

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Krisis energi adalah salah satu tantangan terbesar yang dihadapi dunia saat ini. Pertumbuhan ekonomi yang pesat dan peningkatan standar hidup telah mendorong konsumsi energi secara signifikan. Ketergantungan dunia pada bahan bakar fosil yang terbatas, ditambah dengan dampak buruknya terhadap lingkungan, telah membawa ke titik kritis. Perubahan iklim yang semakin ekstrem dan ketidaksetaraan akses energi semakin memperparah situasi. Untuk mengatasi krisis ini, diperlukan tindakan kolektif yang berani untuk beralih ke energi bersih dan berkelanjutan, serta memastikan keadilan energi bagi semua (Logayah et al., 2023).

Peningkatan jumlah populasi manusia seiring dengan meningkatnya pertumbuhan industri dan ekonomi di Indonesia dimana ketergantungan pemakaian bahan bakar minyak (BBM) semakin tinggi sedangkan cadangan sumber bahan bakar semakin menipis. Bioetanol merupakan sumber energi alternatif pengganti bahan bakar minyak yang ramah lingkungan dengan memiliki angka oktan yang lebih tinggi dari premium yaitu 115, premium 88 dan pertamax 98. Bioetanol dapat dihasilkan dari tanaman yang banyak mengandung selulosa. Bioetanol merupakan sumber energi yang dapat diperbaharui sehingga tidak perlu di khawatirkan lagi persediaan sumber energi di Indonesia akan semakin menipis (Herawati et al., 2021).

Kondisi ini menunjukkan bahwa krisis energi adalah tantangan kompleks yang kita hadapi saat ini. Energi adalah kunci pertumbuhan ekonomi, namun penggunaan bahan bakar fosil yang berlebihan telah menyebabkan perubahan iklim dan masalah lingkungan lainnya. Permintaan energi yang terus meningkat, sementara persediaan semakin terbatas, membuat situasi semakin mendesak (Waruwu, 2023). Krisis energi terkait erat dengan beberapa akar penyebab yang mendasar. Salah satunya adalah ketergantungan global yang berlebihan pada bahan bakar fosil. Sebagian besar dunia masih sangat bergantung pada batu bara, minyak bumi, dan gas alam sebagai sumber energi utama. Sumber-sumber ini, meskipun relative murah dan mudah diakses, memiliki konsekuensi serius dalam hal emisi karbon dan dampak negative terhadap lingkungan terutama pada makhluk hidup. Pembakaran bahan bakar fosil adalah penyebab utama terjadinya perubahan iklim dan pemanasan global yang akan mengancam stabilitas iklim dunia (Waruwu, 2023).

Krisis energi, terutama kelangkaan minyak bumi di dunia sudah pasti akan terjadi, mengingat energi tersebut berasal dari fosil yang jumlahnya terbatas di dalam perut bumi. Butuh jutaan tahun bagi fosil yang tertimbun untuk berubah menjadi minyak



ingkatnya kebutuhan akan energi di setiap waktunya dan semakin banyak minyak bumi yang ada bisa mengakibatkan kelangkaan di tahun-tahun mendatang. Jika minyak bumi semakin menipis, maka perlu dipikirkan bahan pengganti dari minyak bumi agar pergerakan di bidang otomotif terus berjalan. Hal ini akan mencegah akan terjadinya kekurangan bahan bakar minyak bumi yang akan berdampak pada transportasi dan pabrik industri yang menyebabkan krisis energi (Saragi, 2020).

Salah satu alternatif yang menjanjikan adalah bioetanol, dimana bioetanol yaitu etanol atau senyawa alkohol yang diperoleh melalui proses fermentasi biomassa dengan bantuan mikroorganisme yang bisa digunakan sebagai bahan bakar alternatif, minyak bumi dan energi lain berasal dari fosil (Novelia et al., 2022). Bioetanol dapat dihasilkan dari tanaman yang banyak mengandung selulosa. Bioetanol merupakan sumber energi yang dapat diperbaharui sehingga tidak perlu di khawatirkan lagi persediaan sumber energi di Indonesia akan semakin menipis. Bioetanol adalah cairan biokimia yang didapat melalui proses fermentasi gula dari sumber karbohidrat (pati), selulosa dan glukosa menggunakan bantuan mikroorganisme (Herawati et al., 2021). Untuk mengantisipasi sumber energi nasional yang semakin menipis, maka diperlukan energi terbarukan. Beberapa peneliti menemukan bahwa banyak limbah yang digunakan sebagai bahan bakar alternatif. Salah satu untuk menghasilkan bioetanol yang berkualitas sebagai pengganti energi alternatif adalah memiliki kadar bioetanol yang sesuai dengan Standar Nasional Indonesia (Novelia et al., 2022).

Bioetanol dapat dijadikan bahan bakar pengganti bensin serta sebagai bahan bakar untuk memasak dalam rumah tangga, dan terbuat dari berbagai jenis tanaman dan limbah. Produksi dan penggunaan bahan bakar bioetanol di Indonesia saat ini masih terbatas, hal ini dikarenakan masyarakat masih bergantung pada bahan bakar fosil. Bioetanol generasi kedua memanfaatkan limbah biomassa sebagai bahan baku dengan mengolah kandungan lignoselulosa yang terdapat pada limbah. Sedangkan produk bioetanol terbaru ini adalah dengan memanfaatkan kandungan karbohidrat yang ada pada alga baik mikroalga maupun makroalga yang dikenal dengan bioetanol generasi ketiga sedangkan rumput *Panicum antidotale* sering digunakan sebagai bahan baku untuk bioetanol generasi kedua (Jannah et al., 2023).

Rumput *Panicum antidotale* adalah spesies rumput yang dominan, sehingga ditemukan tumbuh di lahan normal dan lahan yang dilanda kekeringan. Populasi *Panicum antidotale* yang tumbuh di daerah yang dilanda kekeringan di tanah normal mungkin mengalami tingkat stres air untuk waktu yang lama. Jadi ada kemungkinan bahwa beberapa sifat toleransi kekeringan telah diperbaiki dalam beberapa populasi *Panicum antidotale* yang tumbuh di daerah yang dilanda kekeringan dan populasi ini dapat sangat bervariasi dalam hal toleransi stres air. Kemudian ada kemungkinan juga bahwa populasi ini juga dapat berbeda dalam pengaturan mekanisme toleransi kekeringan (Javed et al., 2024).

Rumput *Panicum antidotale*, seringkali dikenal sebagai rumput tahunan yang tangguh dan adaptif, memiliki potensi besar dalam produksi bioenergi, khususnya bioetanol. Tumbuhan ini telah menarik perhatian para peneliti dan industri karena kemampuannya tumbuh subur di berbagai kondisi lingkungan yang menantang, serta kandungan biomasnya yang tinggi. *Panicum antidotale* adalah kemampuannya untuk tumbuh di daerah kering dan semi-kering. Hal ini membuatnya menjadi pilihan yang dibudidayakan di wilayah dengan keterbatasan air, sehingga tidak memerlukan irigasi yang banyak. Rumput ini memiliki pertumbuhan yang relatif cepat, menghasilkan biomassa dalam jumlah besar dalam waktu singkat. Hal ini meningkatkan efisiensi produksi bioetanol. Rumput ini mengandung kandungan karbohidrat yang cukup tinggi, terutama dalam bentuk selulosa dan pati. Karbohidrat inilah yang akan menjadi bahan utama dalam proses



pembuatan bioetanol. Melalui proses fermentasi ini, karbohidrat ini akan diubah menjadi gula sederhana, kemudian akan difermentasi oleh mikroorganisme tersebut menjadi etanol (Javed et al., 2024).

Metode *Simultaneous Saccharification and Fermentation* (SSF) merupakan teknik yang menggabungkan proses hidrolisis selulosa menjadi gula sederhana dan fermentasi gula menjadi etanol dalam satu reaktor. Metode ini lebih efisien dibandingkan metode lainnya karena mempercepat waktu produksi, mengurangi risiko kontaminasi, serta biaya operasional lebih hemat. Metode SSF telah terbukti efektif untuk produksi bioetanol dari biomassa lignoselulosa dengan menggunakan mikroorganisme seperti *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis*, dan *Zymomonas mobilis* (Dahnum et al, 2015). Dalam melakukan metode ini menggunakan mikroorganismes seperti bakteri. Bakteri seperti *Zymomonas mobilis* adalah salah satu jenis mikroorganisme yang digunakan dalam fermentasi untuk menghasilkan bioetanol. Bakteri tersebut mampu bekerja lebih spesifik dari pada khamir. Selain itu, keunggulan dari bakteri *Zymomonas mobilis* yaitu memiliki toleran terhadap kadar etanol yang tinggi, dan mampu mengkonversi glukosa dari bahan lignoselulosa dengan baik. Bakteri *Zymomonas mobilis* menggunakan jalur *Entner Doudoroff* dalam fermentasi. Energi yang dihasilkan dari proses tersebut akan menyebabkan *Zymomonas mobilis* memiliki cukup energi untuk menguraikan glukosa (Santi dan Widyaningrum, 2022).

Salah satu bakteri yang dapat menghasilkan etanol adalah *Zymomonas mobilis*. Bakteri ini merupakan bakteri gram negatif yang dapat ditemukan pada tumbuh tumbuhan yang kaya gula. Pada umumnya mempunyai panjang 2-6 µm dan lebar 1-1,4 µm. *Zymomonas mobilis* merupakan bakteri anaerob fakultatif. Pemakaian bakteri *Zymomonas mobilis* untuk industri pembuatan etanol mempunyai beberapa keuntungan antara lain kemampuan untuk tumbuh secara anaerob atau tanpa oksigen, hasil produksi lebih tinggi, dan kemampuan fermentasi lebih spesifik dibandingkan khamir atau sejenis jamur (Albert dkk., 2015). Berdasarkan permasalahan yang telah di uraikan sebelumnya, maka dilakukan penelitian tentang uji efektivitas bakteri *Zymomonas mobilis* untuk pembuatan bioetanol dari rumput *Panicum antidotale* menggunakan metode *simultaneous saccharification and fermentation* (SSF) untuk mengetahui pengaruh penggunaan bakteri *Zymomonas mobilis* dalam memproduksi bioetanol dari rumput *Panicum antidotale*.

1.2 Tujuan dan Manfaat

1.2.1 Tujuan

Penelitian ini memiliki tujuan sebagai berikut :

1. Mengetahui efektivitas penggunaan bakteri *Zymomonas mobilis* dalam proses fermentasi dari rumput *Panicum antidotale* menjadi bioetanol.



i bertujuan untuk memberi informasi terkait pemanfaatan rumput sebagai energi alternatif dalam mengatasi permasalahan krisis h maupun efektivitas bakteri *Zymomonas mobilis* dalam produksi *Panicum antidotale*.

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2024 hingga Juni 2025. Analisis Hemiselulosa, Selulosa, dan Lignin dilakukan di Laboratorium Kimia Pakan Fakultas Peternakan, Universitas Hasanuddin. Produksi bioetanol dan preparasi sampel dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin. Pengujian GC-MS dilakukan di Laboratorium Terpadu Teknik Kimia Politeknik Ujung Pandang, Makassar, Sulawesi Selatan.

2.2 Alat dan Bahan Penelitian

2.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi gunting, cutter, sabit, kantong plastik hitam (trashbag), meteran, sumpit, tali rapih, label, kertas putih, kantong plastik merah (untuk plot), ember (wadah mencuci sampel), jaring hitam, ayakan 35 mesh, tabung reaksi, erlenmeyer, gelas kimia, batang pengaduk, gelas ukur, kaca preparat, corong, pipet tetes, toples kaca, botol UC, botol vial 15 mL, bunsen, ose bulat, spoit, talang oven, sendok tanduk, spatula, gegep, rak tabung, labu semprot, magnetic stirrer, karet gelang, blender, oven, timbangan analitik, timbangan analitik digital, hot plate, inkubator, shaker rotator, mikroskop, spektrofotometer, pH meter, enkass dan autoklaf, pompa vakum, tanur, GC-MS, hammer mill, alat destilasi, desikator.

2.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi nutrient agar (NA), K_2HPO_4 , $(NH_4)_2SO_4$, $MgSO_4$, $CaCl_2$, $FeSO_4$, *yeast extract*, NaOH 3%, H_2O_2 3%, HCl, minyak emersi, aquades, kapas, aluminium foil, kertas saring dan kertas label, rumput *Panicum antidotale*, dan isolat bakteri *Zymomonas mobilis*.

2.3 Metode Kerja

2.3.1 Pengambilan dan Preparasi Sampel

Sampling dilakukan pada hari Jum'at, 27 September 2024 di Jln. Poros Pammanjengan No.1, MoncongLoe, Kec. Moncongloe, Kab. Maros, Sulawesi Selatan. Setelah rumput *Panicum antidotale* diambil sebanyak 1 trasbag besar lalu dipotong kecil-kecil menjadi ukuran 1-2 cm menggunakan cutter atau sabit kemudian dipisahkan dari kotoran dan dicuci dengan air yang mengalir sebanyak 3 kali. Rumput *Panicum antidotale* yang sudah bersih dikeringkan di bawah sinar matahari menggunakan jaring



ih cepat kering. Penjemuran dimulai dari hari Sabtu, 28 September 1, 08 Oktober 2024. Setelah kering rumput *Panicum antidotale* ag besar agar tidak terkontaminasi dan dilubangi agar udara masuk

rumput *Panicum antidotale* menjadi bubuk ini bertujuan untuk partikel rumput, sehingga permukaan kontak dengan enzim dan

mikroorganisme selama proses fermentasi menjadi lebih luas. Pertama-tama masukkan rumput *Panicum antidotale* ke dalam mesin pencacah untuk memperoleh ukuran yang kecil dan halus. Untuk pembuatan bioetanol, ukuran partikel yang lebih halus umumnya akan lebih baik karena memperluas permukaan kontak. Hasil pencacahan tersebut dimasukkan ke dalam plastik sampel lalu ditutup rapat kemudian ditimbang dan dicatat hasilnya. Selanjutnya, sampel diblender agar lebih halus lalu diayak menggunakan ayakan 35 mesh sehingga dapat diperoleh bubuk rumput benggala yang akan digunakan untuk tahapan berikutnya. Pisahkan rumput 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 Hemiselulosa, Selulosa, dan Lignin

Kadar Acid Detergent Fiber (ADF). Prosedur ini digunakan untuk mengukur kandungan serat kasar dalam sampel. Pada penelitian ini, sampel rumput *Panicum antidotale* yang telah dihaluskan sebanyak 0,3 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 45 ml larutan ADF dan ditutup rapat. Tabung tersebut dimasukkan ke dalam air mendidih selama satu jam untuk melarutkan komponen yang tidak termasuk serat kasar. Setelah proses perebusan, campuran disaring menggunakan pompa vakum dengan kaca masir yang telah ditimbang sebelumnya (berat = b gram). Residu yang tertahan kemudian dicuci menggunakan aseton dan air panas untuk menghilangkan sisa larutan dan kotoran. Selanjutnya, residu dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C selama delapan jam atau dibiarkan semalam hingga benar-benar kering. Setelah pengeringan, residu didinginkan dalam desikator dan ditimbang kembali (berat c gram) untuk menentukan kadar ADF dalam sampel

Kadar Neutral Detergent Fiber (NDF). Prosedur ini digunakan untuk mengukur kandungan serat kasar total dalam sampel, yaitu senyawa selulosa, hemiselulosa, dan lignin yang merupakan komponen utama dinding sel tanaman. Sampel rumput *Panicum antidotale* sebanyak 0,3 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 45 ml larutan NDF. Tabung tersebut dipanaskan dalam air mendidih selama satu jam agar komponen yang larut dalam larutan deterjen netral dapat terpisah dari serat kasar. Setelah itu, campuran disaring menggunakan pompa vakum dengan kaca masir yang telah ditimbang sebelumnya (berat b gram). Residu hasil penyaringan dicuci dengan air panas dan aseton untuk menghilangkan sisa larutan dan kotoran. Residu kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C, didinginkan dalam desikator selama satu jam, dan ditimbang kembali untuk mendapatkan berat akhir residu (berat a gram). Berat residu ini digunakan untuk menghitung kadar NDF dalam sampel, yang penting dalam menilai kualitas serat kasar dan potensi biomassa sebagai bahan pakan.



n dan Selulosa. Analisa kadar lignin dan selulosa dilakukan n residu ADF (c gram) yang masih berada dalam kaca masir. Kaca as nampan berisi air setinggi 1 cm dan ditambahkan 20 ml H_2SO_4 selama tiga jam sambil sesekali diaduk. Setelah itu, dilakukan encucian seperti pada tahap sebelumnya. Residu kemudian dalam oven pada suhu 105°C, didinginkan dalam desikator, dan

ditimbang sebagai e gram. Langkah terakhir, residu dimasukkan ke dalam tanur pada suhu 500°C, didinginkan dalam desikator, dan ditimbang kembali untuk mendapatkan berat akhir sebagai f gram. Data yang dihasilkan kemudian di hitung menggunakan rumus sebagai berikut:

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

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

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

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

$$\text{Kadar Hemiselulosa} = \% \text{ NDF} - \% \text{ ADF}$$

$$\text{Kadar Abu Tak Larut} = \frac{f-b}{a} \times 100$$

Keterangan :

a = berat sample bahan kering

b = berat sintered 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

Proses ini dilakukan agar struktur lignoselulosa pada biomassa dapat diubah, sehingga meningkatkan ketersediaan selulosa dan hemiselulosa untuk proses fermentasi. Pretreatment dilakukan dalam 3 tahapan yaitu pretreatment basa, asam dan pemanasan. Sampel rumput *Panicum antidotale* kering yang telah dihaluskan, ditimbang sebanyak 130 gram lalu dicampurkan dengan 1200 mL NaOH 3% dalam wadah kaca tertutup hingga sampel terendam, kemudian dibiarkan selama 24 jam sambil sekali-kali diaduk. Selanjutnya sampel disaring dengan kain penyaring. Residu dibilas 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 lalu ditambahkan 1200 mL H₂O₂ 3% hingga seluruh residu terendam, kemudian diaduk dan dibiarkan semalam dalam keadaan tertutup hingga sisa lignin yang melekat pada residu terlepas. Selanjutnya, residu dibilas hingga air bilasan jernih, kemudian residu dikeringkan dalam oven pada suhu 70-80°C selama semalaman. Dikeluarkan sampel dari dalam oven kemudian dihaluskan lagi menggunakan blender lalu ditimbang dan dicatat hasilnya. Selanjutnya masukkan sampel kedalam plastik sampel untuk disimpan pada suhu ruang.

2.3.4 Pembuatan Media



Optimized using
trial version
www.balesio.com

media peremajaan bakteri *Zymomonas mobilis* pada media edium ini menggunakan media Nutrient Agar (NA) miring dilakukan media Nutrient Agar sebanyak 2,8 gram lalu dimasukkan kedalam nambahkan dengan 100 mL aquades. Erlenmeyer kemudian ditutup panaskan diatas *hotplate* hingga media larut dan homogen. Setelah n ke dalam tabung reaksi menggunakan spoit yang masing-masing disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit pada

tekanan 15-20 Psi. Selanjutnya, tabung reaksi dimiringkan menggunakan kain penyangga hingga memadat dan siap digunakan sebagai media peremajaan.

Pembuatan media cair. Pembuatan medium cair untuk pertumbuhan bakteri dilakukan dengan mencampur K_2HPO_4 0,1 gr, $(NH_4)_2SO_4$ 0,05 gr, $MgSO_4$ 0,3 gr, $CaCl_2$ 0,01 gr, $FeSO_4$ 0,05 gr dan *Yeast extract* 2,5 gr dengan 500 mL akuades lalu diaduk hingga larut dan homogen. Kemudian disterilisasi media menggunakan autoklaf pada suhu $121^\circ C$ selama 15 menit.

Pembuatan media inokulum. Pembuatan komposisi bahan untuk media inokulum dilakukan dengan mencampurkan K_2HPO_4 0,1 gr, $(NH_4)_2SO_4$ 0,05 gr, $MgSO_4$ 0,3 gr, $CaCl_2$ 0,01 gr, $FeSO_4$ 0,05 gr dan *Yeast extract* 2,5 gr kemudian dimasukkan ke dalam gelas kimia 500 mL setelah itu ditambahkan 500 mL aquades dan diaduk hingga larut. Ditimbang rumput *Panicum antidotale* yang telah di preatretment sebanyak 2 gr untuk masing-masing erlenmeyer, kemudian rumput dimasukkan kedalam erlenmeyer. Diukur media yang telah dibuat sebelumnya sebanyak 100 mL, lalu dimasukkan kedalam erlenmeyer berisi rumput dan diaduk hingga tercampur merata. Setelah itu pH larutan diukur dan diatur pada masing-masing erlenmeyer dengan variasi pH 3, pH 5, dan pH 7. Pengukuran dan pengaturan pH dilakukan menggunakan pH meter dan penambahan HCl atau NaOH untuk mencapai variasi pH yang diinginkan. Kemudian ditutup dengan kapas dan *aluminium foil*. Kemudian disterilkan dalam *autoklaf* pada suhu $121^\circ C$ selama 15 menit. Didinginkan kemudian diinokulasi bakteri *Zymomonas mobilis* dari media pertumbuhan kedalam media inokulum sebanyak 16 mL menggunakan spoit secara aseptis dalam ruang sterilisasi. Ditutup kembali dengan kapas dan *aluminium foil* lalu difermentasi pada *shaker incubator* selama 48 jam pada suhu $37^\circ C$ dengan kecepatan 150 rpm.

Pembuatan media fermentasi. Pembuatan komposisi bahan untuk media fermentasi dilakukan dengan mencampur, K_2HPO_4 0,2 gr, $(NH_4)_2SO_4$ 0,1 gr, $MgSO_4$ 0,3 gr, $CaCl_2$ 0,02 gr, $FeSO_4$ 0,1 gr dan *Yeast extract* 5 gr kemudian dimasukkan ke dalam gelas kimia 1000 mL setelah itu ditambahkan 1000 mL aquades dan diaduk hingga larut. Disiapkan 9 erlenmeyer dengan variasi hari ke-3, ke-6, dan ke-9 selanjutnya variasi pH 3, pH 6, dan pH 9. Ditimbang rumput *Panicum antidotale* yang telah di preatretment sebanyak 2 gr untuk masing-masing erlenmeyer, kemudian rumput dimasukkan kedalam erlenmeyer. Diukur media yang telah dibuat sebelumnya sebanyak 100 mL, lalu dimasukkan kedalam erlenmeyer berisi rumput dan diaduk hingga tercampur merata. Setelah itu pH larutan diukur dan diatur pada masing-masing erlenmeyer dengan variasi pH 3 hari ke-3, ke-6, dan ke-9, lalu pH 5 hari ke-3, ke-6, dan ke-9, dan terakhir pH 7 hari ke-3, ke-6, dan ke-9. Pengukuran dan pengaturan pH dilakukan menggunakan pH meter dan penambahan HCl atau NaOH untuk mencapai variasi pH yang diinginkan. Kemudian ditutup dengan kapas dan *aluminium foil*. Kemudian disterilkan dalam *autoklaf* pada suhu $121^\circ C$ selama 15 menit. Didinginkan kemudian diinokulasi bakteri *Zymomonas mobilis* kedalam media fermentasi sebanyak 16 mL menggunakan spoit ruang sterilisasi. Ditutup kembali dengan kapas dan *aluminium foil* dan difermentasi pada *shaker incubator* selama 9 hari dengan variasi hari ke-3, ke-6, dan ke-9 dengan kecepatan 150 rpm.



2.3.5 Peremajaan Bakteri *Zymomonas mobilis*

Biakan murni bakteri *Zymomonas mobilis* diinokulasikan ke dalam media Nutrient Agar (NA) miring secara aseptis menggunakan ose bulat, kemudian diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C. Untuk peremajaan bakteri dalam media cair, bakteri yang telah diremajakan dari media padat diinokulasikan ke dalam media cair yang telah disterilkan menggunakan ose bulat. Selanjutnya, bakteri diinkubasi pada suhu ruang selama 48 jam dengan menggunakan *shaker rotator*.

2.3.6 Pembuatan Inokulum dan Produksi Bioetanol

Pembuatan inokulum. Pembuatan ini dilakukan secara aseptis dengan memindahkan media yang telah disterilkan menggunakan autoklaf ke ruang steril dan didiamkan hingga media dingin, kemudian bakteri yang telah diinkubasi selama 48 jam diinokulasikan ke dalam media inokulum sebanyak 16 mL secara aseptis, dan diinkubasi pada suhu ruang menggunakan *shaker rotator* selama 48 jam.

Produksi bioetanol. Produksi bioetanol dilakukan dengan memasukkan media inokulum yang telah berhasil ditumbuhkan kedalam media fermentasi yang telah dibuat sebelumnya. Larutan media fermentasi yang telah dibuat, selanjutnya Larutan media fermentasi yang telah sterilkan dipindahkan ke ruangan steril, setelah dingin ditambahkan 16 mL media inokulum pada 9 erlenmeyer dengan variasi hari ke-3, ke-6, dan ke-9 selanjutnya variasi pH 3, pH 6, dan pH 9. Ditimbang rumput *Panicum antidotale* yang telah di preatretment sebanyak 2 gr untuk masing-masing erlenmeyer, kemudian rumput dimasukkan kedalam erlenmeyer. Diukur media yang telah dibuat sebelumnya sebanyak 100 mL, lalu dimasukkan kedalam erlenmeyer berisi rumput dan diaduk hingga tercampur merata. Setelah itu pH larutan diukur dan diatur pada masing-masing erlenmeyer dengan variasi pH 3 hari ke-3, ke-6, dan ke-9, lalu pH 5 hari ke-3, ke-6, dan ke-9, dan terakhir pH 7 hari ke-3, ke-6, dan ke-9. Pengukuran dan pengaturan pH dilakukan menggunakan pH meter dan penambahan HCl atau NaOH untuk mencapai variasi pH yang diinginkan. Kemudian ditutup dengan kapas dan *aluminium foil*. Kemudian disterilkan dalam *autoklaf* pada suhu 121°C selama 15 menit. Didinginkan kemudian diinokulasi bakteri *Zymomonas mobilis* dari media inokulum kedalam media fermentasi sebanyak 16 mL menggunakan spoit secara aseptis dalam ruang sterilisasi. Ditutup kembali dengan kapas dan *aluminium foil* lalu difermentasi pada *shaker incubator* selama 9 hari dengan variasi hari ke-3, ke-6, dan ke-9 pada suhu 37°C dengan kecepatan 150 rpm.

Kemudian pada hari ke-3, erlenmeyer dengan variasi hari ke-3 lalu pH 3, pH 5, dan pH 7 yang berisi media fermentasi diambil lalu disaring kemudian didestilasi hingga diperoleh destilat etanol. Diulangi prosedur diatas dengan larutan media pH 3, pH 5 dan 7. Selanjutnya dilakukan hal yang sama pada sampel hari ke-6 dan-9.



stilasi dirangkai dan dinyalakan sesuai prosedur yang benar. Cairan g telah disaring kemudian dimasukkan ke dalam labu destilasi. i jaga pada suhu 80°C dan berlangsung selama 8 jam hingga tidak n yang keluar. Hasil destilasi tersebut kemudian didestilasi kembali °C hingga diperoleh hasil destilasi yang lebih murni.

2.3.8 Uji Berat Jenis Sampel

Pengujian berat jenis sampel yang dilakukan pada saat pengujian berat jenis adalah penentuan volume piknometer. Uji berat jenis etanol dilakukan dengan menggunakan alat piknometer. Destilat tiap hari ke-3, 6 dan 9 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:

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

Keterangan:

$m_{\text{pikno}} + \text{spesimen}$ = Massa total pikno dan specimen (gr)

m_{pikno} = Massa piknometer (gr)

V_{pikno} = Volume piknometer (mL)

$\rho_{\text{bioetanol}}$ = Densitas bioetanol (gr/mL)

2.3.9 Uji GC-MS (Gass Chromatography Mass-Spektrofotometry)

Pengujian GC-MS dilakukan dengan mengambil sampel sebanyak 0,5 mL menggunakan pipet 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.

