



Seminar Nasional Ilmu Teknik dan Aplikasi Industri (SINTA)

Homepage: sinta.eng.unila.ac.id



Pengaruh Konsentrasi Mikroorganisme pada Proses Pembuatan Bioetanol dari Limbah Kulit Singkong (*Manihot esculenta*) Menggunakan Metode SSF (*Simultaneous Sacharification and Fermentation*) dengan Enzim Stargen™ 002, Enzim Selulase, *Saccharomyces cerevisiae* dan *Zymomonas mobilis*

P. N. Febriningrum^{a,*}, H. Utami^b, L. Lismeri^c, Darmansyah^d, Fatullah^e, M. Ikhsan^f

Jurusan Teknik Kimia Universitas Lampung, Jl. Prof. Sumantri Brojonegoro No. 1, Bandar Lampung 35145

INFORMASI ARTIKEL

ABSTRAK

Riwayat artikel:

Diterima 10/11/2025

Direvisi 12/12/2025

Kata kunci:

Bioetanol

Kulit Singkong

Saccharomyces cerevisiae

SSF

Zymomonas mobilis

Penelitian pembuatan bioethanol ini menggunakan bahan baku limbah kulit singkong (*Manihot Esculenta*) dengan menggunakan metode SSF (*Simultaneous Sacharification and Fermentation*) dengan variasi jumlah mikroorganisme *saccharomyces cerevisiae* dengan *zymomonas mobilis* (5%:5%, 5%:10%, 10%:5%, dan 10%:10%) w/v. yang difermentasikan selama 13 hari. Dilakukan analisa gula reduksi dengan menggunakan metode DNS (*Dinitrosalicylid acid*), kemudian analisa jumlah sel dilakukan dengan menggunakan counting chamber, dan analisa kadar ethanol dengan menggunakan GC (*Gas Chromatography*). Hasil penelitian menunjukan bahwa kadar ethanol tertinggi berada pada jumlah mikroorganisme *saccharomyces cerevisiae* dengan *zymomonas mobilis* 5% : 10% (w/v) dengan waktu lama fermentasi selama 12 hari dengan konsentersasi ethanol yang didapatkan sebesar 10,91%, dengan hasil perhitungan jumlah sel tertinggi sebanyak $24,5 \times 10^6$ sel/mL pada hari ke-9. Kemudian hasil analisa gula reduksi pada hari pertama didapatkan nilai sebesar 22,9 gram/mL.

1. Pendahuluan

Kebutuhan etanol dalam negeri semakin tahun semakin meningkat, terutama sebagai bahan bakar terbarukan ataupun dalam kebutuhan medis sebagai antiseptik. Dalam dunia bahan bakar minyak (BBM) sebagian besar bahan bakar yang digunakan di Indonesia menggunakan minyak bumi, bahan bakar tersebut berasal dari fosil yang tidak dapat diperbarui. Untuk menghadapi permasalahan semakin menipisnya percadangan minyak dalam bumi ini, maka perlu menggunakan sumber energi pengganti selain minyak bumi tersebut. Salah satu sumber energi alternatif yang dapat menggantikan ataupun mengurangi penggunaan minyak bumi ini antara lain bahan bakar bioethanol. Bioethanol merupakan cairan hasil proses fermentasi gula dari sumber karbohidrat (pati) dengan

menggunakan bantuan mikroorganisme, bioethanol juga dapat dibuat dengan bahan yang mengandung pati seperti tepung, sorgum, ubi jalar, singkong, sagu dan sebagainya (LIPI, 2008)

Bioethanol merupakan cairan hasil proses fermentasi gula dari sumber karbohidrat (pati) dengan menggunakan bantuan mikroorganisme. Karena proses pembuatannya melibatkan mikroorganisme atau proses biologis maka produk ethanol yang dihasilkan diberi nama bioethanol. Bahan baku yang dapat digunakan adalah sukrosa dan lignoselulosa yang biasanya terkandung dalam nira kelapa, nira tebu, nira aren, nangka, nira nipah, sari buah, jerami, kayu, batang pisang, bagas dan sebagainya. Selain bahan yang mengandung sukrosa dan lignoselulosa, bioethanol juga dapat dibuat dengan bahan yang mengandung pati

* Panca Nugrahini Febriningrum.
E-mail: febriningrumm@gmail.com

seperti ganyong, tepung sorgum, ubi jalar, singkong, sagu, dan sebagainya (LIPI, 2008).

Bahan-bahan pembuatan bioethanol banyak terdapat di Indonesia salah satunya singkong. Singkong merupakan tumbuhan jenis umbi-umbian yang banyak mengandung pati didalamnya. Selain bagian dalam singkong mengandung pati, bagian kulit kulit singkongpun mengandung pati yang merupakan bahan utama dalam pembuatan bioethanol. Di Indonesia kulit singkong sangat minim dimanfaatkan oleh petani singkong, biasanya kulit singkong ini hanya dimanfaatkan untuk pakan ternak yang sangat minim nilai jualnya. Bahkan di beberapa daerah banyak yang menjadikan limbah atau tidak dimanfaatkan.

Dikarenakan dalam kulit singkong mengandung jumlah pati yang cukup banyak. Salah satu pemanfaatan kulit singkong tersebut untuk meningkatkan nilai jualnya yaitu dimanfaatkan sebagai bahan pokok dalam pembuatan bioethanol. Dalam rangka mengurangi bahan bakar fosil, pemerintah Indonesia memberikan penelitian serius terkait pengembangan dan pemanfaatan bioethanol atau bahan bakar nabati (BBN) sebagai bahan bakar alternatif dari sumber terbarukan. Hal ini diwujudkan melalui terbitnya peraturan pemerintah No 22 tahun 2017 tentang Rencana Umum Energy Nasional (REUN). Kebijakan tersebut menjelaskan proyeksi kebutuhan energy nasional pada 2025 yang mana kontribusi minyak bumi dalam bauran energy nasional maksimal sebesar 25% dan konsumsi energy baru terbarukan (EBT) sebesar 23% (LIPI, 2008)

Metode *Simultaneous Saccharification and Fermentation* (SSF) lebih dikenal di Indonesia dengan sebutan Hidrolisis dan Fermentasi serentak. Pada metode ini proses hidrolisis dan proses fermentasi dilakukan secara bersamaan dalam satu waktu dan satu wadah. Metode SSF merupakan kombinasi proses hidrolisis selulosa dengan menggunakan enzim selulase dan khamir untuk fermentasi gula menjadi ethanol secara simultan atau serentak (Novia, 2014). Metode SSF ini dianggap sebagai solusi untuk memecahkan masalah yang terdapat pada metode SHF yaitu dengan mencegah adanya inhibisi kerja enzim hidrolisis oleh produk glukosa dan selubiosa. Sakarifikasi dan fermentasi simultan memiliki banyak keuntungan salah satunya dapat mengurangi waktu tambahan yang diperlukan selama produksi ethanol (Moshi dkk., 2016) SSF melibatkan hidrolisis simultan selulosa menjadi glukosa dengan konversi langsung menjadi ethanol oleh mikroba. Glukosa yang dihasilkan selama sakarifikasi kation secara simultan diasimilasi oleh ragi untuk menghindari penumpukan dari tekanan osmotik yang cenderung menghambat fermentasi (Moshi dkk., 2016). Maka pada penelitian ini untuk mengoptimalkan hasil

dari metode SSF ini kita menambahkan enzim Stargen™ 002, enzim selulase dan menggunakan 2 bakteri bersamaan, tinjauan ini berfokus pada konsentrasi mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae* dan *Zymomonas mobilis* untuk proses fermentasi.

2. Metodologi

2.1. Alat dan bahan

Alat-alat yang digunakan antara lain, toples plastik, gelas ukur, gelas beaker, pisau, nampan, blender, timbangan digital, neraca analitik, cawan petri, selang erlenmeyer, oven, hot plat stirer, pH meter, batang pengaduk, spatula, termometer alkohol, serangkaian alat distilasi, ayakan, pipet tetes, kawat ose, tabung reaksi, .

Adapun bahan yang digunakan antara lain, kulit singkong, enzim stargen™002, enzim selulase, aquadest, *Zymomonas mobilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, Urea (CH₄N₂O), pupuk NPK, asam klorida (HCL), Natrium hidroksida (NaOH), *potato dextrose agar* (PDA), (NH₄)₂SO₄, KH₂PO₄.

2.2. Prosedur percobaan

Pada penelitian ini, hal pertama yang disiapkan yaitu pembuatan bahan baku berupa tepung kulit singkong yang disiapkan dengan cara, limbah kulit singkong yang telah diterima dari pabrik olahan makanan dicuci hingga bersih agar terpisah dari tanah-tanah yang melekat pada kulit singkong tersebut. Dilakukan proses pencucian 3-5 kali untuk memastikan bahwa tidak ada lagi tanah yang menempel pada kulit singkong tersebut. Setelah itu kulit singkong dipotong hingga berukuran kecil agar proses pengeringan dapat berjalan cepat. Proses penjemuran dilakukan hingga berat kulit singkong yang dijemur telah konstan. Kemudian kulit singkong yang telah kering dihaluskan menggunakan blender untuk memperoleh hasil tekstur seperti tepung. Sebelum masuk kedalam proses hidrolisis dan fermentasi perlu dilakukannya proses pretreatment terlebih dahulu yang bertujuan untuk menghilangkan atau mendegradasi kandungan lignin dan lignoselulosa yang terdapat di dalam tepung kulit singkong. Lignin dan lignoselulosa merupakan bahan yang memiliki struktur rapat yang dapat menghambat kinerja enzim pada proses hidrolisis. Pada penelitian ini digunakan NaOH untuk memutus ikatan senyawa lignin dan selulosa pada kulit singkong. Dengan cara menimbang tepung kulit singkong, selanjutnya dilakukan refluks dengan air, dilanjutkan refluks dengan H₂SO₄ dan direndam dan dilakukan refluks kembali dengan H₂SO₄ (Indriasiani dkk, 2019)

$$\text{Hemiselulosa (\%)} = \frac{b-c}{a} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{Selulosa (\%)} = \frac{c-d}{a} \times 100\% \quad (2)$$

$$lignin (\%) = \frac{a-c}{a} \times 100\% \tag{3}$$

Setelah bahan sudah siap dilanjutkan proses hidrolisis dan fermentasi dengan metode SSF (*Simultaneous Saccharification Fermentation*). Proses SSF merupakan metode hidrolisis dan fermentasi dilakukan serentak, dimana pada proses ini 100 gram bahan baku tepung kulit singkong yang sudah di pretreatment dimasukkan ke dalam fermentordisertai penambahan air dengan perbandingan 1:10, untuk membantu kebutuhan nutrisi mikroorganisme perlu ditambahkan NPK sebanyak 4 gram, diakhiri dengan menambahkan enzim stargen^{TM002} dan selulosa serta mikroorganisme dengan memvariasikan rasio konsentrasi mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae* dengan *Zymomonas mobilis* (5%:5%, 5%:10%, 10%:5% dan 10%;10%) w/v. Campuran tersebut difermentasi selama 12 hari. Pengecekan hasil fermentasi diambil setiap 3 hari dengan mengukur kadar etanol, gula reduksi dan jumlah sel. Diakhir penelitian ini dilakukan analisis berupa kandungan gula reduksi dianalisis menggunakan spektrofotometri dengan menggunakan metode

2.3. Analisis

Melakukan analisis kandungan gula reduksi dengan alat spektrofotometer dengan metode DNS (*Dinitrisalicylic acid*). Menghitung jumlah sel menggunakan hemasitometer dengan menggunakan persamaan :

$$Jumlah\ sel\ (ml) = \frac{Jumlah\ sel\ tiap\ petak \times 1000 \times faktor\ pengenceran}{Luas\ petak\ (mm^2) \times kedalaman\ petak\ (mm)} \tag{4}$$

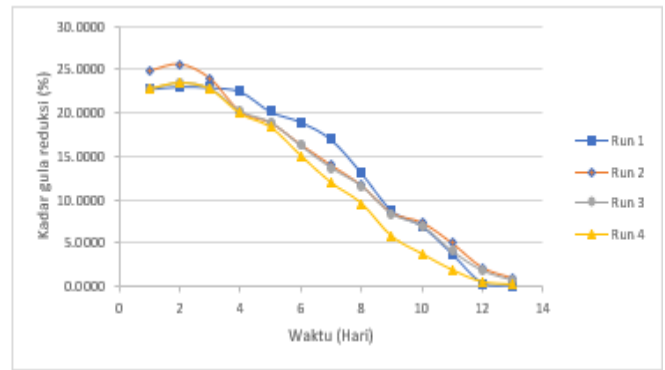
Lalu menghitung kadar etanol menggunakan *gas chromatography* di laboratorium Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Lampung.

3. Hasil dan pembahasan

3.1 Pengaruh Enzim Terhadap Kadar Gula Reduksi

Kadar gula reduksi merupakan jumlah banyaknya kandungan glukosa yang dihasilkan oleh proses enzimatis yang mengubah senyawa pati yang kompleks menjadi senyawa yang lebih sederhana berupa glukosa, pada penelitian ini proses tersebut dilakukan oleh enzim stargen ^{TM002} dan enzim selulase.

Pada penelitian Harun (2010) kadar gula reduksi mengalami penurunan seiring berjalannya waktu dikarenakan enzim akan mengalami perubahan struktur atau muatan asam amino yang merupakan sisi aktif yang berfungsi dalam peningkatan substrat sehingga *yield* glukosa yang dihasilkan menjadi lebih rendah.



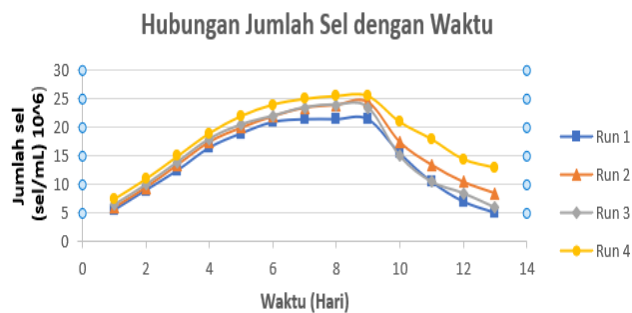
Gambar 1. Pengaruh Gula Reduksi Terhadap Waktu

Dari gambar diatas didapatkan bahwasanya kadar gula reduksi yang terjadi pada setiap run dan setiap harinya mengalami penurunan terkecuali pada hari pertama enzim masih menghasilkan glukosa sedangkan mikroorganisme yang tumbuh pada saat hari itu masih mengalami fase adaptasi sehingga jumlah konsumsi glukosa oleh mikroorganisme masih sedikit. Semakin banyak gula reduksi yang dimanfaatkan oleh sel maka konsentrasi etanol yang dihasilkan semakin tinggi dan sebaliknya semakin sedikit gula reduksi yang dimanfaatkan maka konsentrasi etanol yang dihasilkan semakin rendah. Hal ini sesuai dengan pernyataan wignyanto dkk., (2001) yang menyatakan bahwa semakin banyak gula reduksi yang dapat dimanfaatkan oleh sel maka konsentrasi etanol yang dihasilkan oleh sel semakin tinggi. Pada grafik diatas hal ini dapat dilihat pada run 4 yang memiliki jumlah sel yang banyak sehingga penurunan nilai gula reduksi pada run 4 lebih banyak.

3.2 Pengaruh Jumlah Sel Terhadap Waktu

Pembuatan kurva pertumbuhan bertujuan untuk mengetahui fase hifup *Saccharomyces cerevisiae* yang terdiri dari fase lag, fase logaritmik, fase stasioner dan fase kematian. Pada fase adaptasi ini mikroba beradaptasi dengan lingkungan dan tidak terjadi pertumbuhan. Pada fase pertumbuhan cepat terjadi pertumbuhan mikroba *saccharomyces cerevisiae* karena pada fase ini bakteri tumbuh dengan cepat dan terjadi proses penguraian gula sehingga dihasilkan kadar etanol yang tertinggi. Pada fase stasioner atau diam dimana pertumbuhan mikroorganisme mencapai keadaan maksimum, mikroorganisme yang aktif dan yang mati relative seimbang karena makanan substart relative sedikit. Pertumbuhan sel tersebut tua dan kemudia mati sedangkan sel yang muda akan bertahan hidup sampai nutrisi habis. Kemudian masuk pada fase kematian,

jumlah *sacharomyces cerevisiae* berkurang karena nutrisinya sudah habis (Ahmad, 2009)

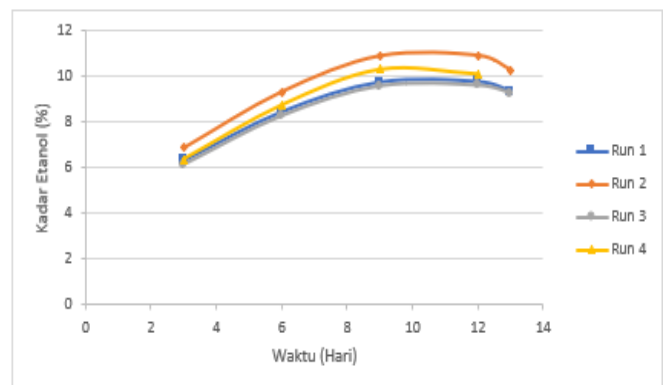


Gambar 2. Pertumbuhan Mikroorganisme

Dari gambar 2 merupakan pertumbuhan mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae* dengan *Zymomonas mobilis* pada setiap harinya. Mikroorganisme merupakan agen yang berperan penting untuk menghasilkan bioetanol, *Saccharomyces cerevisiae* dengan *Zymomonas mobilis* mikroorganisme yang dapat mengubah glukosa menjadi etanol, kedua mikroorganisme ini memiliki karakteristik yang saling mendukung dimana *Saccharomyces cerevisiae* dapat menghasilkan etanol yang cukup tinggi pada konsentrasi etanol yang rendah, sedangkan *Zymomonas mobilis* dapat memproduksi bioetanol walaupun keadaan konsentrasi etanol yang tinggi. Pada variasi konsentrasi mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae* 10% : *Zymomonas mobilis* 10% jumlah mikroorganisme dalam fermentor memiliki jumlah yang lebih tinggi dibandingkan dengan variasi konsentrasi mikroorganisme lainnya. Hal ini disebabkan jumlah mikroorganisme pada awal proses memiliki jumlah lebih banyak, tetapi fase pertumbuhan mikroorganisme pada variasi ini memiliki waktu yang lebih singkat dibandingkan dengan variasi lainnya yang dimana hal tersebut disebabkan oleh banyaknya kebutuhan substrat atau glukosa yang dikonsumsi oleh mikroorganisme.

3.3 Pengaruh Konsentrasi Mikroorganisme Terhadap Konsentrasi Bioetanol

Etanol pada penelitian merupakan hasil fermentasi glukosa yang dihasilkan dari proses hidrolisis secara enzimatik yang dilakukan oleh enzim StargenTM002 dan enzim selulosa. Proses fermentasi ini menggunakan mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae* dan *Zymomonas mobilis*. Kandungan etanol yang dihasilkan ini mengalami peningkatan setiap harinya selama mikroorganisme masih mendapatkan makanan atau nutrisi dari substratnya berupa glukosa, sehingga pada hari terakhir etanol ini mengalami penurunan dikarenakan sebagian etanol dikonsumsi oleh mikroorganisme yang tidak mendapatkan glukosa sebagai makanannya dan ini yang dapat menandakan proses fermentasi ini dapat diselesaikan.



Gambar 3. Pertumbuhan Konsentrasi Etanol Pada Variasi Konsentrasi Mikroorganisme

Pada gambar diatas didapatkan bahwasannya kandungan kadar etanol terbesar pada run ke-2 dengan variasi jumlah *Saccharomyces cerevisiae* dan *Zymomonas mobilis* 5 : 10%, dan kadar etanol terbesar tersebut dihasilkan pada waktu fermentasi hari ke-12 dengan nilai kadar etanol sebesar 10,91%. Pada gambar 4.4 grafik setiap runnya mengalami peningkatan dari hari pertama sampai hari ke-12, terkecuali pada run ke-4 yang mengalami penurunan pada hari ke-12. Penurunan kadar etanol ini menyatakan bahwasannya mikroorganisme sudah tidak dapat menghasilkan etanol kembali dikarenakan sudah tidak adanya substrat yang menjadi makanan atau nutrisi dari mikroorganisme tersebut.

Menurut Minarni (2013) menyatakan bahwa berkurangnya kadar etanol disebabkan karena alkohol telah terkonversi menjadi senyawa lain misalnya ester. Menurut Kunaeph (2008) semakin lama waktu fermentasi maka jumlah mikroorganisme semakin menurun dan akan menuju fase kematian karena alkohol yang dihasilkan semakin banyak dan nutrisi yang ada sebagai makanan mikroba semakin menurun. Penimbunan berkonsentrasi tinggi hasil metabolisme *Saccharomyces cerevisiae* ini menghambat pertumbuhan dan menyebabkan kematian pada sel *Saccharomyces cerevisiae* (Wignyanto, 2001). Menurut Elevri (2006), penurunan etanol pada glukosa berlebih atau konsentrasi glukosa terlalu tinggi atau konsentrasi media terlalu pekat berakibat mengganggu metabolisme sehingga menghambat pembelahan sel selanjutnya dan berpengaruh terhadap etanol. Dalam pembentukan etanol konsentrasi mikroorganisme sangat berpengaruh dikarenakan mikroorganisme sendiri yang akan menghasilkan etanol dengan mengubah glukosa menjadi etanol yang dihasilkan dan juga sebagai efek inhibisi substrat dan produk yang akan mengurangi jumlah oksigen terlarut (Judoamidjoyo, 1990).

Semakin banyak konsentrasi gula reduksi, maka jumlah sel *Saccromyces cerevisiae* juga akan semakin banyak, karena glukosa akan menjadi sumber substrat atau makanan bagi *S.cerevisiae* dan *Zymomonas mobilis* untuk tumbuh, dengan begitu, jumlah sel *S.cerevisiae* akan semakin banyak dan konsentrasi bioetanol yang dihasilkan juga akan semakin besar.

4. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan didapatkan kesimpulan bahwa hasil konsentrasi bioetanol tertinggi terdapat ada run 2 dengan variasi jumlah *Saccharomyces cerevisiae* dan *Zymomonas mobilis* 5:10% sebesar 10,9127% dengan waktu optimum pada hari ke-12. Hal ini juga didukung oleh perolehan konsentrasi gula reduksi dan jumlah sel *S. Cerevisiae* yang lebih banyak dibandingkan run 1,3 dan 4. Hal ini menunjukkan bahwa semakin banyak konsentrasi gula reduksi, maka jumlah sel *S. Cerevisiae* akan semakin banyak dan konsentrasi bioetanol yang dihasilkan juga akan semakin tinggi

Daftar Pustaka

- Ahmad, P., Jaleel, C. A., Azooz, M. M., & Nabi, G. (2009). Generation of ROS and non-enzymatic antioxidants during abiotic stress in plants. *Botany Research International*, 2(1), 11-20.
- Elevri P.A & Putra S.R. (2006). Produksi Etanol Menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* yang Diamobilisasi dengan Agar Batang. *Akta Kimindo*: 1(2): 105-114.
- Harun, R., Danquah, M. K., & Forde, G. M. (2010). Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 85(2), 199-203.
- Indri, dkk (2019) Proses Delignifikasi Kandungan Lignoselulosa Serbuk Bumbu Betung dengan Variasi NaOH dan Tekanan, Universitas Brawijaya, Malang
- Judoamidjojo M. (1990). Teknologi fermentasi. IPB-Press, Bogor.
- Kunaepah, U. (2008). Pengaruh Lama Fermentasi dan Konsentrasi Glukosa Terhadap Aktivitas Anti Bakteri, Polifenol Total dan Mutu Kimia Kefir Susu Kacang Merah, Tesis. Universitas Diponegoro: Semarang.
- LIPI (2008), Jurnal Ekonomi dan Pembangunan, Vol XVI
- Minami, N., B. Ismuyanto., dan Sutrisno, (2013), Pembuatan Bioetanol Dengan Bantuan *Saccharomyces Cerevisiae* Dari Glukosa Hasil Hidrolisis Biji Durian (*Durio Zhibetinus*), Vol. 1, No. 1, pp. 36 42 Jurusan Kimia, Fakultas

Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

Moshi, A.P., Hosea, K.M.M., E., Mamo, G., Onnby, L., & Nges, I.A. (2016) Production of Raw Starch-Degrading Enzyme by *Aspergillus* Sp. And its use in Conversion of Inedible Wild Cassava Flour to Bioetanol *Journal of Bioscience and Bioengineering*

Novia, dkk., (2014) Pembuatan Bioetanol dari Jerami Padi dengan Metode Ozonolisis- Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF), Universitas Sriwijaya, Palembang

Wignyanto, Suharjo dan Novita (2001) Pengaruh Konsentrasi Gula Reduksi Sari Hati Nanas dan Inokulum *Saccharomyces cerevisiae* pada Fermentasi Etanol, *Jurnal Teknologi Pertanian* 2 (1): 68-77