

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Bahan bakar fosil dunia telah mengakibatkan peningkatan emisi karbon global. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Ripple, dkk., (2024) menyatakan bahwa pembakaran dan penggunaan bahan bakar fosil yang mengakibatkan meningkatnya emisi karbon mengalami kenaikan 2.1% pada tahun 2023. Akibat dari peningkatan emisi karbon ini ialah perubahan iklim cuaca yang ekstrem sehingga menyebabkan kerusakan lingkungan. Sebagai negara terpadat keempat di dunia, Indonesia menjadi salah satu negara yang menyumbang peningkatan emisi karbon dan merupakan negara dengan emisi karbon terbesar di Asia Tenggara karena masih tingginya penggunaan energi fosil. Emisi karbon yang dihasilkan ini berasal dari energi bahan bakar fosil yang digunakan untuk keperluan proses industri transportasi maupun keperluan rumah tangga, dimana kontributor utamanya berasal dari industri transportasi (Ramadhan, dkk., 2024). Transisi energi yang digunakan Indonesia dalam menekan emisi karbon yaitu penggunaan bahan bakar rendah karbon yaitu Biofuel/Bahan Bakar Nabati (BBN) yang merupakan upaya peningkatan energi bersih yang berkelanjutan. Bahan Bakar Nabati adalah semua bahan bakar yang berasal dari minyak nabati dan dapat berupa biodiesel, bioetanol, dan bio-oil (minyak nabati murni). Pelaksanaan program BBN ini telah dilaksanakan sejak tahun 2006 dengan mencampurkan *biofuel* berupa bioetanol pada bahan bakar minyak (BBM) jenis bensin (Setyadi, 2016).

Bioetanol merupakan *anhydrous* alkohol yang berasal dari fermentasi jagung, sorgum, sagu atau nira tebu dan tanaman lainnya yang berselulosa. Bioetanol pada dasarnya adalah etanol atau senyawa alkohol yang diperoleh melalui proses fermentasi biomassa dengan bantuan mikroorganisme. Etanol adalah senyawa organik yang terdiri dari karbon, hidrogen dan oksigen, sehingga dapat dilihat sebagai derivat senyawa hidrokarbon yang mempunyai gugus hidroksil dengan rumus C_2H_5OH (Susanti, dkk., 2013). Bioetanol yang diperoleh dari hasil fermentasi bisa memiliki berbagai macam kadar. Bioetanol dengan kadar 90-94% disebut bioetanol tingkat industri. Jika bioetanol yang diperoleh berkadar 94-99,5% maka disebut dengan bioetanol tingkat netral. Umumnya bioetanol jenis ini dipakai untuk campuran minuman keras, dan yang terakhir adalah bioetanol tingkat bahan bakar. Kadar bioetanol tingkat ini sangat tinggi, minimal 99,5%. Indonesia memiliki sumber daya alam yang cukup melimpah dan tersebar di berbagai daerah yang dapat digunakan sebagai sumber energi alternatif sehingga dapat diwujudkan desa mandiri energi (Loupatty, 2014).



apat dibuat dari berbagai jenis biomassa, baik yang berasal dari ioetanol G1) maupun dari biomassa lignoselulosa (bioetanol G2). Igunakan bahan baku biomassa lignoselulosa, misalnya limbah erkebunan, sisa pengolahan hasil hutan, atau dari tumbuhan lain faatkan optimal seperti berbagai jenis rumput-rumputan, sorgum enggunaan bahan baku lignoselulosa untuk produksi bioetanol

mendapat perhatian para ahli di bidang pengembangan energi baru terbarukan di berbagai negara. Hal ini karena jumlah bahan baku lignoselulosa berlimpah dan tersedia di hampir semua negara. Bioetanol yang terbuat dari lignoselulosa (bioetanol G2) mengurangi emisi gas rumah kaca lebih besar dibandingkan bioetanol G1 dan bahan bakar fosil. Bahan lignoselulosa adalah kombinasi dari tiga polimer yang berikatan dalam matriks padat. Ketiga polimer tersebut adalah selulosa, hemiselulosa, dan lignin. Kandungan selulosa dan hemiselulosa tersebut dapat dikonversi menjadi bioetanol. Adapun bahan pembuatan bioetanol golongan 2 (G2) seperti rumput laut, limbah pertanian, dan rumput gulma seperti *Echinochloa colona* (Rifa'i, dkk., 2022). Rumput *Echinochloa colona* memiliki nama sinonim yaitu dikenal dengan *jungle rice* atau padi hutan atau juga jajagoan leutik adalah spesies rumput tahunan yang termasuk ke dalam *family Poaceae*.

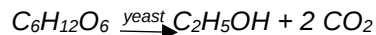
Proses pembuatan bioetanol dari bahan-bahan yang mengandung ligniselulosa melalui tiga proses utama yaitu *pretreatment*, hidrolisis dan fermentasi (Herawati, dkk., 2021). Proses *pretreatment* dilakukan untuk mengkondisikan bahan-bahan lignoselulosa baik dari segi struktur dan ukuran. Proses perlakuan awal dilakukan karena beberapa faktor seperti kandungan lignin, ukuran partikel serta kemampuan hidrolisis dari selulosa dan hemiselulosa (Hendriks dan Zeeman, 2009). Proses *pretreatment* yang sekaligus proses hidrolisis meliputi : perlakuan secara fisik, fisik-kimiawi, kimiawi dan enzimatik. Tujuan dari *pretreatment* adalah untuk membuka struktur lignoselulosa agar selulosa menjadi lebih mudah diakses oleh enzim yang memecah polimer sakarida menjadi monomer gula. *Pretreatment* menyediakan akses yang lebih mudah untuk enzim sehingga akan mengalami peningkatan hasil glukosa dan xilosa (Isroi, dkk (2013).

Proses selanjutnya adalah hidrolisis untuk memisahkan ikatan dan mengurangi ikatan lignin dan hemiselulosa serta memecah struktur ikatan selulosa menjadi gula sederhana (Ferianti, 2012). Hidrolisis meliputi proses pemecahan ikatan lignin yang bertujuan menghilangkan kandungan lignin dan hemiselulosa, merusak struktur kristal selulosa dan meningkatkan porositas bahan Hidrolisis bertujuan untuk memecah polisakarida menjadi monosakarida sehingga dapat langsung difermentasi oleh *yeast*. Adapun hidrolisis secara biologis, yaitu menggunakan enzim. Enzim merupakan protein yang bersifat katalis, sehingga sering disebut biokatalis. Enzim memiliki kemampuan mengaktifkan senyawa lain secara spesifik dan dapat meningkatkan kecepatan reaksi kimia yang akan berlangsung lama apabila tidak menggunakan enzim (Novia, dkk., 2014). Setelah proses hidrolisis selanjutnya dilanjutkan dengan proses fermentasi.

Proses fermentasi merupakan proses biokimia pemisahan karbohidrat menjadi etanol dan karbondioksida yang dihasilkan oleh jamur maupun bakteri alam dimana terjadi perubahan-perubahan atau reaksi-reaksi kimia pada jasad renik penyebab fermentasi tersebut bersentuhan dengan sesuai dengan pertumbuhannya (Sari, dkk., 2018). Selama proses fermentasi atau seluruh bahan akan berubah menjadi alkohol setelah lamanya. Fermentasi oleh *yeast*, misalnya *Sacharomyces*



cerevisiae dapat menghasilkan etil alkohol (etanol) dan CO₂ melalui reaksi sebagai berikut:



Simultaneous Saccharification and Fermentation atau proses SSF secara umum lebih diminati untuk mengurangi biaya produksi etanol. SSF pertama kali dikenalkan oleh Takagi, Abe, Suzuki, Emert, dan Yata (1977), yaitu kombinasi hidrolisis enzimatis dan fermentasi gula menjadi etanol secara simultan dilakukan dalam satu reaktor dan waktu yang bersamaan. Dalam proses SSF polisakarida yang dihidrolisis menjadi monosakarida langsung difermentasi menjadi etanol. Etanol yang terakumulasi tidak menghambat enzim selulase sehingga SSF adalah strategi yang cocok untuk mempercepat laju konversi selulosa menjadi etanol. Sebagai perbandingan, metode SSF mampu menghasilkan etanol hingga 40% lebih banyak daripada metode *Saccharification Hydrolysis and Fermentation* SHF. (Rifa'i, dkk., 2022).

Selain *Saccharomyces cerevisiae*, genus *Trichoderma*, *Aspergillus* dan *Penicillium* termasuk *fungi* yang mampu membantu proses hidrolisis dengan enzim. Selain *fungi*, bakteri yang dapat digunakan dalam hidrolisis fermentasi bioetanol ialah *Zymomonas mobilis*, *Pseudomonas*, *Cellulomonas*, *Bacillus* dan *Clostridium* (Sari, dkk., 2018). *C. acetobutylicum* merupakan bakteri anaerob, sehingga memberikan keuntungan untuk proses fermentasi selulosa yang berlangsung dalam keadaan anaerob. Bakteri *C. acetobutylicum* dapat menghasilkan enzim selulase untuk menghidrolisis selulosa menjadi glukosa. *Clostridium acetobutylicum* merupakan organisme *saccharolytic* (kemampuannya untuk mendegradasi pati ataupun selulosa yang sangat kompleks) dan mampu menghasilkan sejumlah produk yang berguna seperti aseton-butanol-etanol (ABE) (Ruko, 2011). Oleh sebab itu dilakukanlah penelitian tentang pembuatan bioetanol dari rumput *Echinochloa colona* melalui proses sakarifikasi dan fermentasi (SSF) dengan menggunakan bakteri *Clostridium acetobutylicum*.

1.2 Tujuan dan Manfaat Penelitian

1.2.1 Tujuan Penelitian

Mengetahui waktu optimum fermentasi untuk produksi bioetanol dari rumput *Echinochloa colona* dengan menggunakan bakteri *Clostridium acetobutylicum* melalui metode *Simultaneous Saccharification and Fermentation* (SSF).

1.2.2 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah optimasi potensi limbah rumput sebagai bahan dasar pembuatan Bioetanol G2 dengan metode SSF.



BAB 2 METODE PENELITIAN

2.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari sampai bulan Mei 2025 di laboratorium Mikrobiologi Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin.

2. 2 Alat dan Bahan Penelitian

2.2.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah gelas kimia, blender, ayakan 35 mesh, kertas saring, oven, neraca analitik, erlenmeyer, gelas ukur, pipet skala, corong, botol vial, botol UC 1000, botol semprot, batang pengaduk, tabung reaksi, spoit, gunting, *cutter*, *trashbag*, autoklaf, enkas, inkubator, pH meter, shaker, peralatan destilasi, termometer, piknometer, alat GC-MS, dan *hammer mill*.

2.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah NaOH 3%, H₂O₂ 3%, KH₂PO₄, *yeast extract*, (NH₄)₂SO₄, MgSO₄, FeSO₄, CaCl₂, akuades, aluminium foil, kain kasa, kapas, bakteri *Clostridium acetobutylicum*, dan rumput *Echinochloa colona*.

2.3 Prosedur Kerja

2.3.1 Persiapan Sampel

Pengambilan sampel (*sampling*) dilakukan dengan mengambil rumput *Echinochloa colona* menggunakan *cutter* atau sabit. Rumput kemudian dipotong kecil-kecil menjadi ukuran 1-2 cm menggunakan *cutter* atau sabit, lalu dimasukkan ke dalam *trashbag* hingga penuh. Selanjutnya, rumput dipisahkan dari kotoran dan dicuci dengan air yang mengalir. Rumput *Echinochloa colona* yang sudah bersih dikeringkan di bawah sinar matahari menggunakan jaring waring hitam agar lebih cepat kering. Setelah kering rumput *Echinochloa colona* disimpan dalam *trashbag* besar agar tidak terkontaminasi dan dilubangi agar udara masuk sehingga tidak berjamur.

Sampel yang telah kering kemudian dicacah untuk memperoleh tepung/bubuk dari rumput. Pencacahan rumput *Echinochloa colona* menjadi bubuk ini bertujuan untuk memperkecil ukuran partikel rumput, sehingga kontak permukaan dengan enzim dan mikroorganisme selama proses fermentasi menjadi lebih luas. Pertama-tama masukkan rumput *Echinochloa colona* ke dalam mesin pencacah. Kemudian atur ukuran partikel yang diinginkan. Untuk pembuatan bioetanol, ukuran



halus umumnya akan lebih baik karena memperluas permukaan pencacahan hingga seluruh rumput tercacah dengan ukuran yang sukkan rumput yang telah dicacah ke dalam blender industri. an hingga rumput menjadi bubuk dengan ukuran partikel yang partikel yang sangat halus akan mempercepat proses hidrolisis ila. Kemudian ayak bubuk rumput menggunakan ayakan dengan

ukuran 35 mesh. Selanjutnya pisahkan bagian yang masih kasar untuk dihaluskan kembali. Lalu masukkan bubuk rumput yang telah diayak ke dalam kantong plastik atau wadah kedap udara. Setelah itu, simpan di tempat yang kering dan sejuk untuk mencegah kontaminasi dan penurunan kualitas.

2.3.2 Analisis Lignoselulosa

Analisis lignoselulosa menggunakan metode *Van Soest* diawali dengan menentukan kadar *Acid Detergent Fiber* (ADF) dengan cara sampel sebanyak 0,3 g (a gram) dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 45 ml larutan ADS dan tutup rapat. Kemudian dimasukkan ke dalam air mendidih selama 1 jam lalu saring. Penyaringan dilakukan dengan bantuan pompa vakum, juga dengan menggunakan penyaring kaca masir yang sudah ditimbang sebagai b gram. Pencucian dilakukan dengan menggunakan acetone, dan air panas. Masukkan ke dalam oven selama 8 jam atau biarkan bermalam pada suhu 105°C. Setelah itu, dimasukkan lagi ke dalam desikator untuk melakukan pendinginan dan kemudian ditimbang sebagai c gram.

Setelah itu dianalisis kadar *Neutral Detergent Fiber* (NDF). Sample sebanyak 0,3 g (a gram) dimasukkan ke dalam tabung reaksi, serta ditambahkan dengan 45 ml larutan NDS. Masukkan ke dalam air mendidih selama 1 jam lalu saring. Menimbang kaca masir sebagai b gram. Melakukan penyaringan dengan bantuan pompa vakum, lalu dibilas dengan air panas dan acetone. Hasil penyaringan tersebut dikeringkan dalam oven 105°C. Setelah itu dimasukkan lagi dalam eksikator selama 1 jam, kemudian dilakukan penimbangan akhir sebagai c gram.

Selanjutnya analisis kadar lignoselulosa dengan hasil Residu ADF (c gram) yang berada di dalam kaca masir diletakkan di atas nampan yang berisi air setinggi kira-kira 1 cm. Ditambahkan H₂SO₄ 72% sebanyak 20 ml dan dibiarkan selama 3 jam sambil diaduk-aduk. Penyaringan dilakukan dengan bantuan pompa vakum serta, pencucian juga dilakukan seperti analisis sebelumnya. Pengeringan dilakukan dengan menggunakan oven 105°C, dan selanjutnya dilakukan pendinginan dengan desikator dan ditimbang sebagai berat akhir, yaitu e gram. Masukkan ke dalam tanur 500°C, didinginkan dalam desikator serta disimpan kembali sebagai berat akhir, yaitu f gram.

Perhitungan

$$\text{Kadar Acid Detergent Fiber (ADF)} = \frac{c-b}{a} \times 100\%$$

$$\text{Kadar Neutral Detergent Fiber (NDF)} = \frac{c-b}{a} \times 100\%$$

$$\text{Kadar Lignin} = \frac{e-f}{a} \times 100\%$$

$$\text{Kadar Selulosa} = \% \text{ ADF} - \% \text{ lignin} - \% \text{ Abu tak larut}$$



$$\lambda = \% \text{ NDF} - \% \text{ ADF}$$

$$\lambda t = \frac{f-b}{a} \times 100\%$$

el bahan kering
ed glass kosong

- c = Berat sintered glass + residu penyaring setelah diovenkan
- d = Berat sampel asli
- e = Berat sintered glass + lignin + abu tak larut
- f = Berat sintered glass + abu tak larut setelah tanur

2.3.3 Perlakuan Pendahuluan (Pretreatment)

Sampel rumput *Echinochloa colona* yang telah dihaluskan sebanyak 65 gram dicampurkan 600 mL NaOH 3% dalam wadah tertutup sampai sampel terendam dan dibiarkan selama 24 jam sambil sekali-kali diaduk. Kemudian disaring dengan kain penyaring. Residu dicuci dengan akuades hingga lignin yang terikat terlepas dan membuat larutan berwarna hitam pekat. Proses pencucian dihentikan setelah cairan pencuci sudah jernih atau pH netral. Residu yang telah dicuci dimasukkan kembali ke dalam wadah kemudian ditambahkan 600 mL H₂O₂ 3% sampai residu terendam, diaduk dan dibiarkan selama semalam jam dalam keadaan tertutup hingga sisa lignin yang melekat pada residu terlepas. Kemudian sampel dikeringkan dalam oven pada suhu 110°C dan dianalisis lignoselulosa dilakukan dengan menggunakan metode Van Soest.

2.3.4 Peremajaan Bakteri *Clostridium acetobutylicum*

Media *Natrium agar* (NA) dicampurkan dengan 100 mL akuades kemudian dipanaskan di atas *hot plate*. Disiapkan 5 tabung reaksi lalu dipipet 5 mL media ke dalam masing-masing tabung reaksi. Kemudian disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit lalu didinginkan. Biakan murni *C.acetobutylicum* digoreskan secara zig-zag pada media dengan menggunakan ose steril lalu ditumbuhkan dalam inkubator pada suhu 37°C selama 48 jam.

2.3.5 Pembuatan Media

Pembuatan media inokulum dari media NA dilakukan dengan cara bahan KH₂PO₄, *yeast extract*, (NH₄)₂SO₄, MgSO₄, FeSO₄, dan CaCl₂ dilarutkan ke dalam 500 ml akuades kemudian diaduk hingga larut. Kemudian dimasukkan ke dalam elenmeyer sebanyak 50 ml. Kemudian ditutup dengan kapas dan aluminium foil. Kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit lalu didinginkan kemudian ditambahkan stok kultur murni bakteri *C.acetobutylicum* dengan menggunakan ose bulat yang steril dalam ruang sterilisasi. Ditutup kembali dengan kapas dan aluminium foil lalu dishaker selama 48 jam pada suhu 37°C dengan kecepatan 150 rpm.

Selanjutnya pembuatan media inokulum dengan tambahan rumput dilakukan dengan cara bahan KH₂PO₄, *yeast extract*, (NH₄)₂SO₄, MgSO₄, FeSO₄, dan CaCl₂ dilarutkan ke dalam 500 ml akuades kemudian diaduk hingga larut. Kemudian dimasukkan ke dalam elenmeyer sebanyak 50 ml lalu tambahkan 2 gr rumput *Echinochloa colona* dengan kapas dan aluminium foil. Kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit lalu didinginkan kemudian ditambahkan stok kultur murni bakteri *C.acetobutylicum* sebanyak 15 ml di dalam ruang sterilisasi lalu



diatur hingga pH 5. Ditutup kembali dengan kapas dan aluminium foil lalu dishaker selama 48 jam pada suhu 37°C dengan kecepatan 150 rpm.

Pada pembuatan media fermentasi bahan KH_2PO_4 , *yeast extract*, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 , FeSO_4 , dan CaCl_2 dilarutkan dengan akuades kemudian diaduk hingga larut. Kemudian dimasukkan ke dalam 3 buah elenmeyer sebanyak 100 ml lalu tambahkan masing-masing 2 gr rumput *Echinochloa colona* kemudian ditutup dengan kapas dan aluminium foil. Kemudian disumbat dengan kapas dan aluminium foil. Selanjutnya disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Kemudian erlenmeyer dipindahkan ke dalam ruang steril, setelah dingin masing-masing ditambahkan 15 mL media inokulum. Erlenmeyer ditutup kembali dengan kapas, kemudian dishaker pada suhu 37°C dengan kecepatan 150 rpm selama 6, 8, dan 10 hari.

2.3.6 Produksi Bioetanol

Rumput *Echinochloa colona* yang telah dihaluskan dan dicampur di media inokulum akan difermentasi menggunakan media fermentasi yang telah dimasukkan ke dalam 3 buah erlenmeyer. Kemudian setelah disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C lalu ditambahkan 15 mL media inokulum bakteri. Pada hari ke-6 fermentasi, media fermentasi diambil, disaring lalu dianalisis dengan cara destilasi bioetanol. Selanjutnya dilakukan hal yang sama pada hari ke-8 dan 10.

2.3.7 Destilasi

Analisis kandungan bioetanol diawali dengan peralatan destilasi dirangkai dan dinyalakan dengan benar. Kemudian cairan hasil fermentasi dimasukkan ke dalam labu destilasi. Temperatur pemanas dijaga pada suhu 80°C. Proses destilasi dilakukan sampai etanol tidak menetes lagi. Hasil destilasi kemudian didestilasi kembali pada suhu 78°C hingga diperoleh destilat etanol. Sampel bioetanol hasil destilasi ditambahkan CaO hingga jenuh. Didiamkan selama semalam hingga bening kemudian disaring.

2.3.8 Uji Berat Jenis Etanol

Uji berat jenis etanol dilakukan dengan menggunakan alat piknometer. Destilat tiap hari ke-6, 8 dan 10 dimasukkan ke dalam piknometer. Timbang piknometer dalam keadaan kosong, kemudian masukkan destilat ke dalam piknometer, lalu hitung massa destilat dengan cara mengurangi massa piknometer yang berisi destilat dengan massa piknometer yang kosong. Setelah mendapatkan hasil dilakukan perhitungan persamaan berikut:

$$\rho_{\text{bioetanol}} = \frac{m_{\text{pikno}} + m_{\text{spesimen}} - m_{\text{pikno}}}{V_{\text{pikno}}}$$



- = Massa total pikno dan specimen (gr)
- = Massa piknometer (gr)
- = Volume piknometer (mL)
- = Densitas bioetanol (gr/mL)

2.3.9 Analisis Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

Sebanyak 0,5 mL sampel dipipet ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 5 mL metanol. Hasil campuran dihomogenkan menggunakan vortex selama 1 menit lalu di sonikasi pada suhu 65°C selama 20 menit, masukkan ke dalam vial lalu uji kromatografi menggunakan instrumen GC-MS Ultra QP 2010 Shimadzu. Kondisi instrumen dioperasikan pada suhu injektor 250°C dengan mode splitless, tekanan 76,9 kPa dan laju alir 1.4 mL/min dan rasio 1:10. Suhu sumber ion dan interface 200°C dan 280°C, waktu *solvent cut* 3 menit, 400-700 m/z. Jenis kolom SH-Rxi-5Sil MS panjang kolom 30 m dengan diameter dalam 0,25 mm. Suhu awal kolom 700°C dengan waktu tahan 2 menit dan suhu dinaikkan hingga 200°C dengan laju 100°C/min dan suhu akhir 280°C dengan waktu tahan 9 menit dengan laju 50°C/min sehingga total waktu analisa 30 menit. Data kromatogram yang diperoleh diinterpretasi dengan menggunakan *library* NIST 20 pada aplikasi instrumen.

