

PEMBUATAN BIOETANOL DARI SEKAM PADI DENGAN PROSES HIDROLISIS MENGGUNAKAN ENZIM SELULASE

Intan Permatasari, Dwi Wahyuni, Sri Rulianah

Jurusan Teknik Kimia, Politeknik Negeri Malang, Jl. Soekarno Hatta No. 9, Malang 65141, Indonesia
permatasari836@gmail.com ; [sri.rulianah@polinema.ac.id]

ABSTRAK

Sekam padi merupakan limbah proses penggilingan padi dan mengandung lignoselulosa yang cukup tinggi sehingga memiliki potensi besar sebagai bahan baku sumber energi alternatif. Lignoselulosa pada sekam padi tersusun atas selulosa, hemiselulosa, dan lignin. Karena kandungan selulosanya yang relatif tinggi yaitu 34,34-43,80%, maka bisa dimanfaatkan sebagai bahan baku produksi bioetanol. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan pengaruh konsentrasi sekam padi dan waktu fermentasi terhadap kadar dan *yield* bioetanol yang dihasilkan dan untuk mengetahui kondisi terbaik dari variabel yang diaplikasikan. Penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahapan, yaitu: sekam padi dikeringkan dan dikecilkan ukurannya sampai 60 mesh, selanjutnya dilakukan proses delignifikasi dengan NaOH 15% pada suhu 121°C selama 1 jam, kemudian dalam pembuatan bioetanol menggunakan metode *Simultaneous Saccharification and Fermentation* (SSF). Penelitian ini menggunakan enzim selulase 4% (b/b) dan *yeast Saccharomyces cerevisiae* 4% (b/v). Hasil bioetanol dengan metode SSF dianalisis kadar etanolnya menggunakan *Gas Chromatography* (GC). Dalam proses SSF, dilakukan variasi terhadap konsentrasi sekam padi 5, 7,5, 10, 12,5, dan 15% (b/v), serta fermentasi selama 4, 5 dan 6 hari. Hasil penelitian membuktikan bahwa konsentrasi sekam padi dari 5 sampai 10% kadar dan *yield* etanol mengalami kenaikan seiring dengan peningkatan lama waktu fermentasi. Namun, pada konsentrasi 12,5 dan 15% mengalami penurunan kadar dan *yield* etanol. Kondisi operasi terbaik dari variabel yang digunakan pada pembuatan bioetanol dengan melakukan fermentasi selama 6 hari dan menggunakan konsentrasi sekam padi sebanyak 7,5% (b/v) diperoleh kadar etanol yang dihasilkan mencapai 1,71% dan *yield* etanol sebesar 6,40%.

Kata kunci: Bioetanol, Enzim Selulase, Fermentasi, Sekam Padi, *Saccharomyces cerevisiae*.

ABSTRACT

*Rice husk, a residue from rice milling, contains lignocellulose that holds promise as an alternative energy source. Its lignocellulosic composition includes cellulose, hemicellulose, and lignin. With a cellulose content ranging from 34.34% to 43.80%, it presents potential as a feedstock for bioethanol production. The objective of this study is to explore how varying concentrations of rice husk and fermentation duration impact ethanol yield and content aiming to identify optimal operational parameters for these factors. The research progressed through the following stages: drying and milling rice husks to achieve a particle size of 60 mesh, followed by delignification using 15% NaOH at 121°C for one hour. Bioethanol production was conducted using the Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) approach, employing 4% (b/b) cellulase enzyme and 4% (b/v) *Saccharomyces cerevisiae* yeast. Ethanol concentrations were analyzed using Gas Chromatography (GC). The experiment involved varying concentrations of rice husk (5%, 7.5%, 10%, 12.5%, and 15% b/v) during the SSF process, along with fermentation periods of 4, 5, and 6 days. The result of the experiment indicate that the concentration of rice husk 5, 7,5 and 10% ethanol content and yield increased along with the lengthy fermentation duration. While, the concentration of 12,5 dan 15% decreased ethanol content and yield. Optimal conditions for bioethanol production were identified as a 6-day fermentation period with a rice husk concentration of 7.5% (b/v), resulting in an ethanol content of 1.71% and a yield of 6.40%.*

Keywords: Bioethanol, Enzyme Cellulose, Fermentation, Rice Husk, *Saccharomyces cerevisiae*.

Corresponding author: Sri Rulianah

Jurusan Teknik Kimia, Politeknik Negeri Malang

Jl. Soekarno-Hatta No. 9, Malang 65141, Indonesia

E-mail: sri.rulianah@polinema.ac.id



1. PENDAHULUAN

Bahan Bakar Minyak atau disebut juga BBM adalah salah satu sumber kebutuhan energi penting yang diperlukan oleh manusia. Seiring berjalanannya waktu, kebutuhan minyak di Indonesia menghadapi kenaikan yang cukup signifikan. Akibatnya, Indonesia menghadapi krisis energi. BBM merupakan energi yang diperoleh dari fosil yang ada. Meningkatnya kebutuhan energi di Indonesia membuat bahan baku fosil mulai menipis. Hal ini, perlu dilakukan inovasi baru untuk menciptakan energi yang ramah lingkungan. Dimana saat proses pembakaran BBM dihasilkan kandungan CO_2 yang dapat menyebabkan emisi gas rumah kaca sehingga mencemari lingkungan [1]. Hal yang dapat dilakukan adalah menciptakan energi ramah lingkungan seperti bioetanol.

Bioetanol adalah salah satu energi alternatif yang diproduksi melalui proses fermentasi. Dimana bahan baku produksi bioetanol diperoleh dari nabati dan biomassa yang memiliki kandungan gula, pati atau selulosa yang diolah terlebih dahulu untuk menghasilkan glukosa [2]. Proses pembuatan bioetanol dapat dilakukan dengan memanfaatkan fermentasi dengan bantuan *yeast*. Bioetanol dapat diproduksi dari beberapa bahan salah satunya yaitu sekam padi yang memiliki kandungan selulosa tinggi [3].

Sekam padi adalah sisa hasil pertanian yang tersedia dalam jumlah yang sangat besar [4]. Sekam padi adalah salah satu jenis biomassa lignoselulosa yang mengandung selulosa, hemiselulosa, dan lignin. Selulosa tersebut bisa didegradasi oleh enzim selulase menjadi bioetanol [2]. Kandungan selulosa pada sekam padi mencapai 34,34 – 43,80% [4].

Tahapan proses pengolahan sekam padi menjadi bioetanol terdiri dari proses delignifikasi, proses hidrolisis, dan proses fermentasi. Tahap delignifikasi dilakukan untuk mengurangi kandungan lignin yang bisa menghambat proses hidrolisis dalam pembuatan bioetanol [5]. Dengan demikian, delignifikasi dapat meningkatkan konversi selulosa menjadi glukosa yang pada akhirnya akan meningkatkan rendemen bioetanol yang dihasilkan [6]. Setelah itu, tahap hidrolisis menjadi sangat krusial, dimana pada tahap ini ditentukan jumlah glukosa yang dapat dihasilkan untuk menghasilkan bioetanol. Tahap selanjutnya proses fermentasi, dimana terjadi penguraian molekul-molekul glukosa diubah menjadi alkohol dan CO_2 dengan bantuan enzim invertase [7].

Proses produksi bioetanol dengan menggunakan metode *Simultaneous Saccharification and Fermentation* (SSF) adalah gabungan dari proses hidrolisis menggunakan enzim selulase dan *yeast Saccharomyces cerevisiae* digunakan secara simultan untuk mengubah gula menjadi etanol. Metode SSF dapat mengatasi masalah hambatan kerja enzim oleh glukosa yang merupakan kekurangan dari metode *Separated Hydrolysis Fermentation* (SHF) [5]. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Novia, dkk. (2017) menerapkan *pretreatment* dengan kombinasi larutan basa NaOH 10% dan asam H_2SO_4 2% efektif menurunkan kadar lignin hingga 60% setelah proses delignifikasi 90 menit. Sementara itu, konsentrasi selulosa tertinggi sebesar 78,68% tercapai pada delignifikasi selama 75 menit. Proses *Simultaneous Saccharification and Fermentation* (SSF) menghasilkan tingkat produksi etanol sebesar 1% pada SSF 5 hari [4]. Namun, terdapat beberapa kendala dalam penggunaan asam pada proses delignifikasi. Asam lemah dapat menurunkan kadar lignin, tetapi menghasilkan selulosa dalam jumlah rendah, sementara penggunaan asam kuat bersifat korosif memerlukan peralatan khusus yang lebih mahal, sehingga mempengaruhi efisiensi dan biaya proses [8]. Karenanya penggunaan larutan basa cenderung menjadi opsi

yang lebih baik dalam proses delignifikasi. Penelitian oleh Kaur dan Singh (2017) menggunakan metode Van Soest untuk menganalisis kadar lignin, dan hasilnya menunjukkan penurunan kandungan lignin sebesar 24,2% setelah dilakukan *pretreatment* menggunakan NaOH 3%. Proses SSF yang dilakukan menghasilkan kadar etanol sebesar 5,89% [9]. Penelitian oleh Rulianah, dkk. (2021) juga menerapkan metode Van Soest mampu menurunkan kadar lignin hingga 90,36%. Pada proses SSF konsentrasi etanol tertinggi yang diperoleh sebesar 11,04% dengan waktu fermentasi selama 144 jam dan penambahan *crude cellulase* sebanyak 50% (v/v). Dalam penggunaan larutan NaOH 3% menunjukkan penurunan kandungan lignin yang lebih rendah dibandingkan dengan penambahan *crude cellulase* selama waktu fermentasi. Namun penggunaan *crude cellulase* untuk menurunkan kadar lignin tidak sesederhana delignifikasi menggunakan larutan basa. Oleh karenanya, penggunaan larutan basa dengan konsentrasi cukup tinggi dapat dikatakan cukup efektif untuk menurunkan kadar lignin selama proses delignifikasi [10].

Berdasarkan uraian di atas tujuan penelitian ini dilakukan secara eksperimen untuk mengevaluasi pengaruh konsentrasi sekam padi dan waktu fermentasi terhadap kadar dan *yield* bioetanol dengan fermentasi secara *Simultaneous Saccharification and Fermentation* (SSF). Pengujian yang digunakan pada penelitian ini mencakup kadar lignin, hemiselulosa, dan selulosa menggunakan metode Van Soest dan menguji kadar bioetanol menggunakan *Gas Chromatography* (GC).

2. METODOLOGI PENELITIAN

Pada penelitian ini, data dikumpulkan menggunakan metode pendekatan kuantitatif eksperimental. Metodologi penelitian ini melibatkan beberapa tahap, di antaranya:

2.1. Persiapan Bahan Baku

Pembuatan bioetanol diawali dengan penyiapan media atau sekam padi. Dijemur 1000 gram sekam padi di bawah sinar matahari hingga kering dan mencapai kadar air 5,8%. Selanjutnya, dilakukan *size reduction* dengan menggunakan alat penggiling padi dan mengubahnya menjadi bubuk halus. Sekam padi yang sudah dihaluskan diayak dengan ayakan ukuran 60 mesh.

2.2. Delignifikasi

Sekam padi hasil *screening* dilakukan proses delignifikasi. Sekam padi 800 gram direndam dalam 5 liter larutan NaOH 15%. Selanjutnya, campuran tersebut dipanaskan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 1 jam. Lalu, didinginkan dan disaring menggunakan kertas saring. Endapan diambil dan dicuci menggunakan aquades hingga air cucian bersifat netral. Kemudian, endapan sekam padi dikeringkan dalam oven 100°C selama 1 jam menggunakan kertas saring.

2.3. Analisis Kadar Lignin, Selulosa dan Hemiselulosa Metode Van Soest

Proses pertama adalah analisis kadar *Neutral Detergent Fiber* (NDF). Menimbang berat sampel sekam padi 0,5 gram dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL. Kemudian, menambahkan 30 mL larutan *Neutral Detergent Solution* (NDS) dan ditutup rapat menggunakan *alumunium foil*. Erlenmeyer tersebut kemudian dilakukan pemanasan dengan menggunakan air mendidih selama 1 jam sambil sewaktu-waktu dilakukan pengadukan. Setelah pemanasan, sampel disaring dengan kaca masir yang berat awalnya telah diketahui (a gram) dengan penggunaan pompa vakum. Selanjutnya,

dicuci dengan 100 mL air mendidih dan dilanjutkan dengan 25 mL alkohol. Setelah itu, sampel dalam kaca masir dioven pada suhu 105°C selama semalam. Setelah pengeringan, kaca masir ditempatkan dalam desikator selama 30 menit, lalu ditimbang (b gram). Kemudian mengukur menggunakan persamaan (1).

- Perhitungan kadar NDF (%)

$$\text{Kadar NDF(%)} = \frac{b-a \text{ (gram)}}{\text{berat contoh (gram)}} \times 100\% \quad (1)$$

Keterangan : b = berat kaca masir + sampel setelah pengeringan (gram)

a = berat kaca masir awal (gram)

berat contoh = berat sampel awal yang digunakan (gram)

Selanjutnya, analisis kadar *Acid Detergent Fiber* (ADF) menimbang 0,5 gram sekam padi, kemudian dimasukkan kedalam erlenmeyer 250 mL. Setelah itu, menambahkan 40 mL larutan *Acid Detergent Solution* (ADS) dan ditutup rapat menggunakan *alumunium foil*. Selanjutnya dilakukan pemanasan dalam air dengan waktu 1 jam sambil sesekali dilakukan pengadukan. Kemudian, sampel disaring dengan kaca masir yang berat awalnya telah diketahui (a gram) dengan menggunakan pompa vakum. Selanjutnya, dilakukan pencucian menggunakan 100 mL air mendidih dan dilanjutkan 25 mL etanol 75%. Kemudian sampel dalam kaca masir dioven pada suhu 105°C selama semalam. Selanjutnya, kaca masir dimasukkan dalam desikator selama 30 menit, lalu ditimbang (b gram). Kemudian dihitung menggunakan persamaan (2).

- Perhitungan kadar ADF (%)

$$\text{Kadar ADF(%)} = \frac{b-a \text{ (gram)}}{\text{berat contoh (gram)}} \times 100\% \quad (2)$$

Keterangan : b = berat kaca masir + sampel setelah pengeringan (gram)

a = berat kaca masir awal (gram)

berat contoh = berat sampel awal yang digunakan (gram)

Selanjutnya dilakukan analisis kadar hemiselulosa, lignin, dan selulosa. Kertas saring berisi ADF disaring dengan pompa vakum dan ditambahkan 20 mL H₂SO₄ 72% sambil diaduk dan dibiarkan selama 2 jam. Setelah itu, dilakukan pencucian dengan air mendidih secukupnya. Selanjutnya, sampel diletakkan dalam oven pada suhu 100°C dan dibiarkan semalam. Kemudian, dimasukkan dalam desikator selama 30 menit dan ditimbang (c gram). Residu selanjutnya dimasukkan dalam *furnace* untuk proses pengabuan pada suhu 500°C selama 2 jam dan didinginkan kembali pada desikator selama 30 menit dan ditimbang (d gram). Kemudian menghitung dengan persamaan (3), (4), dan (5).

- Perhitungan kadar selulosa (%)

$$\text{Kadar selulosa (\%)} = \frac{c-d \text{ (gram)}}{\text{berat contoh (gram)}} \times 100\% \quad (3)$$

Keterangan : c = berat kaca masir + sampel setelah pengeringan dalam oven (gram)

d = berat kaca masir + sampel setelah pembakaran dalam furnace (gram)

berat contoh = berat sampel awal yang digunakan (gram)

- Perhitungan kadar lignin (%)

$$\text{Kadar lignin (\%)} = \frac{d(\text{gram})}{\text{berat contoh (gram)}} \times 100\% \quad (4)$$

Keterangan : d = berat kaca masir + sampel setelah pembakaran dalam furnace (gram)
berat contoh = berat sampel awal yang digunakan (gram)

- Perhitungan kadar hemiselulosa (%)

$$\text{Hemiselulosa (\%)} = \% \text{ NDF} - \% \text{ ADF} \quad (5)$$

Keterangan : % NDF = *Neutral Detergent Fiber (%)*
% ADF = *Acid Detergent Fiber (%)*

2.4. Pengujian Aktivitas Enzim

Pada uji analisis enzim disiapkan 3 tabung reaksi. Tabung reaksi yang digunakan diberi label blanko, kontrol, dan sampel. Pada tabung reaksi blanko, ditambahkan 1,8 mL CMC dan 0,2 mL aquades. Pada tabung reaksi sampel, dimasukkan 1,8 mL CMC dan 0,2 mL ekstrak enzim. Sedangkan pada tabung reaksi kontrol, ditambahkan 0,2 mL ekstrak enzim dan 1,8 mL substrat CMC. Kemudian, larutan tersebut dipanaskan selama 5 menit pada suhu 40°C. Setelah itu, ketiga tabung reaksi divortex hingga homogen. Larutan yang sudah homogen diinkubasi dalam *waterbath* selama 60 menit pada suhu 50°C. Selanjutnya, ditambahkan 2 mL larutan NDS dan diinkubasi kembali di dalam *waterbath* suhu 100°C selama 5 menit. Kemudian, tabung reaksi didinginkan dalam air dingin sampai suhu tabung mencapai suhu ruang. Selanjutnya, mengukur absorbansi dengan Panjang gelombang 575 nm dengan spektrofotometer UV-VIS. Kemudian, dihitung aktivitas enzim menggunakan rumus persamaan (6).

- Perhitungan aktivitas enzim

$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{\text{kadar glukosa} \times \text{faktor pengenceran} \times \text{volume CMC}}{\text{volume} \times \text{BM glukosa} \times \text{waktu inkubasi}} \quad (6)$$

Keterangan : kadar glukosa = konsentrasi glukosa ($\mu\text{mol/mL}$)

faktor pengenceran = pengenceran sampel sebelum analisis

volume CMC = volume substrat CMC yang digunakan (mL)

volume = volume total larutan uji (mL)

BM glukosa = berat molekul glukosa (180 g/mol)

waktu inkubasi = lama reaksi (menit)

2.5. Pengujian UV – VIS

Pada pengujian UV-VIS pertama, dihubungkan spektrofotometer ke sumber arus. Kemudian, dinyalakan spektrofotometer dengan menekan tombol ON pada perangkat. Setelah itu, tampilan program muncul dan proses ditunggu hingga selesai dengan indikator warna hijau dan status siap. Selanjutnya, didiamkan selama 15 menit untuk memanaskan alat sebelum spektrofotometer siap digunakan. Setelah alat panas, aturlah

panjang gelombang sebesar 575 nm. Kuvet yang berisi sampel kemudian dimasukkan ke bagian depan setelah dilap dengan tisu, sisi kuvet yang terang diarahkan ke lubang cahaya. Setelah pengukuran selesai, kuvet dikeluarkan dan dibersihkan. Terakhir, spektrofotometer dimatikan dengan menekan tombol OFF.

2.6. Proses SSF (*Saccharification and Fermentation*)

Proses pertama yang dilakukan yaitu membuat *Nutrient medium* dengan cara ditimbang 10 g/L glukosa, 10 g/L *yeast extract*, 10 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, kemudian dilarutkan dengan aquades sampai volume mencapai 1000 mL. selanjutnya adalah proses sakarifikasi dan fermentasi serentak atau SSF. Disiapkan botol berwarna coklat yang masing-masing diisi dengan 100 mL *nutrient medium*. Botol-botol tersebut disterilkan terlebih dahulu menggunakan *autoclave* selama 30 menit pada suhu 121°C dan didinginkan. Kemudian, ditambahkan enzim selulase 4% (b/b) dari berat serbuk sekam padi, *yeast* 4% (b/b), serta sekam padi dengan variasi konsentrasi 5, 7,5 10, 12,5, dan 15% (b/v) ke dalam botol berukuran 150 mL. Botol-botol tersebut kemudian ditempatkan dalam inkubator dengan pengaduk pada kecepatan 110 rpm selama 4, 5, dan 6 hari dengan suhu 30°C. Setelah fermentasi selesai, larutan dipisahkan dari residu menggunakan kertas saring biasa dan diukur volumenya. Selanjutnya, kandungan bioetanol yang diperoleh dianalisis menggunakan *Gas Chromatography* (GC).

2.7. Pengujian *Gas Chromatography* (GC)

Pengujian menggunakan *Gas Chromatography* (GC) digunakan untuk menganalisis kadar etanol. Pada analisis ini, menggunakan *Acetonitrile* (ACN) sebagai larutan pembanding. Sampel etanol sebanyak 500 μL diambil untuk masing-masing perlakuan, dimasukkan dalam *eppendorf* dan ditimbang. Selanjutnya, ditambahkan *Acetonitrile* (ACN) sebanyak 200 μL dan ditimbang kembali. Campuran tersebut disentrifugasi pada kecepatan 10000 rpm selama 5 menit, lalu sampel diinjeksi ke *Injector Gas Chromatography*. Alat *Gas Chromatography* yang digunakan adalah tipe HP – 5890 kolom HP – 608 (ECD TESTED), jenis semi-polar, dan fase gerak berupa helium dengan kecepatan 1 mL/menit. Jenis detektor yang digunakan *Flame Ionization Detector* (FID) kecepatan H_2 sebesar 30 mL/menit dan udara 300 mL/menit. Suhu oven yang digunakan dengan temperatur 45°C, suhu “INJ B” 74°C, suhu “DET B” diatur 135°C. Volume sampel yang diinjeksikan sebanyak 0,03 μL , kemudian ditunggu selama 15 menit untuk proses analisis.

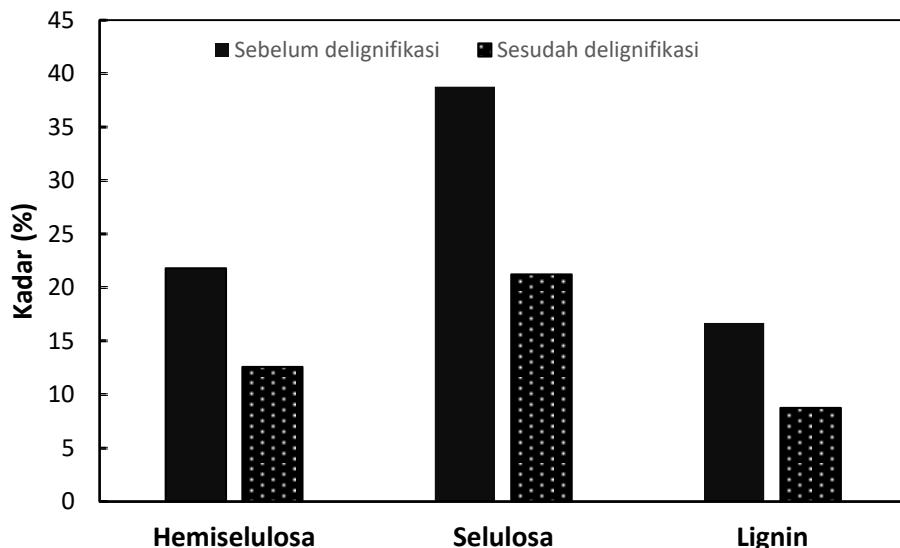
3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1. Analisis Kandungan Bahan

Analisis kandungan bahan yang diterapkan adalah metode Van Soest. Metode Van Soest dimanfaatkan untuk menghitung kandungan serat kasar dan fraksinya.

Hasil Gambar 1, diketahui bahwa terjadi penurunan kadar kandungan sekam padi setelah dilakukan proses delignifikasi. Kadar awal kandungan sekam padi yaitu hemiselulosa 21,803%, selulosa 38,7634%, dan lignin 16,676%. Setelah dilakukan *pretreatment*, kandungan sekam padi yang diperoleh adalah hemiselulosa 12,593%, selulosa 21,226%, dan lignin 8,769%. Perlakuan awal atau *pretreatment* dengan NaOH 15% didapatkan hasil adanya penurunan kadar hemiselulosa 42,24%, selulosa 45,24%, dan lignin 47,40%. Penurunan ini terjadi karena adanya penambahan NaOH yang memiliki konsentrasi lebih tinggi yang menyebabkan pemecahan senyawa lignin, sehingga lignin

larut dalam pelarut. NaOH juga dapat mengurai lignin melalui proses hidrolisis serta melarutkan gugus gula sederhana yang masih terikat dalam serat. Peningkatan konsentrasi NaOH bisa meningkatkan efisiensi degradasi lignin [11].



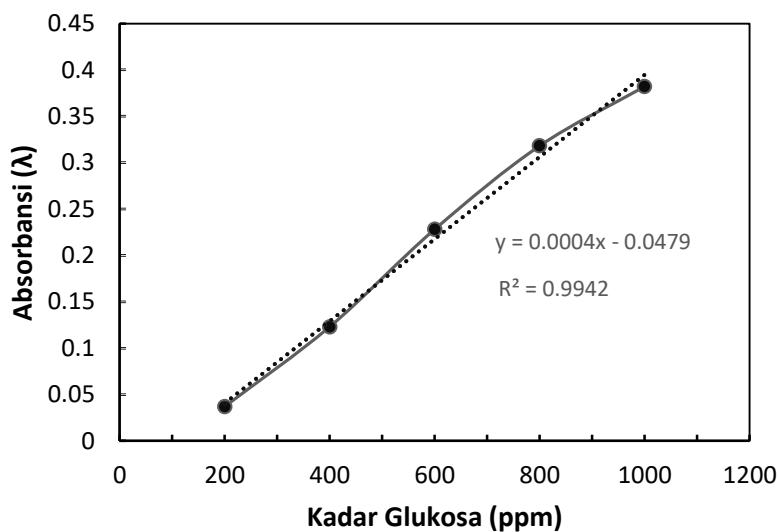
Gambar 1. Kadar selulosa, hemiselulosa, dan lignin sebelum dan sesudah delignifikasi

Hal ini disebabkan oleh proses degradasi lignoselulosa yang dilakukan oleh NaOH. Semakin tinggi konsentrasi NaOH, kadar selulosa cenderung meningkat, sementara kadar hemiselulosa dan lignin cenderung menurun. Namun, dari data yang didapat terjadinya penurunan konsentrasi selulosa disebabkan oleh adanya struktur selulosa yang terbuka dan tersebar di dalam pelarut (NaOH), sehingga menyebabkan depolimerisasi hemiselulosa [12]. Dengan demikian, perlakuan delignifikasi dalam penelitian ini menghasilkan degradasi lignin, namun juga depolimerisasi hemiselulosa. Hal ini terjadi karena hemiselulosa, sebagai salah satu jenis karbohidrat yang membentuk bahan lignoselulosa, memiliki derajat polimerisasi yang lebih rendah daripada selulosa. Akibatnya, hemiselulosa lebih sensitif terhadap suhu tinggi, asam, dan basa dibandingkan dengan selulosa [13].

Kadar hemiselulosa yang menurun diakibatkan oleh sifat bahan yang mayoritas bersifat lunak (*amorf*), sehingga mudah terurai oleh asam [14]. Menurut penelitian Visca, dkk. (2020) membuktikan bahwa semakin tinggi konsentrasi NaOH, semakin banyak ikatan lignin yang terurai atau terputus. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa penelitian ini dapat menurunkan kandungan lignin yang sangat besar dengan konsentrasi NaOH yang tinggi yaitu 15% [15].

3.2. Aktivitas Enzim Selulase

Pengukuran aktivitas enzim selulase ditinjau dari jumlah gula reduksi yang dihasilkan. Kadar gula reduksi dengan substrat CMC 1 % diuji menggunakan reagen DNS dan absorbansi diukur menggunakan panjang gelombang 575 nm. Pengukuran gula reduksi dilakukan dengan membuat kurva standar glukosa terlebih dahulu. Pemakaian glukosa dipilih karena merupakan salah satu gula reduksi yang didapatkan dari pemecahan substrat melalui hidrolisis oleh enzim selulase.

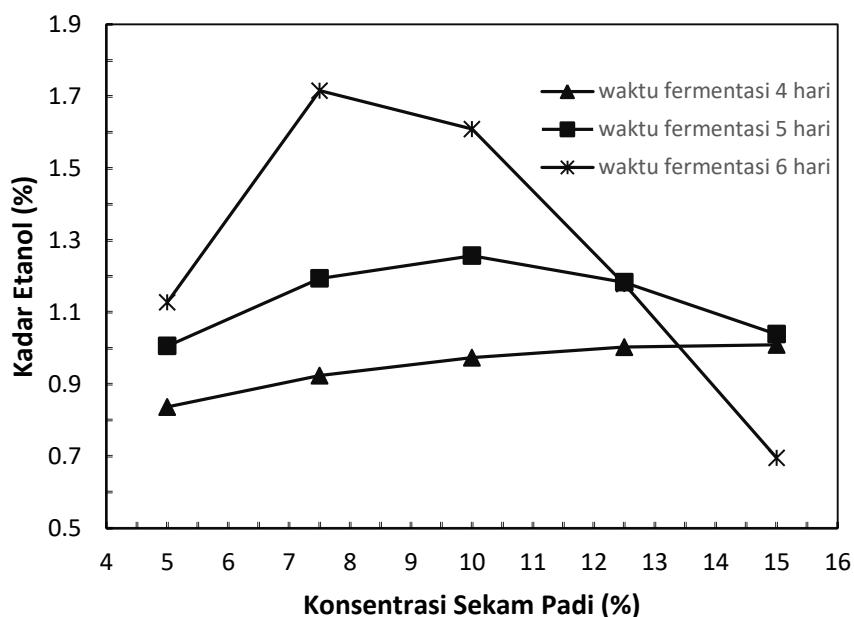


Gambar 2. Kurva Standar Glukosa

Kurva standar glukosa diperoleh dari kadar glukosa dengan mensubstitusi nilai absorbansi ke persamaan Gambar 2. Dari penelitian yang dilakukan, diperoleh aktivitas enzim selulase komersial mencapai 228,84 U/mL. Pada penelitian Rulianah, dkk. (2019) menggunakan kapang *Phanerochaete chrysosporium* dengan substrat ampas tebu menghasilkan aktivitas enzim selulase sebesar 91,304 U/mL [16]. Penelitian Purkan, dkk. (2015) menyimpulkan bahwa menggunakan *Aspergillus niger* pada sekam padi menghasilkan aktivitas enzim sebanyak 0,251 U/mL [17]. Apabila aktivitas enzim selulase dalam penelitian ini dibandingkan dengan studi sebelumnya, maka aktivitas enzim selulase komersial lebih tinggi. Substrat CMC juga dapat dimanfaatkan sebagai penyedia karbon untuk memproduksi glukosa [18].

3.3. Pengaruh Konsentrasi Sekam Padi dan Waktu Fermentasi terhadap kadar Bioetanol yang dihasilkan

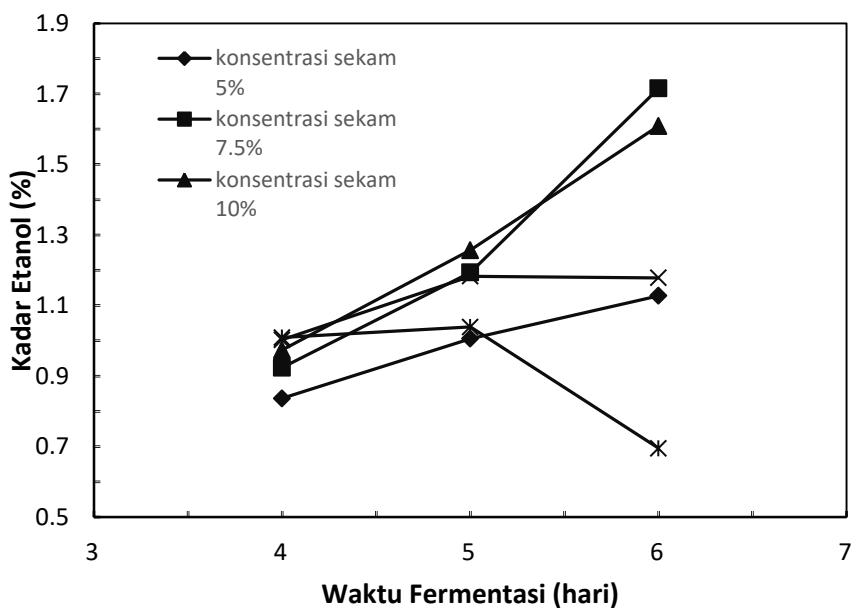
Proses fermentasi menggunakan *yeast Saccharomyces cerevisiae* adalah salah satu proses pembuatan bioetanol. *Saccharomyces cerevisiae* sendiri merupakan ragi yang mampu mengkonversi gula menjadi alkohol. Studi ini memakai pendekatan *Simultaneous Saccharification Fermentation* (SSF), dimana proses hidrolisis dan fermentasi dilakukan secara simultan dalam reaktor tunggal. Pendekatan ini tidak hanya efisien secara waktu, tetapi juga mengurangi biaya produksi [19]. Waktu fermentasi dalam metode SSF juga memiliki dampak signifikan terhadap hasil rendemen bioetanol. Keterkaitan ini disebabkan oleh waktu fermentasi yang mempengaruhi kurva pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* yang berperan mengubah glukosa menjadi bioetanol [20]. Pada penelitian kali ini, menggunakan metode SSF pada suhu 30°C dengan konsentrasi padi 5, 7,5, 10, 12,5, dan 15% (b/v). Proses fermentasi dilakukan pada kondisi anaerob selama 4, 5, dan 6 hari, serta pengujian *Gas Chromatography* (GC) dengan menggunakan internal standar *acetonitrile* (ACN) sebagai pembanding.



Gambar 3. Hubungan konsentrasi sekam padi terhadap kadar etanol yang dihasilkan

Gambar 3 menunjukkan hasil yang fluktuatif. Hal tersebut diketahui bahwa semakin besar konsentrasi sekam padi menghasilkan nilai kadar etanol yang naik turun. Nilai tersebut juga dipengaruhi dari lamanya fermentasi. Semakin lama fermentasi, maka semakin besar kadar etanol yang dihasilkan. Hasil kadar etanol tertinggi diperoleh dari waktu fermentasi selama 6 hari, dengan kadar etanol 1,71% pada konsentrasi sekam padi 7,5%. Kenaikan konsentrasi bioetanol disebabkan oleh adanya aktivitas metabolisme mikroorganisme dalam hal mengurai gula reduksi menjadi etanol [21]. Selain itu, waktu fermentasi juga mempengaruhi kadar yang dihasilkan. Pada penelitian Rulianah, dkk. (2021) lamanya waktu fermentasi memiliki dampak langsung terhadap jumlah etanol yang diproduksi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *yield* maksimum sebesar 16,24% dan konsentrasi bioetanol tertinggi sebesar 11,04% diperoleh pada waktu fermentasi 144 jam dan penambahan selulase kasar sebesar 50% (v/v) [10].

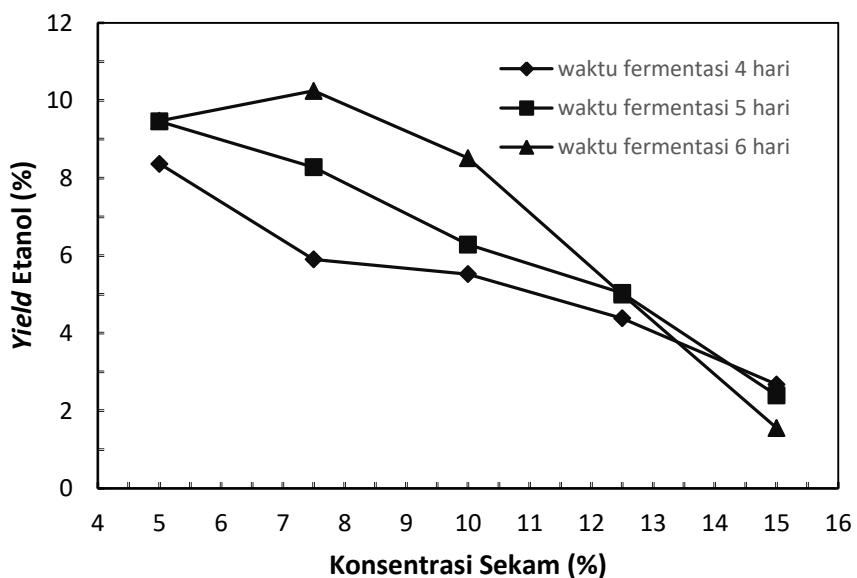
Pada Gambar 4, dapat dilihat bahwa fermentasi hari ke-4 mengalami kenaikan. Hal ini terjadi karena *Saccharomyces cerevisiae* yang berada dalam fase lag, dimana mikroba yang diinokulasi akan menyesuaikan diri dengan kondisi lingkungan barunya. Lamanya fase ini dipengaruhi oleh berbagai faktor, seperti media dan lingkungan pertumbuhan serta jumlah inokulum awal [22]. Sedangkan pada hari ke-6, terjadi penurunan dikarenakan enzim telah mencapai kondisi optimal dan tidak lagi mampu menghidrolisis selulosa. Hasil kadar etanol tertinggi sebesar 1,7157%, diperoleh dari konsentrasi sekam padi 7,5% dengan waktu fermentasi selama 6 hari. Pada penelitian Khaira, dkk. (2015) menunjukkan bahwa penambahan enzim selulase dengan konsentrasi 11% dan waktu fermentasi 72 jam menggunakan metode SSF menghasilkan kadar etanol sebesar 8% [6]. Sedangkan pada penelitian Oktaviani, dkk. (2016) menggunakan enzim komersial 10% dengan metode SSF dan waktu fermentasi 72 jam menghasilkan kadar etanol 2,26% [23]. Hasil perbandingan kadar etanol penelitian ini dengan dua penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa penelitian ini masih kurang.



Gambar 4. Hubungan antara waktu fermentasi terhadap kadar etanol yang dihasilkan

3.4. Konsentrasi Sekam Padi dan Waktu terhadap *Yield Bioetanol* yang Dihasilkan

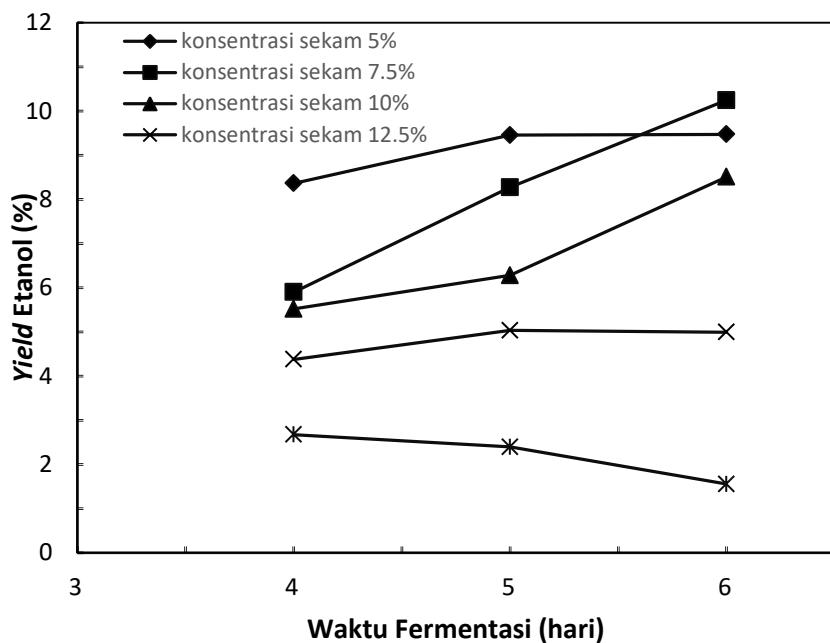
Yield adalah hasil produksi etanol yang didapatkan dari bahan baku setelah proses fermentasi. *Yield* ini biasanya dinyatakan sebagai perbandingan antara jumlah etanol yang dihasilkan dengan jumlah bahan baku yang digunakan [24].



Gambar 5. Hubungan antara konsentrasi sekam padi terhadap *yield* etanol

Hasil fermentasi menunjukkan bahwa *yield* etanol tertinggi didapatkan pada fermentasi hari ke-6 sebesar 6,4055% dengan konsentrasi sekam padi sebesar 7,5%. Hal ini bisa disimpulkan bahwa semakin tinggi nilai *yield*, maka akan semakin efisien proses fermentasinya [25]. Namun, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa penambahan

konsentrasi yang lebih tinggi mengakibatkan penurunan kadar *yield* etanol. Hal ini berlawanan dengan teori yang berlaku.



Gambar 6. Hubungan antara waktu fermentasi terhadap *yield* etanol yang dihasilkan

Menurut Syauqiah (2015), ketika proses fermentasi berlangsung lebih lama dan peningkatan jumlah *yeast*, maka jumlah mikroorganisme yang mengubah glukosa menjadi etanol cenderung meningkat. Namun, pada penelitian ini terdapat variasi jumlah bioetanol yang dihasilkan oleh aktivitas metabolisme *yeast* yang ditambahkan. Selain etanol, proses fermentasi juga menghasilkan produk samping, seperti asam asetat dan asam format. Hal ini disebabkan oleh kontaminasi bakteri asam asetat dan penguraian oksidasi bioetanol selama proses penyimpanan atau pada waktu pembuatannya. Mengakibatkan kematian sejumlah besar ragi selama proses fermentasi. Kekurangan nutrisi juga dapat menyebabkan kematian mikroorganisme, yang pada akhirnya mengurangi kemampuan mereka untuk mengubah glukosa menjadi alkohol [26].

Penurunan *yield* etanol disebabkan penambahan *yeast* yang semakin besar. Hal ini disebabkan *Saccharomyces Cerevisiae* yang semakin banyak justru menggunakan nutrisi untuk bertahan hidup daripada menggunakan untuk mengubah gula menjadi etanol. Fermentasi yang berlangsung terus-menerus dan paparan udara luar akan menghambat pertumbuhan kultur. Kondisi ini memungkinkan bakteri asam asetat membentuk lapisan tebal di permukaan dan mengoksidasi etanol menjadi asam asetat [27].

4. KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan data dari hasil penelitian yang telah diperoleh, pada konsentrasi sekam padi 5%, 7,5%, dan 10% kadar etanol mengalami peningkatan seiring dengan lamanya waktu fermentasi. Namun, pada konsentrasi sekam padi yang lebih tinggi 12,5% dan 15% kadar etanol menurun seiring bertambahnya waktu fermentasi. *Yield* etanol juga mengalami penurunan seiring dengan peningkatan konsentrasi sekam padi dan lamanya waktu

fermentasi. Kondisi waktu operasi terbaik dari variabel yang digunakan adalah pada hari ke 6 dengan konsentrasi sekam padi 7,5% (b/v) diperoleh kadar bioetanol sebesar 1,7157%.

Saran percobaan selanjutnya yaitu perlu dilakukan variabel pada penambahan *saccharomyces cerevisiae* dan hasil fermentasi di distilasi hingga sekam padi dalam keadaan kering.

REFERENSI

- [1] Y. Susmiati, "The Prospect of Bioethanol Production from Agricultural Waste and Organic Waste," *Industria: Jurnal Teknologi dan Manajemen Agroindustri*, vol. 7, no. 2, hal. 67–80, 2018.
- [2] S. Rulianah, P. Gunawan, N. Hendrawati, dan K. N. Nafisa, "Production of Bioethanol from Bagasse With a Simultaneous Saccarification And Fermentation (SSF) Process Using Crude Cellulase from *Phanerochaete Chrysosporium*," *AIP Conference Proceedings*, vol. 2197, no. 1, hal. 030007, 2020.
- [3] Novia, I. Utami, dan L. Windiyati, "Pembuatan Bioetanol Dari Sekam Padi Menggunakan Kombinasi Soaking In Aqueous Ammonia (SAA) Pretreatment Acid Pretreatment Hidrolisis Fermentasi," *Jurnal Teknik Kimia*, vol. 20, no. 1, hal. 46–53, 2014.
- [4] Novia, D. Wijaya, dan P. Yanti, "Pengaruh Waktu Delignifikasi Terhadap Lignin dan Waktu SSF Terhadap Etanol Pembuatan Bioetanol dari Sekam Padi," *Jurnal Teknik Kimia*, vol. 23, no. 1, hal. 19–27, 2017.
- [5] P. F. Wulandari, Z. D. Ma'rifah, Sani, dan D. H. Astuti, "Pembuatan Bioetanol dari Limbah Batang Tembakau Menggunakan Proses Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF)," *Rekayasa Bahan Alam dan Energi Berkelanjutan*, vol. 7, no. 2, hal. 1–7, 2023.
- [6] Z. F. Khaira, E. Yenie, dan S. R. Muria, "Pembuatan Bioetanol dari Limbah Tongkol Jagung Menggunakan Proses Simultaneous Sacharification And Fermentation (SSF) dengan Variasi Konsentrasi Enzim dan Waktu Fermentasi," *JOM FTEKNIK*, vol. 2, no. 2, hal. 1–8, 2015.
- [7] M. K. Huda, R. R. Dewi, M. Y. Prakas, dan N. Cahyanti, "Kajian Lama Fermentasi Terhadap Konsentrasi Glukosa dan Alkohol Pada Pembuatan Tape Onggok," *JTPHP*, vol. 12, no. 2, hal. 59–63, 2017.
- [8] G. Li, S. Fu, A. Zhou, dan H. Zhan, "Improved Cellulose Yield in the Production of Dissolving Pulp from Bamboo Using Acetic Acid in Prehydrolysis," *Bioresources*, vol. 10, no. 1, hal. 877–886, 2015.
- [9] R. Kaur dan H. Singh, "Bio-ethanol Production from Rice Husk Using Simultaneous Saccharification and Fermentation and Optimization of Pretreatment Methods," *Der Pharma Chemica*, vol. 9, no. 7, hal. 1–7, 2017.
- [10] S. Rulianah, P. Prayitno, A. Indiastari, dan D. Fatmawati, "The Effect of Fermentation Time and Addition of Crude Cellulase to Concentration of Bioethanol in Bagasse Fermentation," *IOP Conf Ser Mater Sci Eng*, vol. 1073, no. 1, hal. 1–8, 2021.
- [11] Sutikno, Marniza, dan M. F. Yanti, "Pengaruh Perlakuan Awal Basa dan Asam Terhadap Kadar Gula Reduksi Tandan Kosong Kelapa Sawit," *Jurnal Teknologi Industri dan Hasil Pertanian*, vol. 20, no. 1, hal. 1–10, 2015.

- [12] M. R. Siregar, Y. Hendrawan, dan W. A. Nugroho, "Pengaruh Konsentrasi NaOH dan Lama Waktu Pemanasan Microwave Dalam Proses Pretreatment Terhadap Kadar Lignoselulosa *Chlorella Vulgaris*," *Jurnal Teknologi Pertanian*, Vol. 15 No 2, hal. 129–138, 2014.
- [13] I. A. Larasati, B. D. Argo, dan L. C. Hawa, "Proses Delignifikasi Kandungan Lignoselulosa Serbuk Bambu Betung dengan Variasi NaOH dan Tekanan," *Jurnal Keteknikan Pertanian Tropis dan Biosistem*, vol. 7, no. 3, hal. 235–244, 2019.
- [14] W. A. Naufala dan E. S. Pandebesie, "Hidrolisis Eceng Gondok dan Sekam Padi untuk Menghasilkan Gula Reduksi sebagai Tahap Awal Produksi Bioetanol," *Jurnal Teknik ITS*, vol. 4, no. 2, hal. 109–113, 2015.
- [15] R. Visca, S. Nurjanah, dan N. Yuliana, "Kajian Karakterisasi Mikrokristalin Selulosa Berbasis Kulit Sukun (*Artocarpus astilis*) Melalui Proses Hidrolisa," *J Teknol*, vol. 8, no. 1, hal. 11–21, 2020.
- [16] S. Rulianah, C. Sindhuwati, dan P. Prayitno, "Produksi Crude Selulase dari Limbah Kayu Mahoni Menggunakan *Phanerochaete Chrysosporium*," *Jurnal Teknik Kimia dan Lingkungan*, vol. 3, no. 1, hal. 39–46, 2019.
- [17] Purkan, P. HD, dan S. Sumarsih, "Produksi Enzim Selulase dari *Aspergillus Niger* Menggunakan Sekam Padi dan Ampas Tebu sebagai Induser," *Jurnal Ilmu Dasar*, vol. 16, no. 2, hal. 95–102, 2015.
- [18] M. Nababan, I. B. W. Gunam, dan I. M. M. Wijaya, "Produksi Enzim Selulase Kasar dari Bakteri Selulolitik," *Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri*, vol. 7, no. 2, hal. 190–199, 2019.
- [19] C. Sindhuwati dkk., "Review: Potensi Tandan Kosong Kelapa Sawit sebagai Bahan Baku Pembuatan Bioetanol dengan Metode Fed Batch pada Proses Hidrolisis," *Jurnal Teknik Kimia dan Lingkungan*, vol. 5, no. 2, hal. 128–144, 2021.
- [20] N. Hasanah, I. N. N. Nalaway, dan S. Rulianah, "Studi Literatur Perbandingan Produksi Crude Selulase dari Bahan Berlignoselulosa Untuk Pembuatan Bioetanol," *Jurnal Teknologi Separasi*, no. 2, hal. 458–469, 2021.
- [21] R. Oktaviani, Chairul, dan S. Z. Amraini, "Produksi Etanol dari Limbah Kulit Nanas dengan Metode Solid State Fermentation (SSF) Terhadap Variasi Waktu dan Variasi Ukuran Partikel Substrat," 2013.
- [22] P. W. Saraswati, K. A. Nocianitri, dan N. M. I. H. Arihantana, "Pola Pertumbuhan *Lactobacillus* sp F213 Selama Fermentasi Pada Sari Buah Terung Belanda (*Solanum betaceum* Cav)," *Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan*, vol. 10, no. 4, hal. 621–633, 2021.
- [23] M. Oktaviani, T. Fajriutami, dan E. Hermiati, "Produksi Etanol dari Ampas Tebu Terdelignifikasi Alkali melalui Proses Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak," *SENIATI*, hal. 45–51, 2016.
- [24] A. Maulana, Z. Zulnari, A. Muarif, N. Sylvia, dan R. Dewi, "Pembuatan Bioetanol dari Kulit Pisang Kepok (*Musa Paradisiaca* L) Menggunakan Katalis Asam Sulfat," *Jurnal Teknologi Kimia Unimal*, vol. 12, no. 1, hal. 97–111, 2023.
- [25] Y. Astuti, Chairul, dan Khairat, "Pembuatan Bioetanol dari Nira Aren Menggunakan Proses Fermentasi dengan Variasi Kecepatan Pengadukan dan Waktu Fermentasi," *JOM FTEKNIK*, vol. 2, no. 1, hal. 1–5, 2015.

- [26] I. Syauqiah, "Pengaruh Waktu Fermentasi dan Persentase Starter Pada Nira Aren (*Arenga pinnata*) Terhadap Bioethanol Yang Dihasilkan," *Jurnal Teknik Kimia*, vol. 16, no. 2, hal. 217–226, 2015.
- [27] M. Djana, "Pengaruh Massa Ragi dan Lama Fermentasi Terhadap Pembuatan Etanol dari Enceng Gondok," *Integrasi*, vol. 1, no. 2, hal. 36–44, 2016.