnya merupakan suatu proses yang lebih ramah lingkungan. Pada penelitian ini, bakteri digunakan untuk memproduksi enzim guna menghidrolisis selulosa menjadi glukosa. Bakteri yang digunakan adalah *Clostridium acetobutylicum* dimana bakteri ini adalah jenis bakteri yang dapat menghasilkan enzim selulase untuk menghidrolisis selulosa menjadi glukosa (Balusu, 2004; Demain, 2005; Riyanti, 2009).

Proses sakarifikasi dan fermentasi yang dilakukan pada satu tempat dengan menggunakan mikroorganisme disebut sistem sakarifikasi dan fermentasi simultan (SFS) atau *Simultaneous Sacharification and Fermentation* (SSF). Salah satu keuntungan dari proses SSF adalah hidrolisis dan fermentasi dilakukan dalam satu wadah atau reaktor sehingga dapat berlangsung secara efisien. Hidrolisis bertujuan untuk memecah polisakarida menjadi monosakarida sehingga dapat langsung difermentasi oleh enzim yang dihasilkan oleh mikroba (Ruso, 2011).

Beberapa penelitian telah dilakukan terhadap biomassa yang mengandung lignoselulosa. Ruso (2011) melakukan penelitian dengan mengkonversi selulosa

dari rumput gajah menjadi etanol menggunakan bakteri *Clostridium acetobutylicum*. Hasil dari penelitian ini menunjukkan kondisi fermentasi optimum dari rumput gajah dengan menggunakan bakteri *Clostridium acetobutylicum* adalah pada pH 6,5 pada waktu fermentasi 10 hari pada suhu 29 °C menghasilkan bioetanol dengan kadar 96,24%. Pada penelitian Kusuma (2014), dengan mengkonversi selulosa dari alga merah menjadi etanol menggunakan bakteri yang sama menghasilkan kondisi optimum fermentasi pada pH 6,0 dengan waktu fermentasi 10 hari untuk sampel utuh dengan kadar bioetanol 17,03%. Pada penelitian Setiawati dkk (2016), melaporkan kadar etanol yang dihasilkan dari pisang tanduk melalui proses fermentasi sebesar 8,90% dengan waktu optimum fermentasi 7 hari. Penelitian mengenai bioetanol dari tanaman pisang telah banyak dilakukan namun belum pernah dilakukan pada limbah batang pisang.

Oleh karena itu dilakukan penelitian mengenai “Pemanfaatan Limbah Batang Pisang Kepok (*Musa paradisiaca formatopycal*) Sebagai Bahan Dasar Pembuatan Bioetanol dengan Metode Sakarifikasi dan Fermentasi Simultan (SFS)” yang diharapkan mampu menghasilkan kadar bioetanol yang maksimal.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Adapun rumusan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Berapakah kadar selulosa yang terdapat pada limbah batang pisang kepok (*Musa Paradisiaca fomotypica*) ?
2. Berapakah waktu dan pH optimum yang dihasilkan pada fermentasi secara simultan dengan bakteri *Clostridium acetobutylicum* ?
3. Berapakah kadar bioetanol yang dihasilkan melalui metode sakarifikasi dan fermentasi secara simultan ?

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

#### **1.3.1 Maksud Penelitian**

Maksud penelitian ini adalah untuk mengetahui dan mempelajari :

1. Cara menentukan kondisi optimum fermentasi secara simultan dengan bakteri *Clostridium acetobutylicum*.
2. Cara menggunakan metode sakarifikasi fermentasi simultan (SFS) dalam menghasilkan bioetanol.

#### **1.3.2 Tujuan Penelitian**

Tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Menentukan kadar selulosa pada batang pisang kepok (*Musa paradisiaca*).
2. Menentukan waktu dan pH optimum fermentasi secara simultan dengan bakteri *Clostridium acetobutylicum*.
3. Menentukan kadar bioetanol yang dihasilkan melalui metode sakarifikasi dan fermentasi simultan (SFS).

### **1.4 Manfaat Penelitian**

Manfaat penelitian ini adalah :

1. Mengurangi limbah batang pisang kepok yang kemudian diolah menjadi bahan dasar bioetanol.
2. Membantu memenuhi kebutuhan bahan bakar minyak yang semakin berkurang.
3. Memberikan informasi kepada masyarakat mengenai pengelolaan limbah batang pisang menjadi bahan bakar alternatif pengganti minyak bumi.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Batang Pisang

Pada hakekatnya, tanaman pisang diklasifikasikan dalam berbagai jenis. Jenis pisang yang telah familiar seperti pisang ambon, pisang nangka, pisang mas, pisang klutuk, pisang tanduk, pisang hias, pisang kepok dan lainnya. Semua tanaman pisang tersebut dapat tumbuh subur di Indonesia. Terbukti hampir di setiap tempat dapat dengan mudah ditemukan tanaman pisang, baik yang dipelihara di pekarangan rumah ataupun tumbuh liar di pinggiran jalan (Santoso, 1995).

Satuhu dan Supriyadi (2008) menyebutkan, tanaman pisang diklasifikasikan sebagai berikut :

Kingdom : Plantae

Divisi : Magnoliophyta

Kelas : Liliopsida

Ordo : Zingiberales

Famili : Musaceae

Genus : *Musa*

Spesies : *Musa paradisiaca formatypica*.

Aktivitas pertanian dari pisang menghasilkan banyak residu, karena setiap pohon hanya menghasilkan satu tandan yang berisi buah-buah pisang (Cordeiro, dkk., 2003). Setelah tandan tersebut dipanen, batang pisang tersebut dipotong dan biasanya ditinggal di permukaan tanah (Gambar 1). Dari hal tersebut dapat diperkirakan banyaknya limbah batang pisang yang dihasilkan setiap

tahunnya pada suatu daerah. Selain aktivitas penanaman pisang yang banyak tersebut, keuntungan lain menggunakan limbah batang pisang sebagai bahan pembuat kertas yaitu serat pisang memiliki kandungan lignin yang rendah (Irawan, dkk., 2013).

Pada dasarnya, tanaman pisang merupakan tumbuhan yang tidak memiliki batang sejati. Batang pohonnya terbentuk dari perkembangan dan pertumbuhan pelepah yang mengelilingi poros lunak panjang. Pelepah pohon pisang juga mengandung selulosa dalam jumlah yang cukup tetapi selama ini pemanfaatannya selama ini dirasa kurang optimal.



Gambar 1. Limbah Batang Pisang ( *Musa paradisiaca formatypica* )

Batang pisang semu merupakan sumber daya biomassa yang sangat besar yang biasanya tidak dipergunakan. Meskipun masih terdapat senyawa organik yaitu selulosa yang masih dapat dimanfaatkan (Pereira, dkk., 2014). Menurut Lisnawati (2000), Batang pisang memiliki kadar kadar lignin rendah (5%), selulosa (63-64%) dan hemiselulosa (20%) tinggi, sedangkan seratnya relatif panjang sekitar 4,29 mm.

Serat batang pisang diperoleh dari pohon pisang kepok merupakan serat yang mempunyai sifat mekanik yang baik. Sifat mekanik dari serat batang pisang mempunyai densitas  $1,35 \text{ g/cm}^3$ , kandungan selulosanya 63-64%, hemiselulosa (20 %), kandungan lignin 5%, kekuatan tarik rata-rata 600 MPa, modulus tarik rata-rata 17,85 GPa dan pertambahan panjang 3,36% (Lokantara, 2012).

Tabel 1. Komposisi Kimia Serat Batang Pisang (Venkateshwaran dan Elayaperumal, 2010)

Komposisi kimia	Kandungan %
Lignin	9
Selulosa	46
Hemiselulosa	38,54
Kadar abu	8,3

Rosyidin, dkk (2015) melaporkan uji Chesson kandungan batang pisang kepok tanpa perlakuan *pretreatment* menunjukkan hasil, selulosa 31,89%, hemiselulosa 24,17% dan lignin 6,845%.

## 2.2 Pretreatment

Proses *pretreatment* dilakukan untuk mengkondisikan bahan lignoselulosa dengan tujuan memecah dan mengurangi kandungan lignin dan hemiselulosa, merusak struktur kristal dari selulosa serta meningkatkan porositas bahan. Rusaknya struktur kristal selulosa akan mempermudah terurainya selulosa menjadi glukosa. Selanjutnya senyawa-senyawa gula sederhana tersebut yang akan difermentasi oleh mikroorganisme tertentu (Mosier, dkk., 2005).

Lignin adalah senyawa kompleks yang menyebabkan selulosa saling terikat dalam batang dan memberi warna coklat pada batang. Namun keberadaan lignin dalam biomassa menyebabkan enzim sukar berinteraksi dengan selulosa pada

proses hidrolisis. Supaya proses hidrolisis berlangsung dengan baik maka perlu dilakukan proses delignifikasi sebelum rumput gajah diproses menjadi bioetanol. Delignifikasi dilakukan dengan menggunakan NaOH 2-8% (Jalaluddin dan Rizal, 2003).

*Pretreatment* secara kimiawi mempunyai tujuan utama untuk meningkatkan biodegradasi selulosa dengan menghilangkan lignin dan atau hemiselulosa. Metode ini juga bertujuan menurunkan tingkat polimerisasi dan kristalinitas komponen selulosa. *Pretreatment* kimia ini awalnya dikembangkan di industri kertas untuk delignifikasi bahan selulosa agar dihasilkan produk kertas berkualitas (Menon dan Rao, 2012).

*Pretreatment* asam menggunakan larutan asam sebagai katalisnya. Asam memiliki pengaruh yang kuat pada hemiselulosa dan lignin dibandingkan pada struktur kristalin selulosa. Tujuan utama metode ini adalah melarutkan sebagian hemiselulosa agar enzim selulase dapat menjangkau struktur selulosa (Tomas-Pejo, dkk., 2011).

Metode *pretreatment* basa dalam pengolahan biomassa lignoselulosa umumnya menggunakan basa seperti natrium, kalium, kalsium, dan amonium hidroksida. Pemakaian basa menyebabkan perubahan struktur lignin dengan cara mendegradasi ester dan rantai samping glikosidiknya. Penggunaan basa juga menyebabkan dekrystalisasi parsial selulosa, solvasi parsial hemiselulosa dan mengakibatkan selulosa membesar. Proses ini dilakukan dengan cara merendam biomassa dalam larutan alkali pada suhu dan waktu yang telah ditentukan. Tahap netralisasi perlu dilakukan sebelum masuk tahap hidrolisis enzimatik untuk menghilangkan lignin dan zat inhibitor (misalnya garam, asam fenolik, dan

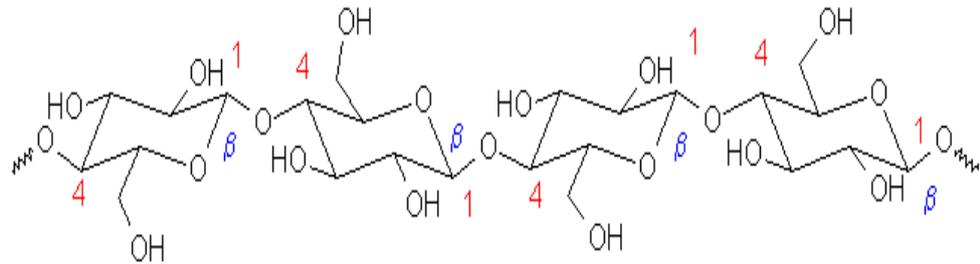
aldehid). Dibandingkan *pretreatment* asam metode ini lebih efektif dalam solubilisasi lignin, sebaliknya kurang dalam mendegradasi selulosa dan hemiselulosa. Efektifitas metode ini juga tergantung kadar lignin pada biomassa (Tomas-Pejo, dkk., 2011).

### 2.3 Selulosa

Selulosa merupakan struktur dasar sel-sel tanaman, oleh karena itu merupakan bahan alam yang paling penting yang dibuat oleh organisme hidup. Di dalam biosfer  $27 \times 10^{10}$  ton karbon terikat dalam organisme hidup, lebih 99% adalah tanaman. Dapat diperkirakan bahwa sekitar 90% karbon tanaman terikat dalam selulosa, yang berarti bahwa selulosa total di dunia nabati berjumlah sekitar  $26,5 \times 10^{10}$  ton (Fengel dan Wegener, 1995). Selulosa adalah polimer linear yang terdiri dari 300 sampai 150.000 unit D-glukosa saling berhubungan melalui ikatan glikosidik  $\beta$ -1,4 (Gambar. 2) dan berat molekul diperkirakan mencapai 500.000 g/mol (Hardjo, dkk., 1989).

Selulosa hampir tidak pernah ditemui dalam keadaan murni di alam, melainkan selalu berikatan dengan bahan lain yaitu lignin dan hemiselulosa. Serat selulosa alami terdapat di dalam dinding sel tanaman dan material vegetatif lainnya. Selulosa murni mengandung 44,4% C; 6,2% H dan 49,3% O. Rumus empiris selulosa adalah  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , dengan banyaknya satuan glukosa yang disebut dengan derajat polimerisasi (DP), dimana jumlahnya mencapai 1.200-10.000 dan panjang molekul sekurang-sekurangnya 5.000 nm. Berat molekul selulosa rata-rata sekitar 400.000 Mikrofibril selulosa terdiri atas bagian amorf (15%) dan bagian berkrystal (85%). Struktur berkrystal dan adanya lignin serta hemiselulosa disekeliling selulosa merupakan hambatan

utama untuk menghidrolisa selulosa (Sjostrom, 1995). Pada proses hidrolisis yang sempurna akan menghasilkan glukosa, sedangkan proses sebagian akan menghasilkan disakarida selobiosa.



Gambar 2. Struktur Selulosa (Cole dan Fort, 2007)

Secara alamiah molekul selulosa tersusun dalam bentuk “fibril” yang terdiri atas beberapa molekul selulosa paralel yang dihubungkan oleh ikatan hidrogen, fibril-fibril tersebut membentuk struktur kristalin pada kayu. Struktur kristalin tersebut dibungkus oleh lignin yang berperan sebagai pelindung selulosa terhadap serangan enzim pemecah selulosa (Fengel dan Wegener, 1995).

Dalam tubuh manusia, selulosa tidak dapat dicerna karena manusia tidak mempunyai enzim yang dapat menguraikan selulosa (Poedjiadi, 1994). Ikatan glikosidik  $\beta$ -1,4 pada serat selulosa dapat dihidrolisis menjadi monomer glukosa. Proses perubahan selulosa menjadi glukosa dapat dilakukan dengan cara hidrolisis asam atau secara enzimatik menggunakan enzim selulosa (Kennedy dan Philips, 1985).

## 2.4 Selulase

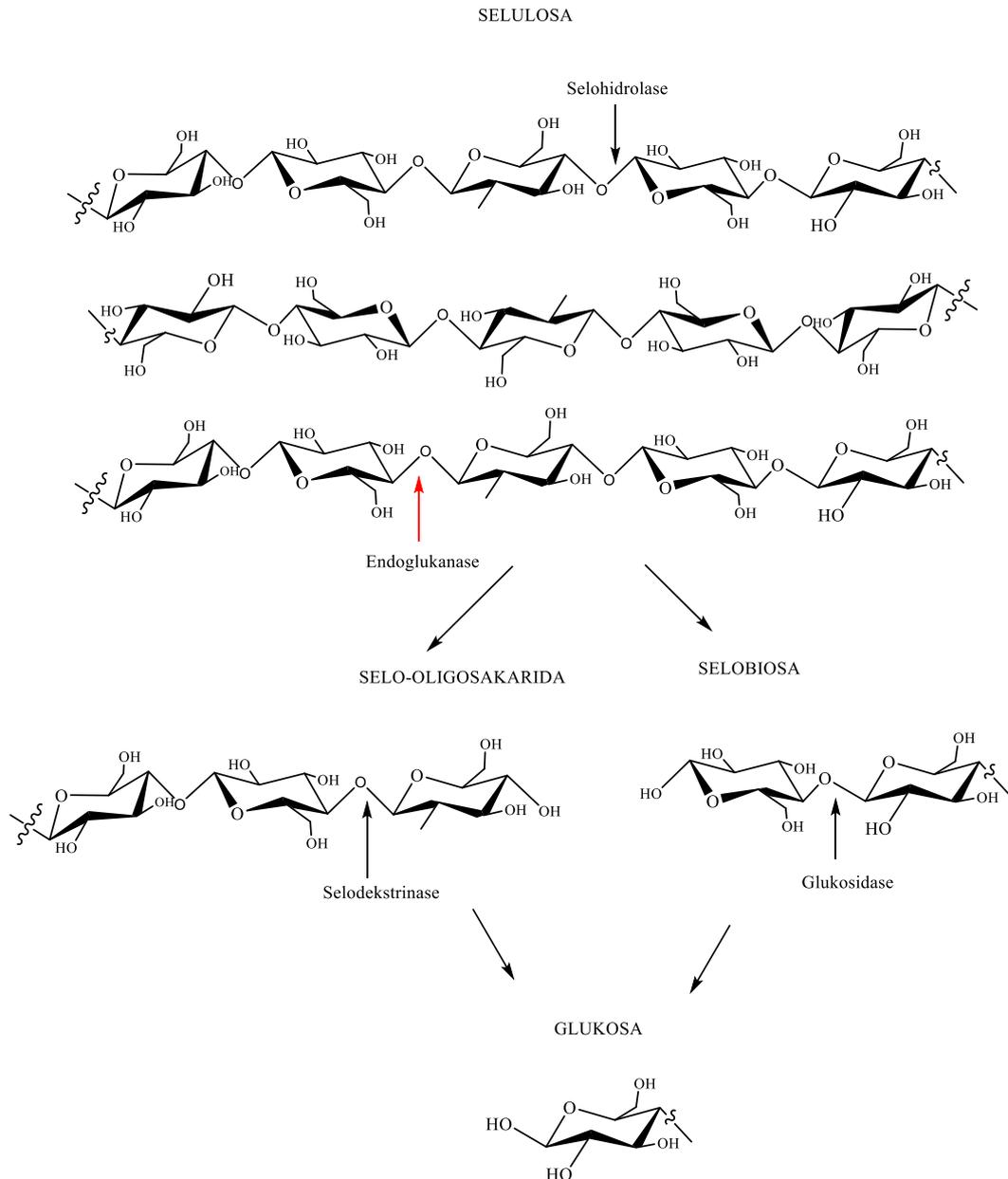
Selulase merupakan kelompok enzim golongan hidrolase yang sangat penting dalam industri, enzim ini mengkatalisis substrat selulosa dengan bantuan

molekul air. Golongan enzim hidrolase antara lain selulase, amilase, invertase, protease dan lipase (Risnoyatiningasih, 2011).

Selulase adalah suatu enzim yang termasuk dalam kelompok hidrolase yang mengkatalisis reaksi pemutusan ikatan  $\beta$ -1,4-glukopiranosil dari senyawa selulosa, selobiosa dan turunan selulosa lainnya. Selulase merupakan nama umum atau trivial bagi enzim selulase sedang nama sistematiknya adalah  $\beta$ -1,4-glukan-4-glukahidrolase (Wirahadikusumah dan Madayanti, 1990). Milala, dkk (2005) melaporkan bahwa kenaikan konsentrasi substrat sampai 5% menghasilkan kenaikan aktivitas enzim. Liu dan Yang (2007) melaporkan bahwa aktifitas maksimum selulase diperoleh pada pH awal 5,0 dan temperatur inkubasi 30 °C.

Menurut Fengel dan Weneger (1995), penggolongan enzim yang menyusun selulase didasarkan pada spesifitas substrat masing-masing adalah:

1. Endo-  $\beta$ -1,4- glukonase adalah enzim yang menghidrolisis ikatan glikosidik secara acak.
2.  $\beta$ -1,4 glukon selobiohidrolase (eksoglukanase) adalah enzim yang menyerang ujung rantai selulosa non pereduksi dan menghasilkan selobiosa. Enzim ini dapat menyerang selodekstrin, tetapi tidak dapat menyerang selulosa yang telah tersubstitusi serta tidak dapat menghidrolisis selobiosa.
3.  $\beta$ -1,4 glukon glukohidrolase adalah enzim yang menyerang ujung rantai selulosa non pereduksi dan menghasilkan glukosa. Enzim ini menyerang selulosa yang telah dilunakkan oleh asam fosfat, misalnya selooligosakarida.
4.  $\beta$ -1,4 glukosidase adalah enzim yang menghidrolisis selobiosa dan rantai pendek selo-oligosakarida dan menghasilkan glukosa. Enzim ini tidak menyerang selulosa dan selodekstrin.



Gambar 3. Aktivitas enzim selulase

Gambar 3 menjelaskan tentang aktivitas enzimatik dari selulosa. Enzim endoglukanase (ditandai dengan panah merah) secara acak membelah ikatan  $\beta$ -1,4 glikosidik pada struktur selulosa. Enzim selobiohidrolase (juga dikenal sebagai eksoglukanase) menyerang ujung rantai selulosa pereduksi dan non pereduksi menghasilkan selobiosa. Selooligosakarida sebagai hasil dari kegiatan ini diubah

menjadi glukosa oleh enzim selodekstrin, sedangkan selobiosa merupakan hasil dari aksi selobiohidrolase diubah menjadi glukosa oleh enzim  $\beta$ -glukosidase (Yeoman, dkk., 2010).

Pemanfaatan limbah berlignoselulosa dengan menggunakan jasa mikroorganisme dapat menghasilkan enzim ekstraseluler yang mampu mendegradasi bahan berlignoselulosa menjadi fraksi penyusunnya. Enzim selulase adalah enzim yang bisa mengurai selulosa menjadi glukosa, setelah diurai bisa difermentasikan menjadi etanol. Enzim selulase yang dapat merombak bahan berlignoselulosa berupa jerami atau serat (Seftian, dkk., 2012).

Produksi komersial selulase pada umumnya menggunakan fungi atau bakteri yang telah diisolasi. Meskipun banyak mikroorganisme yang dapat mendegradasi selulosa, hanya beberapa mikroorganisme yang memproduksi selulase dalam jumlah yang signifikan yang mampu menghidrolisa kristal selulosa secara *invitro*. Fungi adalah mikroorganisme utama yang dapat memproduksi selulase, meskipun beberapa bakteri dan *actinomycetes* telah dilaporkan juga menghasilkan aktivitas selulase (Ikram, dkk., 2005).

## **2.5 Bakteri Selulolitik *Clostridium acetobutylicum***

Mikroorganisme selulolitik memainkan peranan penting dalam biosfer dengan mendaur-ulang selulosa (Leschine, 1995). Mikroorganisme juga penting dalam beberapa proses fermentasi dalam industri, terutama dalam penghancuran limbah selulosa secara anaerob, sehingga menghasilkan lignoselulosa dengan persentase tinggi (Cailliez, dkk., 1993).

Bakteri selulolitik adalah bakteri yang dapat memecah selulosa. Bakteri yang bersifat selulolitik mampu menghasilkan enzim selulase yang dapat memecah

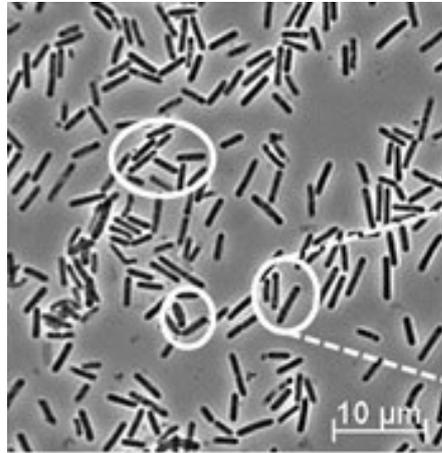
$\beta$ -1,4 ikatan glikosida pada selulosa. Bakteri selulolitik misalnya *Ruminococcus albus* suatu jenis bakteri rumen yang banyak terdapat pada binatang ruminansia (Arora, 1989).

Mikroorganisme yang digunakan untuk fermentasi alkohol bisa dari bakteri seperti *Clostridium thermocellum*, *Clostridium acetobutylicum* (Gambar 4), *Klebsiella pneumoniae*, *Zymomonas mobilis*. atau jamur (fungi) seperti *Aspergillus oryzae*, *Endomyces fibugilera*, *Kloeckera sp.*, *Kluyveromyces fragilis*, *Mucor sp.*, *Neurospora crassa*, *Rhizopus sp.*, *Saccharomyces beticus*, *Sacharomyces cerevisiae*, *S. ellipsoideus*, *S. oviformis*, *S. saki*, *Torula sp.*, dan lain-lain (Ruso, 2011).

*Clostridium acetobutylicum* terkenal karena kemampuannya untuk mendegradasi pati ataupun selulosa yang sangat kompleks. Namun, agar terjadi degradasi selulosa, *Clostridium acetobutylicum* menghasilkan banyak enzim protein yang sangat vital bagi hidrolisis selulosa. Penelitian bioteknologi menunjukkan bahwa bakteri ini menghasilkan sistem selulase kompleks yang dikenal sebagai selulosome yang terdiri atas sekitar 20 katalisator protein yang terlibat dalam proses degradasi dan regulasi pemecahan selulosa dan transportasi gula monomer (Contreras, dkk, 2009).

*Clostridium acetobutylicum* memiliki beberapa kelebihan dibandingkan dengan bakteri penghasil butanol lainnya. *C. acetobutylicum* merupakan bakteri anaerob, sehingga memberikan keuntungan untuk proses fermentasi selulosa yang berlangsung dalam keadaan anaerob. Selain itu, bakteri *C. acetobutylicum*, dapat bertahan pada pH rendah, antara 4,5-5 dengan suhu optimum 37 °C (Whitman, 2009). Menurut hasil penelitian Ruso (2011) melaporkan bahwa bakteri

*Clostridium acetobutylicum* dapat berkembang dengan baik pada pH 6,5 dan dapat menghasilkan kadar bioetanol dengan waktu fermentasi 10 hari pada suhu 29 °C.



Gambar 4. Bakteri *Clostridium acetobutylicum* (Shawn, dkk., 2011)

Menurut McCoy (1926), taksonomi dari bakteri *Clostridium acetobutylicum* adalah :

Kingdom : Bacteria  
Phylum : Firmicuter  
Class : Clostridia  
Ordo : Clostridiales  
Family : Clostridiaceae  
Genus : *Clostridium*  
Species : *Clostridium acetobutylicum*

Butanol umumnya diproduksi dalam aseton-butanol etanol (ABE) proses fermentasi. Proses fermentasi ABE adalah salah satu proses utama biokimia dari produksi biofuel yang yang ditemukan aplikasi industri (Emran, dkk., 2014).

Proses fermentasi ABE mencakup dua fase. Tahap pertama dikenal sebagai fase *Acidogenic*. Selama fase ini, jalur pembentukan asam diaktifkan di mana

substrat karbohidrat terutama glukosa difermentasi menjadi asam organik. Asetat, butirat, hidrogen, dan karbon dioksida adalah produk utama dari fase ini. Fase *Acidogenic* biasanya terjadi pada fase pertumbuhan eksponensial dari spesies *Clostridium*. Tahap kedua adalah tahap *solventogenic* di mana asam asimilasi muncul. Produk yang diperoleh pada fase ini terutama aseton, butanol, dan etanol. Tahap kedua adalah tahap *solventogenic* selama asam yang sedang berasimilasi dan digunakan dalam produksi aseton, butanol, dan etanol. Selama proses fermentasi ABE, *Clostridium acetobutylicum* dapat memanfaatkan gula (sumber karbohidrat) dalam medium dan mengubahnya menjadi aseton, etanol, dan butanol (Emran, dkk., 2014).

## 2.6 Fermentasi

Fermentasi berasal dari bahasa latin “*Ferfere*” yang berarti mendidihkan (Muljono, dkk., 2002). Seiring perkembangan teknologi, definisi fermentasi meluas menjadi proses yang melibatkan mikroorganisme untuk menghasilkan suatu produk. Pada mulanya istilah fermentasi digunakan untuk menunjukkan proses perubahan glukosa menjadi etanol. Namun, kemudian istilah fermentasi berkembang lagi menjadi seluruh perombakan senyawa organik yang dilakukan oleh mikroorganisme. (Seftian, dkk., 2012).

Menurut Desrosier (1987), ada beberapa faktor yang mempengaruhi proses fermentasi, antara lain adalah sebagai berikut :

### a. pH

Mikroba tertentu dapat tumbuh pada kisaran pH yang sesuai untuk pertumbuhannya.

### b. Suhu

Suhu yang digunakan dalam fermentasi akan mempengaruhi mikroba yang berperan dalam proses fermentasi. Suhu optimal pada proses fermentasi yaitu 35 °C dan 40 °C.

#### c. Oksigen

Derajat anaerobiosis adalah merupakan faktor utama dalam pengendalian fermentasi. Bila tersedia O<sub>2</sub> dalam jumlah besar, maka produksi sel-sel khamir dipacu. Bila produksi alkohol yang dikehendaki, maka diperlukan suatu penyediaan O<sub>2</sub> yang sangat terbatas. Produk akhir dari suatu fermentasi sebagian dapat dikendalikan dengan tegangan O<sub>2</sub> substrat apabila faktor-faktor lainnya optimum.

#### d. Substrat

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

Lama fermentasi pada proses produksi bioetanol sangat mempengaruhi kadar bioetanol yang dihasilkan. Semakin lama waktu fermentasi maka semakin tinggi kadar Bioetanol yang dihasilkan. Jika bioetanol yang terkandung didalam substrat tinggi maka hal ini justru akan berpengaruh buruk terhadap pertumbuhan mikroba (Azizah, dkk., 2012).

Fermentasi dapat dilakukan dengan metode kultur permukaan dan kultur terendam. Medium kultur permukaan dapat berupa medium padat, semi padat, atau cair. Sedangkan kultur terendam dilakukan dalam medium cair menggunakan bioreaktor yang dapat berupa labu yang diberi aerasi, labu yang digoyang dengan shaker atau fermentor (Wirahadikusuma dan Madayanti, 1990).

Fermentasi media padat mempunyai beberapa kelebihan, antara lain cara operasinya sederhana, bahan untuk media atau substrat mudah diperoleh dan relatif murah harganya. Sedangkan kelemahannya antara lain memerlukan ruang yang luas, dan sulit mengatur kondisi lingkungan fermentasi (Wirahadikusuma dan Madayanti, 1990).

Medium cair digunakan pada fermentasi permukaan dan fermentasi terendam. Dibandingkan dengan medium padat, fermentasi medium cair lebih memungkinkan untuk mengendalikan faktor-faktor fisik dan kimia yang mempengaruhi proses fermentasi, seperti suhu, pH, dan kebutuhan oksigen. Disamping itu komposisi dan konsentrasi media juga sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan dan produksi enzim ekstraseluler dari mikroorganisme (Tanyildizi, 2007).

Mekanisme pembentukan bioetanol dari bakteri melalui jalur Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) atau lebih dikenal dengan jalur glikolisis. Hasil dari tahap glikolisis adalah memecah glukosa menjadi dua molekul asam piruvat. Proses yang terjadi dalam jalur glikolisis dapat dilihat pada Gambar 5 (Didu, 2010).

1. Glikolisis diawali dengan reaksi pembentukan senyawa glukosa-6- fosfat dari glukosa. Reaksi tersebut merupakan reaksi yang 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. Reaksi kedua adalah 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 fruktosafosfokinase. Reaksi ini berjalan spontan dan merupakan rate limiting step pada proses glikolisis. Pada tahap inipun satu 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 (GA-3P) oleh enzim triosefosfat isomerase.

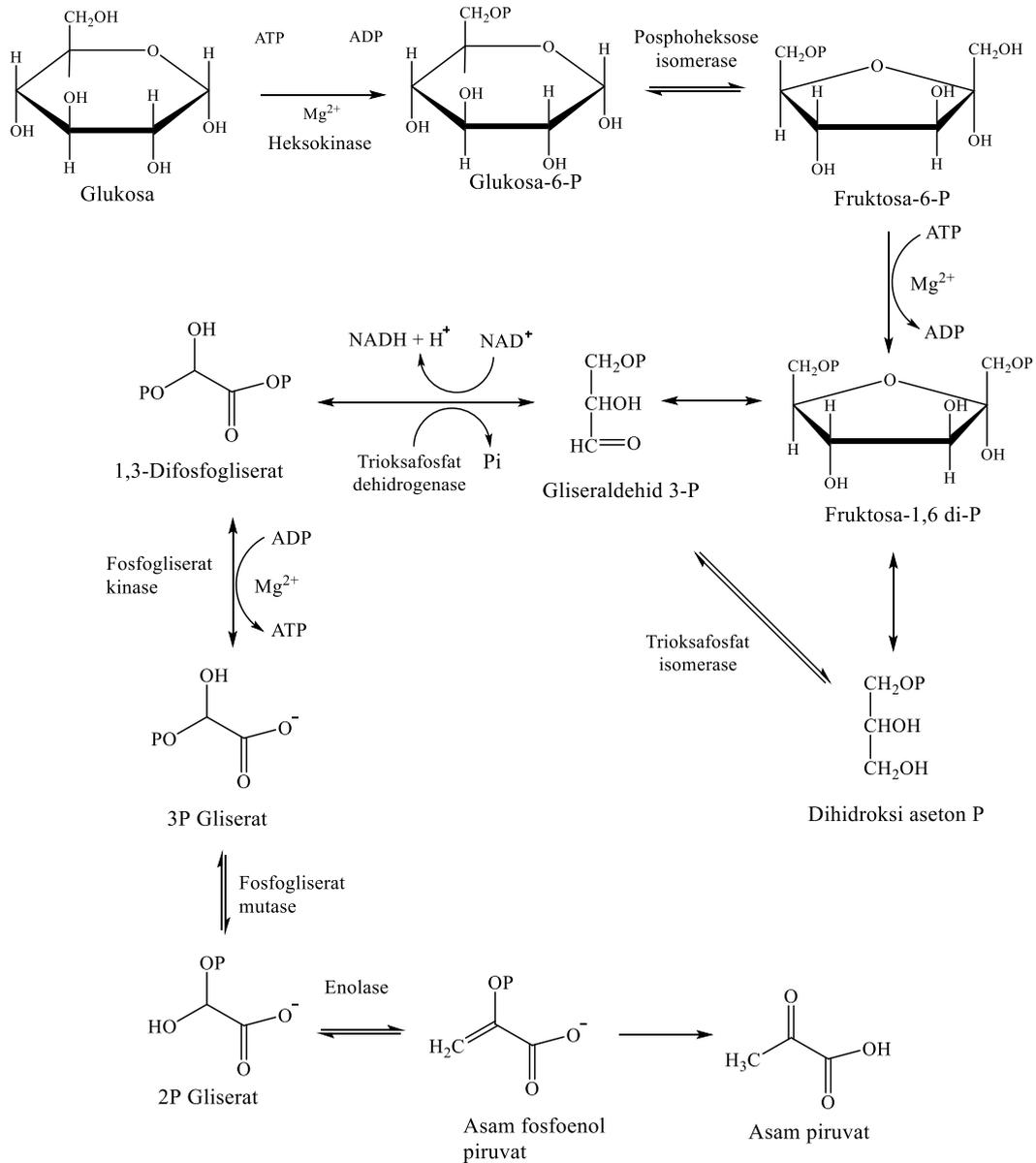
5. Gliseraldehid-3-fosfat (GA-3P) dioksidasi dengan penambahan fosfat inorganis (Pi) menjadi 1,3-difosfogliserat (1,3-dP-GA) oleh enzim gliseraldehid-3-fosfat-dehidrogenase.

6. 1,3-difosfogliserat melepaskan satu grup fosfat untuk membentuk ATP dan ADP kemudian dikonversi menjadi 3-fosfogliserat (3P-GA) oleh enzim phosphogliserate kinase kemudian dikonversi menjadi 2-fosfogliserat (2P-GA) oleh enzim fosfogliserat mutase.

7. 2-fosfogliserat (2P-GA) selanjutnya didehidrasi menjadi fosfoenol piruvat oleh enzim enolase.

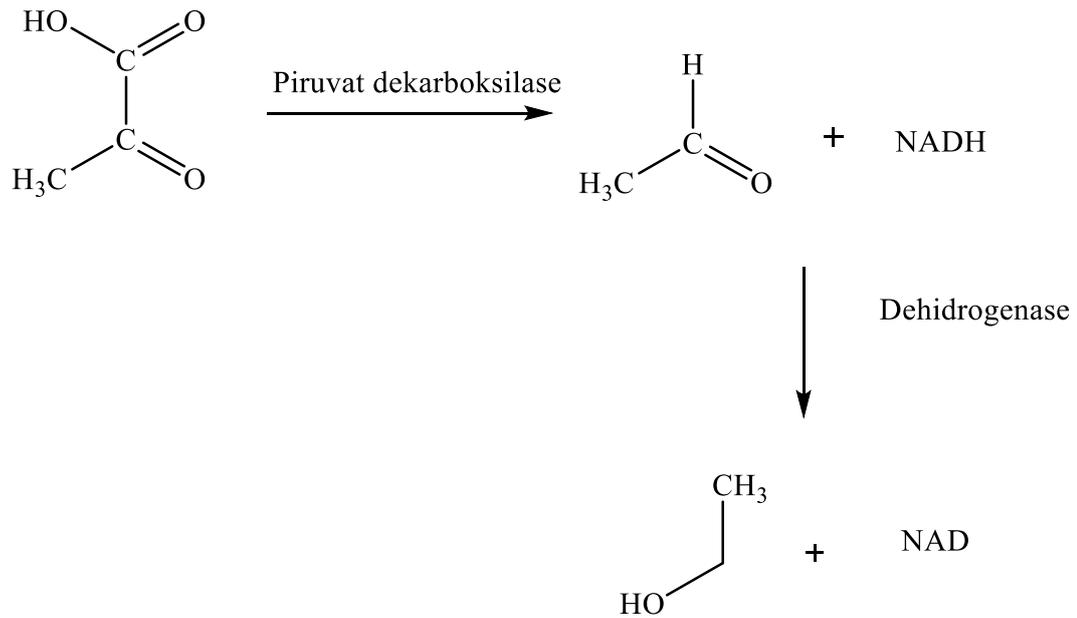
8. Tahap terakhir dari jalur glikolisis oleh defosforelasi fosfoenol piruvat (PEP) menjadi piruvat oleh enzim piruvat kinase; pada tahap ini dibentuk sebuah molekul ATP. Setelah penambahan DHAP dan GA-3P selama proses glikolisis berlangsung sebanyak dua kali. Piruvat yang merupakan produk akhir dari tahap glikolisis ini merupakan kunci pada proses metabolisme. Secara keseluruhan reaksi yang terjadi pada proses glikolisis adalah sebagai berikut (Didu, 2010):





Gambar 5. Tahap glikolisis melalui jalur Embden-Mayerhof-Parnas (EMP) (Didu, 2010)

Setelah melalui tahapan glikolisis, piruvat yang terbentuk kemudian diubah menjadi asetaldehid dan  $CO_2$  oleh enzim piruvat dekarboksilase, setelah itu enzim alkohol dehidrogenase mengubah asetaldehid menjadi etanol seperti yang terlihat pada Gambar 6 (Didu, 2010).



Gambar 6. Proses pembentukan etanol dari piruvat (Didu, 2010)

## 2.7 Bioetanol

Bioetanol dapat dihasilkan dari biomassa yang mengandung komponen pati atau selulosa, seperti singkong, umbi garut, ubi jalar, tepung sagu, dan ganyong. Dalam dunia industri, etanol umumnya digunakan sebagai bahan baku industri turunan alkohol, campuran minuman keras, serta bahan baku farmasi dan kosmetika (Hambali, dkk., 2007).

Secara umum sintesis bioetanol yang berasal dari biomassa terdiri dari dua tahap utama, yaitu hidrolisis dan fermentasi. Pada metode terdahulu proses hidrolisis dan fermentasi dilakukan secara terpisah atau *Separated Hydrolysis and Fermentation* (SHF) dan yang terbaru adalah proses *Simultaneous Saccharification and Fermentation* (SSF) atau Sakarifikasi dan Fermentasi secara Serentak (SFS). Salah satu keuntungan dari proses SSF adalah hidrolisis dan fermentasi dilakukan dalam satu wadah atau reaktor

sehingga dapat berlangsung secara efisien. Hidrolisis bertujuan untuk memecah polisakarida menjadi monosakarida sehingga dapat langsung difermentasi oleh enzim yang dihasilkan oleh mikroba (Ruso, 2011).

Cara yang lebih baik untuk produksi bioetanol yaitu dengan pengembangan teknologi bioproses dengan pendekatan enzimatik. Bioproses dengan menggunakan mikroba untuk menghasilkan enzim memiliki efisiensi sakarifikasi yang tinggi sehingga bioetanol yang dihasilkan besar. Teknologi ini juga diyakini sebagai suatu proses yang lebih ramah lingkungan karena menggunakan enzim yang dihasilkan oleh mikroba pada proses hidrolisis maupun fermentasi yang dilakukan pada satu tempat. Proses sakarifikasi dan fermentasi yang dilakukan pada satu tempat dengan menggunakan mikroorganisme disebut sistem sakarifikasi dan fermentasi simultan atau *Simultaneous Sacharification and Fermentation* (SSF) (Ruso, 2011).

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Alat Penelitian**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain cawan petridist, peralatan gelas, erlenmeyer, kawat ose, bunsen, hotplate, kapas, aluminium foil, termometer, peralatan inokulasi, inkubator, neraca analitik, otoklaf, *shaker incubator*, pH meter, destilasi, kromatografi gas shimadzu 2010.

#### **3.2 Bahan Penelitian**

Bahan-bahan yang akan digunakan pada penelitian ini adalah batang pisang kepok dari daerah Sudiang Makassar Sulawesi Selatan, bakteri *Clostridium acetobutylicum*, ekstrak ragi, ekstrak toge,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{CaCl}_2$  anhidrat,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  30%,  $\text{NaOH}$ , etanol absolute, Sistein, Asparagin, Casein, ekstrak daging dan air suling.

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

Penelitian ini dilaksanakan mulai September 2016 sampai bulan Maret 2017 di Laboratorium Biokimia, Laboratorium Kimia Analitik dan Laboratorium Kimia Fisika Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin.

### 3.4 Prosedur Penelitian

#### 3.4.1 Preparasi Sampel

Batang pisang kepok di potong kecil-kecil dengan ukuran 1-2 cm, dijemur hingga kering kemudian digiling dengan crusher hingga halus dan diayak dengan ayakan 60 mesh (0,2 mm).

#### 3.4.2 Analisis Lignin dan Selulosa

Analisis selulosa dan lignin dilakukan dengan metode Chesson (Datta, 1981). Sebanyak 1 g (a) sampel kering ditambahkan 150 mL akuades, dipanaskan pada suhu 90-100 °C dengan *water bath* selama 1 jam. Hasilnya disaring, residu dicuci dengan air panas (300 mL). Residu kemudian dikeringkan dengan oven sampai konstan kemudian ditimbang (b). Residu ditambahkan 150 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N kemudian dipanaskan dengan water bath selama 1 jam pada suhu 90-100 °C. Hasilnya disaring dan dicuci dengan akuades sampai netral (300 mL) lalu dikeringkan (c). Residu kering ditambahkan 10 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% dan direndam pada suhu kamar selama 4 jam. Ditambahkan 150 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N dan direfluks pada *water bath* selama 1 jam pada pendingin balik. Residu disaring dan dicuci dengan akuades sampai netral (400 mL) kemudian dipanaskan dalam oven pada suhu 105 °C dan hasilnya ditimbang sampai bobot tetap (d), selanjutnya residu diabukan dan ditimbang (e). Perhitungan kadar selulosa dan kadar lignin sebagai berikut:

$$\text{Kadar selulosa} : \frac{c - d}{a} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{Kadar lignin} : \frac{d - e}{a} \times 100\% \quad (2)$$

Dimana :        a = berat sampel (gram)  
                  c = berat residu pada penimbangan ketiga (gram)  
                  d = berat residu pada penimbangan keempat (gram)  
                  e = berat abu (gram)

### **3.4.3 Perlakuan Pendahuluan**

Perlakuan pendahuluan dilakukan dengan mencampur tepung batang pisang dengan larutan Natrium hidroksida 5% b/b dalam suatu wadah plastik bertutup sampai tepung terendam diaduk lalu dibiarkan selama 24 jam sambil sekali sekali diaduk lalu disaring dengan kertas saring atau kain penyaring. Residu dicuci dengan akuades hingga lignin yang berwarna hitam pekat keluar semua. Proses pencucian dihentikan setelah cairan pencuci sudah jernih atau pH netral. Residu yang telah dicuci dimasukkan kembali kedalam wadah plastik ditambahkan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% sampai semua residu terendam, diaduk dan dibiarkan semalam dalam keadaan tertutup hingga sisa lignin yang melekat pada residu terlepas (sampel berwarna putih) kemudian sampel dikeringkan dalam oven pada suhu 110 °C (Seligh, dkk., 2009). Analisis selulosa dan lignin kembali dilakukan dengan metode *Chesson* (Datta, 1981).

### **3.4.4 Penyiapan Media Untuk Penentuan Kondisi Optimum Fermentasi**

#### **3.4.4.1 Peremajaan Bakteri Dengan Media Agar Miring**

Bahan-bahan pada Lampiran 8 dicampur dengan 150 mL ekstrak toge lalu dipanaskan sambil diaduk hingga larut. Disiapkan beberapa tabung reaksi lalu dipipet 10 mL larutan ekstrak dimasukkan kedalam tiap tabung reaksi, disumbat dengan kapas dan aluminium foil. Disterilisasi pada 121 °C selama 15 menit lalu didinginkan dalam keadaan miring (media agar

miring). Biakan murni bakteri *Clostridium acetobutylicum* digoreskan secara zig-zag pada media agar miring dengan menggunakan ose. Pengerjaan ini dilakukan dalam lemari sterilisasi (*ent case*) lalu ditumbuhkan dalam inkubator pada suhu 37 °C selama 7 hari.

#### **3.4.4.2 Pembuatan Inokulum**

Kedalam beker gelas yang berisi selulosa dari batang pisang ditambahkan 100 mL air dipanaskan sambil diaduk hingga membentuk gel. Kedalam gel ditambahkan nutrien pada Lampiran 9, diaduk hingga larut lalu pH diatur dengan buffer fospat hingga pH larutan menjadi 5,0. Campuran dipindahkan kedalam erlenmeyer 250 mL, diencerkan hingga volume 150 mL dengan akuades ditutup dengan kapas dan aluminium foil lalu disterilkan dalam otoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Didinginkan lalu ditambahkan stok kultur murni bakteri *Clostridium acetobutylicum* dengan menggunakan ose dalam ruang sterilisasi. Ditutup kembali dengan kapas dan aluminium foil lalu difermentasi pada *shaker incubator* selama 48 jam pada suhu 37 °C dengan kecepatan 150 rpm.

#### **3.4.4.3 Pembuatan Media Fermentasi**

Kedalam beker gelas yang berisi selulosa dari batang pisang ditambahkan 700 mL air dipanaskan sambil diaduk hingga membentuk gel. Kedalam gel ditambahkan bahan-bahan seperti Lampiran 10, diaduk hingga larut. Diatur pH larutan hingga pH 5,0 dengan buffer fospat lalu diencerkan hingga 1050 mL. Disiapkan beberapa buah erlenmeyer 250 mL lalu ditambahkan 150 mL larutan kedalam tiap erlenmeyer, disumbat dengan kapas dan aluminium foil dan

disterilisasi dalam otoklaf selama 15 menit pada suhu 121 °C. Erlenmeyer dipindahkan kedalam ruang steril lalu tambahkan 15 mL media inokulum kedalam setiap erlenmeyer dengan menggunakan gelas ukur yang steril. Erlenmeyer ditutup kembali dengan kapas lalu difermentasi pada *shaker incubator* selama, 2, 4, 6, 8, dan 10 hari pada suhu 37 °C dengan kecepatan 150 rpm. Setelah 2 hari salah satu erlenmeyer pada media fermentasi diambil, disaring lalu didestilasi pada suhu 78 °C hingga diperoleh destilat. Selanjutnya dilakukan variasi pH pada kisaran 5,0; 5,5; 6,0; 6,5 untuk memperoleh waktu optimal fermentasi.

#### **3.4.5 Pembuatan Media Fermentasi Untuk Produksi Bioetanol**

Media produksi dibuat setelah diperoleh kondisi optimum fermentasi. Pada penelitian ini kondisi optimum fermentasi digunakan pada kondisi pH 6,0 dengan waktu fermentasi optimum. Kedalam baker gelas yang berisi selulosa dari batang pisang ditambahkan 700 mL air dipanaskan sambil diaduk hingga membentuk gel. Kedalam gel ditambahkan bahan-bahan yang lain diatas, diaduk hingga larut. Diatur pH larutan hingga pH 6,0 dengan buffer fospat lalu diencerkan hingga 1050 mL. Dituangkan kedalam beberapa buah erlenmeyer 250 mL, disumbat dengan kapas dan aluminium foil lalu sterilisasi dalam otoklaf selama 15 menit pada suhu 121 °C. Tambahkan secara aseptik 15 mL media inokulum. Tutup tabung kembali lalu difermentasikan sesuai dengan kondisi optimum pada 37 °C dengan kecepatan 150 rpm. Destilasi hasil fermentasi pada suhu 78 °C.

#### **3.4.6 Destilasi Bioetanol**

Destilasi dilakukan untuk memisahkan bioetanol dan destilat (sebagian besar adalah air dan bioetanol) sehingga bioetanol dan air terkondensasi

secara keseluruhan. Cairan didestilasi dengan menggunakan alat destilasi fraksionasi.

#### **3.4.7 Analisis kualitatif bioetanol dengan kromatografi gas**

Analisis kualitatif bioetanol dilakukan dengan membandingkan waktu retensi dari kromatogram etanol absolut dengan bioetanol yang dihasilkan dari fermentasi dan proses destilasi.

#### **3.4.8 Analisis Kadar Bioetanol Dengan Refraktometer**

Analisis kadar bioetanol dilakukan dengan menggunakan alat refraktometer. Refraktometer merupakan alat yang digunakan untuk mengukur kadar atau konsentrasi berdasarkan nilai indeks biasnya. Uji indeks bias dilakukan untuk menentukan kondisi optimum. Oleh karena besarnya nilai indeks bias berbanding lurus dengan konsentrasi bioetanol maka nilai indeks bias yang tertinggi menunjukkan kondisi optimum dari fermentasi.

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Analisis Kadar Selulosa

Limbah batang pisang yang telah melalui proses pengeringan, *crusher* dan *pretreatment* mengalami penurunan berat bahan. Hal ini disebabkan karena menyusutnya bahan setelah pengeringan karena mengandung kadar air yang cukup tinggi dan akibat terlepasnya lignin setelah proses *pretreatment*. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Anindyawati, (2009). Bahwa untuk produksi bioetanol harus melalui beberapa tahapan antara lain delignifikasi untuk melepaskan kandungan selulosa dan hemiselulosa dari ikatan lignin. Proses tersebut menghasilkan data yang ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Data analisis kadar selulosa

Sampel limbah batang pisang	Berat sampel (a)	Berat residu (c)	Berat residu (d)	Kadar selulosa (%)
Sebelum <i>pretreatment</i>	1 g	0,3122 g	0,2440 g	6,82
Setelah <i>pretreatment</i>	1 g	0,4796 g	0,0158 g	46,38

Nilai kadar selulosa pada Tabel 2 menunjukkan bahwa sampel limbah batang pisang sebelum *pretreatment* sebesar 6,82% dan setelah melalui proses *pretreatment* kadar selulosa pada limbah batang pisang sebesar 46,38%. Wilda, dkk (2015) melaporkan kadar selulosa sekam padi sebelum *pretreatment* dengan penggunaan asam sebesar 26,30 % dan setelah *pretreatment* 41,52%. Hal ini

menunjukkan bahwa proses *pretreatment* dengan menggunakan basa dapat meningkatkan kadar selulosa sekitar 7 kali lebih tinggi.

Kandungan lignin material lignoselulosa limbah batang pisang dapat dikurangi dengan *pretreatment* (delignifikasi) menggunakan NaOH 5%. *Preatment* cukup efektif untuk mendegradasi lignin yang terkandung dalam limbah batang pisang. Lignin dapat menghalangi atau memperlambat akses enzim dalam memecah polisakarida pada proses hidrolisis sehingga dapat menurunkan jumlah etanol yang dihasilkan dalam proses fermentasi. Kemampuan NaOH dalam proses biodegradasi lignin karena NaOH dapat menyebabkan hancurnya ikatan polimer pada komponen kimia penyusun limbah batang pisang.

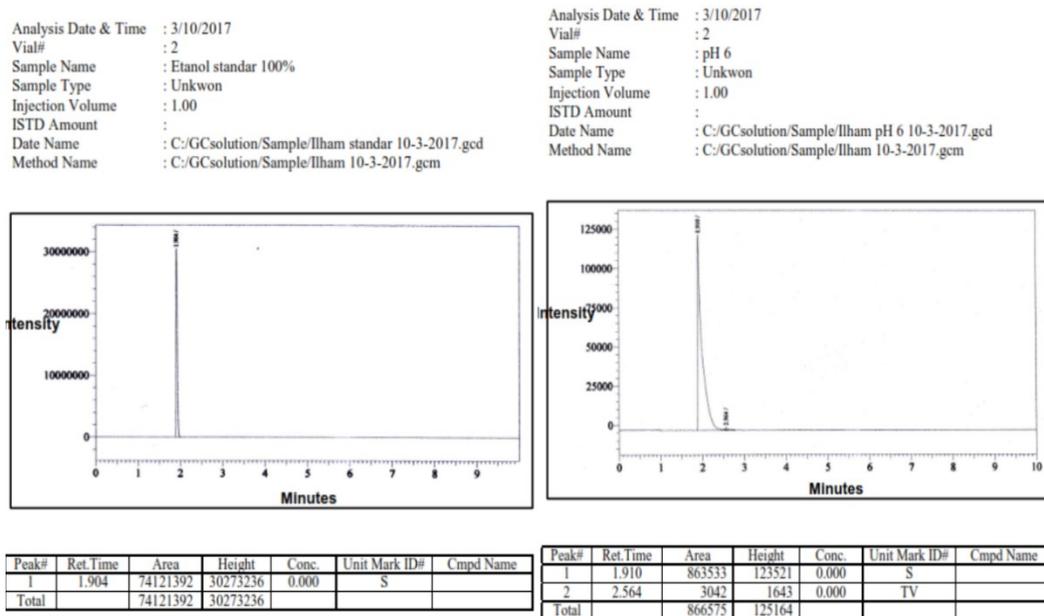
Menurut Elwin, dkk (2013), lignin menurun seiring dengan penambahan konsentrasi NaOH. Hal ini disebabkan penambahan basa alkali berupa NaOH akan mempermudah pemutusan ikatan senyawa lignin. Partikel NaOH akan masuk ke dalam bahan dan memecah struktur lignin sehingga lignin lebih mudah larut yang mengakibatkan penurunan kadar lignin.

Semakin banyak lignin yang terdegradasi maka hidrolisis akan semakin sempurna sehingga proses fermentasi untuk mengkonversi glukosa menjadi bioetanol akan optimal. Banyaknya lignin yang hilang akibat terdegradasi oleh NaOH yang menyebabkan pula terjadinya saponifikasi ikatan ester dari residu lignin atau hemiselulosa menjadi lebih terbuka sehingga struktur selulosa lebih mudah untuk diakses oleh enzim. Apabila hal ini terjadi maka hidrolisis selulosa menjadi glukosa akan lebih mudah. Selain itu dapat menurunkan derajat polimerisasi dan kristalinitas dari struktur selulosa (Sun, 2002).

## 4.2 Analisis kualitatif Gas Chromatografi (GC)

Bioetanol yang telah di dehidrasi kemudian dianalisis secara kualitatif dengan menggunakan alat kromatografi gas (GC). Pada analisis ini digunakan etanol absolut sebagai pembanding atau standar. Hasil analisis dengan menggunakan GC dapat dilihat pada Gambar 7.

Pada analisis kromatografi gas (GC) diperoleh data seperti yang ditunjukkan pada Gambar 7. Kromatogram etanol standar (A) memiliki waktu retensi 1,904. Sampel limbah batang pisang kepok *Musa paradisiaca formatypica* (B) memiliki 2 puncak, pada puncak pertama waktu retensi yang tidak jauh berbeda dari waktu retensi etanol standar yaitu 1,910. Hal ini membuktikan bahwa secara kualitatif pada sampel *Musa paradisiaca formatypica* memiliki kandungan etanol. Pada puncak kedua merupakan zat pengotor dari sampel hasil destilasi. Hal ini bisa disebabkan karena proses dehidrasi yang kurang maksimal pada sampel sehingga masih terdapat air yang belum terikat dengan CaO.



**Gambar 7.** Kromatogram etanol standar (A), Kromatogram sampel limbah batang pisang kepok *Musa paradisiaca formatypica* (B).

### **4.3 Penentuan Kondisi Optimum Fermentasi Berdasarkan Pengaruh Waktu dan pH Fermentasi**

Pada penelitian ini hidrolisis dilakukan secara enzimatik menggunakan bakteri *Clostridium acetobutylicum* yang menghasilkan enzim selulase. Enzim selulase merupakan enzim kompleks yang terdiri dari eksoselulase atau eksobiohidrolase, endoselulase atau endo- $\beta$ -1,4-glukanase dan  $\beta$ -1,4-glukosidase atau selobiase. Bakteri *Clostridium acetobutylicum* dapat menghasilkan enzim selulase untuk memecah monomer-monomer pada selulosa menjadi glukosa, setelah dipecah menjadi glukosa selanjutnya akan diubah menjadi etanol melalui proses fermentasi. Monosakarida yang terbentuk akan diubah oleh enzim oksidase menjadi etanol dan karbondioksida (CO<sub>2</sub>).

Penelitian ini dilakukan beberapa variasi perlakuan yang berbeda agar hasil yang diperoleh dapat dibandingkan satu sama lain. Perlakuan tersebut meliputi variasi waktu fermentasi dan kondisi derajat keasaman (pH) yang berlainan. Waktu fermentasi digunakan variasi 2, 4, 6, 8 dan 10 hari sedangkan pH pada proses ini dikontrol dengan menggunakan buffer posfat, variasi pH yang dilakukan; 5,0; 5,5; 6,0 dan 6,5. Dari variasi waktu fermentasi dan pH ini dapat ditentukan waktu optimum untuk proses SSF dengan melihat kadar tertinggi dari setiap variasi perlakuan.

#### **4.3.1 Penentuan Waktu Optimum Fermentasi**

Waktu merupakan hal yang paling penting dalam proses fermentasi sebab mikroorganisme dalam perkembangannya memerlukan waktu untuk menghasilkan enzim yang berperan sebagai biokatalis untuk merubah selulosa menjadi gula dan selanjutnya menjadi etanol.

Proses pembuatan bioetanol dilakukan dengan variasi waktu fermentasi selama 2, 4, 6, 8 dan 10 hari dengan pH 5,0. pH 5,0 dipilih berdasarkan literatur yang diperoleh Gozan (2007) tentang pH optimum fermentasi enzim selulase, Data hasil pengaruh waktu fermentasi terhadap kadar bioetanol dapat dilihat pada Tabel 3. Kadar bioetanol ditentukan berdasarkan hubungan kadar etanol standar dengan indeks bias (dapat dilihat lampiran 12) melalui persamaan linier.

Tabel 3. Data penentuan kondisi terbaik fermentasi berdasarkan nilai indeks bias bioetanol dengan variasi waktu fermentasi

Waktu (Hari)	Indeks Bias	Kadar Etanol (%)
2	1,3320	3,16
4	1,3320	3,16
6	1,3324	3,83
8	1,3332	5,16
<b>10</b>	<b>1,3355</b>	<b>9</b>

Tabel 3 menunjukkan bahwa pada hari ke-2 sampai hari ke-4 bakteri masih berada pada tahap penyesuaian sehingga peningkatan kadar bioetanol masih sangat lambat. Kadar bioetanol mulai meningkat pada hari ke-6 sebesar 3,83% dan pada hari ke-10 terjadi peningkatan kadar bioetanol sebesar 9% yang merupakan kadar bioetanol tertinggi. Ini disebabkan karena bakteri telah menyesuaikan diri dengan kondisi proses fermentasi.

Waktu fermentasi pada hari ke-2 sampai hari ke-4 peningkatan kadar bioetanol belum meningkat. Pada tahap ini terjadi fase lag yakni fase dimana mikroba masih menyesuaikan diri dengan kondisi lingkungan sehingga aktivitas

mikroba belum optimum. Selama fase ini massa sel bertambah sangat sedikit tanpa disertai penambahan densitas jumlah sel, oleh karena itu laju pertumbuhan sel bisa saja sama dengan nol. Lama fase lag pada bakteri sangat bervariasi, tergantung pada komposisi media, pH, suhu, aerasi, jumlah sel pada inokulum awal dan sifat fisiologis mikroorganisme pada media sebelumnya. Ketika sel telah menyesuaikan diri dengan lingkungan yang baru maka sel mulai membelah hingga mencapai populasi yang maksimum. Fase ini disebut fase logaritma atau fase eksponensial. Fase eksponensial ditandai dengan terjadinya periode pertumbuhan yang cepat. Setiap sel dalam populasi membelah menjadi dua sel. Variasi derajat pertumbuhan bakteri pada fase eksponensial ini sangat dipengaruhi oleh sifat genetik yang diturunkannya. Selain itu, derajat pertumbuhan juga dipengaruhi oleh kadar nutrisi dalam media, suhu inkubasi, kondisi pH dan aerasi. Fase ini terjadi pada hari ke-10 yang ditandai dengan peningkatan kadar bioetanol. Pada hari ke-6 dan ke-8 mulai terjadi reproduksi seluler, dimana perlahan-lahan konsentrasi biomassa meningkat disertai dengan penambahan jumlah sel. Pada saat ini laju pertumbuhan atau reproduksi seluler mencapai titik maksimum, maka terjadi pertumbuhan secara eksponensial. Selama fase eksponensial, laju pertumbuhan sel meningkat sebanding dengan konsentrasi sel pada saat itu.

#### **4.3.2 Penentuan pH Optimum Fermentasi**

Derajat keasaman (pH) merupakan salah satu faktor penting yang mempengaruhi proses fermentasi etanol. Derajat keasaman optimum untuk proses fermentasi antara 5,0 – 6,5. Derajat keasaman yang diinginkan diperoleh dengan menambahkan buffer posfat. Penambahan buffer dimaksudkan agar kondisi pH sesuai dengan besaran yang diinginkan. Hasil yang diperoleh dengan perlakuan

variasi pH terhadap kadar bioetanol dapat dilihat pada Tabel 4. Kadar etanol ditentukan berdasarkan hubungan kadar etanol standar dengan indeks bias (dapat dilihat lampiran 12) melalui persamaan garis linier. Indeks bias yang diperoleh dari penentuan pH optimum disubstitusi kedalam persamaan garis linier (dapat dilihat lampiran 16).

Tabel 4. Data penentuan kondisi optimum fermentasi berdasarkan nilai indeks bias bioetanol dengan variasi pH

pH	Indeks Bias	Kadar (%)
5,0	1,3355	9
5,5	1,3368	11,16
<b>6,0</b>	<b>1,3382</b>	<b>13,5</b>
6,5	1,3330	4,83

Pengaruh pH fermentasi terhadap kadar bioetanol limbah batang pisang *Musa paradisiaca formatypica* pada kondisi waktu 10 hari fermentasi dapat dilihat pada Tabel 4. Dari tabel dapat diketahui bahwa konsentrasi bioetanol paling tinggi dihasilkan pada proses fermentasi dengan pH 6,0 yaitu 13,5%. Konsentrasi ini merupakan konsentrasi bioetanol tertinggi yang diperoleh dibandingkan variasi pH yang lainnya.

Perubahan pH bisa terjadi karena fermentasi tidak hanya menghasilkan etanol tetapi juga menghasilkan senyawa-senyawa lain seperti asam asetat, asam butirat dan asam formiat. Asam asetat dapat dihasilkan oleh kontaminan yang hidup bersama bakteri. Namun ada juga kemungkinan glukosa yang terhidrolisis telah habis terfermentasi menjadi produk lain karena sudah tidak ada lagi

monosakarida yang dihasilkan dari hidrolisis polisakarida. Hal ini bisa disebabkan oleh inhibitor-inhibitor yang ada dalam biomassa antara lain lignin, asam lemah turunan senyawa fenolik.

Tinggi rendahnya kadar bioetanol pada proses fermentasi dapat disebabkan oleh aktifitas enzim yang dihasilkan oleh bakteri. Aktifitas enzim dipengaruhi oleh pH, karena sifat ionik gugus karboksil dan gugus amino mudah dipengaruhi oleh pH. Perubahan pH atau pH yang tidak sesuai akan menyebabkan daerah katalitik atau konformasi enzim berubah. Selain itu pengaruh pH juga menyebabkan denaturasi enzim serta mengakibatkan hilangnya aktifitas enzim. Bakteri *Clostridium acetobutylicum* dapat berkembang baik pada pH 6,0 karena itu konsentrasi bioetanol yang dihasilkan lebih tinggi dari perlakuan pH yang lain.

## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa analisis kadar selulosa limbah batang pisang kepok (*Musa paradisiaca formatypica*) sebelum *pretreatment* diperoleh hasil sebesar 6,82% dan setelah *pretreatment* sebesar 46,38%. Kondisi optimum fermentasi bioetanol secara simultan dari limbah batang pisang kepok (*Musa paradisiaca formatypica*) dengan menggunakan bakteri *clostridium acetobutylicum* diperoleh pada pH 6,0 dan waktu terbaik fermentasi selama 10 hari. Kadar bioetanol yang diperoleh dari sampel limbah batang pisang *Musa paradisiaca formatypica* sebesar 13,5%.

#### 5.2 Saran

Diperlukan penelitian yang lebih lanjut mengenai pengaruh katalis basa dalam proses delignifikasi untuk dapat melihat banyaknya kandungan selulosa dan lignin yang terdegradasi akibat delignifikasi pada limbah batang pisang kepok (*Musa paradisiaca formatypica*) dan perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai penambahan ekstrak ragi pada media fermentasi agar kadar bioetanol yang dihasilkan lebih banyak.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anand, A. P., Vennison, S. J., Sankar, S. G., Prabhu, I. G., Vasan, P. T., Raghuraman, T., Geoffrey, C. J., dan Vendan, S. E., 2009, Isolation and Characterization of Bacteria from the Gut Of *Bombyx Mori* that Degrade Cellulose, Xylan, Pectin and Starch and Their Impact on Digestion. *Journal of Insect Science*. **10**(107): 1-20.
- Anindyawati, T., 2009, *Prospek Enzim dari Limbah Lignoselulosa untuk Produksi Bioetanol*, Pusat Penelitian Bioteknologi, LIPI, Bogor.
- Apriliani, S., Asteria, dan Agustinus, F., 2013, Pembuatan Etanol dari Kulit Pisang Secara Fermentasi. *Jurnal Teknologi Kimia dan Industr*, (2):2 Jurusan Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Diponegoro.
- Arora, S. P., 1989, *Pencernaan Mikroba Pada Ruminansia*, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Azizah, N., Al-Baarri, N., dan Mulyani S., 2012, Pengaruh Lama Fermentasi Terhadap Kadar Alkohol, pH dan Produksi Gas Pada Proses Fermentasi Bioetanol Dari Whey Dengan Subtitusi Kulit Nanas, *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*, **2**(1);72-77.
- Balusu, R., Paduru, R. M. P., Seenayya, G., dan Reddy, G., 2004, Production of Ethanol From Cellulosic Biomass by *Clostridium thermocellum* SS19 in Submerged Fermentation Screening of Nutrients Using Plackett Burman. (<http://www.springerlink.com/content/91323g1780726n12/fulltext.pdf> diakses 12 Februari 2010).
- Budi, M., dan Sasongko., (2007), *Prospek Pengembangan Ubi Kayu Sebagai Bahan Baku Bioetanol Daerah Istimewa Yogyakarta*, [www.distan.pemda.diy.go id](http://www.distan.pemda.diy.go.id).
- Cailliez, C., Benoit, L., Petitdemange, H., dan Raval, G., 1993, Solubilization of Cellulose By Mesophilic Cellulolytic Clostridia Isolated From A Municipal Solidwaste Digester. *Journal of Bioresource Technology*, (online), **43**, 77–83, ([http:// linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/096085249390087R](http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/096085249390087R), diakses 4 Februari 2016).
- Cole, B. J. W. dan Fort, R. C. C., 2007, *Extraction of Valuable Chemicals from Materials Generally Wasted by the Forest product Industry in Maine*, (online), ([Http: Chemistry\\_umeche\\_maine.edu/Fort/cole-Fort.html](http://Chemistry_umeche_maine.edu/Fort/cole-Fort.html), diakses 20 Oktober 2010).
- Cordeiro, N., Belgacem, M. N., Torres, I. C., dan Moura, J. C. V. P., 2003, Chemical Composition and Pulping of Banana Pseudo-Stems, *An*

- International Journal Industrial Crops and Product*, 19 September 2003, 147-154.
- Datta, R., 1981, Acidogenic fermentation of lignocellulose-acid yield and conversion of components, *Biotechnology and Bioengineering*, **23**(9): 2167-2170.
- Demain, A. L., Newcomb, M., dan Wu, J. H. D., 2005, Cellulase, Clostridia, and Ethanol, *Microbiologi And Molecular Biology Reviews*, **69**(1): 124–154.
- Desfrian, F., 2014, *Pengaruh Waktu dan Kadar Saccharomyces cerevisiae Terhadap Produksi Etanol Dari Serabut Kelapa Pada Proses Sakarifikasi dan Fermentasi Simultan Dengan Enzim Selulase*, Skripsi, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pengetahuan Universitas Bengkulu, Bengkulu (Tidak Diterbitkan).
- Desrosier, N. W., 1987, *Teknologi Pengawetan Pangan*, Universitas Indonesia Press, Jakarta.
- Didu, N., 2010, *Produksi Bioetanol dari Sirup Glukosa Ubi Jalar (Ipomea batatas L) secara Fed Batch dengan Menggunakan Saccharomyces cerevisiae*, Tesis, Institut Pertanian Bogor (Tidak Diterbitkan).
- Elwin, Lutfi, M., dan Hendrawan, Y., 2013, Analisis Pengaruh Waktu Pretreatment dan Konsentrasi NaOH terhadap Kandungan Selulosa, Lignin, dan Hemiselulosa Eceng Gondok Pada Proses Pretreatment Pembuatan Bioetanol, *Keteknikan Pertanian Tropis dan Biosistem*, **2** (2): 104-110.
- Emran, I. K., Hamid, A. A., Abdeshahian, P., Yusoff, W. M. W., dan Kalil, M. S., 2014, Enhanced Buthanol Production by Clostridium acetobutylicum NCIMB 13357 Grown on Date Fruit as Carbon Source in P2 Medium, *The Scientific World Journal*, ID 395754, 1-7.
- ESDM, 2005, Pergeseran kebijakan energi akan menguntungkan Sumatera Selatan. [http://dbm.djmbp.esdm.go.id/old/portal-dpmb/modules/news/news\\_detail.php?\\_id=1518](http://dbm.djmbp.esdm.go.id/old/portal-dpmb/modules/news/news_detail.php?_id=1518), diakses pada tanggal 6 Februari 2016.
- Fengel, D., dan Weneger, D., 1989, *Kayu: Kimia, Ultrastruktur, Reaksi-Reaksi*, terjemahan oleh hardjono Sastrohamidjojo, 1995, UGM-Press, Yogyakarta.
- Groggins, P. H., 1992, *Unit Process In Organic Synthesis*, Mc Graw Hill Book Company, New York.
- Hambali, E., Mudjalipah, S., Tambunan, A. H., Pattiwiri, A.W., Hendroko, R., 2007, *Teknologi Bioenergi*, Agromedia Pustaka, Jakarta.

- Hardjo, S., Indrasti, N. S., dan Tajuddin, 1989, Biokonversi Pemanfaatan Limbah Pertanian, Pusat Antar Universitas Pangan Dan Gizi, IPB Bogor.
- Ikram, U., Javed, M. M., Khan, T. S., dan Siddiq, Z., 2005, Cotton Saccharifying Activity of Cellulases Produced by Co-culture of *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride*, *Journal of Agriculture and Biological Sciences*, **1**, 241-245.
- Irawan, C., Dwita, A., dan Pradifa, H., 2013, Pemanfaatan Limbah Batang Pisang (*Musa sp.*) di Kalimantan Selatan Sebagai Alternatif Bahan Baku Pembuatan Kertas, *Teknoin*, (3): 2-10.
- Jalaluddin dan Risal, S., 2003, *Pembuatan Pulp dan Jerami Padi dengan Menggunakan Natrium Hidroksida*, Jurusan Teknik Kimia, Universitas Mallikulsaleh, Lhoksumawe.
- Kennedy, J. F. dan Philips, G. O., 1985, *Cellulosa And Derivates*, John Willey And Sons, New York.
- Leschine, S. B., 1995, Cellulose degradation in anaerobic environments, *Annual Review of Microbiology*, **49**, 399–426.
- Lisnawati, 2000, *Biologi serat abaka (Musa textiles Nee) dan Musa spp. lain berdasarkan sifat fisikokimia dan kelayakannya untuk bahan baku pulp dan kertas*, Skripsi Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Pertanian Bogor, Bogor. (Tidak Diterbitkan).
- Liu, J., dan Yang, L., 2007, Cellulase Production by *Trichoderma koningii* AS3.4262 in Solid-State Fermentation Using Lignocellulosic Waste from the Vinegar Industry, *Food Technology Biotechnology*, (online), **45**, 420 – 425, (<http://hrcak.srce.hr/file/37778>, diakses 12 februari 2011).
- Lokantara, P., 2012, *Analisis Kekuatan Impact Komposit Polyester-Serat Tapis Kelapa dengan Variasi Panjang dan Fraksi Volume Serat yang Diberi Perlakuan NaOH*, Skripsi, Fakultas Teknik Universitas Udayana Kampus Bukit Jimbaran, Bali, Indonesia (Tidak Diterbitkan).
- McCoy, E., Fred, E. B., Petersor, W. H., dan Hastings, E. G., 1926, A Cultural Study of The Acetone Butyl Alcohol Organisms, *Journal of Infectious Diseases*, **39**: 457-483.
- Menon, V., dan Rao, M., 2012, Trends In Bioconversion of Lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept, *Progress in Energy and Combustion Science* **8**(4): 522–550.
- Milala, M. A., Shugaba, A., Gidado, A., Ene, A. C., dan Wafar, J. A., 2005, Studies on the Use of Agricultural Wastes for Cellulase Enzyme Production by

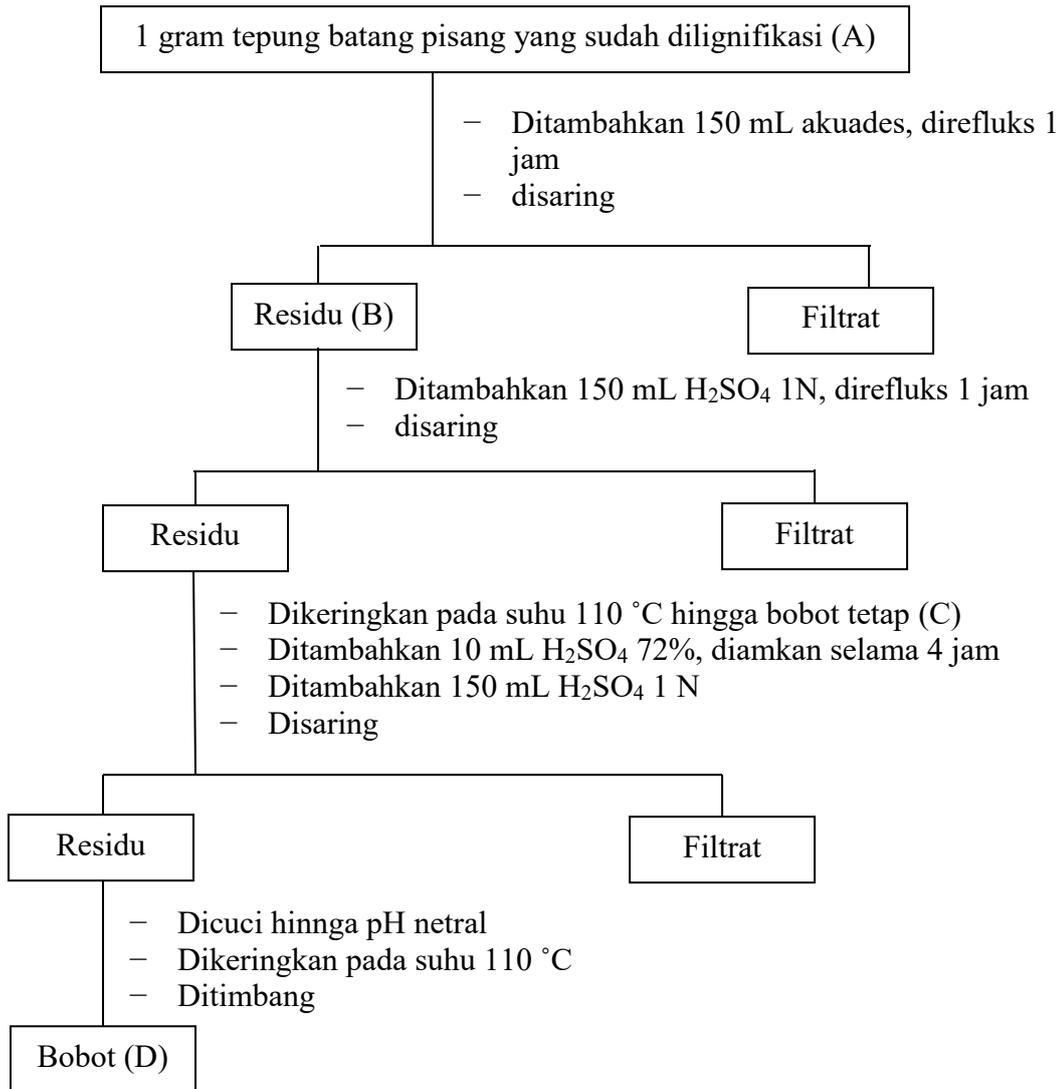
- Aspegillus niger, *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, **1**, 325-328.
- Mosier, N., Wyma, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y., dan Holtzapple, M., 2005, Features of Promising Technologies for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass, *Bioresource Technology*, 673-686.
- Muljono, Judoamidjojo, Darwis, Aziz, A., dan Gumbira, E, 2002, *Teknologi Fermentasi*, Rajawali pers, Jakarta.
- Ngili, Y., 2010, *Biokimia Dasar*, Rekayasa sains, Bandung.
- Rahman, H., 2006. *Pembuatan Pulp dari Batang Pisang Uter (Musa paradisiacal Linn. var uter) Pascapanen dengan Proses Soda*, Skripsi, Fakultas Kehutanan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta (Tidak Diterbitkan).
- Risnoyatiningsih, S., 2011, Hidrolysis of Starch Saccharides From Sweet Potatoes Using Enzyme, *Jurnal Teknik Kimia*, **2**(5):417-424.
- Riyanti, E. I., 2009, Biomassa sebagai Bahan Baku Bioetanol, *Jurnal Litbang Pertanian*, **28** (3) : 101-110.
- Rosyidin, K., Kaharuddin, Y., Amin, R., Andriani, N. K., dan Maharani, D. M., 2015, Assisted Pretreatment With Microwave Heating Untuk Peningkatan Kadar Selulosa Batang Pisang pada Produksi Bioetanol, *Prosiding Simposium Nasional Inovasi dan Pembelajaran Sains 2015 (SNIPS 2015)*, ISBN: 978-602-19655-8-0, 33-36.
- Pereira, A. L., Nascimento, D. M., Filho, S., Cassales, A. R., Morais, J. P. S., Paula, R. C. M., Rosa, M. F., dan Feitosa, J. P. A., 2014, Banana (Musa sp. cv. Pacovan) Pseudostem Fibers are Composed of Varying Lignocellulosic Composition throughout The Diameter, *Bioresources*, **9**(4): 7749-7763.
- Poedjiadi, A., 1994, *Dasar-dasar Biokimia*, Universitas Indonesia Press, Jakarta.
- Rao, S. N. S., 1994, *Mikroba Tanah dan Pertumbuhan Tanaman Edisi Kedua*, UI-PRESS, Jakarta.
- Ruso, S., 2011, *Pembuatan Bioetanol Dari Batang Rumput Gajah (Pennisetum purpureum schumach) Dengan Sistem Fermentasi Simultan Menggunakan Bakteri Clostridium acetobutylicum*, Tesis, Jurusan Kimia Fakultas MIPA, UNHAS, Makassar (Tidak Diterbitkan).
- Santoso, H. B., 1995, *Cuka Pisang*, Kanisius, Yogyakarta.
- Sari, N. I., 2009, Purifikasi Bioetanol Dari Rumput Gajah Dengan Distilasi Batch, Seminar Nasional Teknik Kimia Indonesia, Bandung, (Online),

[www.che.itb.ac.id/sntki2009/daftar/prosiding/OTK08.pdf](http://www.che.itb.ac.id/sntki2009/daftar/prosiding/OTK08.pdf), diakses 25 November 2016.

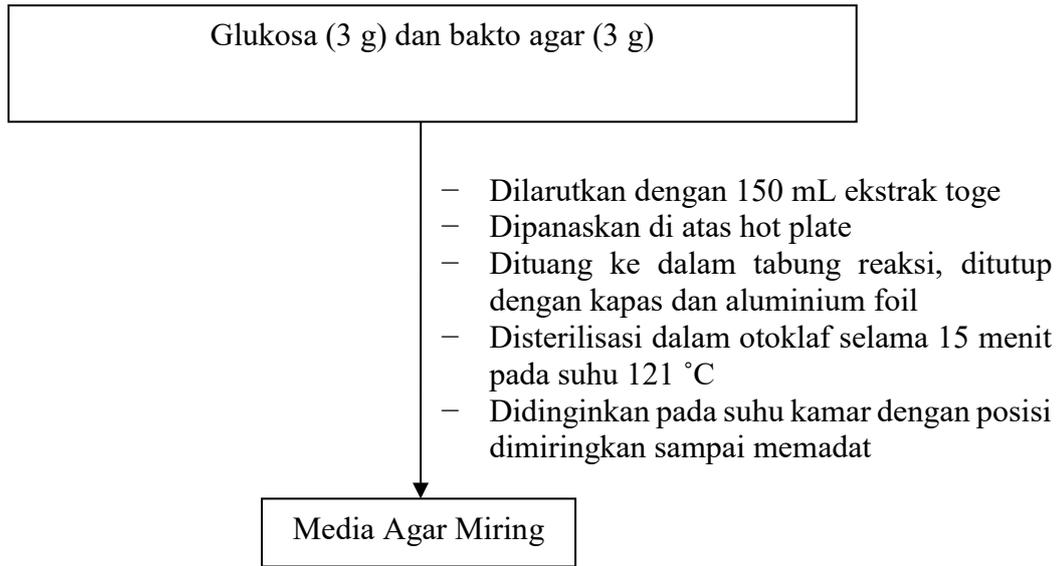
- Sari, R. F., 2010, *Optimasi Aktivitas Selulase Ekstraseluler dari Isolat Bakteri Rf-10*, Skripsi, Departemen Biokimia Fmipa IPB, Bogor (Tidak Diterbitkan).
- Satuhu, S., dan Supriyadi, A., 2008, *Pisang Budidaya, Pengolahan dan prospek Pasar*, Penebar swadaya, Jakarta.
- Seftian, D., Antonius, F., dan Faizal, M., 2012, Pembuatan Etanol Dari Kulit Pisang Menggunakan Metode Hidrolisis Enzimatik dan Fermantasi, *Jurnal Teknik Kimia*, **1**(8): 10-16.
- Selig, M. J., Todd, B., Vinzant, T. B., Himmel, M. E., dan Decker, S. R., 2009, The Effect of Lignin Removal by Alkaline Peroxide Pretreatment on the Susceptibility of Corn Stover to Purified Cellulolytic and Xylanolytic Enzymes, *Appl Biochem Biotechnol*. DOI 10.1007/s12010-008-851 1-x.
- Setiawati, E. L., Gonggo, S. T., dan Abran, P. H., 2016, Penentuan Waktu Optimum Dalam Pembuatan Bioetanol dari Bonggol Pisang Tanduk (*Musa paradisiaca*) Melalui Fermentasi, *Jurnal Akademika Kimia*, **5**(3): 115-120
- Shawn W. J., Bryan, P. T., Stefan, M. G., dan Elfatherios, T. P., 2011, Inactivation of  $\sigma^F$  in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 Blocks Sporulation Prior to Asymmetric Division and Abolishes  $\sigma^E$  and  $\sigma^G$  Protein Expression but Does Not Block Solvent Formation, *Journal of Bacteriology*, **10**(193): 2429-2440.
- Sjostrom, E., 1995, *Kimia Kayu: Dasar-Dasar dan Pemggunaan Edisi Kedua*, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Tanyildizi, M. S., Dursun, Ö., dan Murat, E., 2007, Production of bacterial  $\alpha$ -amylase by *B. amyloliquefaciens* Under Solid Substrate Fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, **37**, 294-297.
- Tomas-Pejo, E., Alvira, P., Ballesteros, M., dan Negro M., 2011. Pretreatment Technologies for Lignocellulose-to-Bioethanol Conversion. Di dalam Pandey A (ed.), *Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes*, pp: 149-176.
- Venkateshwaran, N., dan Elayaperumal, A., 2010, Banana Fiber Reinforced Polymer Composites-A Review, *Journal of Reinforced Plastics and Composites*, 29-2387.
- Whitman, W. B., 2009, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd edition, *The Firmicutes*, (3), New York.

- Wilda, A., Naufala, dan Pandebesie, E. S., 2015, Hidrolisis Eceng gondok dan Sekam Padi untuk Menghasilkan Gula Reduksi Sebagai Tahap Awal Produksi Bioetanol, *Jurnal Teknik ITS*, 4(2): B109-B114.
- Wirahadikusumah, M., dan Madayanti, F., 1990, *Teknologi Enzim*, Pusat Antar Universitas Bioteknologi ITB, Bandung.
- Yeoman, C. J., Han, Y., Dodd, D., Schroeder, C. M., Mackie R. I., dan Cann, I. K., 2010, Thermostable Enzymes as Biocatalysts in the Biofuel Industry, *Applied Microbiology*, **70** : 1-55.

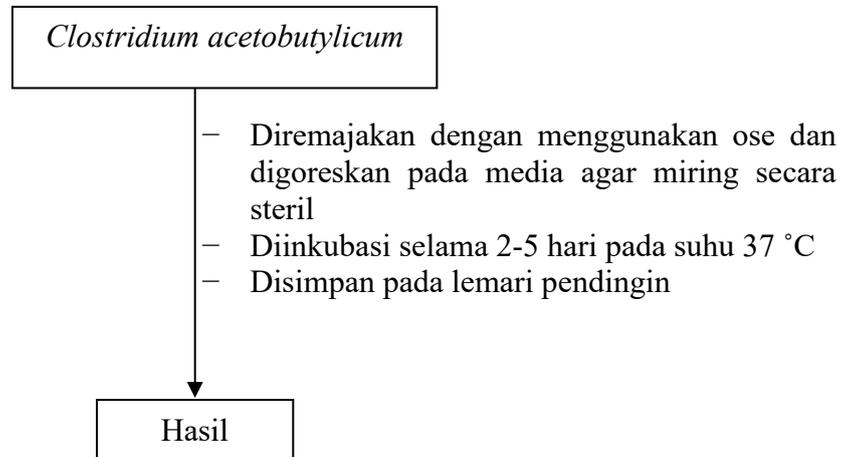
**Lampiran 1. Skema kerja analisis kadar selulosa**



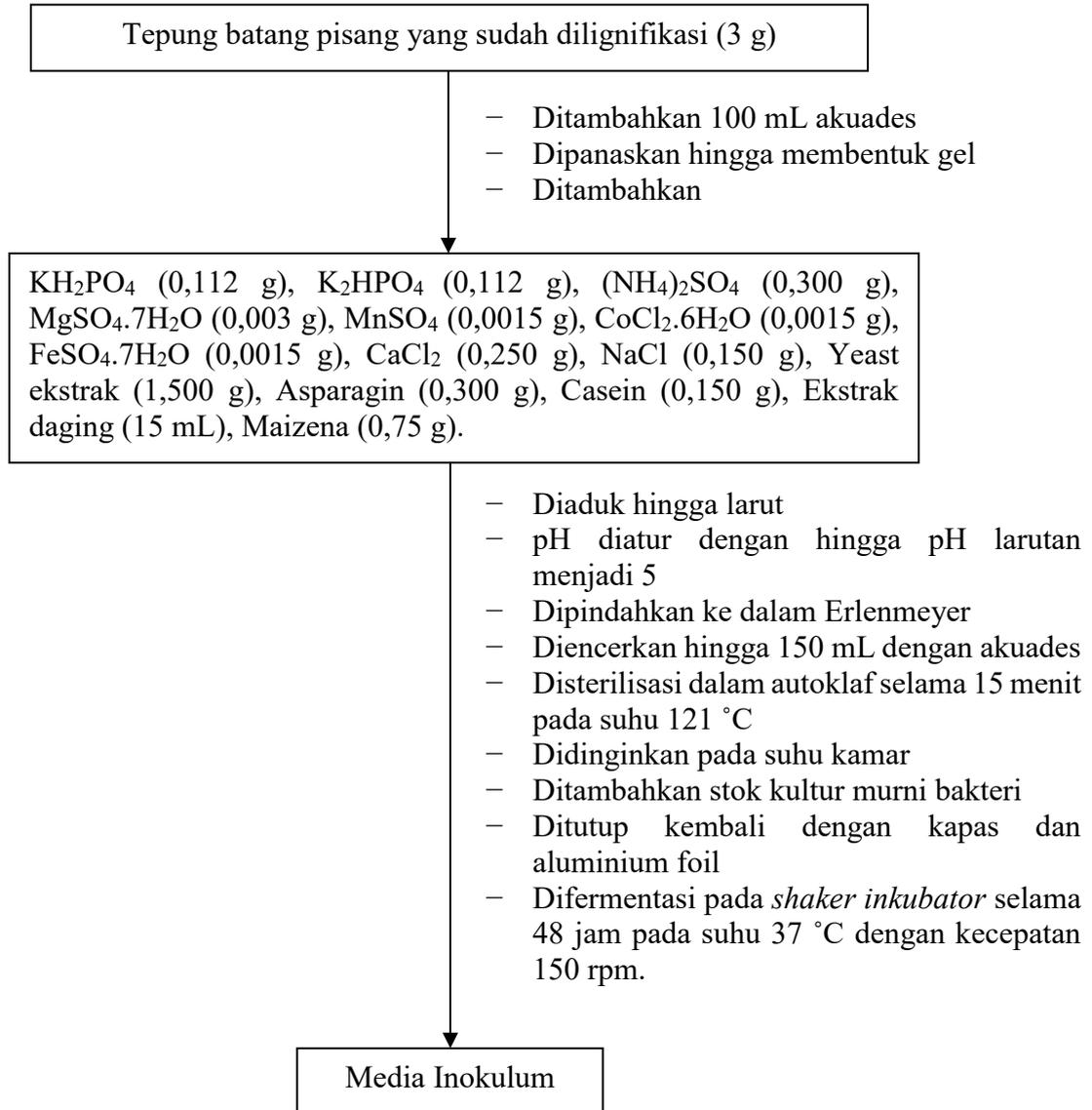
### Lampiran 2. Skema kerja pembuatan media agar miring



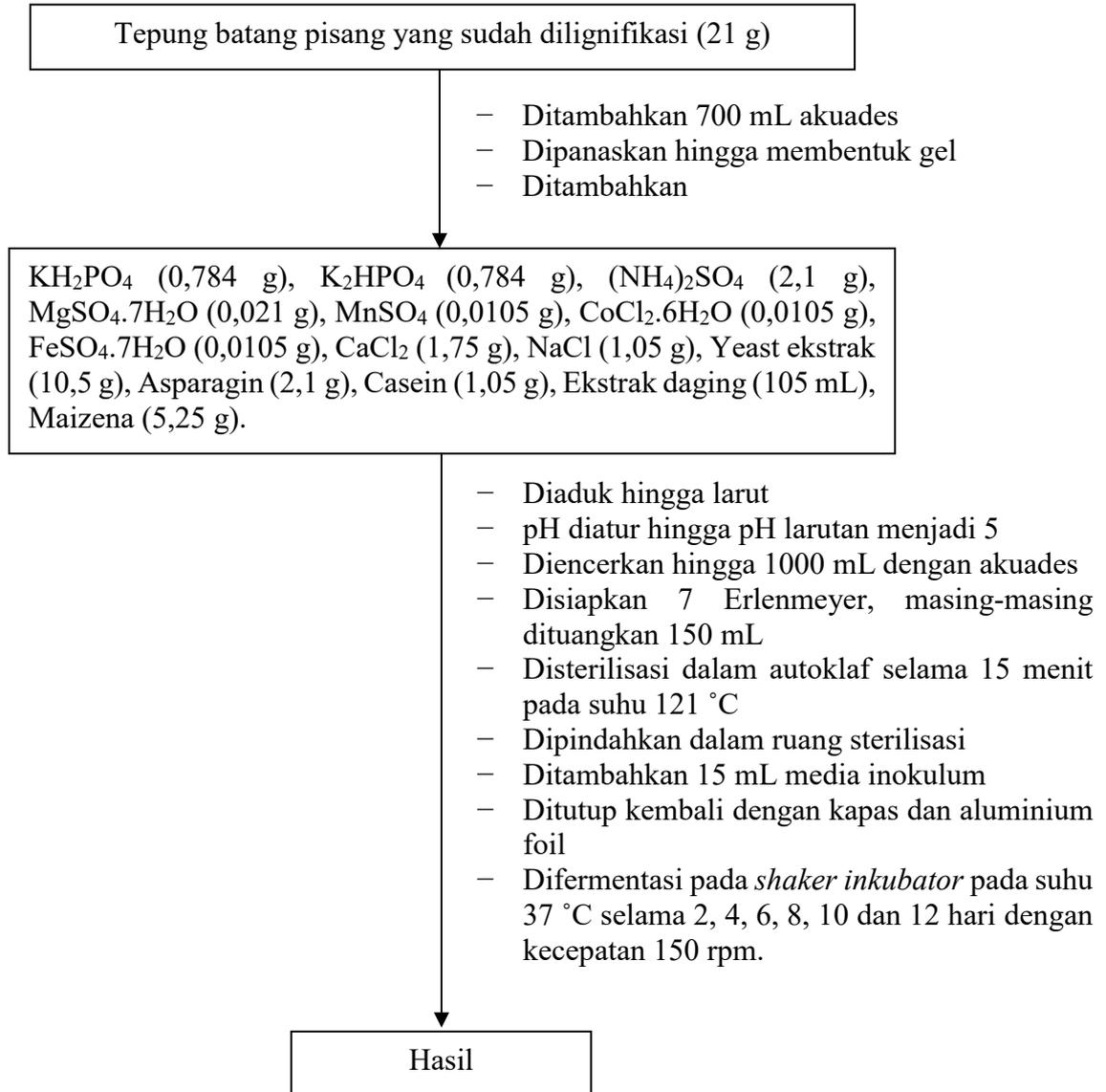
### Lampiran 3. Skema kerja peremajaan bakteri



#### Lampiran 4. Skema kerja pembuatan media inokulum

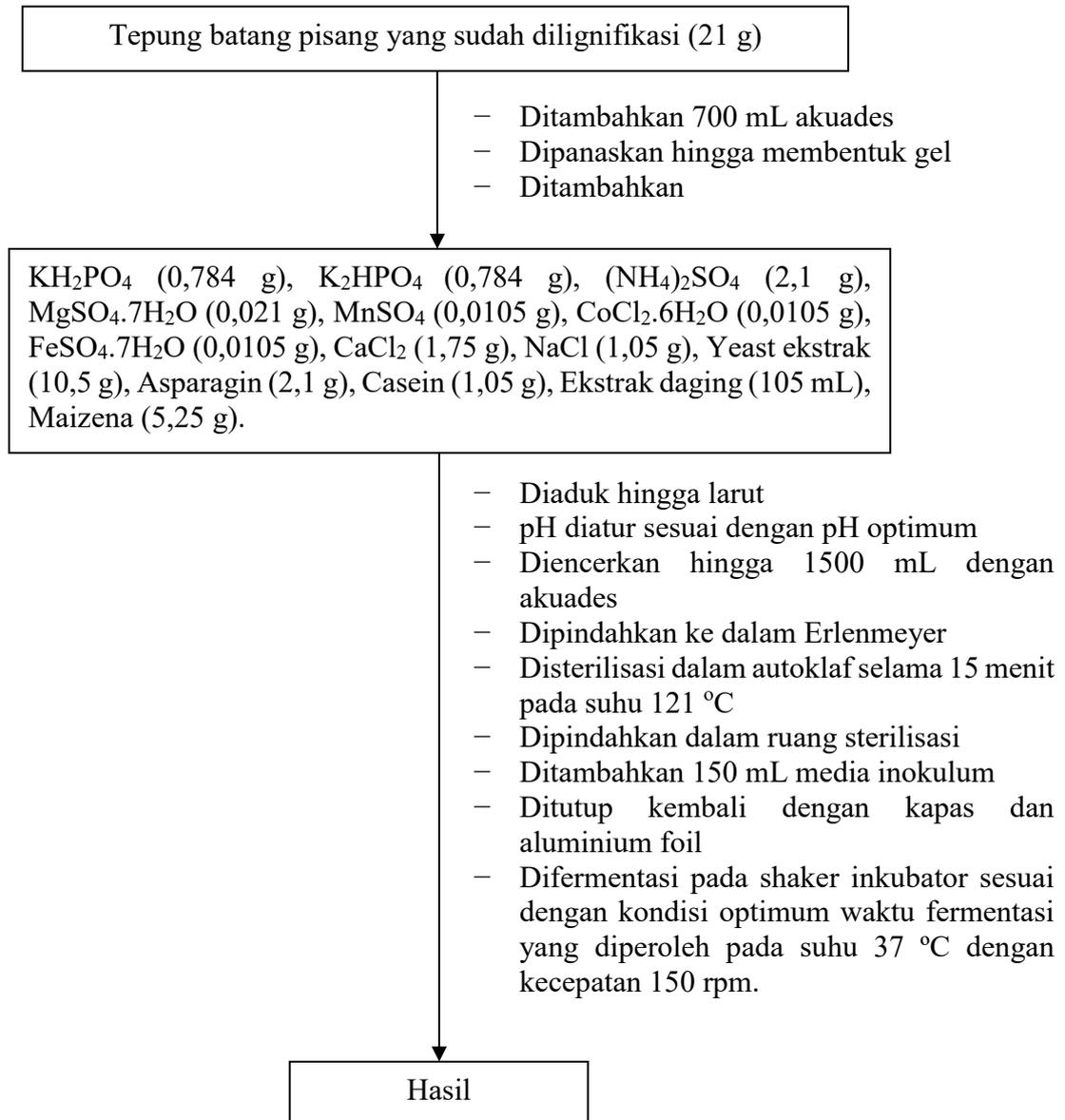


### Lampiran 5. Skema kerja pembuatan media fermentasi



**Catatan :** dilakukan variasi pH pada kisaran 5,0; 5,5; 6,0 dan 6,5 untuk memperoleh pH optimal fermentasi.

## Lampiran 6. Skema kerja pembuatan media produk bioetanol



**Lampiran 7. Komposisi bahan untuk media agar miring**

Bahan	Jumlah (g)
Glukosa	3,00
Bakto agar	3,0
Ekstrak toge	15,00

**Lampiran 8. Komposisi bahan untuk media inokulum**

Bahan	Jumlah (g)
Tepung batang pisang kepok	3,000
$K_2HPO_4$	0,112
$KH_2PO_4$	0,112
$(NH_4)_2SO_4$	0,300
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,003
$MnSO_4$	0,0015
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,0015
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,0015
$CaCl_2$	0,250
$NaCl$	0,150
Ekstrak Ragi	1,500
Asparagin	0,300
Casein	0,150
Ekstrak daging	15 mL
Maizena	0,75

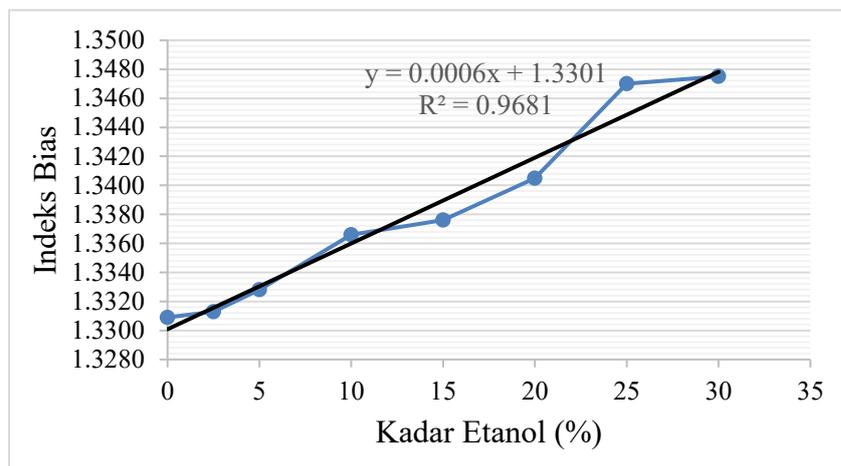
**Lampiran 9. Komposisi bahan untuk media fermentasi**

Bahan	Jumlah (g)
Selulosa dari batang pisang kepok	21,00
$K_2HPO_4$	0,784
$KH_2PO_4$	0,784
$(NH_4)_2SO_4$	2,100
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,021
$MnSO_4$	0,0105
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,0105
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,0105
$CaCl_2$	1,750
$NaCl$	1,05
Ekstrak Ragi	1,05
Asparagin	2,100
Casein	1,050
Ekstrak daging	105 mL
Maizena	5,25

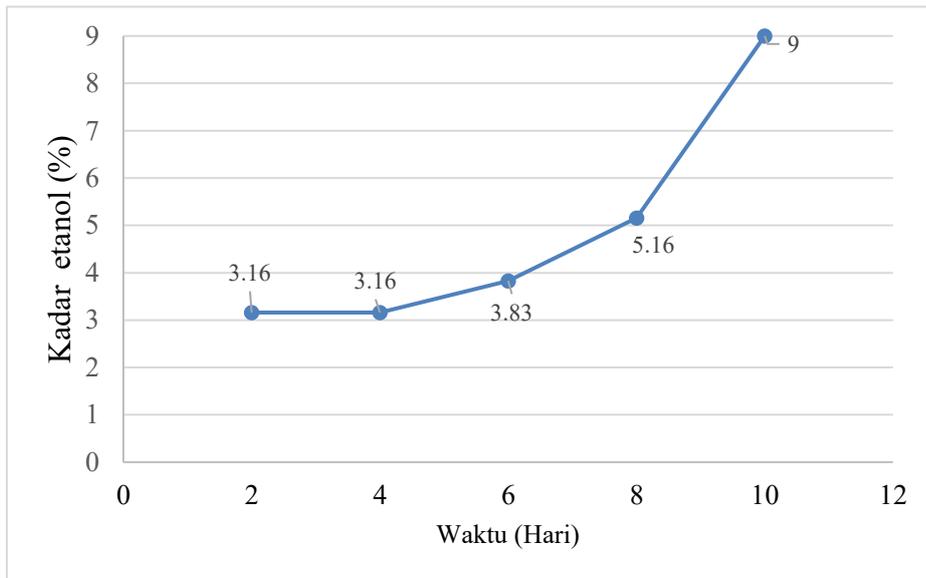
### Lampiran 10. Data penentuan nilai indeks bias etanol standar

No.	Volumen Campuran		Kadar Etanol Standar (%)	Indeks Bias
	Etanol Absolut (mL)	Akuades (mL)		
1.	0	1	0	1,3309
2.	0,025	0,975	2,5	1,3313
3.	0,050	0,950	5	1,3328
4.	0,100	0,900	10	1,3366
5.	0,150	0,850	15	1,3376
6.	0,200	0,800	20	1,3405
7.	0,250	0,750	25	1,3470
8.	0,300	0,700	30	1,3475

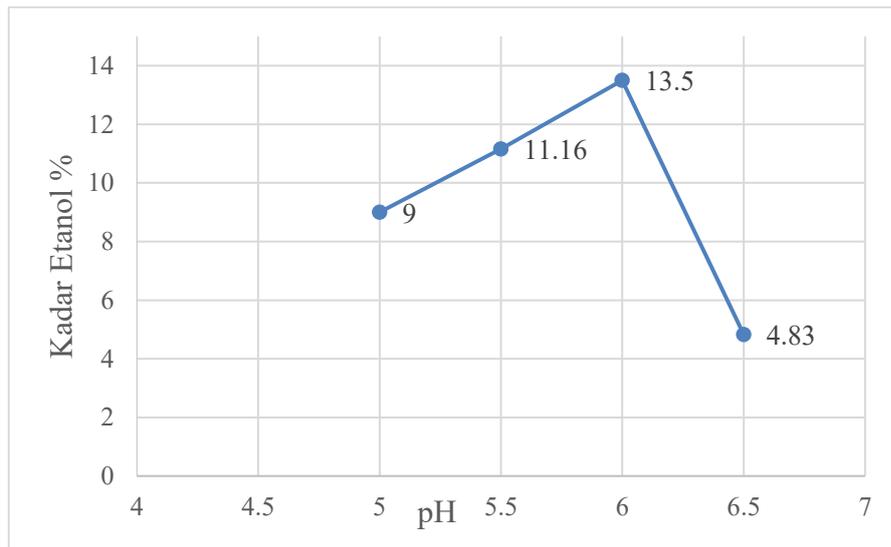
### Lampiran 11. Kurva kalibrasi larutan etanol standar



**Lampiran 12.** Grafik penentuan waktu optimum fermentasi *Musa paradisiaca fomatypica*



**Lampiran 13.** Grafik penentuan pH optimum fermentasi *Musa paradisiaca fomatypica*



#### Lampiran 14. Perhitungan Analisis Selulosa

Setelah dilakukan analisis, maka data berat yang dihasilkan adalah :

Sampel sebelum delignifikasi

Berat a = 1 g

Berat c = 0,3122 g

Berat d = 0,2440 g

$$\text{Kadar selulosa} = \frac{c - d}{a} \times 100\%$$

$$= \frac{0,3112 \text{ g} - 0,2440 \text{ g}}{1 \text{ g}} \times 100\% = 6,82 \%$$

Sampel setelah delignifikasi

Berat a = 1 g

Berat c = 0,4796 g

Berat d = 0,0158 g

$$\text{Kadar selulosa} = \frac{c - d}{a} \times 100\%$$

$$= \frac{0,4796 \text{ g} - 0,0158 \text{ g}}{1 \text{ g}} \times 100\%$$

$$= 46,38\%$$

## Lampiran 15. Perhitungan Kadar Etanol Menggunakan Refraktometer

Pada kurva kalibrasi etanol standar didapatkan persamaan regresi :

$$\begin{aligned} y &= 0,0006x + 1,3301 \\ x &= \frac{y - 1,3301}{0,0006} \end{aligned}$$

x= konsentarsi bioetanol      y = indeks bias sampel

### - Perhitungan Waktu Optimum Fermentasi

$$X_2 = \frac{1,3320 - 1,3301}{0,0006} = 3,16$$

$$X_4 = \frac{1,3320 - 1,3301}{0,0006} = 3,16$$

$$X_6 = \frac{1,3324 - 1,3301}{0,0006} = 3,83$$

$$X_8 = \frac{1,3332 - 1,3301}{0,0006} = 5,16$$

$$X_{35} = \frac{1,3355 - 1,3301}{0,0006} = 9$$

### - Perhitungan pH Optimum Fermentasi

$$- X_{5,0} = \frac{1,3355 - 1,3301}{0,0006} = 9$$

$$- X_{5,5} = \frac{1,3368 - 1,3301}{0,0006} = 11,16$$

$$- X_{6,0} = \frac{1,3382 - 1,3301}{0,0006} = 13,50$$

$$- X_{6,5} = \frac{1,3330 - 1,3301}{0,0006} = 4,83$$

## Lampiran 16. Dokumentasi Penelitian

### 1. Proses Delignifikasi



### 2. Analisis Kadar Selulosa



### 3. Kultur Bakteri *Clostridium acetobutylicum*



### 4. Pembuatan Media Fermentasi



## 6. Proses Destilasi

