

**LAPORAN PENELITIAN**  
**TAHUN ANGGARAN 2022**

**PENGEMBANGAN TEKNOLOGI *SMART ENERGY* MELALUI  
PEMANFAATAN LIMBAH PERTANIAN SEBAGAI *BIOETHANOL/*  
*RENEWABLE ENERGY***

Nomor DIPA	:	DIPA BLU-DIPA 025.04.2.423812/2022
Tanggal	:	7 November 2021
Satker	:	(4238120) UIN Maulana Malik Ibrahim Malang
Kode Kegiatan	:	(2132) Peningkatan Akses, Mutu, Relevansi dan Daya Saing Pendidikan Tinggi Keagamaan Islam
Kode Output Kegiatan	:	(050) PTKIN Penerima BOPTN
Sub Output Kegiatan	:	(514) Penelitian (BOPTN)
Kode Komponen	:	(004) Dukungan Operasional Penyelenggaraan Pendidikan
Kode Sub Komponen	:	D Penelitian Pengembangan Pendidikan Tinggi

Oleh:

Dr. Evika Sandi Savitri, MP (197410182003122002)



**KEMENTERIAN AGAMA**  
**LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT (LP2M)**  
**UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG**

**2022**

## HALAMAN PERSETUJUAN

Laporan penelitian dengan judul “Pengembangan Teknologi Smart Energy Melalui Pemanfaatan Limbah Pertanian Sebagai Bioethanol/*Renewable Energy*”

Oleh:

Dr. Evika Sandi Savitri, M.P (NIP. 197410182003122002)

Azizatur Rahmah, M.Sc (NIP. 19860930092019032011)

Retno Novvitasari H. D. M.Sc (NIP. 19831129201101013)

Telah diperiksa dan disetujui *reviewer* dan komite penilai pada tanggal 7 November 2022

Malang, 14 November 2022

*Reviewer 1,*



Prof. Dr. Roihatul Muti'ah, S.F.Apt,  
M.Kes

*Reviewer 2,*



Dr. Zainabur Rahmah, S.Si., M.Si

Komite Penilai,



Prof. Dr. H. M. Zainuddin, M.A

## HALAMAN PENGESAHAN

Laporan Penelitian ini disahkan oleh Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat  
Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang  
Pada tanggal 14 November 2022

### Peneliti

Ketua : Dr. Evika Sandi Savitri, M.P  
NIP. 197410182003122002

Tanda Tangan



Anggota I : Azizatur Rahmah, M.Sc  
NIP. 198609302019032011

Tanda Tangan



Anggota II : Retno Novvitasari H.D. M.Sc  
NIP. 19831129201101013

Tanda Tangan



Ketua LP2M  
UIN Maulana Malik Ibrahim Malang

Prof. Dr. H. Agus Maimun, M.Pd.  
NIP. 19650817 199803

## PERNYATAAN ORISINALITAS PENELITIAN

Kami yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Dr. Evikia Sandi Savitri  
NIP : 197410182003122002  
Pangkat /Gol.Ruang : Lektor Kepala/ IVb  
Fakultas/Program Studi : Sains & Teknologi/ Biologi  
Jabatan dalam Penelitian : Ketua Peneliti

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa dalam penelitian ini tidak terdapat unsur-unsur penjiplakan karya penelitian atau karya ilmiah yang pernah dilakukan atau dibuat oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis disebutkan dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka. Apabila dikemudian hari ternyata dalam penelitian ini terbukti terdapat unsur-unsur penjiplakan dan pelanggaran etika akademik, maka kami bersedia mengembalikan dana penelitian yang telah kami terima dan diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku.

Malang, 14 November 2022

Ketua Peneliti,



(Dr. Evikia Sandi Savitri, MP)

NIP 197410182003122002

## ABSTRAK

Indonesia merupakan negara tropis yang memiliki hasil pertanian dengan ragam yang banyak. Dalam proses pengolahan hasil pertanian tersebut akan menghasilkan limbah berupa biomassa yang mengandung lignoselulosa dan glukosa. Ketersediaan limbah hasil pertanian ini menjadi penting untuk diolah kembali menjadi berbagai kepentingan seperti bioethanol. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengisolasi dan mengidentifikasi IY (indigenous yeast) yang ada pada limbah buah-buahan tropis, menguji potensi IY (indigenous yeast) yang berpotensi dalam fermentasi bioethanol secara *in vitro*, dan menguji potensi bioethanol limbah buah tropis untuk produksi bioethanol. Metode yang dilakukan meliputi uji berbagai jenis limbah buah sebagai media sumber yeast yang berpotensi untuk fermentasi bioethanol. Jenis buah yang digunakan adalah anggur (*Vitis vinifera*), nanas (*Ananas comosus*), Nangka (*Artocarpus integra*) dan manga (*Mangifera indica*). Media yang digunakan untuk enrichment adalah media YMM (yeast maintenance media). Identifikasi yeast dilakukan secara morfologi dengan menggunakan mikroskop. Seleksi yeast yang berpotensi untuk uji produksi bioethanol meliputi Uji toleransi pada Glucose dan Uji toleransi pada Ethanol diukur Optical Density menggunakan Spectrofotometer. Uji produksi bioethanol menggunakan indigenous yeast secara *in vitro* pada media YPG (Yeast Peptone Glucose). Pengujian kadar ethanol menggunakan GC FID. Hasil isolasi dari yeast menggunakan media selektif didapatkan 6 isolate dengan A1 (yang diisolasi dari buah anggur), kode NG1, NG2 yang diisolasi dari buah Nangka dan kode N1, N2, N3 yang diisolasi dari buah Nanas, sedangkan pada buah manga tidak berhasil diisolasi. Hasil uji pada ketahanan glucose dan ethanol terpilih 3 isolate dengan kode A1, NG1 dan NG2. Hasil uji fermentasi produksi bioethanol menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* sebagai control didapatkan kadar bioethanol pada *Saccharomyces* : 6,60%, yeast spesies kode A1 : 3,30%, yeast spesies kode NG1 : 4,5 %, yeast spesies kode NG2 : 4,85%.

Kata kunci : bioethanol, yeast, limbah pertanian organik

## BAB I. PENDAHULUAN

### LATAR BELAKANG

Perkembangan populasi manusia di muka bumi selalu diikuti dengan factor penunjang pemenuhan hidup seperti kebutuhan sekunder berupa kendaraan bermotor yang menggunakan bahan bakar minyak. Dewasa ini penggunaan bahan bakar minyak Indonesia semakin tinggi hingga 1,6 jt barel per hari, sehingga pemerintah selalu membuat kebijakan untuk melakukan pemenuhan kebutuhan konsumsi minyak dan gas dengan membuka pengeboran minyak dan mencari sumber-sumber minyak. Penggunaan bahan bakar fosil ini memberikan beberapa dampak buruk yaitu polusi udara yang mengganggu kesehatan manusia karena emisi karbon yang tinggi dan logam berat Pb. Ketersediaan bahan bakar minyak di alam semakin lama semakin habis karena merupakan sumber energy yang tidak terbarukan sehingga diperlukan alternative penggunaan energy yang terbarukan (renewable energy).

Keadaan ini selalu diikuti dengan terjadinya kerusakan alam yang menyebabkan hilangnya lahan hutan dan sumber daya alam lain. Dalam Al-quran Surat Al A`raf ayat 56 :Dan janganlah kamu berbuat kerusakan di muka bumi, setelah (diciptakan) dengan baik. Berdo'alah kepada-Nya dengan rasa takut dan penuh harap. Sesungguhnya rahmat Allâh sangat dekat kepada orang-orang yang berbuat kebaikan. [al-A`râf/7:56]

وَلَا تُفْسِدُوا فِي الْأَرْضِ بَعْدَ إِصْلَاحِهَا وَادْعُوهُ خَوْفًا وَطَمَعًا إِنَّ  
رَحْمَتَ اللَّهِ قَرِيبٌ مِّنَ الْمُحْسِنِينَ

Ayat tersebut menjelaskan bahwa berbuat kerusakan di muka bumi untuk memenuhi kebutuhan secara berlebihan itu tidak dikehendaki Allah SWT. Allah SWT maha pencipta seluruh alam dan seisinya hendaknya dipergunakan dengan semestinya dan diikuti dengan pembaharuan

sehingga tidak terjadi kepunahan, demikianlah cara bersyukur atas nikmat yang Allah berikan kepada manusia.

Teknologi pengganti energi dari bahan bakar minyak dengan *bioenergy* yang *renewable* telah banyak dikembangkan untuk memenuhi kebutuhan bahan bakar minyak bagi manusia. *Bioenergy renewable* secara umum terbagi menjadi tiga yaitu biofuel (biodiesel dan bioetanol), biogas, dan biomassa padat (serpihan kayu, biobriket serta residu pertanian) (Bappenas, 2015). Ketiga jenis bioenergy dapat dihasilkan dari sumber daya alam di Indonesia. Ketersediaan sumber daya alam yang dimiliki Indonesia cukup mampu untuk diubah menjadi *bioenergy renewable* dan membutuhkan teknologi yang cukup sederhana.

Bioethanol adalah salah satu bentuk energi terbarukan yang dapat diproduksi dari tumbuhan. Bahan baku pembuatan bioethanol generasi pertama yang banyak terdapat di Indonesia antara lain singkong atau ubi kayu, jagung, ubi jalar, dan tebu. Semuanya merupakan biomassa yang kaya karbohidrat dan berasal dari tanaman penghasil karbohidrat atau pati. Bioethanol dapat dibuat dari tanaman-tanaman yang umum, misalnya tebu, kentang, singkong, dan jagung. Produksi biofuel/bioethanol dari biomassa ini bersaing dengan aplikasi dan pemanfaatan lain yang bukan bagian dari sektor energi. Kekhawatiran baru-baru ini muncul bahwa produksi biofuel bersaing dengan produksi pangan. Kekhawatiran mengenai produksi dan adanya kemungkinan naiknya harga makanan yang disebabkan karena dibutuhkan lahan yang sangat besar, ditambah lagi energi dan polusi yang dihasilkan dari keseluruhan produksi etanol, terutama tanaman jagung. (Rutz, D., & Janssen, R., (2007). Pengembangan teknologi energi terbarukan dengan munculnya komersialisasi dan produksi etanol selulosa dapat memecahkan masalah ini.

Indonesia merupakan negara tropis yang memiliki hasil pertanian dengan ragam yang banyak. Dalam proses pengolahan hasil pertanian tersebut akan menghasilkan limbah berupa biomassa yang mengandung lignoselulosa. Ketersediaan limbah hasil pertanian ini menjadi penting untuk diolah kembali menjadi berbagai kepentingan seperti bioethanol.

Alternatif bahan bakar yang digunakan untuk pengganti bahan bakar fosil berupa bioethanol ini menjadi sebuah project penting untuk *renewable smart energy*. Beberapa sumberdaya yang dapat digunakan sebagai bioethanol adalah bahan yang mengandung selulosa, karbohidrat dan pati. Selulosa dan karbohidrat ini lebih banyak terdapat pada tumbuhan. Kandungan selulosa, karbohidrat dan pati pada limbah hasil pertanian seperti tongkol jagung, bagasse tebu, batang jagung, jareami, serbuk gergaji, biomassa rumput dan sisa sayuran.

Limbah pertanian yang sebagian besar mengandung selulosa, karbohidrat dan gula dengan jumlah melimpah di Indonesia ini perlu dilakukan proses lebih lanjut untuk menghasilkan bioethanol.

Produksi bioethanol dari biomassa lignoselulosa merupakan salah satu upaya untuk meningkatkan perekonomian dan efisiensi lingkungan. Teknologi bioethanol lignoselulosa membutuhkan beberapa perlakuan khusus yang berbeda dengan teknologi produksi bioethanol yang berasal dari pati, karbohidrat dan gula. Teknik ini membutuhkan perlakuan meliputi pretreatment, hidrolisis enzimatis, fermentasi dan distilasi. *Pre treatment* yang dilakukan pada proses pembentukan bioethanol merupakan tahap awal yang menentukan efisiensi proses selanjutnya. *Pre treatment* yang dilakukan berfungsi untuk mengubah lignoselulosa menjadi lebih mudah terlarut dalam air, proses ini penting untuk fase hidrolisis setelah proses pretreatment. Pretreatment bisa dilakukan dengan pemberian larutan asam atau basa dapat juga dengan enzim hidrolisis pemecah lignoselulosa. Dalam proses pretreatment dilakukan beberapa perlakuan untuk memaksimalkan proses pemecahan lignoselulosa menjadi struktur yang lebih sederhana.

Bioethanol dihasilkan melalui proses fermentasi, dimana terdapat pemecahan selulosa dan karbohidrat oleh bakteri selulolitik dan proses fermentasi oleh *Saccharomyces cerevisiae* (ragi) untuk pembuatan tape dan roti (Icoz, et al, 2009). Pada tahap fermentasi gula akan diubah menjadi ethanol berupa cairan dan karbondioksida berupa gas. Ethanol yang dihasilkan merupakan bioethanol yang dapat digunakan sebagai bahan bakar *renewable*. Pengembangan teknologi *energy renewable* ini penting untuk dilakukan sebagai kajian untuk *smart energy* yang dibutuhkan secara terus menerus oleh manusia.

Penelitian ini akan mengembangkan teknologi bioethanol yang berasal dari berbagai limbah pertanian yang mengandung lignoselulosa, sehingga menghasilkan bioethanol terbaik dengan kadar tinggi dan nilai oktan tinggi. Pemilihan biomassa yang digunakan dalam proses pembentukan bioethanol ini menjadi penting untuk mengefektifkan proses fermentasi. Sehingga perlu uji biomassa terkait kadar selulosa, kadar gula serta karbohidrat. Proses fermentasi yang menjadi perantara gula dan bioethanol dapat terjadi karena bantuan bakteri selulolitik yang menggunakan enzim yang digunakan untuk menghidrolisis karbohidrat menjadi gula sederhana. Proses fermentasi ini perlu *pretreatment* untuk memaksimalkan proses dalam pembentukan bioethanol. Perlakuan *pretreatment* menjadi perantara yang penting untuk keseimbangan reaksi enzimatik untuk proses selanjutnya. Pretreatment yang lain yang perlu diperhatikan adalah penggunaan bahan kimia asam/basa untuk mempercepat penguraian. Kemudian dalam proses fermentasi memerlukan suhu, pH, waktu yang cukup sehingga



menghasilkan bioethanol terbaik. Parameter-parameter ini merupakan penunjang terbentuknyabioethanol yang akan diamati dalam penelitian ini.

### **RUMUSAN MASALAH**

1. Apakah terdapat indigenenous yeast (IY) pada buah buahan tropis ?
2. Apakah terdapat indigenenous yeast (IY) yang berpotensi dalam fermentasi bioethanol melalui uji ketahanan glucose, ethanol dan kadar bioethanol hasil fermentasi ?
3. Bagaimanakah potensi indigenenous yeast (IY) untuk menghasilkan bioethanol secara in vitro ?

### **TUJUAN PENELITIAN**

1. Mengisolasi indigenenous yeast (IY) yang ada pada buah buahan tropis
2. Menguji potensi indigenenous yeast (IY) yang berpotensi dalam fermentasi bioethanol melalui uji ketahanan glucose, ethanol dan kadar bioethanol hasil fermentasi
3. Menguji potensi indigenenous yeast (IY) untuk menghasilkan bioethanol secara in vitro

## BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

Energi bioethanol merupakan cairan hasil dari proses fermentasi gula (selulosa) dengan bantuan bakteri pendegradasi selulosa (Farida, *et.al*, 2015). Biofuel sudah digunakan sejak tahun 1898 dengan ditemukannya kendaraan bermotor oleh Rudolph Diesel dengan teknologi biodiesel yang menggunakan minyak kacang sebagai bahan utama untuk menghasilkan penggerak motor, kemudian tahun 1940 Henry Ford menciptakan kendaraan dengan penyimpanan ethanol, tetapi berhenti ketika ditemukan bahan bakar fosil berupa bensin memiliki harga yang lebih murah (Icoz, *et al*, 2009). Bioetanol (etil alkohol, alkohol biji-bijian,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$ ) adalah biofuel cair dapat diproduksi dari beberapa bahan baku dan konversi biomassa yang berbeda, diproses melalui reaksi fermentasi menggunakan mikroorganisme (Balat *et al.*, 2008). Bioetanol dapat dihasilkan dari berbagai sumber daya alam seperti molase, bahan bertepung dan lignoselulosa (Suresh, *dkk.*, 1999). Ada berbagai bahan baku dari etanol dari bahan bertepung seperti singkong, jagung, biji sorgum, gandum, jelai; dari tanaman gula seperti tebu, bit gula, sorgum manis; dari bahan lignoselulosa seperti kayu dan batang tanaman. Bioetanol memiliki angka oktan yang lebih tinggi, lebih luas batas mudah terbakar, kecepatan nyala lebih tinggi dan lebih tinggi titik didihnya dibandingkan bensin. Hal ini memungkinkan rasio kompresi yang lebih tinggi, waktu pembakaran yang lebih pendek dan mesin bakar yang lebih ramping, yang mengarah pada teori keunggulan efisiensi dibandingkan bensin di internal mesin pembakaran (Balat, 2011). Kekurangan dari bioetanol termasuk kepadatan energi yang lebih rendah daripada bensin (<60%), korosifnya, nyala api luminositas rendah, tekanan uap lebih rendah, dapat bercampur dengan air, dan toksisitas terhadap ekosistem (Mac Lean & Lave, 2003).

Bioetanol merupakan pengganti bahan bakar fosil yang menjanjikan untuk mengatasi krisis energi. Untuk meningkatkan perekonomian dan efisiensi lingkungan produksi bioetanol dari biomassa lignoselulosa merupakan metode terbaik. Metode yang dibutuhkan meliputi pretreatment, hidrolisis enzimatik, fermentasi dan distilasi. (Chen, 2021)

Perlakuan pre treatment awal merupakan prasyarat penting untuk mengatasi biomassa dan meningkatkan efisiensi konversi etanol polisakarida. Perlakuan awal bisa secara fisik, kimia dan biologis. Secara fisik dilakukan untuk memperkecil partikel lignoselulosa sehingga memudahkan air dapat masuk ke dalam selulosa dan

mudah terurai menjadi karbohidrat dan gula. Pre treatment secara fisik dapat menggunakan pencacahan sampel menjadi bagian lebih kecil dan halus ( Liu and Shen. 2007). Perlakuan kimia dapat menggunakan perlakuan larutan asam basa dan enzimatis yang masing-masing pelarut asam mampu mengubah lignoselulosa yang sifatnya sulit untuk dipecah lebih lunak.

Untuk mencapai hasil etanol yang lebih tinggi dan laju fermentasi etanol yang lebih cepat, eksperimen ortogonal fermentasi etanol dengan ragi dari batang sorgum manis dilakukan untuk menyelidiki efek faktor utama, yaitu suhu fermentasi, laju agitasi, dan pH terhadap rendemen etanol dan laju kehilangan berat CO<sub>2</sub>. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kondisi optimal untuk fermentasi bioethanol yaitu suhu fermentasi, laju agitasi, dan pH. adalah 37 ° C, 200 rpm, 25% dan 5.0, Hasil percobaan menunjukkan bahwa rendemen etanol dan penurunan berat CO<sub>2</sub> adalah 98,07% dan 1,020 g h<sup>-1</sup>, masing-masing. Hasil fermentasi etanol pada bioreaktor 5 L menunjukkan rendemen etanol dan waktu fermentasi berturut-turut adalah 93,24% dan 11 jam. (Liu, R., & Shen, F., 2008).

Jerami padi adalah salah satu stok pakan lignoselulosa yang melimpah di dunia dan telah dipilih untuk memproduksi etanol dengan cara yang layak secara ekonomi. Biomassa ini berisi campuran gula (heksosa dan pentosa). Hidrolisis asam biphasic dilakukan dengan asam sulfat menggunakan jerami padi. Setelah hidrolisis asam, gula, furan dan fenolat diukur. Konsentrasi awal gula ditemukan 16,8 gram L<sup>-1</sup>. Namun untuk meningkatkan hasil etanol, konsentrasi gula awal hidrolisis dipekatkan menjadi 31 g L<sup>-1</sup> dengan distilasi vakum. Konsentrasi gula, fenol dan furan diukur dan kemudian didetoksifikasi dengan pengapuran berlebih untuk digunakan untuk fermentasi etanol. Konsentrasi etanol ditemukan menjadi 12 g L<sup>-1</sup>, dengan hasil, produktivitas etanol volumetrik dan efisiensi fermentasi 0,33 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, 0,4 g g<sup>-1</sup> dan 95%, masing-masing dengan kultur bersama OVB 11 *Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipitis* NCIM 3498. (Yadav, et al., 2011).

Perlakuan awal merupakan prasyarat penting untuk mengatasi biomassa yang rekalsitran dan meningkatkan efisiensi konversi etanol polisakarida. Dibandingkan dengan yang lain metode pretreatment, air panas cair/liquid hot water (LHW) pretreatment dengan membuat selulosa lebih mudah diakses oleh enzim tetapi meminimalkan pembentukan produk degradasi yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme fermentasi. Peningkatan proses LHW untuk bahan baku biomassa yang berbeda, perilaku dekomposisi biomassa di proses LHW, hidrolisis enzimatis substrat yang diolah LHW, dan produksi produk bernilai tambah tinggi dan etanol. Selain itu, proses gabungan memproduksi etanol dan produk bernilai tambah tinggi membuat pretreatment LHW dapat diterima dalam biorefinery etanol selulosa. (Zhuang, et al., 2016)

## Etanol

Etanol merupakan cairan tak berwarna dan larut dalam air. Jenis alkohol ini sering disebut juga sebagai alkohol biji-bijian. Etanol merupakan senyawa alkohol yang mempunyai rumus kimia  $C_2H_5OH$ , zat cair tak berwarna, berbau khas, mudah terbakar, dan mudah bercampur dengan air. Etanol memiliki titik didih  $78,5\text{ }^{\circ}C$  (Mulyono, 2006). Menurut Murdiyatno (2007), 68 % etanol di dunia digunakan sebagai bahan bakar. Produksi etanol tersebut banyak dikembangkan dengan komoditi pertanian melalui fermentasi. Menurut Harahap (2003), produksi etanol dengan cara fermentasi bisa diproduksi dari 3 macam karbohidrat yaitu bahan-bahan yang mengandung gula seperti gula, tebu, gula bit, molasses (tetes), sari buah dan lain-lain. Dalam proses fermentasi alkohol digunakan ragi. Ragi ini dapat mengubah glukosa menjadi alkohol dan gas  $CO_2$ . Ragi merupakan mikroorganisme bersel satu, tidak berklorofil dan termasuk golongan eumycetes. Menurut Nurdyastuti (2008), etanol dapat dibuat melalui proses fermentasi diikuti kemudian dengan proses destilasi sehingga serat dan gumpalan gula dari bahan dasar (jagung, gandum, kentang, tebu, buah-buahan ataupun sisa sayur-mayur) ataupun pengotor lainnya terpisah dari etanolnya. Produksi etanol dengan bahan baku tanaman yang mengandung pati atau karbohidrat, dilakukan melalui proses konversi karbohidrat menjadi gula (glukosa) larut. Dalam proses konversi karbohidrat menjadi gula (glukosa) larut air dilakukan dengan penambahan air dan enzim, kemudian dilakukan proses peragian atau fermentasi gula menjadi etanol dengan menambahkan yeast atau ragi. Selain etanol dapat diproduksi dari bahan baku tanaman yang mengandung selulosa, namun dengan adanya lignin mengakibatkan proses penggulaannya menjadi lebih sulit, sehingga pembuatan etanol dari selulosa tidak direkomendasikan. Meskipun teknik produksi etanol merupakan teknik yang sudah lama diketahui, namun etanol untuk bahan bakar kendaraan memerlukan

etanol dengan karakteristik tertentu yang memerlukan teknologi yang relatif baru di Indonesia antara lain mengenai neraca energi (energy balance) dan efisiensi produksi, sehingga penelitian lebih lanjut mengenai teknologi proses produksi etanol masih perlu dilakukan. Secara singkat teknologi proses produksi etanol tersebut dapat dibagi dalam tiga tahap, yaitu gelatinasi, sakarifikasi, dan fermentasi. Menurut Suriawiria (1986) dalam Manshur (1998) pembuatan etanol dapat dilakukan dengan dua cara yaitu : 1. Cara sintesis Pada cara sintesis dilakukan reaksi kimia untuk mengubah bahan baku menjadi alkohol. Misalnya dengan reaksi hidrasi etilena yang merupakan hasil samping pada proses penyulingan minyak bumi. Reaksi yang terjadi dapat dituliskan sebagai berikut :  $C_2H_4 + H_2O \rightarrow C_2H_5OH$  2. Cara fermentasi Cara ini dilakukan dengan menggunakan aktivitas mikroba. Pada proses fermentasi akan dihasilkan bioetanol.

Bioetanol adalah etanol yang dihasilkan dari biomassa atau bahan baku alami melalui proses fermentasi. Produksi bioetanol dengan bahan baku tanaman yang mengandung pati atau karbohidrat, dilakukan melalui proses konversi karbohidrat menjadi gula (glukosa) larut air dilakukan dengan penambahan air dan enzim dengan perbandingan 1:2, kemudian dilakukan proses peragian atau fermentasi gula menjadi etanol dengan penambahan yeast atau ragi. 2.4 Fermentasi Etanol Fermentasi adalah proses produksi energi dalam sel dalam keadaan anaerobik (tanpa oksigen) maupun aerob. Secara umum, Fermentasi adalah salah satu bentuk respirasi anaerobik, akan tetapi, terdapat definisi yang lebih jelas yang mendefinisikan fermentasi sebagai respirasi dalam lingkungan anaerobik dengan tanpa akseptor elektron eksternal (Dirmanto, 2006). Fermentasi mempunyai pengertian aplikasi metabolisme mikroba untuk mengubah bahan baku menjadi produk yang bernilai tinggi, seperti asam-asam organik, protein sel tunggal, antibiotika, dan biopolymer. Fermentasi merupakan proses yang relatif murah yang pada hakekatnya telah lama dilakukan oleh nenek moyang kita secara tradisional dengan produk-produknya yang sudah biasa dikonsumsi manusia sampai sekarang seperti tape, tempe, oncom, dan lain-lain (Nurhayani, 2000). Fermentasi dapat diartikan sebagai perubahan gradual oleh enzim beberapa bakteri, khamir dan jamur. Contoh perubahan kimia dari fermentasi meliputi pengasaman susu, dekomposisi pati dan gula menjadi alkohol dan karbondioksida, serta oksidasi senyawa nitrogen organik (Hidayat, 2006).

Pada proses fermentasi lebih dari 3 hari terjadi perombakan gula menjadi alkohol, akan dapat menyebabkan minuman sari buah beralkohol (Siswadji, 1985). Pada proses fermentasi melibatkan beberapa enzim yang dikeluarkan oleh kapang, sehingga jumlah sel kapang yang hidup paling tinggi terdapat pada lama fermentasi 3 hari dan semakin lama fermentasi aktivitas kapang semakin menurun (Ingrid, 2003). Lamanya proses fermentasi tergantung kepada bahan dan jenis produk yang akan dihasilkan. Proses pemeraman singkat (fermentasi tidak sempurna) yang berlangsung sekitar 1-2 minggu dapat menghasilkan produk dengan kandungan etanol 3-8 %. Contohnya adalah produk bir. Sedangkan proses pemeraman yang lebih panjang (fermentasi sempurna) yang dapat mencapai waktu bulanan bahkan tahunan seperti dalam pembuatan anggur dapat menghasilkan produk dengan kandungan etanol sekitar 7-18 % (Hidayat, 2006). Reaksi dalam fermentasi berbeda-beda tergantung pada jenis gula yang digunakan dan produk yang dihasilkan.

Secara singkat glukosa ( $C_6H_{12}O_6$ ) yang merupakan gula paling sederhana, melalui fermentasi akan menghasilkan etanol ( $2C_2H_5OH$ ). Reaksi fermentasi ini dilakukan oleh ragi, dan digunakan pada produksi makanan. Persamaan reaksi kimia yaitu :  $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2 + 2 ATP$  (energi yang dilepaskan) Dijabarkan sebagai gula (glukosa, fruktosa dan sukrosa) alkohol (etanol) + karbondioksida + energi (ATP) (Nurdyastuti, 2008). Untuk memperoleh hasil yang optimum, persyaratan untuk pertumbuhan ragi harus diperhatikan, yaitu (Winarno, 1980):

- pH dan kadar karbohidratnya dari substrat
- Temperatur selama fermentasi
- Kemurnian dari ragi itu sendiri

Proses fermentasi tergantung pada banyak sedikitnya penambahan khamir dalam bahan. Semakin banyak jumlah ragi yang diberikan berarti semakin banyak jumlah khamir yang terlibat, sehingga kadar alkohol meningkat (Tarigan, 1988). Semakin lama fermentasi maka asam yang dihasilkan akan lebih banyak (Yuliani, 2003). Proses terjadinya penurunan pH dapat terjadi dari awal fermentasi diakibatkan terbentuknya asam-asam selama proses fermentasi berlangsung. Asam-asam yang terbentuk seperti asam asetat, asam piruvat, dan asam laktat dapat menurunkan pH (Muljono dan Daewis, 1990).

Semakin lama waktu fermentasi maka semakin tinggi pula kadar alkohol yang dihasilkan dan semakin banyak dosis ragi yang diberikan maka kadar alkohol juga semakin tinggi (Sugiarti, 2007). Bahwa tinggi rendahnya kadar gula dan kadar alkohol setiap gramnya dipengaruhi oleh banyak sedikitnya kandungan karbohidrat. Hal ini menunjukkan bahwa kadar karbohidrat yang lebih tinggi mempengaruhi kadar alkohol yang dihasilkan dalam proses fermentasi karbohidrat (Sriyanti, 2003). Beberapa faktor yang mempengaruhi proses fermentasi diantaranya adalah pH, suhu, konsentrasi gula, waktu fermentasi, aerasi, nutrien, dan jenis mikroba (Hasanah, 2008). a. Derajat Keasaman (pH) Untuk fermentasi bioetanol, khamir memerlukan media dengan suasana asam, yaitu antara pH 4-5 (Hidayat dkk., 2006). Pada pH 3, khamir (ragi) sebenarnya masih dapat melakukan fermentasi, tetapi agak lambat. Karena sangat pentingnya pH maka pada sebagian besar proses fermentasi pH diatur dengan suatu sistem pengendali pH. Derajat keasaman (pH) diatur antara 4,5 - 5,0 dengan menambahkan asam sulfat 1-2 liter per 1000 liter substrat.

Periyasami (2009) mengatakan bahwa pH yang digunakan dalam fermentasi bioetanol dari tetes tebu adalah 4, sedangkan Elena (2009) mengatakan bahwa pH yang sesuai untuk proses fermentasi adalah pH 4,5. Perubahan pH dapat mempengaruhi pembentukan hasil samping. Pengaruh pH terhadap pertumbuhan khamir juga tergantung pada konsentrasi gula. Untuk menurunkan pH dapat digunakan asam sulfat dan untuk menaikkan pH digunakan natrium benzoat.

Suhu Temperatur selama fermentasi perlu mendapatkan perhatian, karena disamping temperatur mempunyai efek yang langsung terhadap pertumbuhan khamir juga mempengaruhi komposisi produk akhir. Pada temperatur yang terlalu tinggi akan menonaktifkan khamir, begitu sebaliknya dengan suhu rendah. Selama proses fermentasi akan terjadi pembebasan panas sehingga akan lebih baik apabila pada tangki fermentasi dilengkapi dengan unit pendingin. Temperatur optimal untuk khamir berkisar antara 25-30 °C dan temperatur maksimal antara 35-47 °C. Beberapa jenis khamir dapat hidup pada suhu 0 °C (Hidayat dkk., 2006). Highina dkk., (2011) mengatakan bahwa suhu yang diperlukan untuk fermentasi alkohol adalah 30 °C. Menurut Periyasami dkk., (2009) suhu optimal untuk fermentasi bioetanol adalah 35 °C. Kenaikan suhu akan menurunkan ketahanan khamir terhadap alkohol yang dihasilkan dan akan meningkatkan pembentukan asam asetat yang bersifat racun. Sedangkan Abdalbasit dkk., (2012) menyatakan bahwa suhu optimal pertumbuhan khamir pada proses fermentasi antara 33 °C.

Konsentrasi Gula. Wanto dan Soebagyo (1980) menyatakan bahwa tetes tebu harus diencerkan terlebih dahulu sehingga kadar gulanya 12-17 % atau dengan menambahkan air sebanyak empat kali volume tetes tebu. Bahan bergula tersebut harus dipasteurisasi dahulu sebelum inokulasi sehingga mikroorganisme yang mengganggu fermentasi alkohol tidak aktif. Utami dkk. (2012) melakukan penelitian tentang pengolahan limbah tetes tebu menjadi bioetanol. Parameter yang digunakan dalam penelitian tersebut adalah kadar gula (6 %, 8 %, 10 %, 12 %, dan 14 %) dan waktu fermentasi (1 hari, 2 hari, 3 hari, 4 hari, 5 hari, 6 hari, dan 7 hari). Bioetanol tertinggi diperoleh pada konsentrasi gula 10 % dengan kadar bioetanol sebesar 11,75 %. d. Lama Fermentasi Pada proses fermentasi, jumlah mikroba antara lain dipengaruhi oleh waktu fermentasi yakni semakin lama waktu fermentasi jumlah mikroba semakin banyak dan produksi bioetanol semakin tinggi. Proses ini akan terhenti jika kadar bioetanol sudah meningkat sampai tidak dapat ditolerir lagi oleh sel-sel khamir. Tingginya kandungan bioetanol akan menghambat pertumbuhan khamir dan hanya mikroba yang toleran terhadap bioetanol yang tinggi yang dapat tumbuh.

Menurut Hidayat dkk., (2006) fermentasi alkohol memakan waktu sekitar 30-40 jam. Abdalbasit dkk., (2012) mengatakan bahwa waktu fermentasi alkohol yang diperlukan adalah 3 hari. Periyasami (2009) juga menyatakan bahwa waktu fermentasi optimum bioetanol dicapai pada hari ke-3. Wahyudi (1997) melaporkan bahwa waktu fermentasi bioetanol optimum didapatkan pada hari ke-7. Sedangkan Utami dkk., (2012) mengatakan bahwa waktu fermentasi biasanya berlangsung secara sempurna selama 6 hari.

Aerasi berdasarkan kemampuannya untuk mempergunakan oksigen bebas, mikroorganisme dapat diklasifikasikan menjadi tiga, yaitu: aerob (memerlukan oksigen untuk pertumbuhannya), anaerob (tidak membutuhkan oksigen untuk pertumbuhannya), dan fakultatif (dapat tumbuh dengan baik pada keadaan ada oksigen bebas maupun tidak ada oksigen bebas). Sebagian besar khamir merupakan mikroorganisme aerob. Khamir dari kultur aerob akan menghasilkan alkohol dalam jumlah yang lebih besar apabila dibandingkan dengan khamir kultur anaerob. Akan tetapi efek ini tergantung khamir yang digunakan (Fardiaz, 1988). Aerasi yang ditujukan untuk pertumbuhan dan perkembangbiakan sel khamir (ragi) penting untuk dilakukan. Aerasi harus dilakukan secukupnya, karena apabila berlebihan akan menyebabkan penurunan hasil bioetanol, rasa tawar dan terbentuknya asam-asam yang berlebihan (Hidayat dkk., 2006).



Nutrien dalam pertumbuhannya mikroba memerlukan nutrisi. Nutrien yang dibutuhkan digolongkan menjadi dua yaitu nutrisi makro dan nutrisi mikro. Nutrien makro meliputi unsur C, N, P, K. Unsur C didapat dari substrat yang mengandung karbohidrat, unsur N didapat dari penambahan urea, sedang unsur P dan K dari pupuk NPK (Halimatuddahlia, 2003). Unsur mikro meliputi vitamin dan mineral-mineral lain yang disebut trace element seperti Ca, Mg, Na, S, Cl, Fe, Mn, Cu, Co, Bo, Zn, Mo, dan Al (Irianto, 2006).

Jenis mikroba, mikroba berperan penting dalam proses fermentasi karena aktivitas enzim yang dimilikinya sehingga dapat terjadi perubahan-perubahan dalam proses fermentasi tersebut. Adapun macam-macam mikroba adalah sebagai berikut (Erdiyanti, 1999): a. Khamir, misalnya *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula* dan *Candida* yang dapat mengubah glukosa menjadi alkohol. b. Bakteri, misalnya *Acetobacter* yang dapat merubah alkohol menjadi asam asetat. c. Kapang, misalnya *Amylomyces reuxii* (*Clamydomucor oryzae*) dan *Rhizopus* yang dapat mengubah amilum menjadi glukosa. Ada sejumlah mikroba yaitu khamir dan bakteri yang mempunyai kemampuan untuk menghasilkan bioetanol.

Pada saat ini 95% dari fermentasi bioetanol melibatkan penggunaan spesies *Saccharomyces cerevisiae* dan spesies yang ada hubungannya dengan spesies ini (Rahayu, 1987).

*Saccharomyces cerevisiae* merupakan khamir sejati tergolong eukariot yang secara morfologi hanya membentuk blastospora berbentuk bulat lonjong, silindris, oval atau bulat telur yang dipengaruhi oleh strainnya dapat berkembang biak dengan membelah diri melalui “budding cell”. Reproduksi dapat dipengaruhi oleh keadaan lingkungan serta jumlah nutrisi yang tersedia bagi pertumbuhan sel. Penampakan makroskopik mempunyai koloni berbentuk bulat, warna kuning muda, permukaan berkilau, licin, tekstur lunak dan memiliki sel bulat dengan askospora 1-8 buah (Nikon, 2004; Landecker, 1972; Lodder, 1970).

*Saccharomyces cerevisiae* mempunyai kemampuan untuk mengfermentasi bermacam-macam gula yaitu sukrosa, glukosa, fruktosa, galaktosa, manosa, maltose, dan maltotriose. Tahap permulaan penggunaan gula oleh *Saccharomyces cerevisiae* dilakukan melalui dua cara, pertama yaitu pemindahan senyawa gula ke dalam membran sel, kedua menghidrolisis senyawa gula di luar sel dan diikuti dengan pemindahan hasil hidrolisis ke dalam membrane sel (Rahayu dan Kuswanto, 1988). Pertumbuhan sel merupakan puncak aktivitas fisiologi yang saling mempengaruhi secara berurutan. Proses pertumbuhan ini sangat kompleks meliputi pemasukan nutrien dasar dari lingkungan ke dalam sel dan konversi bahan-bahan nutrient menjadi energi (Kultsum, 2009). Pertumbuhan mikrobial ditandai dengan peningkatan jumlah dan massa sel serta kecepatan pertumbuhan tergantung pada lingkungan fisik dan kimia.

Pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* dapat diketahui dengan mengetahui nilai absorbansi atau dengan mengetahui optical density (OD). Nilai absorbansi yang terbaca tiap analisa dalam fermentasi akan menunjukkan grafik yang tidak jauh beda dengan. *Saccharomyces cerevisiae* memerlukan media dan lingkungan yang sesuai untuk pertumbuhan dan perkembangannya. Unsur-unsur yang dibutuhkan adalah: karbon, nitrogen, hidrogen, oksigen, fosfor, potassium, zat besi dan magnesium (Manshur, 1998). *Saccharomyces cerevisiae* yang penting dalam pembuatan roti memiliki sifat dapat memfermentasikan maltosa secara cepat (lean dough yeast), memperbaiki sifat osmotolerance (sweet dough yeast), rapid fermentation kinetics, freeze dan thaw tolerance, dan memiliki kemampuan memetabolisme substrat. Pemakaian ragi dalam adonan sangat berguna untuk mengembangkan adonan karena terjadi proses peragian terhadap gula, memberi aroma (alkohol).

*Saccharomyces cerevisiae* juga telah digunakan dalam beberapa industri lainnya, seperti industri roti (bakery), industri flavour, (menggunakan ekstrak ragi/yeast extracts), industri pembuatan alkohol (farmasi) dan industri pakan ternak. Khamir lebih banyak digunakan untuk memproduksi alkohol secara komersial dibandingkan dengan bakteri. Hal ini disebabkan karena khamir dapat memproduksi alkohol dalam jumlah besar, tetapi pembuatan etanol dengan bantuan mikroorganisme seperti ragi atau khamir (*Saccharomyces cerevisiae*) yang selama ini banyak digunakan umumnya tidak tahan pada etanol konsentrasi tinggi yang dihasilkan yang menyebabkan produktivitas etanolnya rendah.

Oleh karena itu dibutuhkan mikroorganisme yang lebih berpotensi untuk menghasilkan produktivitas etanol yang tinggi dan yang mampu memenuhi semua kelemahan dari *Saccharomyces cerevisiae* (Gunasekaran dan Raj, 1999). Khamir dapat berkembang biak dalam gula sederhana seperti glukosa, maupun gula kompleks disakarida yaitu sukrosa (Marx, 1991). Selain itu untuk menunjang kebutuhan hidup diperlukan oksigen, karbohidrat, dan nitrogen. Pada uji fermentasi gula-gula mempunyai reaksi positif pada gula dekstrosa, galaktosa, sukrosa, maltose, raffinosa, trehalosa, dan negatif pada gula laktosa (Lodder, 1970).

Media Pertumbuhan Media adalah suatu bahan yang terdiri dari campuran zat-zat hara (nutrient) yang berguna untuk membiakkan mikroba. Dengan menggunakan bermacam-macam media dapat dilakukan isolasi, perbanyakan, pengujian sifat-sifat fisiologis dan perhitungan jumlah mikroba (Sutedjo, 1996). Supaya mikroba dapat tumbuh baik dalam suatu media, maka medium tersebut harus memenuhi syarat-syarat antara lain (Sutedjo, 1996): a. Harus mengandung semua zat hara yang mudah digunakan oleh mikroba b. Harus mempunyai tekanan osmosa, tegangan permukaan dan pH yang sesuai dengan kebutuhan mikroba yang ditumbuhkan c. Harus mengandung zat-zat yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba

## **KONSEP ATAU TEORI YANG RELEVAN**

Pasokan minyak yang berkurang dan meningkatnya ketidakstabilan politik di negara-negara penghasil minyak, dunia sedang menghadapi ancaman energi utama yang perlu dipecahkan berdasarkan sumber energi alternatif. Bioetanol telah mendapat perhatian yang cukup besar di sektor transportasi karena kegunaannya sebagai penambah oktan, penambah bahan bakar, dan bahkan sebagai bahan bakar. Brasil dan Amerika Serikat masing-masing telah memproduksi etanol dalam skala besar dari tebu dan jagung. Namun, karena kegunaan utamanya sebagai makanan dan pakan, tanaman ini tidak dapat memenuhi permintaan global untuk produksi etanol sebagai bahan bakar transportasi alternatif. Biomassa lignoselulosa diproyeksikan sebagai bahan mentah yang paling memungkinkan untuk produksi etanol bahan bakar. Hambatan utama sejauh ini adalah masalah teknologi, yang tidak mendukung produksi bioetanol lignoselulosa yang hemat biaya dan kompetitif. Ulasan ini menjelaskan beberapa pendekatan praktis yang dapat diadopsi untuk membuat produksi bioetanol lignoselulosa secara ekonomis. Ini termasuk penggunaan substrat yang lebih murah, teknik pre treatment yang hemat biaya, produksi berlebih dan strain rekombinan untuk toleransi dan hasil etanol yang maksimal, proses pemulihan yang lebih baik, bioproses yang efisien integrasi, eksploitasi ekonomi produk sampingan, dan minimalisasi energi dan limbah. Pendekatan terpadu dan berdedikasi dapat membantu dalam mewujudkan produksi komersial bioetanol lignoselulosa skala besar, dan dapat berkontribusi menuju dunia yang lebih bersih dan hemat energy (Banerjee et al., 2010).

Selama dekade terakhir peningkatan minat bahan bakar dari biomassa di Amerika Serikat dan di seluruh dunia telah muncul setiap kali bensin turunan minyak bumi mencatat lonjakan harga. Ketersediaan pemerintah AS untuk menghadapi masalah minyak asing yang lebih mahal harganya dan perubahan iklim telah mendorong lebih banyak investasi pada sumber bahan bakar nabati berkelanjutan yang berasal dari tumbuhan. Biomassa dari jagung telah menjadi salah satu bahan baku utama untuk produksi bioetanol selama beberapa tahun terakhir di AS. Namun, kebutuhan bahan pangan sebagai biofuel telah menyebabkan pencarian alternatif sumber non-makanan. Upaya penelitian industri menjadi lebih terfokus pada biaya rendah proses skala besar untuk bahan baku lignoselulosa yang terutama berasal dari residu pertanian dan hutan bersama dengan bahan herba dan limbah kota. Meskipun biofuel yang diturunkan dari selulosa adalah teknologi yang menjanjikan, ada beberapa kendala yang mengganggu proses biokonversi mencapai kinerja optimal terkait dengan investasi modal minimal. (Limayem, A., & Ricke, S. C. (2012).

Produksi biofuel dari bahan baku terbarukan telah menarik banyak penelitian ilmiah perhatian karena dapat digunakan untuk memasok energi dan bahan bakar alternatif. Bioetanol adalah salah satu biofuel yang paling menarik karena dampak positifnya terhadap lingkungan. Saat ini, sebagian besar diproduksi dari bahan baku yang mengandung gula dan pati. Namun, berbagai jenis biomassa lignoselulosa yang tersedia seperti residu pertanian dan kehutanan, dan tanaman energi herba dapat berfungsi sebagai bahan baku untuk produksi bioetanol, energi, panas, dan bahan kimia bernilai tambah. Lignoselulosa adalah campuran kompleks karbohidrat yang membutuhkan pre treatment yang efisien untuk membuat jalur yang dapat diakses oleh enzim untuk produksi gula yang dapat difermentasi, yang setelah hidrolisis difermentasi menjadi etanol. Bahan baku lignoselulosa merupakan bahan terbarukan dengan biaya bahan baku yang tidak bersaing dengan rantai makanan dan pakan, sehingga keberlanjutan. Selanjutnya, pemisahan bioetanol alternatif dan proses pemurnian juga telah dikembangkan secara intensif. (Bušić et al., 2018)

Bio ethanol adalah bahan kimia berupa cairan berasal dari hasil fermentasi karbohidrat (pati) dengan bantuan mikroorganisme. Karena pembuatannya melibatkan proses biologis maka produk ethanol yang dihasilkan diberi nama bioethanol. Bioetanol adalah etanol yang diproduksi dengan cara fermentasi menggunakan bahan baku nabati.

Etanol atau ethyl alcohol ( $C_2H_5OH$ ) adalah senyawa organik golongan alkohol yang mengandung gugus hidroksil (OH) dengan rumus kimia  $CH_3CH_2OH$ . Etanol dapat diklasifikasikan berdasarkan bahan baku yang digunakan, proses, dan pemanfaatannya.

Secara mikrobiologis menggunakan bahan baku berpati (jagung, ubi kayu dan umbi umbian lainnya) serta bahan baku yang mengandung gula (molasses, tebu, sweet sorghum, aren, dan jenis palem lainnya) dan bahan berserat (onggok, jerami, sekam, tongkol jagung, baggas tebu serta kulit kakao dan kopi)

Substrat yang umum digunakan untuk bioetanol adalah yang berasal dari gula tebu (molasses) seperti halnya di Brasilia. Selain molasses, bahan sumber gula lainnya yang dapat digunakan, adalah nira aren, nira kelapa, bit, nipah dan nira batang sorgum manis. Kelebihan dari bahan baku sumber gula ini, yaitu dapat langsung dilakukan gula menjadi etanol, sehinggaproses menjadi lebih pendek dan sederhana.

Konversi biomassa lignoselulosa menjadi bioethanol meliputi 3 tahap, yaitu pre treatment, enzimatik hidrolisis dan fermentasi (Gambar 1). Struktur LCB (lignoselulosa biomassa) yang rekalsitran dapat diubah menggunakan metode secara kimiawi, fisik dan biologi dengan mengubah ukuran, struktur dan komposisi kimia biomassa. Proses enzimatik hidrolisis adalah mengubah LCB menjadi gula terfermentasi dengan memecah rantai karbohidrat. Pada proses fermentasi, gula dikonversi menjadi bioethanol melalui aktivitas mikroorgasnime.

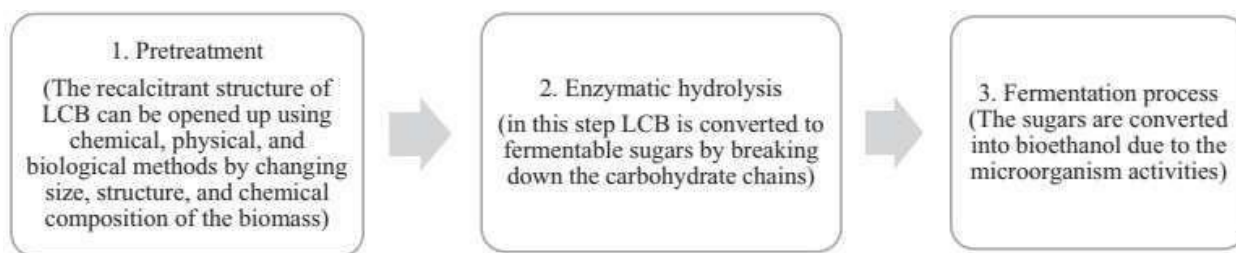
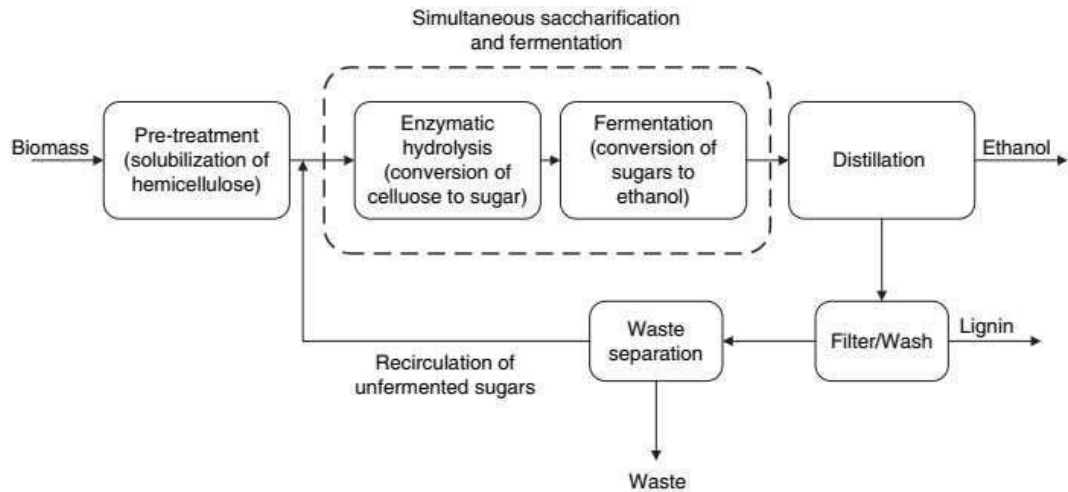


Fig. 1. Conversion of the LCB to bioethanol.

**Gambar 1. Konversi biomassa Lignoselulosa menjadi Bioethanol (Gamage *et al*, 2010)**

Kerangka konversi dari biomasa lignoselulitik menjadi ethanol disajikan pada Gambar 2.



**Gambar 2. Kerangka konversi dari biomasa lignoselulitik menjadi ethanol (Gamage et al., 2010)**

Produksi bioethanol dari biomassa lignoselulitik membutuhkan 3 tahapan pada Gambar 1. yaitu meliputi : pretreatment , hidrolisis, dan fermentasi.

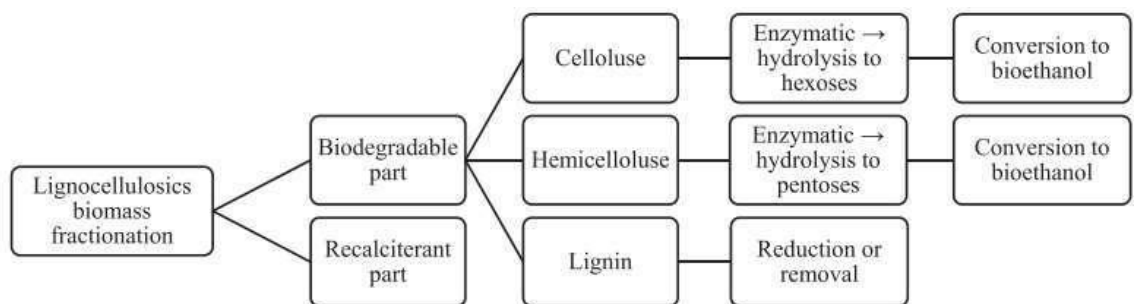
**Pre Treatment** : Thermal Treatment/pyrolysis, Acid Treatment, Alkaline Treatment, .Ammonia Fiber Explosion (AFEX) Treatment,. Ozonolysis, Organosolv Process, Explosion Treatment .

**Physical pretreatment** : Bahan lignoselulosa dapat dihancurkan dengan kombinasi chipping, grinding, dan milling untuk mengurangi kristalinitas selulosa. Ukuran bahan biasanya 10–30 mm setelah chipping dan 0,2–2 mm setelah milling atau grinding

**Hydrolysis** :Acid Hydrolysis, Enzymatic Hydrolysis

**Fermentation** : *Saccharomyces Cerevisiae*, *Escherichia Coli*, *Zymomonas mobilis*

Fraksinasi biomassa Lignosleulosa menjadi Bioethanol disajikan pada Gambar 3.



**Fig. 2. Fractionation of LCB to bioethanol.**

**Gambar 3. Fraksinasi biomassa Lignosleulosa menjadi Bioethanol**

Perbedaan metode Pre Treatment untuk biomassa Lignoselulose disajikan pada Gambar4.

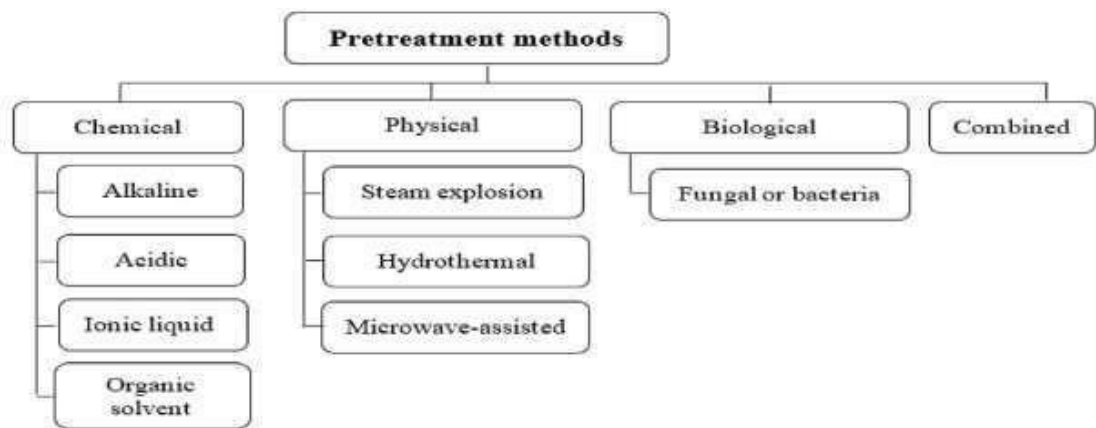


Fig. 3. Different pretreatment methods (Adopted from Ref. [49]).

**Gambar 4. Perbedaan metode Pre Treatment untuk biomassa Lignoselulose**

Proses Pre treatment sampai menjadi Bioethanol disajikan pada Gambar 5.

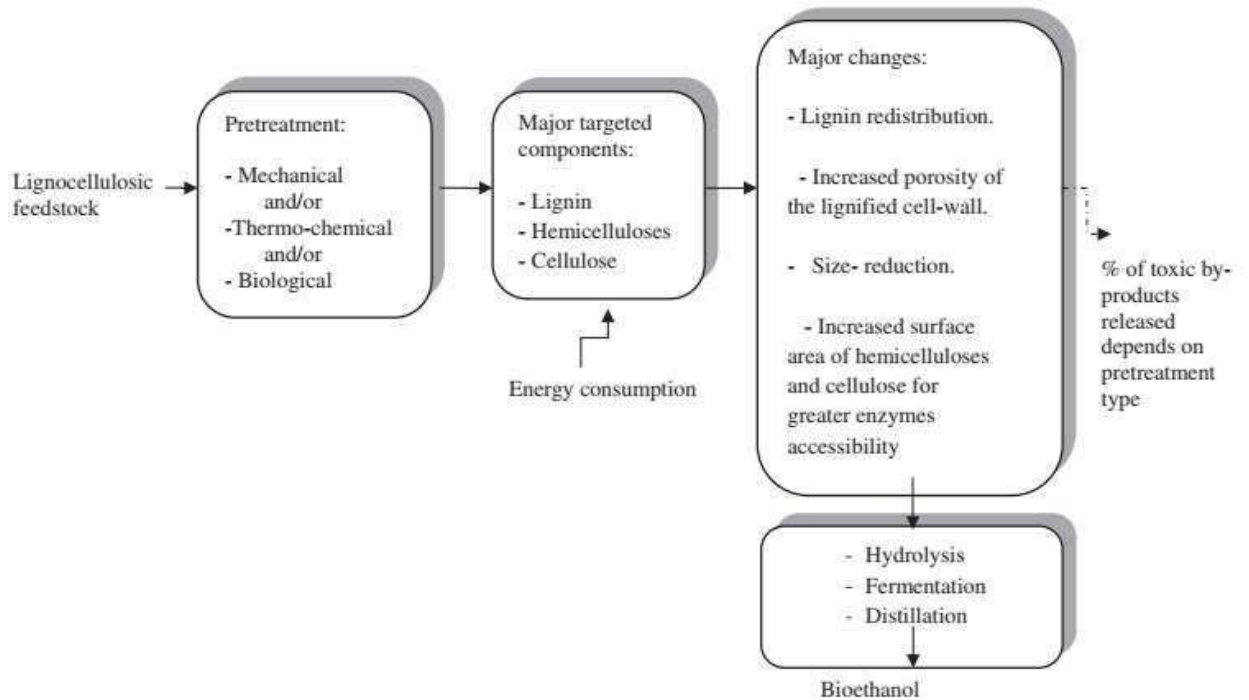


Fig. 2. Pretreatment upstream process: Major effects.

**Gambar 5. Proses Pre treatment sampai menjadi Bioethanol**



### **BAB III. METODOLOGI PENELITIAN**

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu buah lokal Indonesia diantaranya nangka, mangga manalagi, nanas dan anggur lokal yang diperoleh dari pasar di kota Malang. Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah YPGA (Yeast extract Peptone Glucose Agar) dan YPGB (Yeast extract Peptone Glucose Broth), akuades, aseton, alkohol 70 %, Cloramphenicol 0.05%, reagen pewarnaan methylene blue, minyak imersi, aquades, kapas dan spiritus.

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu autoclave (DEA), vortex (Benchmark Scientific), laminar air flow (Innotech), timbangan analitik (Mettler), kompor listrik (maspion), incubator (Memmert), sentrifuge dingin (Fisher Sci), shaker waterbath (Memmert), Gas Chromatography (Shimadzu), mikroskop (Olympus), lemari pendingin, bunsen, jarum ose, dan glassware seperti beaker glass, erlenmeyer, gelas ukur, pipet ukur, tabung reaksi dan cawan petri.

Desain Penelitian Dalam penelitian ini menggunakan metode deskriptif, dengan pendekatan kualitatif dan penelitian kuantitatif. Karakteristik dari penelitian deskriptif yaitu 1) menggambarkan fenomena apa adanya dengan cara menelaah secara ketat dan teratur, cermat, dan mengutamakan obyektivitas, 2) tidak ada perlakuan yang diberikan atau dikendalikan, dan tidak ada uji hipotesis (Furchan, 2004). Penelitian ini menggunakan metode explorative kuantitatif dan kualitatif, dengan menggunakan beberapa variabel. Variabel bebas penelitian adalah morfologi yeast, ketahanan/toleransi yeast dan produksi bioethanol secara in vitro, Variabel terikat: jenis buah buahan tropis

#### **Prosedur Kerja**

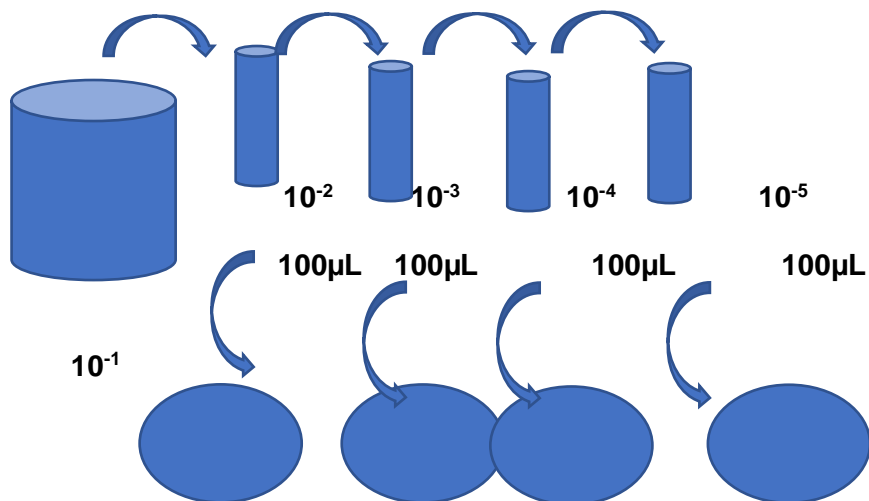
##### **Pembuatan Media**

Media Yeast extract Peptone Glucose Agar (YPGA) (Thais.M, 2006) Media YPGA ini dibuat dengan menimbang 5 g yeast extract, 5 g pepton, 10 g glukosa, dan 15 g agar. Kemudian dilarutkan dengan 500 mL akuades dan dipanaskan sampai mendidih sambil diaduk hingga larut. Selanjutnya media tersebut dimasukkan ke dalam dua Erlenmeyer masing-masing 250 mL dan disterilisasi dalam autoclave pada suhu 121 oC, tekanan 15 psi selama 15 menit. Larutan tersebut sebagian didinginkan dalam tabung reaksi pada keadaan miring hingga memadat.

Media Yeast extract Peptone Glucose Broth (YPGB) (Thais.M, 2006) Media selanjutnya adalah YPGB dibuat dengan 5 g yeast extract, 5 g peptone, dan 10 g glukosa. Semua bahan dicampur dengan akuades sebanyak 500 mL, dipanaskan sampai mendidih sambil diaduk hingga larut, kemudian media tersebut dimasukkan ke dalam dua Erlenmeyer masing-masing volumenya 250 mL, ditutup kapas, dan disterilisasi dalam autoclav

### Isolasi dan Identifikasi Indigeneous Yeast (IY)

Isolasi yeast didapatkan dari beberapa buah uji yang diinkubasi di media enrichment selama 72 jam (3 har) Media enrichment Yeast and Mould Medium (YMM) terdiri dari Yeast extract : 6 gram, Maltose:6 gram, Peptone: 10 gram, Glukosa : 20 gram dan Aquadest : 2 liter  
Sebanyak 50 buah dimasukkan dalam 450 ml media enrichment



## **Parameter penelitian yang diamati meliputi:**

1. Identifikasi yeast secara morfologis , Sub kultur dari media miring ke media cair untuk pengamatan mikroskopis. Pengamatan morfologis meliputi : ukuran, warna, bentuk, dan elevasi, margin. Pengamatan media miring, sub kultur dari media miring ke media cair untuk pengamatan mikroskopis.

Uji Morfologi Koloni Pengamatan makroskopik pada medium padat dilakukan menggunakan media YPGA. Satu ose biakan khamir diinokulasikan dengan metode empat kuadran gores ke dalam media kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 48 jam. Karakteristik morfologi makroskopik koloni khamir yang diamati pada media padat antara lain: tekstur, warna, penampakan permukaan, tepi koloni, dan bentuk koloni.

Uji Morfologi Sel (Kusmiati, 2007) Uji morfologi sel dilakukan dengan pewarnaan menggunakan methylen blue. Diambil 1 ose biakan dari masing-masing khamir, kemudian ditetaskan pada kaca preparat yang telah ditetesi akuades. Preparat ditetesi dengan methylen blue dan minyak imersi, preparat diamati dengan mikroskop dengan perbesaran 1000x

2. Uji toleransi yeast pada Glucosa

Uji toleransi pada media YMM Broth pada beberapa konsentrasi glucose 0%, 2%, 4%, 6%, 8%, 10%, 12%, 14%, 16% dan 18% diamati Optical Density menggunakan spektrofotometer pada 24 dan 48 jam

3. Uji toleransi yeast pada Ethanol

Subkultur yeast ke media YMM Broth cair , 1 ose dalam 30 ml kemudian shaker 90 rpm selama 24 jam Menyiapkan media uji toleransi Ethanol pada konsentrasi 10,20,30,40 dan 50%, diamati Optical Density menggunakan spektrofotometer pada 24 dan 48 jam

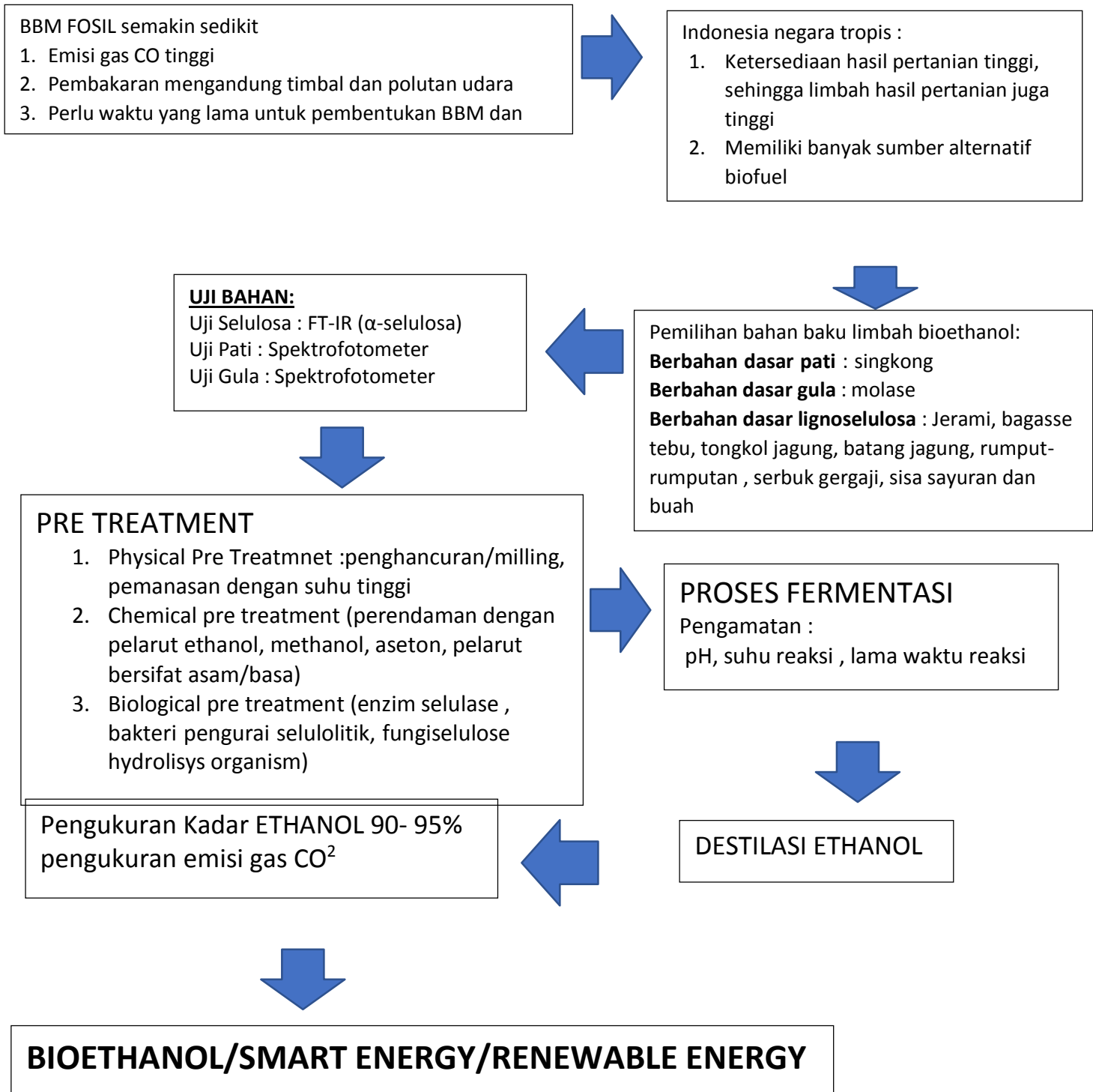
4. Uji potensi produksi Bioethanol secara in vitro

Subkultur yeast pada media YPG (Yeast Peptone Glucose) dilakukan fermentasi selama 7 hari dan pengamatan kadar ethanol menggunakan GCFID

## **Analisis Data**

Data dianalisa secara deskriptif kualitatif yaitu untuk pengamatan secara morfologis dan data kuantitatif untuk kadar bioethanol dianalisis menggunakan standard error/ simpangan deviasi Karl Pearson.

## KERANGKA OPERASIONAL



## KERANGKA KONSEPTUAL



## ROADMAP PENELITIAN



## HASIL DAN PEMBAHASAN

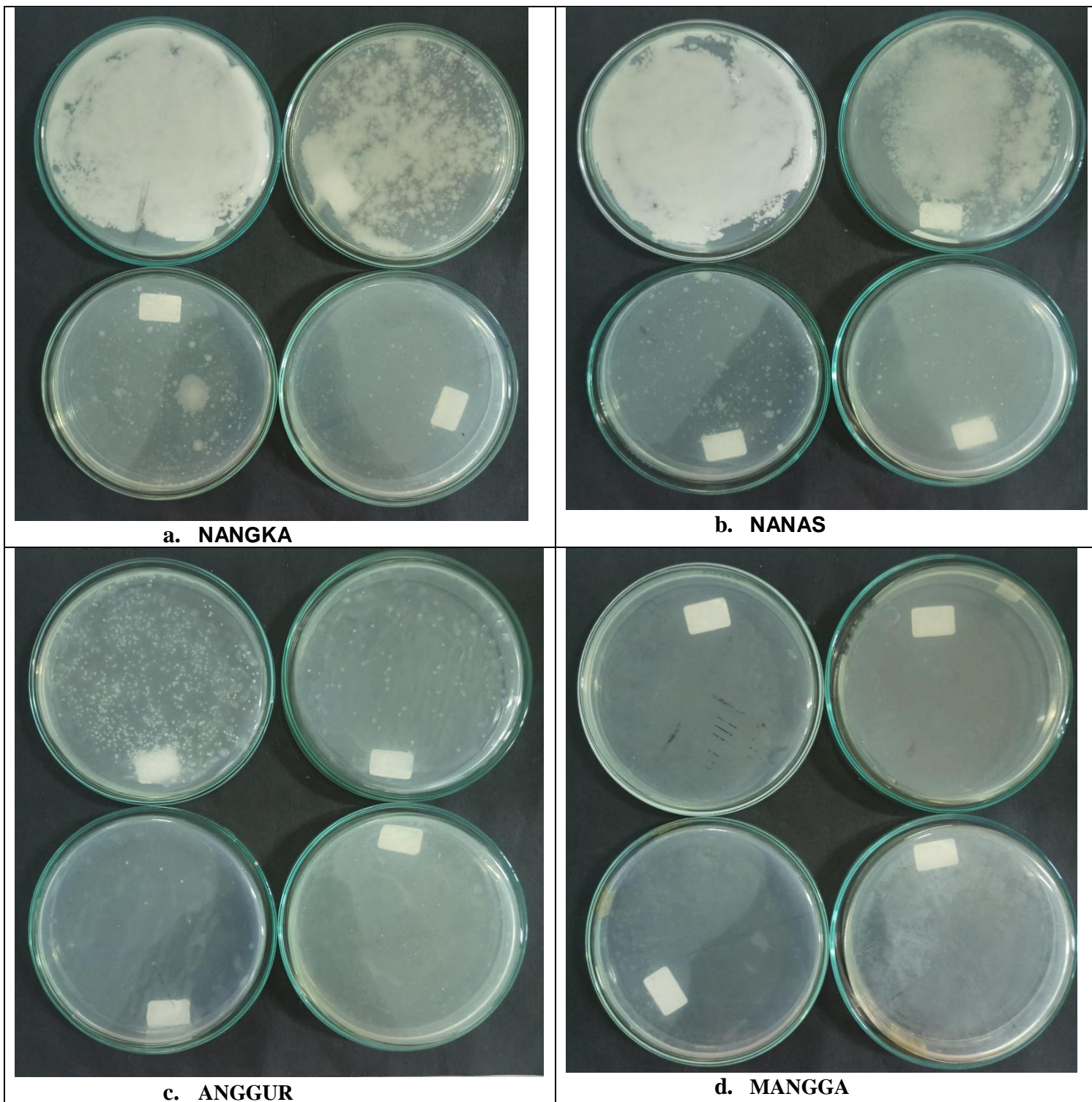
### 4.1. Isolasi dan identifikasi indigenous yeast pada beberapa buah tropis **Isolasi Yeast Indigenous**

Hasil isolasi dan identifikasi yeast pada buah anggur, nanas, nangka dan mangga pada media enrichment YMM (Yeast and Mold Medium). Beberapa jenis buah diperam pada media YMM selama 3 hari kemudian dilakukan isolasi yeast. (Gambar 1)



**Gambar 1. Pemeraman buah pada media YMM**

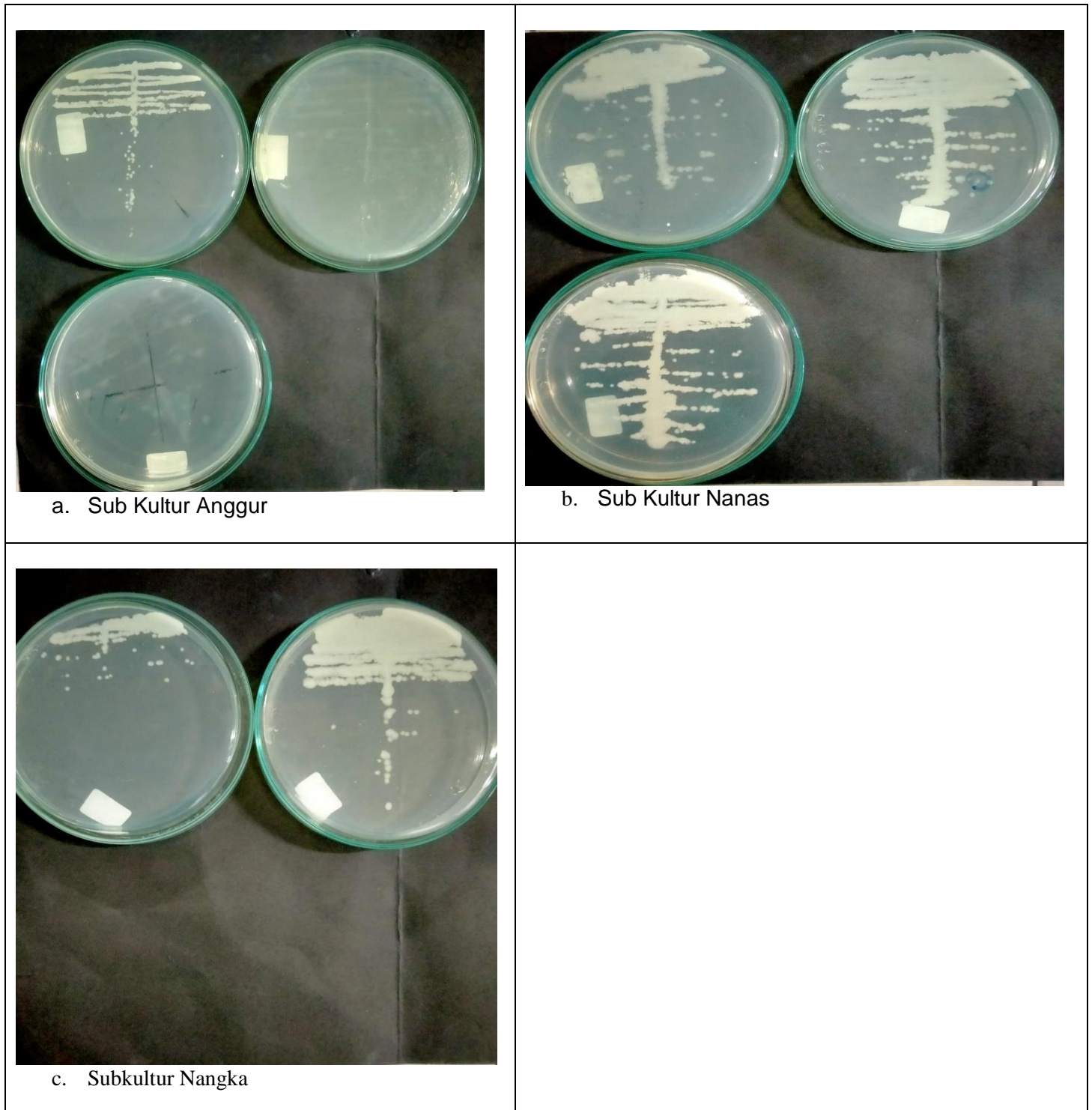
Hasil isolasi yeast pada beberapa jenis buah pada media enrichment kemudian dibiakkan pada cawan petri. Hasil biakan diamati selama 1- 3 hari dan pada media sudah muncul koloni yeast pada masing jenis buah. (Gambar 2). Koloni yang muncul pada jenis buah nangka, nanas, dan anggur, sedangkan pada mangga tidak tumbuh.



**Gambar 2. Hasil biakan koloni yeast pada media YMM**

### Sub Kultur Yeast pada Media YMM

Hasil pengamatan pada kultur biakan yeast didapatkan 3 jenis buah yang berhasil tumbuh kemudian di subkultur untuk menumbuhkan yeast yang berhasil di isolasi. Hasil sub kultur disajikan pada Gambar 3.

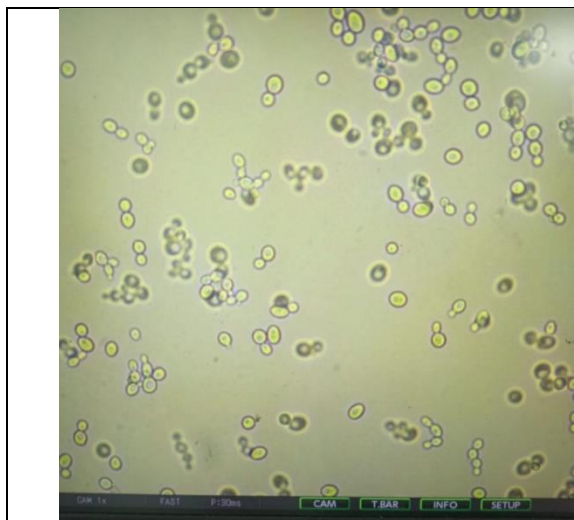


**Gambar 3. Sub Kultur yeast beberapa jenis buah pada Media YMM**



## Pengamatan Morfologi Yeast

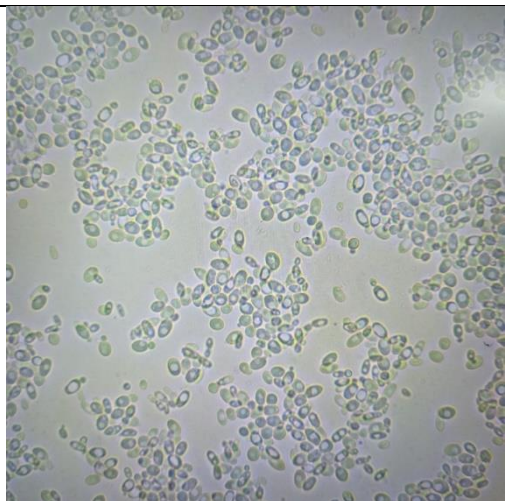
Pengamatan morfologi yeast dilakukan setelah sub kultur pada media miring dengan menggunakan mikroskop. Hasil pengamatan didapatkan ada 7 jenis yeast yang berhasil diidentifikasi secara morfologi pada Gambar 4.



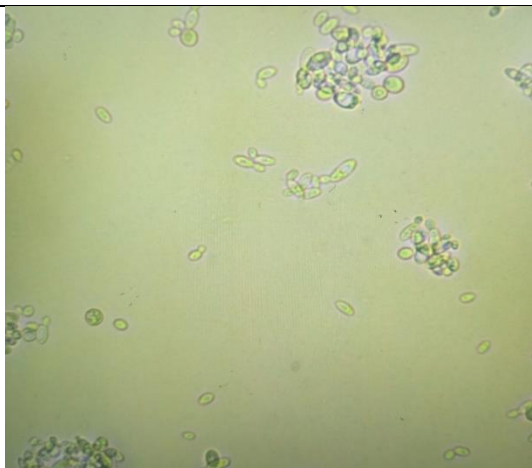
A1



A2



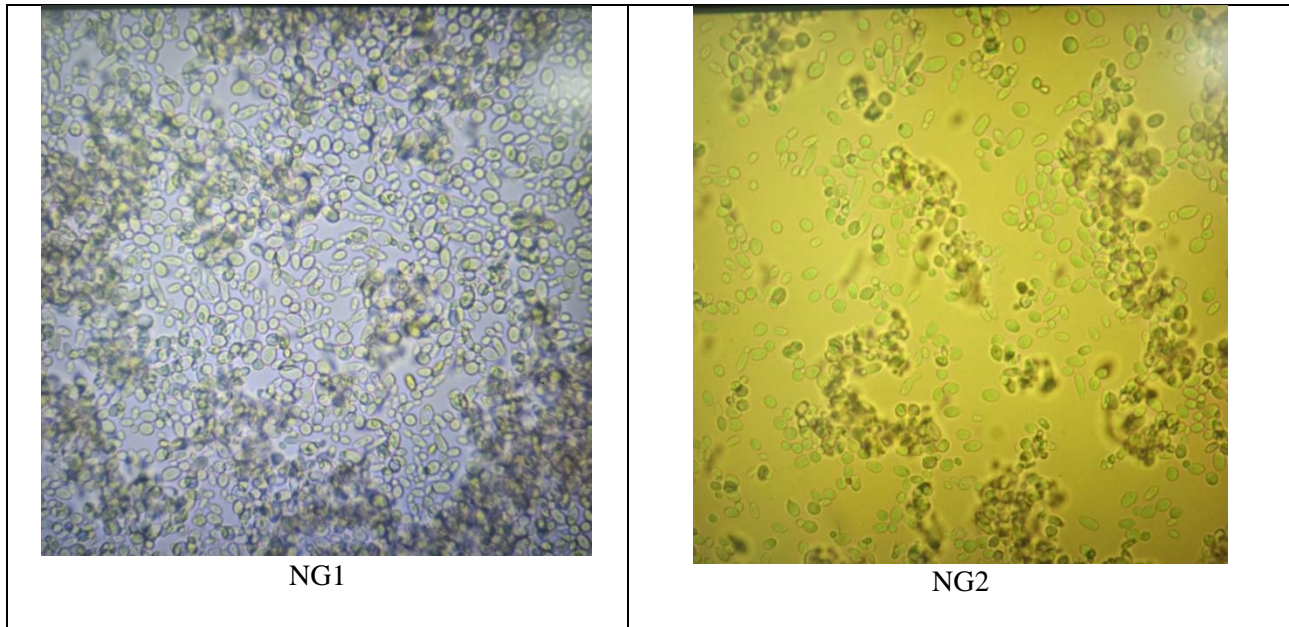
N1



N2



N3



**Gambar 4. Pengamatan Morfolgi Yeast**

Dari masing masing jenis buah didapatkan pada buah anggur terdapat 2 jenis yeast dengan kode A1 dan A2, dan pada buah nanas ditemukan ada 3 jenis yeast dengan kode N1, N2 dan N3 dan pada buah nangka ditemukan 2 jenis yeast yaitu NG1 dan NG2.

#### **Karakter Morfologi Yeast**

Pengamatan morfologi yeast menggunakan mikroskop meliputi ukuran, optic/warna, bentuk, elevasi, permukaan dan margin pada Tabel 1. Dari hasil subkultur didapatkan ada 7 jenis yeast yang kemudian diamati karrakter morfologinya. Karakter ukuran meliputi pinpoint, moderate dan small, warna meliputi opaque, transparent, dan translucent. Bentuk circular dan irregular. Elevasi raised dan flat. Permukaan halus mengkilap. Margin/tepi meliputi entire, undulate dan lobate.

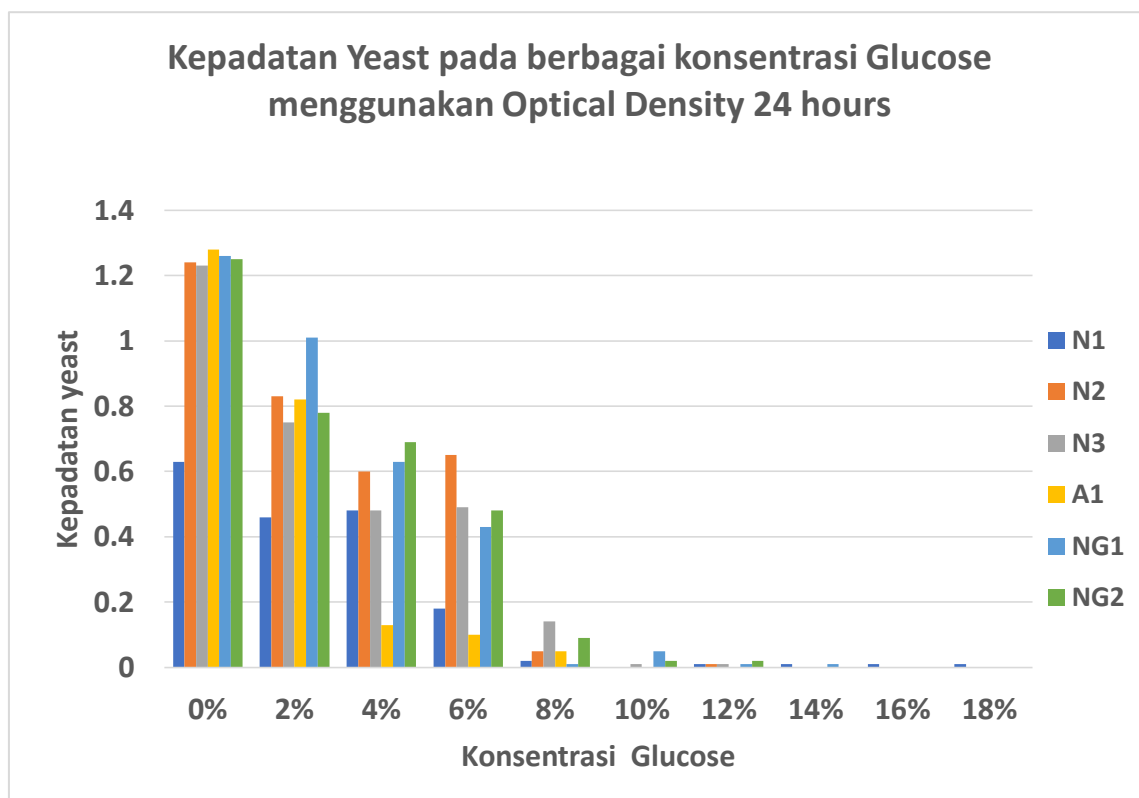
Uji morfologi koloni dan sel khamir dilakukan dengan mengamati struktur makroskopis dan mikroskopis. Hasil uji makroskopis dan mikroskopis tersebut akan dibandingkan dengan jenis-jenis khamir yang telah diketahui spesiesnya. Namun, hasil ini masih belum kuat jika ditujukan untuk mengetahui tingkat genus maupun spesies. Tetapi uji morfologi ini dapat digunakan sebagai data untuk memperkirakan genus isolat yang belum diketahui melalui kemiripan morfologinya dengan spesies yang telah diketahui

**Tabel 1. Karakter Morfologi Yeast pada Beberapa Jenis Buah**

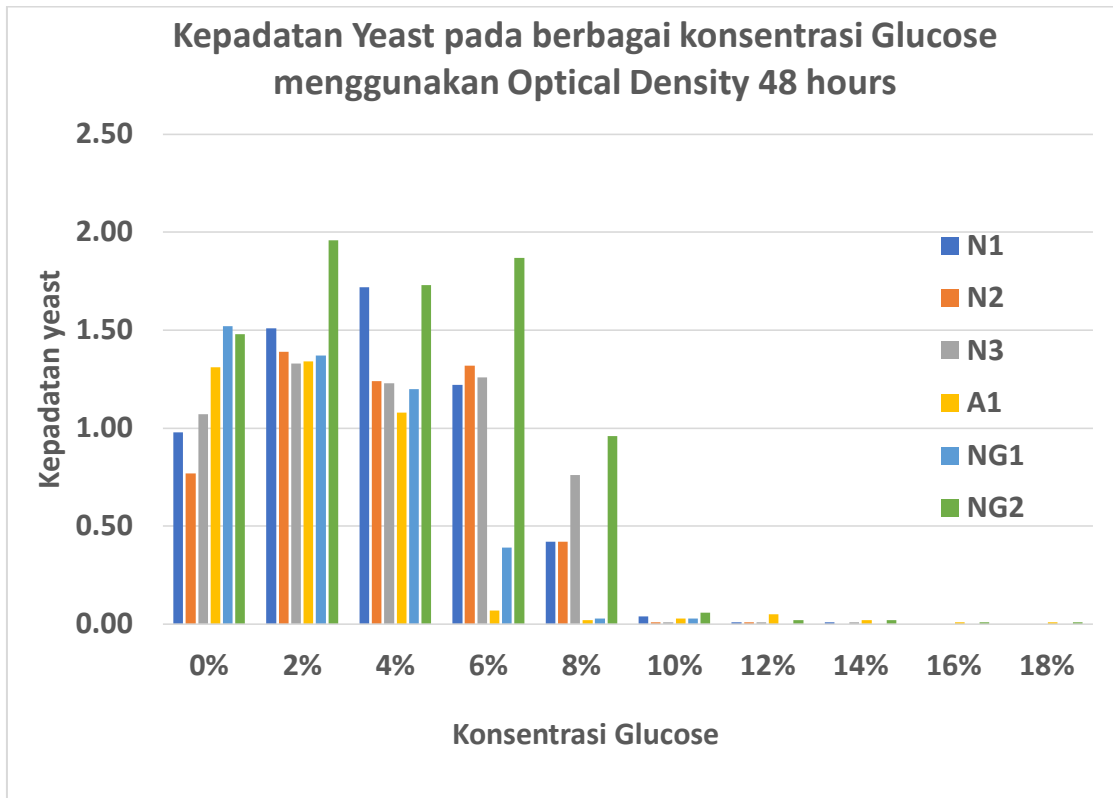
Kode Isolat	Deskripsi Morfologi					
	Ukuran	Optik/Warna	Bentuk	Elevasi	Permukaan	Margin
A1	pinpoint	Opaque	circular	flat	Halus mengkilap	Entire
A2	small	transparant	circular	raised	Halus mengkilap	Entire
A3	moderate	transparant	irregular	raised	Halus mengkilap	Undulate
NG1	pinpoint	translucent	circular	flat	Halus mengkilap	Entire
NG2	moderate	translucent	circular	flat	Halus mengkilap	Entire
N1	pinpoint	translucent	circular	flat	Halus mengkilap	Undulate
N2	moderate	Opaque	irregular	raised	Halus mengkilap	Lobate
N3	small	translucent	circular	flat	Halus mengkilap	Undulate

**Uji Toleransi Yeast pada Glucosa**

Uji toleransi yeast pada glucose diamati pada 24 dan 48 jam pada Gambar 5 dan 6. Hasil pengamatan pada ketahanan glucose didapatkan yeast mampu bertahan pada glucose sampai pada konsentrasi 8%. Jenis yeast yang diduga tahan pada glucose yaitu pada isolate N2 dan NG 2



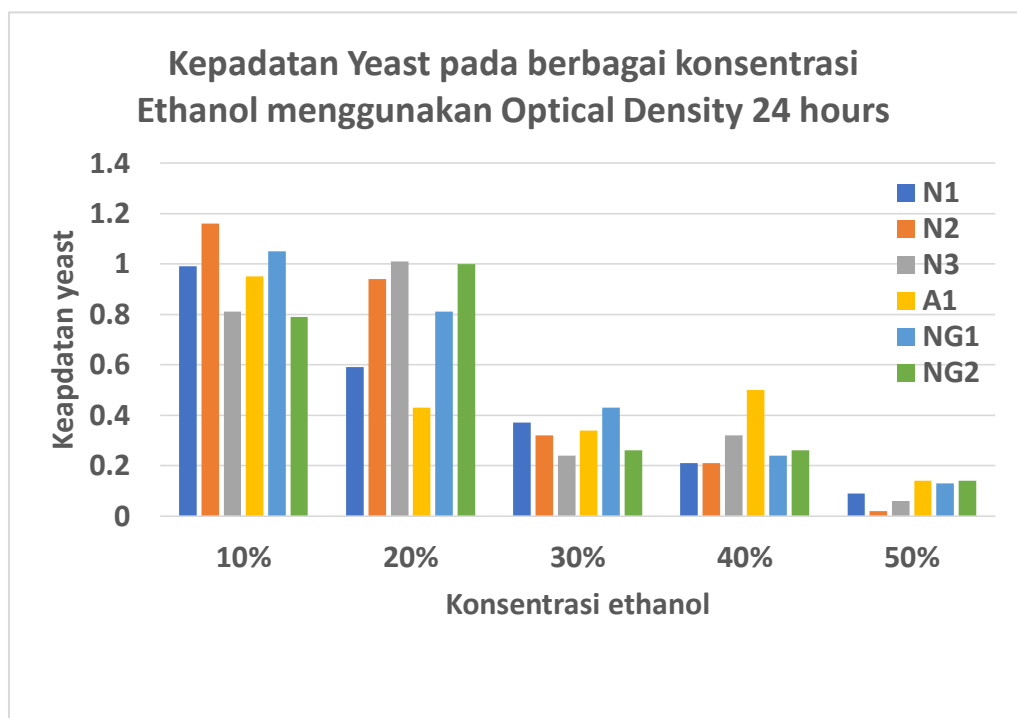
**Gambar 5. Uji toleransi yeast pada glucose pada pengamatan 24 jam**



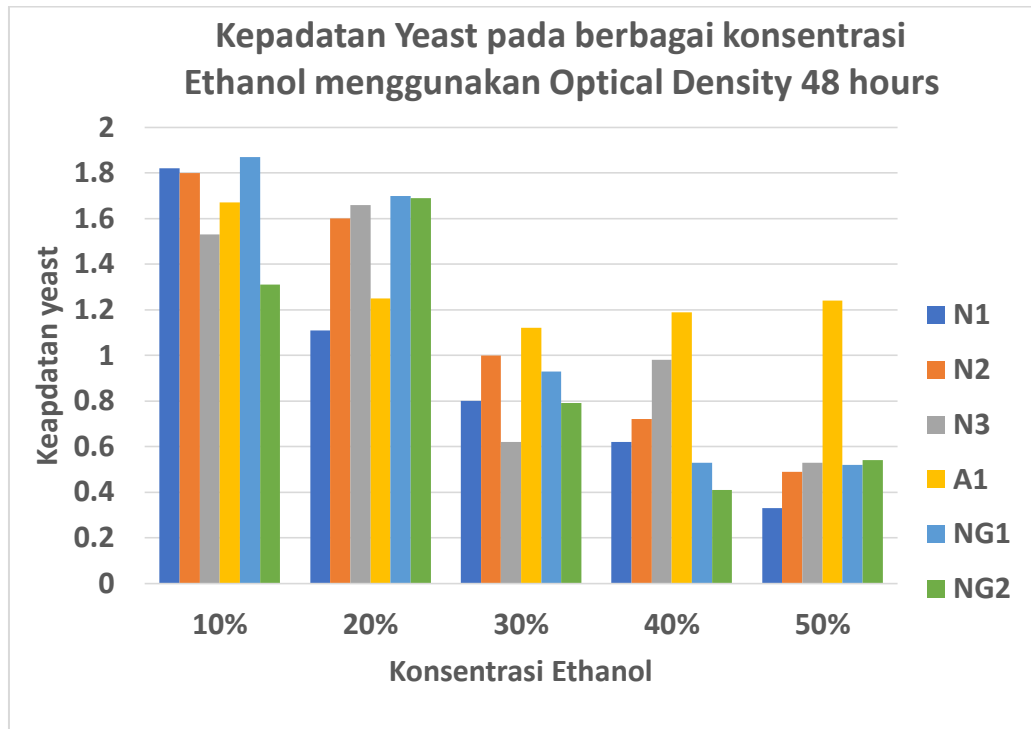
**Gambar 6. Uji toleransi yeast pada glucose pada pengamatan 48 jam**

### Uji Toleransi Yeast pada Ethanol

Uji toleransi yeast pada glucose diamati pada 24 dan 48 jam pada Gambar 7 dan 8. Hasil pengamatan pada ketahanan ethanol didapatkan yeast mampu bertahan pada glucose sampai pada konsentrasi 8%. Jenis yeast yang diduga tahan pada glucose yaitu pada isolate N2 dan NG 2.



**Gambar 7. Uji toleransi yeast pada ethanol pada pengamatan 24 jam**



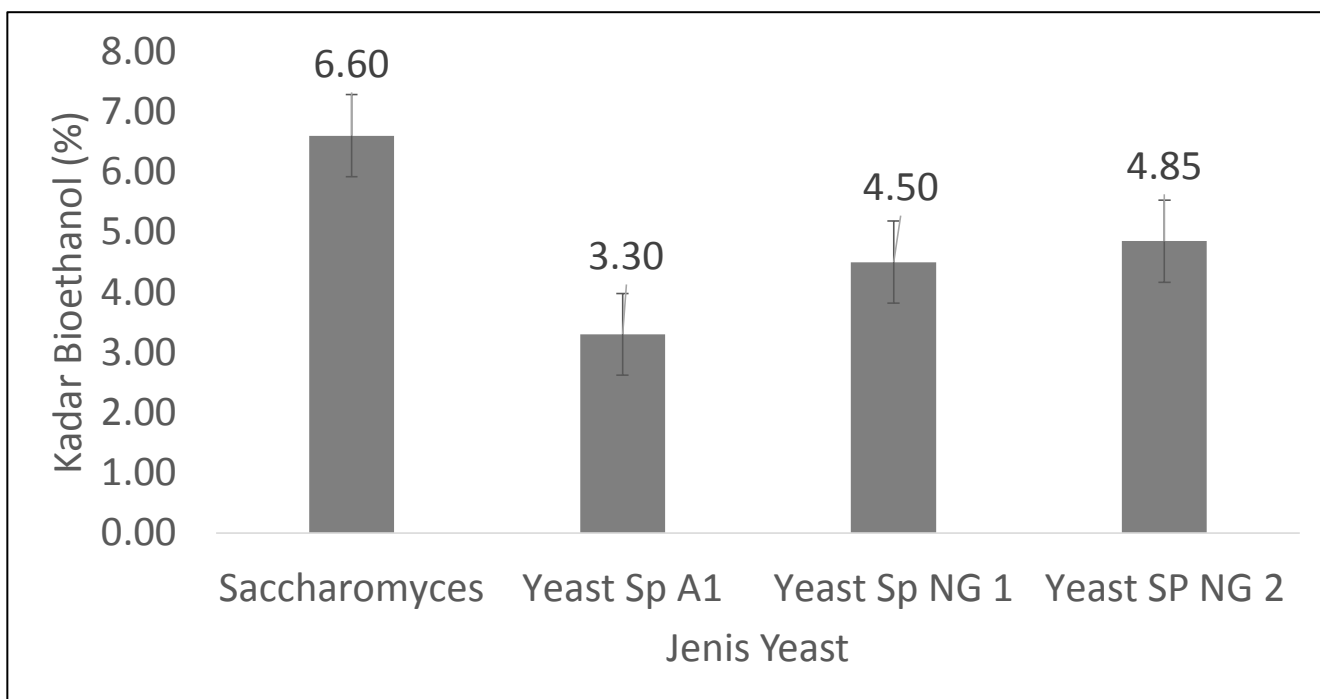
**Gambar 8. Uji toleransi yeast pada ethanol pada pengamatan 48 jam**

Nilai kerapatan optik khamir pada uji toleransi etanol di ukur menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dengan  $\lambda$  600 nm. Konsentrasi etanol yang menghasilkan nilai kerapatan optik isolat khamir terbesar adalah pada etanol 5%. Hal ini menandakan konsentrasi optimum isolat khamir yang di isolasi dari limbah kulit nanas madu adalah pada 5%. Semakin besar konsentrasi etanol, nilai kerapatan optik khamir semakin menurun (Ali & Khan, 2014). Nilai kerapatan optik menandakan jumlah sel yang tumbuh pada media uji dan berkaitan erat dengan proses fermentasi yang dilakukan oleh sel khamir.

Sel khamir dapat toleran pada etanol disebabkan oleh sifat fisik sel pada khamir dikelilingi oleh dinding sel yang terdiri dari mannoprotein dan glukan yang dapat memberikan bentuk pada sel khamir. Selain itu juga memberikan perlindungan mekanis dan termal dari lingkungan. Selanjutnya, dinding sel dapat mencegah terjadinya tekanan turgor yang mungkin akan membahayakan membran sel (Cabib et.al, 1991).

### Uji Kadar Bioethanol secara in Vitro

Kadar bioethanol yang dihasilkan oleh masing masing isolate khamir melalui fermentasi pada media YPG (Yeast Peptone Glucose) menggunakan GC-FID. Pengujian kemampuan yeast dalam memproduksi bioethanol dibandingkan dengan yeast control *Saccharomyces cerevisiae*. Hasil analisis menunjukkan bahwa kemampuan indigenous yeast dalam menghasilkan bioethanol masih dibawah kemampuan *S. cerevisiae*. *S. cerevisiae* salah satu yeast yang paling umum digunakan untuk proses fermentasi industri. Penggunaan strain ragi yang efisien dengan toleransi etanol yang lebih tinggi meningkatkan hasil etanol dalam proses fermentasi akan mengurangi biaya distilasi dan karenanya profitabilitas keseluruhan proses dan ramah lingkungan.



**Gambar 9. Kemampuan yeast dalam produksi bioethanol (%)**

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan oleh Ali & Khan (2014) dapat diketahui bahwa pada kulit buah anggur yang di isolasi terdapat khamir yang bisa digunakan dalam proses fermentasi untuk menghasilkan etanol. Penelitian yang dilakukan oleh Nasir, et al. (2017) juga menunjukkan bahwa terdapat khamir *Saccharomyces cerevisiae* pada buah nanas yang juga bisa memproduksi bioethanol. Hal ini tidak menutup kemungkinan pada kulit buah nanas madu juga terdapat khamir yang juga bisa digunakan dalam industri produksi etanol. Pada penelitian yang dilakukan oleh Setyawati & Rahman (2010) diketahui bahwa kulit nanas yang di fermentasi bisa digunakan sebagai substrat fermentasi dengan penambahan *Saccharomyces cerevisiae* selama 10 hari.

Bioetanol adalah salah satu parameter penting untuk menguji efisiensi pemanfaatan isolat khamir (Patil, 2006). Sebagian besar isolat menghasilkan bioetanol dalam kisaran 7,1 hingga 12,00 %. Sharma et al., (2007) telah melaporkan bahwa bioetanol maksimum dapat diproduksi mulai 48 jam waktu inkubasi. Hasil yang sama juga diperoleh dari penelitian yang dilakukan oleh Belal et al., (2014) dan Nasir et al., (2017), yang melaporkan bahwa konsentrasi etanol maksimum diperoleh setelah 72 jam. Produksi bioetanol meningkat secara bertahap sampai hari ketiga dan setelah itu menurun. Toleransi terhadap konsentrasi gula dan etanol yang lebih tinggi digunakan untuk menghasilkan jumlah etanol yang cukup besar. Selain itu toleransinya terhadap konsentrasi etanol juga menjadi kriteria lain yang diperlukan untuk memilih khamir sebagai kandidat untuk produksi industri bioetanol (Hacking et al., 1984 dan Rose, 1976 dalam Brooks 2008).. Adanya variasi dalam produksi bioetanol oleh isolat khamir yang berbeda mungkin dikarenakan oleh tingkat pemanfaatan gula mereka dalam medium fermentasi yang ditunjukkan oleh nilai konsentrasi gula reduksi dan batas toleransi etanol yang sudah diujikan sebelumnya. Hasil ini mirip dengan penelitian yang dilakukan oleh Patil (2006) dan Nasir, et al., (2017).

Berbagai mikroba telah digunakan dalam fermentasi etanol, diantaranya yang paling lazim adalah khamir *Saccharomyces cerevisiae* (ragi) yang merupakan mikroorganisme paling komersial saat ini, serta mempunyai pertumbuhan sempurna pada suhu  $\pm 30$  oC dan pH 4,8 (Narita, 2005).

Khamir dapat diperoleh dengan cara isolasi. Isolasi mikroorganisme adalah mengambil mikroorganisme yang terdapat di alam dan menumbuhkannya dalam suatu medium buatan. Proses pemisahan atau pemurnian dari mikroorganisme lain perlu dilakukan karena semua pekerjaan mikrobiologis, misalnya telaah dan identifikasi mikroorganisme, memerlukan suatu populasi yang hanya terdiri dari satu macam mikroorganisme saja. Prinsip dari isolasi mikroba adalah memisahkan satu jenis mikroba dengan mikroba lainnya yang berasal dari campuran bermacam-macam mikroba. Hal ini dapat dilakukan dengan menumbuhkannya dalam media padat sel-sel mikroba akan membentuk suatu koloni sel yang tetap pada tempatnya (Sutedjo, 1996). Guimaraes (2006) melaporkan bahwa hasil isolasi *Saccharomyces* dari anggur, ditemukan spesies yang paling dominan sebanyak 61 koloni dengan morfologi yang sesuai dengan spesies *Saccharomyces cerevisiae*. Istiana dkk., (2012) juga melakukan isolasi *Saccharomyces cerevisiae* dari 89 sampel yang terdiri atas tape singkong (27), tape ketan (16), ragi (32), kompos (3), lahang (4), madu (3), dan sampel lainnya. Sampel-sampel tersebut ditumbuhkan dalam cawan petri berisi media sabourauds glucose agar (SGA) dengan pH 5,5. Hasil pemeriksaan diperoleh sebanyak 7 isolat dari 89 sampel asal tape, ragi, cuka, madu dan lainnya (organ, cairan fermentasi) yang memiliki karakter morfologi *Saccharomyces cerevisiae*. Sedangkan *Saccharomyces* sp. telah diidentifikasi sebanyak 15 isolat, selanjutnya jenis khamir lain yang ditemukan adalah *Candida* sp. sebanyak 36 dan *Trichosporon* sp. sebanyak 17. Qureshi, dkk., (2007), melakukan isolasi sebanyak 25 sampel dari berbagai sumber yaitu makanan, jus jeruk

dan tetes tebu kemudian dikumpulkan secara acak dari daerah yang berbeda dari Rawalpindi dan 40 jenis ragi diisolasi dengan menggunakan media selektif Sabouraud's dekstroza agar (SDA). Jumlah total jenis ragi yang terisolasi dari ragi roti, jus jeruk, sampingan, dan tetes tebu adalah 1, 14, 13 dan 12. Masing-masing dari 40 jenis sampel, 14 diidentifikasi sebagai *Saccharomyces cerevisiae*, 12 sebagai *Saccharomyces kluyveri*, 4 sebagai *Saccharomyces exigus* dan *Saccharomyces dairnensis*, 2 sebagai *Saccharomyces ludwigii*, *Saccharomyces octosporus* dan *Saccharomyces unisporus*.

Fermentasi adalah proses produksi energi dalam sel dalam keadaan anaerobik (tanpa oksigen). Secara umum fermentasi adalah salah satu bentuk respirasi anaerobik, atau dapat lebih jelasnya yaitu sebagai proses respirasi dalam lingkungan anaerobik dengan akseptor elektron eksternal. Gula merupakan salah satu faktor dalam fermentasi, sehingga perbedaan reaksi fermentasi tergantung dari gula yang digunakan dan hasil dari produk. Glukosa ( $C_6H_{12}O_6$ ) yang merupakan gula paling sederhana, melalui fermentasi akan menghasilkan dua molekul etanol ( $C_2H_5OH$ ) dimana reaksi fermentasi ini dilakukan oleh khamir, dan digunakan pada produksi makanan. Persamaan reaksi kimia :  $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2 + 2ATP$  Pada awalnya gula yang disakarida akan di pecahkan menjadi monosakarida terlebih dahulu. Proses penguraian sukrosa dilakukan dengan bantuan enzim sukrase (invertase). Sukrosa yang dipecahkan menghasilkan glukosa dan fruktosa (Wirahadikusumah, 1985).

Azizah (2012) telah melakukan penelitian dalam pengaruh lama fermentasi terhadap kadar alkohol pada proses fermentasi bioetanol dari whey dengan substitusi kulit nanas. Berdasarkan penelitiannya diketahui bahwa perlakuan lama fermentasi (12, 24, 36, 48, dan 60 jam) tidak berpengaruh nyata terhadap kadar alkohol. Fermentasi selama 60 jam menghasilkan kadar alkohol yang bekisar antara 1,21-2,25%. Penelitian mengenai bioetanol telah banyak dilakukan sebelumnya dan menunjukkan hasil yang berbeda-beda. Kumalasari (2011), dengan menggunakan substrat kulit nanas kemudian difermentasi dengan ragi roti (*Saccharomyces cerevisiae*) selama 4 hari pada suhu 24-33 oC menghasilkan kadar alkohol bekisar 4,18-5,49%. Hal ini menunjukkan bahwa lama fermentasi pada penelitian ini belum mencapai waktu yang optimal. Sari, dkk (2008), menyatakan bahwa lama fermentasi yang paling optimal untuk proses pembuatan bioetanol adalah 3 hari. Jika fermentasi dilakukan lebih dari 3 hari, akan mengurangi kadar alkohol. Berkurangnya kadar alkohol disebabkan karena alkohol telah dikonversi menjadi senyawa lain, misalnya ester.



## **KESIMPULAN**

1. Hasil isolasi dari yeast menggunakan media selektif didapatkan 6 isolate dengan A1 (yang diisolasi dari buah anggur), kode NG1,NG2 yang diisolasi dari buah Nangka dan kode N1, N2, N3 yang diisolasi dari buah Nanas, sedangkan pada buah manga tidak berhasil diisolasi
2. Hasil uji pada ketahanan glucose, ethanol terpilih 3 isolate dengan kode N1, NG1 dan NG2
3. Hasil uji fermentasi bioethanol menggunakan yeast *Saccharomyces* sebagai control didapatkan kadar bioethanol pada *Saccharomyces* : 6,60%, yeast spesies kode N1 : 3,30%, yeast spesies kode NG1 : 4,5 %, yeast spesies kode NG2 : 4,85%

## **SARAN**

1. Perlu dilakukan identifikasi secara lebih lanjut baik secara biokimiawi dan molekuler untuk identifikasi pada jenis yeast yang berhasil diisolasi
2. Perlu dilakukan uji potensi produksi bioethanol pada skala laboratorium dan skala industri

## DAFTAR PUSTAKA

- Balat, M. 2011. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*, 52, 858–875.
- Balat, M., Balat, H., Oz, C. 2008. Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*, 34, 551–573.
- Banerjee, S., Mudliar, S., Sen, R., Giri, B., Satpute, D., Chakrabarti, T., & Pandey, R. A. (2010). Commercializing lignocellulosic bioethanol: technology bottlenecks and possible remedies. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining: Innovation for a sustainable economy*, 4(1), 77-93.
- Bonfiglioa Fernando , Matías Cagnoa , Fabiana Reya , Marina Torresb , Silvia Böhiga , Pilar Menéndezc , Solange I. Mussattod, 2019. Pretreatment of switchgrass by steam explosion in a semi-continuous prepilot reactor. *Biomass and Bioenergy* 121 (2019) 41–47
- Bušić, A., Marđetko, N., Kundas, S., Morzak, G., Belskaya, H., Ivančić Šantek, M., ... & Šantek, B. (2018). Bioethanol production from renewable raw materials and its separation and purification: a review. *Food technology and biotechnology*, 56(3), 289-311.
- Chen Hongzhang & Xiaoguo Fu. 2016. Industrial technologies for bioethanol production from lignocellulosic biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 57 (2016) 468–478
- Chen, J., Zhang, B., Luo, L., Zhang, F., Yi, Y., Shan, Y., ... & Lü, X. (2021). A review on recycling techniques for bioethanol production from lignocellulosic biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 149, 111370.
- Erkan I`c-o`za, K. Mehmet Tug`rula , Ahmet Saralb , Ebru I`c-o`z. 2009. Research on ethanol production and use from sugar beet in Turkey. *BIOMASS AND BIOENERGY* 33 (2009)1-7
- Gamage, J., Lam, H., & Zhang, Z. (2010). Bioethanol production from lignocellulosic biomass, a review. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, 4(1), 3-11.
- Hilares, Ruly Terán João Vitor Ienny, Paulo Franco Marcelino, Muhammad Ajaz Ahmed, Felipe A.F. Antunes, Silvio Silvéria da Silva, Júlio César dos Santos. 2017. Ethanol production in a simultaneous saccharification and fermentation process with interconnected reactors employing hydrodynamic cavitation-pretreated sugarcane bagasse as raw material. *Bioresource Technology*, 243(2017):652-659
- Iftachul Faridaa, Khaswar Syamsub\* , and Mulyorini Rahayuningsih. 2015. Direct Bioethanol Production from Breadfruit Starch (*Artocarpus communis* Forst) by Engineered Simultaneous Saccharification and Fermentation (ESSF) using Microbes Consortium. *Int. Journal of Renewable Energy Development* 4 (1) 2015: 25-31
- Limayem, A., & Ricke, S. C. (2012). Lignocellulosic biomass for bioethanol production: current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in energy and combustion science*, 38(4), 449-467.

Liu, R., & Shen, F. (2008). Impacts of main factors on bioethanol fermentation from stalk juice of sweet sorghum by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* (CICC 1308). *Bioresource technology*, 99(4), 847-854.

Mac Lean H.L., Lave, L.B. 2003. Evaluating automobile fuel/propulsion system technologies. *Prog Ener Combust Sci*, 29, 1–69.

Meinarni, Ni Putu Suci. 2016. Dampak Pencemaran Lingkungan Laut Terhadap Indonesia Akibat Tumpahan Minyak Montara Di Laut Timor. *Jurnal Komunikasi Hukum*. 2(2): 228-235

Nasir, A., Rahman, S. S., Hossain, M. M. & Choudhury, N., 2017. Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* from Pineapple and Orange and Study of Metal's Effectiveness of Ethanol Production. *European Journal of Microbiology and Immunology*, I(7), pp. 76-91

Rutz, D., & Janssen, R. (2007). *Biofuel technology handbook*. WIP Renewable energies, 95.

Shinde V and Patil R (2016). Production of fruit and vegetable waste by *saccharomyces cerevisiae* using banana peel and orange peel, *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci* 5(8): 280-284.

Suresh, K., Sree, N.K., Rao, L. V. 1999. Utilization of damaged sorghum and rice grains for ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresource Technology*, 68, 301-304.

Susanto, Heri. 2016. 15 Konsumen Minyak Terbesar Dunia. Artikel ini telah tayang di [Katadata.co.id](http://katadata.co.id) dengan judul "15 Konsumen Minyak Terbesar Dunia" , <https://katadata.co.id/herisusanto/infografik/5e9a56e2c6d6c/15-konsumen-minyak-dunia>

Yadav, K. S., Naseeruddin, S., Prashanthi, G. S., Sateesh, L., & Rao, L. V. (2011). Bioethanol fermentation of concentrated rice straw hydrolysate using co-culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*. *Bioresource technology*, 102(11), 6473-6478.

Zhu Shengdong , Wenjing Huang, Wangxiang Huang, Ke Wang, Qiming Chen, Yuanxin Wu.

2015. Pretreatment of rice straw for ethanol production by a two-step process using dilute sulfuric acid and sulfomethylation reagen. *Applied Energy*, 154(2015), 190–196

Zhuang, X., Wang, W., Yu, Q., Qi, W., Wang, Q., Tan, X., ... & Yuan, Z. (2016). Liquid hot water pretreatment of lignocellulosic biomass for bioethanol production accompanying with high valuable products. *Bioresource technology*, 199, 68-75.

**Pengujian Ketahanan pada Ethanol 24 jam**

	N1				N2				N3				A1				NG1				NG2			
	1	2	3	Rata rata	1	2	3	Rata rata	1	2	3	Rata rata	1	2	3	Rata rata	1	2	3	Rata rata	1	2	3	Rata rata
10%	1,09	0,94	0,94	<b>0,99</b>	1,09	1,16	1,22	<b>1,16</b>	1,00	0,32	1,11	<b>0,81</b>	1,5	0,68	0,68	<b>0,95</b>	1,1	1,08	0,97	<b>1,05</b>	0,83	1,10	0,45	<b>0,79</b>
20%	0,76	0,70	0,31	<b>0,59</b>	0,87	0,94	0,99	<b>0,93</b>	1,00	1,00	1,02	<b>1,01</b>	0,48	0,6	0,22	<b>0,43</b>	0,75	0,70	0,99	<b>0,81</b>	1,05	1,10	0,84	<b>1,00</b>
30%	0,35	0,26	0,51	<b>0,37</b>	0,22	0,21	0,53	<b>0,32</b>	0,24	0,19	0,29	<b>0,24</b>	0,39	0,3	0,32	<b>0,34</b>	0,35	0,37	0,57	<b>0,43</b>	0,24	0,26	0,28	<b>0,26</b>
40%	0,28	0,30	0,06	<b>0,21</b>	0,17	0,21	0,26	<b>0,21</b>	0,46	0,17	0,34	<b>0,32</b>	0,45	0,58	0,48	<b>0,50</b>	0,28	0,15	0,3	<b>0,24</b>	0,3	0,26	0,21	<b>0,26</b>
50%	0,14	0,07	0,07	<b>0,09</b>	0,02	0,02	0,02	<b>0,02</b>	0,06	0,04	0,07	<b>0,06</b>	0,14	0,12	0,16	<b>0,14</b>	0,15	0,13	0,12	<b>0,13</b>	0,14	0,13	0,14	<b>0,14</b>

**Pengujian Ketahanan pada Ethanol 48 jam**

	N1				N2				N3				A1				NG1				NG2			
	1	2	3	Rata rata	1	2	3	Rata rata	1	2	3	Rata rata	1	2	3	Rata rata	1	2	3	Rata rata	1	2	3	Rata rata
10%	1,91	1,74	1,82	<b>1,82</b>	1,8	1,68	1,93	<b>1,80</b>	1,78	0,86	1,96	<b>1,53</b>	2	1,41	1,61	<b>1,67</b>	1,87	1,9	1,83	<b>1,87</b>	1,16	1,82	0,94	<b>1,31</b>
20%	1,35	1,33	0,65	<b>1,11</b>	1,51	1,66	1,64	<b>1,60</b>	1,63	1,74	1,62	<b>1,66</b>	1,33	1	1,43	<b>1,25</b>	1,58	1,57	1,95	<b>1,70</b>	1,53	1,79	1,75	<b>1,69</b>
30%	0,94	0,4	1,07	<b>0,80</b>	1	0,57	1,43	<b>1,00</b>	0,54	0,09	1,22	<b>0,62</b>	0,93	0,94	1,49	<b>1,12</b>	0,45	0,82	1,51	<b>0,93</b>	0,86	0,76	0,76	<b>0,79</b>
40%	0,74	0,79	0,34	<b>0,62</b>	0,55	0,67	0,95	<b>0,72</b>	1,12	0,45	1,38	<b>0,98</b>	1,02	1,22	1,33	<b>1,19</b>	0,62	0,38	0,58	<b>0,53</b>	0,56	0,2	0,47	<b>0,41</b>
50%	0,42	0,28	0,30	<b>0,33</b>	0,32	0,54	0,6	<b>0,49</b>	0,68	0,27	0,65	<b>0,53</b>	1,24	1,73	0,74	<b>1,24</b>	0,54	0,48	0,54	<b>0,52</b>	0,59	0,5	0,52	<b>0,54</b>