

**BIOKONVERSI SELULOSA DARI LIMBAH TANDAN KOSONG
KELAPA SAWIT (TKKS) MENGGUNAKAN ISOLAT *Actinomyces*
DARI SEDIMEN MANGROVE MENJADI BIOETANOL MELALUI
SIMULTANEOUS SACCARIFICATION AND FERMENTATION (SSF)**

(Skripsi)

Oleh

Geo Alfriza Gaghana



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
2024**

ABSTRAK

BIOKONVERSI SELULOSA DARI LIMBAH TANDAN KOSONG KELAPA SAWIT (TKKS) MENGGUNAKAN ISOLAT *Actinomyces* DARI SEDIMEN MANGROVE MENJADI BIOETANOL MELALUI *SIMULTANEOUS SACCARIFICATION AND FERMENTATION* (SSF)

Oleh

GEO ALFRIZA GAGHANA

Persediaan bahan bakar fosil mengalami keterbatasan, yang menimbulkan permasalahan terhadap pemenuhan kebutuhan energi di masa yang akan datang. Bioetanol merupakan bahan bakar alternatif yang dapat mensubstitusikan penggunaan bahan bakar fosil sebagai bahan bakar terbarukan. Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS) sebagai limbah pertanian berlignoselulosa dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku pada teknologi generasi ke-2. Penelitian ini bertujuan untuk memanfaatkan biomassa TKKS sebagai bahan baku bioetanol menggunakan *Simultaneous Saccharification and Fermentation* (SSF) dengan memanfaatkan *Actinomyces*. Tahapan penelitian yang dilakukan meliputi perlakuan awal TKKS, karakterisasi biomassa TKKS, isolasi *Actinomyces* sedimen mangrove, penapisan *Actinomyces*, dan produksi bioetanol melewati SSF menggunakan *Actinomyces* dan *S.cerevisiae* selama 72 jam. Hasil karakterisasi menunjukkan bahwa TKKS mengandung 18,86% lignin, 54,28% selulosa, dan 26,86 % senyawa lainnya. Kristalinitas serbuk TKKS yaitu sebesar 71,17% meningkat menjadi 81,47% setelah delignifikasi. Hasil isolasi *Actinomyces* diperoleh satu isolat unggul yaitu ActDM-2 yang memiliki indeks selulolitik 0,722 dengan aktivitas unit sebesar 2,2618 U.mL⁻¹. Produksi bioetanol menggunakan proses SSF dilakukan dengan waktu fermentasi 72 jam menggunakan *S.cerevisiae*. Kadar glukosa tertinggi didapatkan pada jam ke-24 yaitu sebesar 2,186 g/L. Waktu optimum produksi etanol didapatkan pada jam ke-48 dengan konsentrasi etanol sebesar 0,755 g.L⁻¹ dengan persen efisiensi sebesar 83,74 %.

Kata kunci: limbah TKKS, *Actinomyces*, bioetanol, SSF

ABSTRACT

BIOCONVERSION OF CELLULOSE FROM OIL PALM EMPTY FRUIT BUNCH (OPEFB) USING *Actinomyces* ISOLATES FROM MANGROVE SEDIMENT INTO BIOETHANOL THROUGH SIMULTANEOUS SACCARIFICATION AND FERMENTATION (SSF)

BY

GEO ALFRIZA GAGHANA

The supply of fossil fuels is limited, which creates problems for the fulfillment of energy needs in the future. Bioethanol is an alternative fuel that can substitute the use of fossil fuels. Empty Palm Oil Bunches (OPEFB) as a lignocellulosic agricultural waste can be utilized as raw material in the 2nd generation technology. This research aims to utilize TKKS biomass as raw material for bioethanol using Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) by utilizing *Actinomyces*. The research stages include pretreatment of TKKS, characterization of TKKS biomass, isolation of *Actinomyces* from mangrove sediment, screening of *Actinomyces*, and bioethanol production through SSF using *Actinomyces* and *S.cerevisiae* for 72 hours. Characterization results showed that TKKS contains 18,86% lignin, 54,28% cellulose, and 26,86% other compounds. The crystallinity of TKKS is 71,17% increasing to 81,47% after delignification. *Actinomyces* isolation results obtained one superior isolate, ActDM-2, which has a cellulolytic index of 0,722 with unit activity of 2,2618 U.mL⁻¹. Bioethanol production using the SSF process was carried out with a fermentation time of 72 hours using *Actinomyces* and *S.cerevisiae*. The highest glucose level was obtained at the 24th hour which amounted to 2,186 g/L. The optimum time of ethanol production was obtained at 48th hour with ethanol concentration of 0,755 g.L⁻¹ with percent efficiency of 83,74%.

Keywords: OPEFB waste, *Actinomyces*, bioethanol, SSF

**BIOKONVERSI SELULOSA DARI LIMBAH TANDAN KOSONG
KELAPA SAWIT (TKKS) MENGGUNAKAN ISOLAT *Actinomyces*
DARI SEDIMEN MANGROVE MENJADI BIOETANOL MELALUI
SIMULTANEOUS SACCARIFICATION AND FERMENTATION (SSF)**

Oleh

Geo Alfriza Gaghana

Skripsi

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar
SARJANA SAINS**

Pada

**Jurusan Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
2024**

Judul : Biokonversi Selulosa Dari Limbah
Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS)
Menggunakan Isolat *Actinomyces* dari
Sedimen Mangrove Menjadi Bioetanol
Melalui *Simultaneous Saccharification
and Fermentation* (SSF)

Nama : Geo Alfriza Gaghana

Nomor Pokok Mahasiswa : 2017011074

Jurusan : Kimia

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



1. Komisi Pembimbing

Dr. Eng. Héri Satria, S.Si., M.Si.
NIP. 19711001200501011002

Dr. Herlan Eriska Putra
NIP.198304212006041006

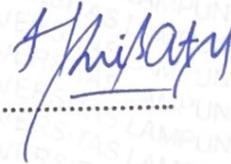
2. Ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung

Dr. Mita Rilyanti, S.Si., M.Si.
NIP. 197205302000032001

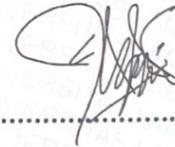
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

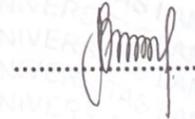
Ketua : **Dr.Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si.**



Sekretaris : **Dr. Herlian Eriska Putra**



Anggota : **Prof. Dr. Dr. Kamisah Delilawati
Pandiangan, S.Si., M.Si**



Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si.
NIP. 197110012005011002



Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 9 Agustus 2024

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Geo Alfriza Gaghana
NPM : 2017011074
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan dengan sebenar-benarnya, bahwa skripsi saya yang berjudul:
**Biokonversi Selulosa Dari Limbah Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS)
Menggunakan Isolat *Actinomyces* dari Sedimen Mangrove Menjadi
Bioetanol Melalui *Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF)***
merupakan benar karya saya sendiri yang tidak terdapat karya orang lain kecuali
disebutkan dalam daftar pustaka. Sehingga, apa yang tercantum di dalam skripsi
saya ini dapat dipertanggungjawabkan.

Kemudian, saya juga tidak keberatan jika sebagian atau seluruh data di dalam
skripsi tersebut digunakan oleh program studi untuk kepentingan publikasi selama
nama saya tercantum dalam publikasi tersebut atas kesepakatan bersama.

Demikianlah surat ini saya buat dengan sebenar-benarnya.

Bandar Lampung, 19 Agustus 2024
Penulis,



Geo Alfriza Gaghana
NPM. 2017011074

RIWAYAT HIDUP

Penulis bernama lengkap Geo Alfriza Gaghana lahir di Jakarta pada tanggal 3 Maret 2001. Penulis merupakan anak kedua dari tiga bersaudara, putra dari Bapak Tavip Triyono dan Ibu Linda Widyastuti. Penulis mengawali jenjang pendidikan dari Sekolah Dasar di SDI Cikal Harapan II Bogor yang diselesaikan pada tahun 2013, kemudian melanjutkan pendidikan Sekolah Menengah Pertama di SMPI Cikal Harapan Bogor yang diselesaikan pada tahun 2016, dan melanjutkan pendidikan Sekolah Menengah Atas di SMAN 1 Cileungsi Bogor, yang diselesaikan pada tahun 2019.

Pada tahun 2019, penulis diterima sebagai mahasiswa Universitas Islam Indonesia Jurusan S1 Teknik Lingkungan namun dikarenakan jurusan tersebut tidak sesuai kemauan penulis tidak mengambil kesempatan tersebut dan melanjutkan hidup dengan belajar untuk mempersiapkan SBMPTN. Kemudian pada tahun 2020 penulis diterima sebagai mahasiswa Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SBMPTN).

Selama menjadi mahasiswa, penulis pernah mengikuti Karya Wisata Ilmiah ke-30 yang diselenggarakan oleh BEM FMIPA Unila tahun 2020. Penulis mengikuti program pertukaran pelajar ke Universitas Gadjah Mada. Penulis aktif mengikuti kegiatan organisasi *Chemistry English Club (CEC)* bidang *Design and Publication*. Penulis melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) pada bulan Januari-Februari 2023 di Desa Kota Karang, Pesisir Barat. Penulis juga pernah menjadi asisten Praktikum Biokimia Jurusan Biologi Terapan dan Biologi FMIPA Universitas Lampung pada tahun 2024. Pada tahun 2024, penulis menyelesaikan Praktik Kerja Lapangan (PKL) di Laboratorium Biokimia, Universitas Lampung dengan judul “Isolasi dan Uji Aktivitas Isolat *Actinomycetes* dari Sedimen Mangrove yang Memiliki Kemampuan Menghidrolisis Selulosa”. Kemudian sebagai bentuk aplikasi bidang ilmu di dunia

kerja, penulis telah menyelesaikan Skripsi yang berjudul “Biokonversi Selulosa Dari Limbah Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS) Menggunakan Isolat *Actinomyces* dari Sedimen Mangrove Menjadi Bioetanol Melalui *Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF)*”.

PERSEMBAHAN



Dengan menyebut nama Allah Yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang
Dengan mengucap *Alhamdulillah rabbi 'alamin* atas ridho Allah dengan segala
rasa syukur kupersembahkan karya kecil ini kepada:

Kedua Orangtua Tercinta

Ibu Linda Widyastuti dan Bapak Tavip Triyono yang senantiasa memberikan motivasi, nasihat, cinta dan kasih, doa, serta dukungan secara moril dan finansial kepada penulis selama ini.

Kedua saudaraku

Ausie Nenden Hanifah dan Syafira Ababiel Hafidzah yang selalu penulis sayangi.

Tanteku Tercinta

Endang Eka Purwanti yang selalu menjadi pengingat dan penyemangat penulis selama ini.

Dengan rasa hormat kepada:

Bapak Dr. Eng. Heri Satria, M.Si., Bapak Dr. Herlian Eriska Putra, dan Ibu Prof. Dr. Kamisah Delilawati Pandiangan, S.Si., M.Si, serta seluruh dosen

Kimia FMIPA Universitas Lampung yang telah membimbing dan memberikan ilmu serta nasehatnya hingga penulis mencapai gelar sarjana

Sahabat-sahabatku dan semua orang baik yang telah mendukung, mendoakan dan memberikan semangat kepada penulis.

Almamater Tercinta Universitas Lampung

MOTTO

“Allah tidak membebani seseorang melainkan sesuai dengan kesanggupannya.”

(Q.S. Al Baqarah: 286)

"Dan Dia bersama kamu di mana saja kamu berada. Dan Allah Maha Melihat apa yang kamu kerjakan."

(Q.S. Al-Hadid: 4)

"Ketahuilah bahwa kemenangan bersama kesabaran, kelapangan bersama kesempitan, dan kesulitan bersama kemudahan."

(Q.S. Al-Insyirah:5-6)

"Jadi baiklah. Sesungguhnya Allah menyukai orang-orang yang berbuat baik."

(Q.S. Al Baqarah: 195)

“Dunia itu tempat berjuang, istirahat itu di surga”

(Syekh Ali Jaber)

“Trust yourself, trust your power, that’s how you stop it”

(Dr. Stephen Strange)

SANWACANA

Bismillahirrahmanirrahim.

Alhamdulillah Segala puji bagi Allah SWT. atas segala rahmat, nikmat dan ridho-Nya, penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “**Biokonversi Selulosa Dari Limbah Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS) Menggunakan Isolat *Actinomyces* dari Sedimen Mangrove Menjadi Bioetanol Melalui *Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF)*” sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.**

Dalam penulisan skripsi ini tidak lepas dari kesulitan dan rintangan, namun itu semua dapat penulis lalui berkat rahmat dan ridho Allah SWT. Serta bantuan dan dukungan dari orang-orang terdekat penulis. Maka dari itu, pada kesempatan ini sebagai wujud rasa hormat penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada:

1. Allah SWT atas kenikmatan dan karunia yang telah diberikan sehingga skripsi ini dapat terselesaikan .
2. Kedua orang tua, Papih dan Mamih dari penulis yang sangat berjasa karena selalu mendukung, mendoakan, memotivasi, menjadi tempat berkeluh kesah, dan selalu berusaha memberikan perlindungan, kesehatan, rezeki, kebahagiaan dunia akhirat, dan umur yang panjang sehingga dapat mendampingi penulis hingga sukses..
3. Tanteku yang selalu menjadi motivasi penulis selama menjalani perkuliahan
4. Bapak Dr. Eng. Heri Satria. M.Si, selaku pembimbing pertama atas segala kebaikan, ilmu, kesabaran, motivasi, dan bimbingan kepada penulis, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan baik. Ditengah

5. waktu yang sibuk, selalu berusaha meluangkan waktu dan senantiasa memberikan dukungan kepada penulis sehingga penulis tidak pernah kehilangan semangat hingga berada dititik ini. Semoga Allah selalu memberikan perlindungan dan keberkahan atas semua yang telah bapak berikan.
6. Bapak Herlian Eriska Putra, selaku pembimbing kedua atas saran , dan bimbingan yang sangat bermanfaat kepada penulis, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan baik.
7. Ibu Prof. Dr. Kamisah Delilawati Pandiangan, S.Si. M.Si., selaku pembahas atas kritik, saran, dan ilmu yang bermanfaat. Atas segala kesediannya untuk memberikan yang terbaik kepada penulis, sehingga skripsi ini dapat terselesaikan. Semoga Allah berikan atas semua yang telah ibu berikan.
8. Dr. Sonny Widiarto, selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah meluangkan waktu serta memberikan bimbingan, nasihat, dan saran kepada Penulis.
9. Ibu Dr. Mita Rilyanti, M.Si., selaku ketua Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung
10. Bapak dan Ibu Dosen Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung yang telah memberikan bimbingan dan ilmu secara akademik maupun non-akademik, motivasi, dan segala pengalaman kepada penulis selama perkuliahan.
11. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, M.Si., sebagai Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Lampung.
12. Seluruh karyawan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam atas waktu dan pelayanan yang telah diberikan dalam proses perkuliahan.
13. Teman-teman Pertukaran Pelajar UGM, Yasmin Fahira, Elsa, Mamot, Anggun, Muti, Tasyi, Salwi, dan Sarah atas motivasi dan dukungannya
14. Unila *Food Vlogger*, Icha, Depa , Stephani Marisca Febrianti, Anggun Nadhifahmia Azizah, Maria, Ribka, Ratih Nurhidayati, Mutiara Septia Nurokhim, Bunga, Rahmadtullah, Avi Eriyani, Najla Shauma Zahra, Nadia Anindhita, dan Nurdiana, terima kasih untuk kebersamaan,

kekeluargaan, hiburan, bantuan, semangat, kepedulian, kekompakan, serta waktu yang diluangkan untuk mendengar keluh kesah Penulis. Semoga kita bisa sukses bersama dan bertemu kembali di keadaan yang lebih baik dari saat ini.

15. Kakak tingkat satu bimbingan penelitian, Marcella, S.Si, Rara, S.Si., Nabila, S.Si., dan Dienus, S.Si terima kasih atas ilmu dan saran yang diberikan kepada penulis selama mengerjakan penelitian ini.
16. Teman-teman Kimia 2020 terutama Kelas A atas segala kenangan selama perkuliahan.

Bandar Lampung, 19 Agustus 2024
Penulis,

Geo Alfriza Gaghana
NPM. 2017011074

DAFTAR ISI

DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian	4
1.3 Manfaat Penelitian	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS)	5
2.2 Lignoselulosa	6
2.3 Selulosa	6
2.4 Hemiselulosa	7
2.5 Lignin	8
2.6 <i>Actinomycetes</i>	9
2.7 Enzim Selulase	10
2.8 <i>Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF)</i>	11
2.9 Fermentasi	12
2.10 Bioetanol	13
2.11 Mikroorganisme Penghasil Bioetanol	14
2.12 Karakterisasi Substrat dan Analisis Kadar Bioetanol	15
2.12.1 Karakterisasi Substrat Menggunakan <i>X-Ray Diffraction (XRD)</i> ...	15
2.12.2 Analisis Kadar Bioetanol Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis	16

III. METODE PENELITIAN	17
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	17
3.2 Alat dan Bahan	17
3.2.1 Alat	17
3.2.2 Bahan	18
3.3 Metode Penelitian	18
3.3.1. Preparasi Tandan Kosong Kelapa Sawit	18
3.3.2 Perlakuan Awal TKKS	18
3.3.3 Analisis Karakteristik Substrat	19
3.3.4 Isolasi Actinomycetes Indigenous	20
3.3.5 Produksi dan Uji Aktivitas Enzim Selulase	22
3.3.6. Pembuatan Kurva Standar Glukosa	22
3.3.7 Produksi Bietanol	23
3.3.8. Analisis Bioetanol	24
3.4 Diagram Alir	26
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	27
4.1 Analisis Komponen Limbah TKKS dengan Metode TAPPI	27
4.2 Karakter Subtrat	29
4.3 Hasil Penapisan Isolat Actinomycetes	32
4.4 Produksi Enzim dan Optimasi Waktu Inkubasi	35
4.5 Uji Aktivitas Enzim Selulase dengan Metode DNS	36
4.6 Simultaneous Saccarification and Fermentation (SSF)	39
V. KESIMPULAN DAN SARAN	43
5.2 Kesimpulan	43
5.2 Saran	44
DAFTAR PUSTAKA	45
LAMPIRAN	50

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Indeks aktivitas selulolitikdari isolat <i>Actinomyces</i>	35
2. Perhitungan Kandungan Kimia TKKS	52
3. Informasi puncak kristalin pada difraktogram	52
4. Informasi puncak kristalin dan amorf pada difraktogram	53
5. Data standar glukosa	55
6. Data aktivitas unit enzim selulase dari isolat ActDM-2	56
7. Data kadar glukosa hasil SSF	57
8. Data standar etanol	58
9. Data kadar etanol hasil SSF	59
10. Data kadar etanol teoritis	59
11. Data Yield atau efisiensi fermentasi	60

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur lignoselulosa pada biomassa	6
2. Struktur selulosa	7
3. Struktur hemiselulosa	8
4. Struktur lignin	9
5. Mekanisme hidrolisis selulosa secara enzimatik	12
6. Siklus metabolisme etanol	15
7. Spektrofotometer UV- <i>Vis</i>	16
8. Hasil perlakuan TKKS	27
9. Persentase kandungan kimia pada serbuk TKKS	28
10. Mekanisme pemutusan lignin	29
11. Perbandingan pola difraktogram XRD	31
12. Hasil isolasi dengan pengenceran bertingkat	33
13. Hasil kultivasi 22 isolat Actinomycetes mangrove	33
14. Zona bening hasil penapisan aktivitas selulolitik	34
15. Hasil uji kualitatif ekstrak kasar selulase dengan DNS	37
16. Kondisi optimum selulase	38
17. Hasil biotanol SSF	40
18. Hasil uji kualitatif etanol	41
19. Konsentrasi kadar glukosa dan etanol saat SSF	41

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pada saat ini kebutuhan energi di Indonesia masih banyak didapatkan dari bahan bakar fosil. Sementara itu, produksi minyak bumi di Indonesia mengalami penurunan yang signifikan dalam dua dekade, dari rata-rata sebesar 1,5 juta barel per hari menjadi rata-rata 710,3 ribu barel per hari pada tahun 2020. Sejalan dengan jumlah cadangan minyak di Indonesia mengalami penurunan menjadi 4,2 Miliar Barel pada tahun 2020 dibandingkan tahun 2015 yaitu sebesar 7,3 Miliar Barel. Hal tersebut menimbulkan ketidakseimbangan antara konsumsi dan ketersediaan energi bahan bakar fosil di Indonesia (Sekretariat Jenderal Dewan Energi Nasional, 2021). Karena adanya fakta tentang bahan bakar fosil yang terbatas ini menimbulkan krisis energi sehingga mendorong pengembangan bahan bakar terbarukan, salah satu bahan bakar yang berpotensi adalah bioetanol.

Etanol (C_2H_5OH) merupakan salah satu senyawa yang banyak dimanfaatkan oleh manusia yaitu sebagai pencampur, pelarut, antiseptik, bahan baku kimia, dan juga bahan bakar, saat ini etanol telah banyak dikembangkan untuk pembuatannya dari berbagai bahan baku berupa tumbuh-tumbuhan yang disebut dengan bioetanol. Menurut Chaudhry *et al*, (2014) bioetanol ada beberapa macam berdasarkan sumbernya. Generasi pertama mengandung sumber gula yang berasal dari bahan-bahan yang mengandung pati. Generasi kedua memiliki sumber gula yang berasal dari limbah-limbah dengan kandungan lignoselulosa yang tinggi.

Generasi ketiga menggunakan alga yang memiliki kandungan selulosa yang cukup tinggi dan memiliki kandungan lignin yang sangat minim atau bahkan tidak ada sama sekali (Tan *et al.*, 2020). Bioetanol generasi pertama dikhawatirkan akan mengganggu kebutuhan pangan karena bahan bakunya berupa bahan pertanian yang mengandung gula, untuk mengatasi kekhawatiran itu maka bioetanol generasi kedua muncul dengan memanfaatkan bahan nabati yang mengandung selulosa dan hemiselulosa tinggi. Selulosa tidak dapat dicerna oleh manusia, dan banyak limbah pertanian yang memiliki kandungan selulosa tinggi, sehingga produksi bioetanol dari limbah pertanian tidak akan mengganggu kebutuhan pangan.

Limbah pertanian yang potensial dan melimpah adalah Tandan Kosong Kelapa Sawit, berdasarkan buku statistik komoditas kelapa sawit terbitan Ditjen Perkebunan Tahun 2015, luas area kelapa sawit mencapai 10,9 juta Ha dengan produksi 29,3 juta ton *Crude Palm Oil* (CPO), dalam setiap pengolahan CPO limbah TKKS yang dihasilkan mencapai 22- 23%. Limbah tersebut memiliki kandungan selulosa yang jumlahnya bervariasi bergantung pada beberapa faktor, misalnya jenis perlakuan yang digunakan (Abdullah & Sulaiman, 2013). Selain itu, TKKS merupakan sumber gula dengan kadar selulosa yang relatif tinggi (75-80%), menunjukkan TKKS dapat dijadikan bahan baku bioetanol yang baik (Tan *et al.*, 2010). Berdasarkan komposisi tersebut, selulosa pada TKKS dapat diisolasi sebagai substrat pada tahap *pretreatment*.

Proses *pretreatment* pada bahan lignoselulosa perlu dilakukan untuk mempermudah proses hidrolisis yaitu untuk membuka struktur lignoselulosa agar selulosa menjadi lebih mudah diakses oleh enzim yang memecah polimer polisakarida menjadi bentuk monomer, sehingga dapat mengurangi penggunaan enzim dan dapat menekan biaya (Dashtban, 2009). *Pretreatment* secara kimia dapat menggunakan asam dan alkali. *Pretreatment* alkali mempunyai keuntungan dapat meningkatkan kandungan selulosa, menurunkan tingkat polimerasi selulosa sehingga dapat meningkatkan kinerja enzim pada proses sakarifikasi (Zhung *et al.*, 2016). Salah satu *pretreatment* alkali yang banyak digunakan adalah

menggunakan NaOH. Proses *pretreatment* ini merupakan tahapan penting karena menentukan keberhasilan pada proses hidrolisis secara enzimatik pada biomassa. Adapun proses hidrolisis untuk mendegradasi selulosa yang terkandung dalam TKKS dapat dilakukan menggunakan *Actinomycetes*.

Actinomycetes dapat diisolasi salah satunya dari sedimen mangrove. Mangrove termasuk ekosistem dengan salinitas tinggi, pasang surut yang ekstrim, tekanan angin yang kuat, suhu tinggi, berlumpur, dan tanah yang anaerobik (Retnowati *et al.*, 2017). Akar mangrove dapat memberikan nutrisi dan perlindungan bagi komunitas biologis seperti invertebrata, algae, dan mikroorganisme lainnya termasuk *Actinomycetes* (Katili & Retnowati, 2017; Ryandini *et al.*, 2018; Sengupta *et al.*, 2015). *Actinomycetes* mampu menghasilkan berbagai macam senyawa bioaktif termasuk enzim xilanase dan selulase (Saini *et al.*, 2015). Selulosa dapat dihidrolisis untuk menghasilkan monomer glukosa dengan menggunakan enzim selulase (Satria dkk., 2010).

Produksi bioetanol dari TKKS memiliki beberapa tahapan proses. Tahap pertama, TKKS diberi perlakuan awal (*pretreatment*). Setelah *pretreatment*, yaitu menghilangkan lignin dan meningkatkan fraksi selulosa pada biomassa, sakarifikasi dan fermentasi mampu dilakukan dalam satu labu yang disebut *Simultaneous Saccharification and Fermentation* (SSF) (Gauss *et al.*, 1976). Salah satu penelitian dengan memanfaatkan metode ini telah dilakukan oleh Dahtban *et al.*, (2014) dan menghasilkan etanol dengan konsentrasi sebesar 21,3724 g.L⁻¹ dengan enzim selulase.

Penelitian ini memanfaatkan sumber monomer glukosa dari hidrolisis selulosa yang berasal dari biomassa lignoselulosa yaitu tandan kosong kelapa sawit (TKKS) untuk menghasilkan etanol. Isolat *Actinomycetes* dipilih untuk menghasilkan enzim selulase sebagai pendegradasi selulosa menjadi menjadi monomer glukosa. Glukosa yang dihasilkan dikonversi menjadi etanol. Produksi etanol ini dilakukan dengan menggunakan metode SSF. Hasil penelitian ini diharapkan menjadi salah

satu alternatif produksi etanol dengan pemanfaatan limbah berlignoselulosa, sehingga dapat meningkatkan nilai efisiensi dan ekonomi dari bahan tersebut.

1.2 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dilakukannya penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Mendapatkan isolat *Actinomycetes* dari sedimen *mangrove* yang berpotensi menghasilkan enzim pendegradasi selulosa melalui tahap penapisan.
2. Mendapatkan kandungan kimia pada TKKS dengan metode *Technical Assotiation of the Pulp and Paper Industry* (TAPPI).
3. Mempelajari fermentasi hidrolisat TKKS menggunakan *Saccaromyces cereviciae* menjadi bietanol dengan metode SSF.

1.3 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan mampu memberikan kontribusi dalam perkembangan energi terbarukan yaitu bioetanol menggunakan TKKS dengan bantuan isolat *Actinomycetes* dari sedimen mangrove.

II. TINJAUAN PUSTAKA

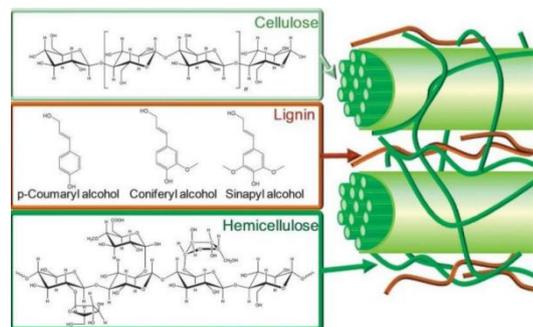
2.1 Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS)

Kelapa sawit memiliki nama latin *Elaeis guineensis Jacq* yang berasal dari bahasa Yunani. *Elaeis* berasal dari kata *Elation* yang berarti minyak, *guineensis* berasal dari kata *Guinea* yang berarti pantai Barat Afrika, dan *Jacq* merupakan singkatan dari Jacquin yaitu seorang botanis Amerika (Lubis, 2008). Kelapa sawit termasuk kelas *Liliopsida*, ordo *Arecales*, famili *Arecaceae*, dan genus *Elaeis*. Di Indonesia tanaman ini tersebar di daerah Aceh, pantai timur Sumatera, Jawa, dan Sulawesi (Ropiah, 2010). Berdasarkan Direktorat Jenderal Perkebunan (2011), pada tahun 2008 luas lahan perkebunan kelapa sawit di Indonesia mencapai 7,1 juta. Sumatera Utara sendiri pada tahun 2008 memiliki luas perkebunan kelapa sawit 948.800 Ha.

Tandan kosong kelapa sawit (TKKS) merupakan limbah utama dari industri pengolahan kelapa sawit. Tandan kelapa sawit merupakan bagian dari pohon kelapa sawit yang berfungsi sebagai tempat untuk buah kelapa sawit. Setiap tandan mengandung 62- 70% buah dan sisanya adalah tandan kosong yang belum dimanfaatkan secara optimal. Menurut Fauzi *et al.* (2005) dalam satu kali produksi minyak sawit akan dihasilkan 23-25% TKKS, 13-15% serat, 6,5% cangkang, 5,5-6% biji, dan 16-20% Crude Palm Oil (CPO). Menurut penelitian Mardawati *et al.* (2019), TKKS memiliki kandungan selulosa sebanyak 33,83% – 34,85%; hemiselulosa 17,07% - 18,05%; dan lignin 26,71% - 27,54%.

2.2 Lignoselulosa

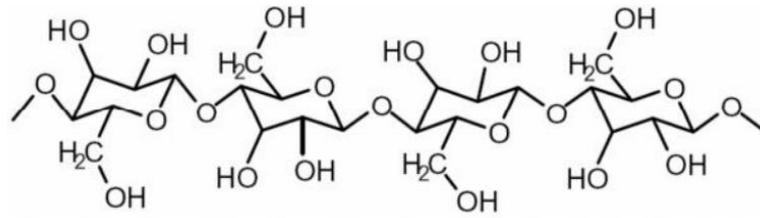
Lignoselulosa merupakan biomassa yang terdiri atas komponen polimer karbohidrat (selulosa dan hemiselulosa), lignin, dan senyawa – senyawa yang larut dalam air yang jumlahnya bervariasi tergantung sumbernya. Selulosa, hemiselulosa, dan lignin membentuk struktur yang disebut mikrofibril, yang kemudian bergabung membentuk struktur makrofibril. Struktur inilah yang menyebabkan dinding sel tanaman menjadi stabil dan kuat (LIPI, 2019). Namun komponen dari lignoselulosa yang memiliki struktur paling kuat adalah lignin, sehingga keberadaan lignin menjadi penghambat dalam konversi polisakarida menjadi bioetanol. Oleh karena itu banyak penelitian dibidang biomassa yang terus mengembangkan upaya untuk mendegradasi lignin (Trisakti dkk., 2015).



Gambar 1. Struktur lignoselulosa pada biomassa (Alonso dkk., 2012)

2.3 Selulosa

Selulosa adalah bahan kimia organik dan merupakan homopolisakarida rantai panjang dengan monomer glukosa yang saling berikatan dengan ikatan β -1,4 glikosida (Nagarajan *et al.*, 2017). Mikrofibril selulosa mengandung sekitar 50-90% bagian kristal dan sisanya bagian amorf. Ikatan β -1,4 glikosida pada selulosa dapat diputus menggunakan metode hidrolisis dengan asam atau enzim.



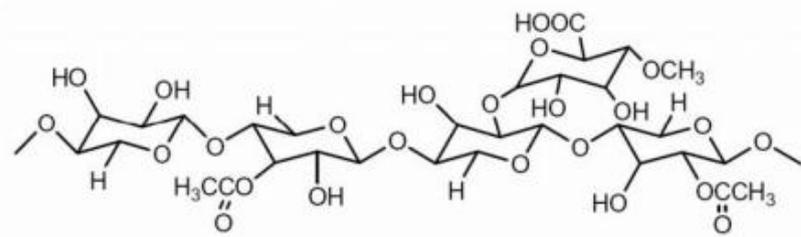
Gambar 2. Struktur selulosa (Suryanto, 2016)

Menurut Tang *et al.* (2017) Selulosa dapat diuraikan oleh aktivitas mikroorganisme yang mampu menghidrolisis selulosa sebagai sumber energi seperti bakteri dan fungi. Hidrolisis selulosa dapat menghasilkan monosakarida berupa glukosa bila hidrolisisnya sempurna, dan jika hidrolisisnya tidak sempurna akan menghasilkan disakarida berupa selobiosa (Lee *et al.*, 2014). Glukosa yang dihasilkan dari hidrolisis dapat difermentasi yang akan menghasilkan bioetanol. Selulosa merupakan polimer linier dari D-glukosa yang terikat pada ikatan 1,4 glikosidik dan sangat erat berasosiasi dengan hemiselulosa dan lignin. Hemiselulosa merupakan salah satu penyusun dinding sel tumbuhan yang terdiri dari kumpulan beberapa unit gula/ heteropolisakarida dan dikelompokkan berdasarkan residu gula utama sebagai penyusunnya seperti xilan, mannan, galactan dan glucan (Fengel dan Wegener, 1995).

2.4 Hemiselulosa

Hemiselulosa merupakan polimer polisakarida heterogen yang dapat larut dalam alkali yang memiliki berat molekul rendah. Jumlah hemiselulosa adalah sekitar 15-30% dari berat kering bahan lignoselulosa (Taherzadeh, 1999). Hemiselulosa terdapat pada dinding sel tumbuhan dengan ikatan yang kompleks menghubungkan serat selulosa menjadi mikrofibril dan berikatan silang dengan lignin (Isikgor and Becer, 2015). Hemiselulosa merupakan polisakarida dengan bobot molekul yang lebih rendah dibandingkan selulosa. Terdiri dari D-xylosa, D-manosa, D-galaktosa, D-glukosa, L-arabinosa, 4-o-metil-glukoronat, D-galakturonat, dan asam D-galakturonat. Perbedaan utama dari selulosa ialah hemiselulosa mengikat gula yang berbeda dengan rantai pendek sehingga dapat dengan mudah dihidrolisis (Perez and Munoz-Dorado, 2002).

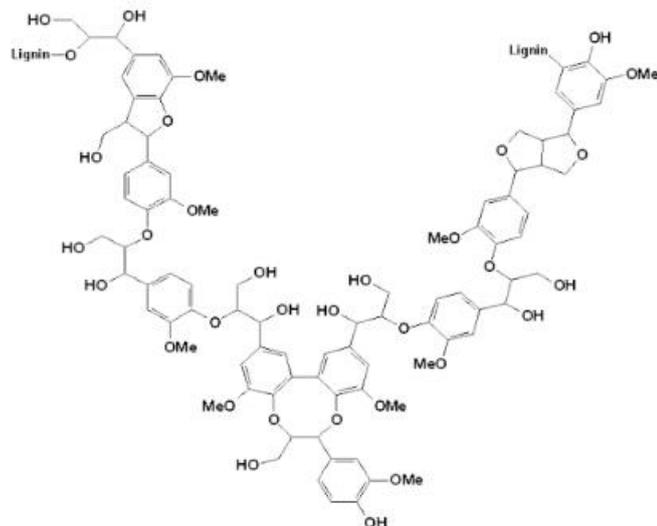
Rantai hemiselulosa lebih pendek dibandingkan dengan selulosa (Hermiati dkk., 2017)



Gambar 3. Struktur hemiselulosa (Suryanto, 2016)

2.5 Lignin

Lignin merupakan polimer aromatik yang berasosiasi dengan polisakarida pada dinding sel sekunder tanaman. Pada umumnya, lignin mengandung tiga jenis alkohol aromatik yaitu coniferyl, sinapyl, dan p-coumaryl (Howard *et al.*, 2003). Umumnya satu jenis monomer akan mendominasi tergantung jenis tanamannya, contohnya untuk koniferil alkohol akan mendominasi di *gymnospermae*, sedangkan pada tanaman dikotil mengandung monomer koniferil dan sinapil alcohol, untuk ketiga jenis monomer dapat ditemukan pada tanaman monokotil (Usman dan Kiaer 2019). Lignin memiliki kandungan gugus-gugus metoksil (OCH₃) dan gugus-gugus hidroksil. Lignin merupakan salah satu polimer alami yang memiliki struktur dan heterogenitas dalam bentuk polimer-polimer polifenol yang bercabang-cabang dengan unit-unit berulang yang tidak teratur (Kusudiandaru, 2009). Fungsi utama lignin adalah memperkuat struktur tanaman dalam menahan terhadap serangan mikroba dan tekanan oksidasi (Anindyawati, 2010). Lignin merupakan salah satu faktor utama yang menyulitkan degradasi lignoselulosa dengan enzim. Selain lignin adalah hambatan utama untuk mengakses selulosa dan hemiselulosa, interaksi hidrofobik lignin dengan molekul enzim menyebabkan ikatan yang menurunkan kemampuan enzim menghidrolisis selulosa (Darojati, 2017).



Gambar 4. Struktur lignin (Sutini dkk., 2019)

2.6 *Actinomycetes*

Proses hidrolisis lignoselulosa secara lengkap memerlukan sistem enzim yang simultan untuk memperoleh hasil akhir yang diinginkan. Penggunaan *actinomycetes* dalam pendegradasian limbah berlignoselulosa memiliki nilai strategis jika dibandingkan dengan mikroba lainnya karena mikroba ini memiliki sistem enzim hidrolitik yang lengkap. *Actinomycetes* merupakan bakteri Gram positif berbentuk filamen yang tersebar luas di alam, terutama di tanah (El Kaouri *et al.*, 2019). *Actinomycetes* merupakan bakterial tanah yang memiliki kemampuan untuk menguraikan lignoselulosa secara lengkap, karena genus ini memiliki kemampuan untuk menghasilkan enzim-enzim hidrolitik ekstraselular (Wendish and Kutzner 1992). Kemampuan *Actinomycetes* dalam mendegradasi lignoselulosa bukan saja dapat dimanfaatkan untuk proses delignifikasi tetapi juga sekaligus proses sakarifikasi karena kebanyakan dari genus ini mampu menghasilkan enzim ligninase, selulase, dan hemiselulase secara bersamaan. Mikroorganisme yang selama ini diketahui memiliki kemampuan menghidrolisis selulosa dan hemiselulosa seperti *Trichoderma reesei* (Howard *et al.* 2003) tidak memiliki kemampuan menghidrolisis lignin. Sebaliknya jamur pelapuk akar dari

kelas *Basidiomycetes* mampu mendegradasi lignin tetapi tidak memiliki kemampuan menghidrolisis selulosa dan hemiselulosa (Gold dan Alic 1993).

2.7 Enzim Selulase

Enzim selulase merupakan suatu enzim yang mampu menguraikan selulosa dengan cara menghidrolisis ikatan β -1,4 glikosidik menjadi bentuk yang lebih sederhana yaitu monomer glukosa (Lehninger, 1998). Selulase diklasifikasikan menjadi tiga tipe berdasarkan aktivitasnya terhadap berbagai substrat, yaitu :

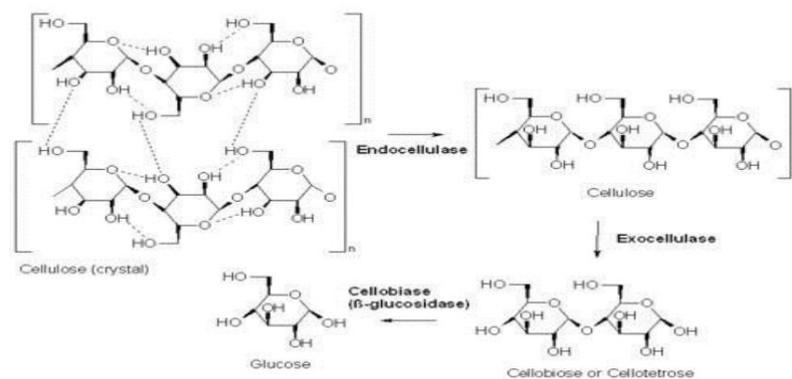
- a. Endo- β -1,4-D-glukanase yang memecah ikatan internal glukosidik yang berada di antara glukosa yang utuh.
- b. Exo- β -1,4-D-glukanase/Exo- β -1,4-D-selobiohidrolase yang memecah dimer selubiosa dari rantai glukosa dan melepaskan ke dalam larutan.
- c. β -glukosidase yang menyempurnakan hidrolisis selulosa menjadi glukosa dengan memecah selubiosa menjadi monomer glukosa untuk mengeliminasi penghambatan selubiosa (Gozan, 2014).

Aktivitas enzim endoglukanase pada umumnya dapat diuji dengan substrat CMC (*Carboxymethyl cellulose*) sehingga enzim endoglukanase disebut dengan istilah CMCase, sedangkan aktivitas enzim selobiohidrolase atau eksoglukanase seringkali diuji dengan substrat avisel sehingga enzim eksoglukanase disebut dengan aviselase (Zhang *et al.*, 2016). Tiga enzim tersebut berperan dalam mendegradasi selulosa menjadi gula sederhana. Salah satu enzim yang dibutuhkan untuk menghidrolisis selulosa menjadi glukosa adalah endo-1,4 β -glukanase yang dapat dideteksi dengan hidrolisis CMC dari nilai indeks selulolitik. Nilai indeks selulolitik menggambarkan kemampuan isolat bakteri selulolitik dalam mengekskresikan enzim endoglukanase (CMCase), semakin besar nilai indeks selulolitik maka semakin besar kemampuan dalam mengekskresikan CMC-ase. Endoglukanase merupakan komponen selulase yang selalu ditemukan pada bakteri selulolitik. Pertumbuhan dan kemampuan bakteri merombak bahan organik ditandai dengan terbentuknya zona bening pada medium CMC. Zona

bening yang timbul menunjukkan terjadinya hidrolisis bahan organik dalam substrat yang diakibatkan oleh enzim selulase dari bakteri selulolitik (Shuangqi *et al.*, 2011).

2.8 *Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF)*

Menurut Bains (1998) fermentasi adalah proses metabolisme yang terjadi dalam substrat karbon (C) dengan menggunakan bantuan mikroorganisme secara anaerob. Hidrolisis merupakan proses untuk mengkonversi selulosa dan hemiselulosa menjadi monomer glukosa dalam produksi bioetanol, hidrolisis dapat dilakukan dengan menggunakan asam atau enzim. Hidrolisis dengan menggunakan enzim disebut dengan sakarifikasi. Menurut Mosier *et al.* (2005) hidrolisis enzimatik dapat dilakukan dengan cara terpisah yaitu *Separated Hydrolysis and Fermentation (SHF)*, ataupun secara bersamaan yaitu *Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF)*. Sakarifikasi dan Fermentasi Simultan (SSF) atau Hidrolisis dan Fermentasi Serentak adalah kombinasi dari proses hidrolisis selulosa dengan menggunakan enzim hidrolisis dan mikroorganisme untuk fermentasi glukosa menjadi etanol secara serentak (Novia *et al.*, 2014). Proses *Simultaneous Saccharification and Fermentation* memungkinkan terjadinya proses sakarifikasi dan fermentasi berlangsung secara simultan dalam satu tangki yang dilengkapi jaket pendingin dan agitator secara batch (Ahrens *et al.*, 2018). Proses SSF berlangsung hingga 120 jam pada suhu 40°C menggunakan enzim glukoamilase dan ragi *Saccharomyces cerevisiae* (Pemberton *et al.*, 1978; Hitz *et al.*, 2009; Lantero *et al.*, 2011). Tingkat keasaman pada proses SSF dapat dipertahankan pada pH 4 dengan menambahkan H₂SO₄ (Batie *et al.*, 2008; Hitz *et al.*, 2009; Bharti dan Chauhan, 2016).



Gambar 5. Mekanisme hidrolisis selulosa secara enzimatik (Ahrens *et al.*, 2018)

2.9 Fermentasi

Fermentasi adalah peruraian senyawa organik menjadi senyawa sederhana dengan bantuan mikroorganisme sehingga menghasilkan energi. Glukosa yang merupakan gula paling sederhana, melalui fermentasi akan menghasilkan etanol.

Dengan persamaan reaksi gula pada persamaan :



Secara teori 100 gram glukosa akan menghasilkan 51,4 gram etanol dan 48,8 gram CO_2 (Nugroho dkk., 2016). Dalam proses fermentasi, perlu ditambahkan *starter* untuk menunjang proses fermentasi pada substrat tertentu. *Starter* adalah populasi mikroba dalam jumlah dan kondisi yang fisiologis yang siap diinokulasikan pada media fermentasi (Prabowo, 2011).

Pada proses fermentasi akan terjadi perombakan gula sederhana menjadi alkohol melalui serangkaian reaksi glikolisis dan metabolisme karbohidrat lainnya. Enzim invertase yang dihasilkan oleh mikroba tertentu akan mengubah glukosa menjadi alkohol. Semakin besar populasi mikroba dalam media fermentasi dan semakin lama proses fermentasi, maka semakin banyak gula sederhana yang dirombak menjadi alkohol dan senyawa lainnya. Alkohol yang dihasilkan dari proses fermentasi biasanya masih mengandung gas-gas antara lain CO_2 yang timbul dari pengubahan gula sederhana menjadi etanol. Fermentasi bioetanol dapat didefinisikan sebagai proses penguraian gula menjadi bioetanol dan

karbondioksida yang disebabkan enzim yang dihasilkan oleh massa sel mikroba (Bestari dkk., 2013)

2.10 Bioetanol

Bioetanol merupakan salah satu biofuel yang telah dikembangkan sebagai bahan bakar nabati karena bersumber dari sumber biologis umumnya biomassa. Bioetanol ini dihasilkan berdasarkan reaksi yang menghasilkan metabolit sekunder dari beberapa jenis khamir yang memanfaatkan glukosa sebagai sumber makanannya (Nursalim dkk., 2019). Bioetanol yang dihasilkan dari makroalga melalui proses fermentasi oleh ragi atau bakteri. Berbagai spesies makroalga memiliki karakteristik kimia dan fisik yang berbeda sehingga memerlukan parameter proses yang spesifik. Oleh karena itu, penting untuk memahami karakteristiknya sebelum produksi bioetanol. Penilaian lengkap dari proses fermentasi umumnya mengacu pada profil pertumbuhan sel, konsumsi gula pereduksi oleh mikroorganisme dan laju produksi bioetanol. Ada banyak metode fermentasi yang digunakan untuk mengubah gula pereduksi yang dihasilkan dari makroalga menjadi bioetanol. Proses-proses tersebut dilambangkan sebagai berikut: (1) hidrolisis dan fermentasi terpisah ; (2) sakarifikasi dan fermentasi simultan ; (3) sakarifikasi dan ko-fermentasi simultan dan (4) bioproses terkonsolidasi (Tan *et al.*, 2020). Berdasarkan sumber bahan bakunya, bioetanol dibedakan menjadi beberapa generasi yaitu sebagai berikut :

a. Bioetanol Generasi Pertama (G1)

Bioetanol generasi pertama adalah bioetanol yang diproduksi dari bahan baku yang mengandung pati seperti ubi kayu, nira, tebu, jagung, dan sebagainya. Namun bahan baku tersebut masih banyak dimanfaatkan sebagai bahan pangan sehingga terjadi persaingan antara pangan dan *Biofuel* (Tan *et al.*, 2020).

b. Bioetanol Generasi Kedua (G2)

Bioetanol generasi kedua adalah bioetanol yang diproduksi dari limbah yang mengandung lignoselulosa tinggi seperti *bagasse*, jerami padi, tandan kosong kelapa sawit, tongkol jagung, dan lain sebagainya. Produksi dari generasi kedua ini memiliki kendala yaitu tingginya kandungan lignin, memerlukan teknologi yang mahal, dan tidak ekonomis dalam produksi skala besar.

c. Bioetanol Generasi Ketiga (G3)

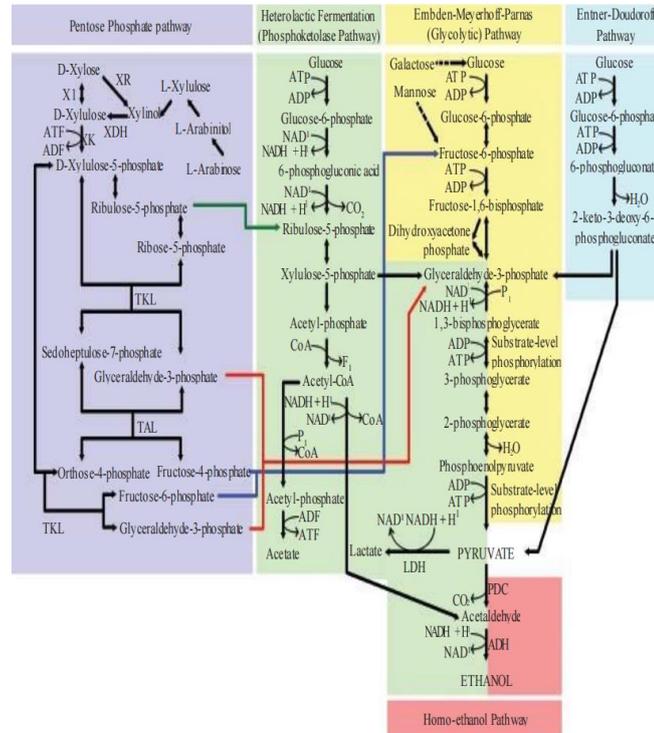
Bioetanol generasi ketiga merupakan bioetanol yang menggunakan bahan baku dari kelompok alga, baik mikroalga maupun makroalga (rumput laut). Kelompok alga dipilih karena terbukti dapat tumbuh dan tahan pada berbagai lingkungan, memiliki persediaan yang cukup dan aman karena pertumbuhannya yang cepat dan pemanenan yang mudah, sedikit mengandung lignin atau tidak ada sama sekali, pertumbuhannya cepat, dan berperan dalam pengurangan efek rumah kaca. Alga mampu tumbuh pada air limbah dan mengkonversi CO₂ menjadi biomassa yang berguna tanpa mengganggu persediaan pangan dan tanaman pertanian (Chaudhary *et al.*, 2014).

2.11 Mikroorganisme Penghasil Bioetanol

Etanol dapat diproduksi melalui beberapa cara, yaitu secara kimiawi dengan bahan baku dari bahan bakar fosil atau melalui proses biologi dengan cara fermentasi gula yang hasilnya berupa bioetanol (Hill *et al.*, 2006). Beberapa mikroba yang dapat digunakan untuk produksi bioetanol salah satunya adalah *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Clostridium thermocheilum* dan *Thermoanaerobacter* spp. Mikroba yang dapat menghasilkan bioetanol paling tinggi adalah *Saccharomyces cerevisiae* karena dapat menghasilkan etanol yang paling tinggi, sekitar 12-14% dan *Zymomonas mobilis* sekitar 12%. *Saccharomyces cerevisiae* memecah molekul gula melalui siklus Meyerhoff Parnas (EMP) yang menghasilkan 2 mol ATP sedangkan *Zymomonas mobilis*

memecah molekul gula melalui siklus Entner Doudoroff (ED) menghasilkan 1 mol ATP (Riyanti, 2009).

Adapun siklus metabolisme etanol ditunjukkan pada Gambar 6.



Gambar 6. Siklus metabolisme etanol (Riyanti, 2009)

2.12 Karakterisasi Substrat dan Analisis Kadar Bietanol

2.12.1 Karakterisasi Substrat Menggunakan *X-Ray Diffraction* (XRD)

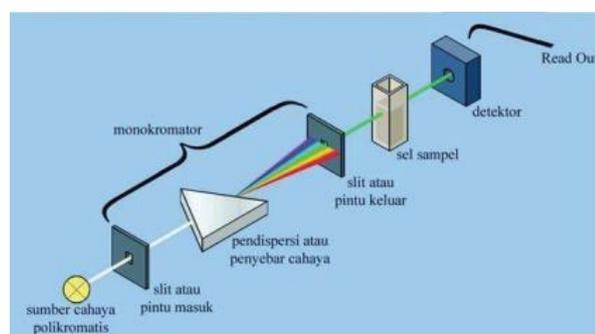
Karakterisasi XRD bertujuan untuk mengidentifikasi derajat kristalinitas selulosa yang terdapat dalam substrat (Segal *et al.*, 1959). Kristalinitas merupakan sifat penting polimer yang menunjukkan ikatan antara rantai molekul sehingga menghasilkan susunan molekul yang lebih teratur. Kristalinitas yang tinggi pada selulosa dapat menghambat proses sakarifikasi. Semakin tinggi kristalinitas maka kemampuan enzim dalam mendegradasi substrat selulosa menjadi glukosa semakin rendah. Umumnya untuk menurunkan derajat kristalinitas selulosa yang tinggi digunakan NaOH. Karena NaOH dapat memutuskan ikatan hidrogen terutama ikatan inter-molekul selulosa. Putusnya ikatan hidrogen ini

menyebabkan air yang diserap lebih banyak sehingga nilai retensi air meningkat. Hal ini meningkatkan penyerapan enzim selulase ke dalam substrat selulosa karena penyerapan air lebih banyak (Wayan dkk., 2011).

Analisis XRD didasarkan pada pola difraksi dari paduan atau senyawa yang dihasilkan oleh proses difraksi, ukuran panjang gelombang sinar-X tidak berbeda jauh dengan jarak antar atom di dalam kristal. Ketika seberkas sinar-X berinteraksi dengan sampel kristal, maka bidang kristal itu akan membiaskan sinar-X yang memiliki panjang gelombang yang sama dengan jarak antar kisi dalam kristal tersebut. Sinar yang dibiaskan akan ditangkap oleh detektor, kemudian diterjemahkan sebagai puncak difraksi. Semakin banyak bidang kristal yang sama terdapat dalam sampel, semakin kuat intensitas pembiasan yang dihasilkan (Mahliani, 2022).

2.12.2 Analisis Kadar Bioetanol Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Etanol merupakan alkohol primer dimana gugus OH pada etanol hanya terikat dengan 1 atom karbon. Analisis kadar bioetanol dilakukan untuk mengetahui konsentrasi etanol yang dihasilkan dari proses fermentasi menggunakan *S. cerevisiae*. Etanol yang dihasilkan ditambahkan pereaksi dikromat yang diasamkan untuk analisis alkohol primer dan alkohol sekunder. Dalam reaksinya, ion-ion kromium dalam dikromat mengoksidasi alkohol primer menjadi aldehida dan alkohol sekunder menjadi keton, sedangkan alkohol tersier tidak teroksidasi. Ketika alkohol teroksidasi, ion-ion kromium dalam dikromat tereduksi dari bilangan oksidasi +6 menjadi +3 yang memberikan warna oranye menjadi hijau. (Seo *et al.*, 2009).



Gambar 7. Spektrofotometer UV-Vis (Suhartati, 2017))

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan dari bulan Oktober 2023 hingga bulan Juni 2024 di Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung. TKKS diperoleh dari PT. Perkembungan Nusantara VII. Isolat *Actinomycetes* diisolasi dari tanah mangrove yang diambil dari Pantai Dwi Mandapa, Pesawaran, Lampung dengan titik koordinat-5.571883°LS 105.243494°BT. Analisis karakter substrat serbuk TKKS menggunakan *X-Ray Diffractometer* (XRD) dilakukan di Universitas Negeri Padang. Analisis penentuan gula pereduksi dan kadar etanol menggunakan Spektrofotometer UV-*Vis* dilakukan di Laboratorium Biokimia FMIPA Universitas Lampung.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain alat-alat gelas, gunting, blender, pengayak 60 mesh, spatula, bunsen, jarum ose, mikropipet, pipet tetes, neraca analitik, termometer, cawan petri, corong, rak tabuk reaksi, mortal dan alu, oven, *waterbath*, sentrifus, tabung sentrifus, *magnetic strirrer*, *shaker*, autoklaf, pH meter, spatula, *incubator*, Spektrofotometer UV-*Vis* Cary Win 100 dan PANalytical *X-Ray Diffractometer* (XRD).

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain adalah substrat tandan kosong kelapa sawit, kultur *Saccharomyces cerevisiae* yang diperoleh dari fermipan kemasan, sedimen tanah mangrove, asam sulfat pekat (H_2SO_4), media *International Streptomyces Project-2* (ISP-2), media *Yeast Malt Broth* (YMB), media *Potato Dextrose Agar* (PDA), *carboxymethyl cellulose* (CMC), natrium klorida (NaCl), *congo-red*, glukosa, reagen dikalium kromat, asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS), buffer fosfat pH 7, buffer sitrat pH 4,5, indikator *universal*, aluminium foil, kertas saring, kapas, akuades, dan ragi roti Fermipan.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1. Preparasi Tandan Kosong Kelapa Sawit

Tandan kosong kelapa sawit didapatkan dari PT. Perkebunan Nusantara VII yang kemudian dikeringkan dibawah sinar matahari selama 3 hari. Kemudian, digunting hingga berukuran kecil sehingga mudah dihaluskan untuk menjadi tepung tandan kosong kelapa sawit. Tepung diayak menggunakan ayakan 60 mesh (250 μ m) dan disimpan dalam keadaan tertutup.

3.3.2 Perlakuan Awal TKKS

Perlakuan awal TKKS dilakukan menurut metode yang dilakukan oleh Teharzadeh *et al* (2007) Serbuk TKKS ditimbang sebanyak 15 gram dimasukkan ke dalam Erlenmeyer ukuran 500 mL, kemudian ditambahkan larutan NaOH 12% sebanyak 300 mL. Setelah itu, dihomogenisasi menggunakan *shaker* dengan kecepatan 100 rpm selama 3 menit dan dipanaskan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah itu, sampel disaring dan dibilas menggunakan air suling sebanyak 4000 mL. Kemudian bagian padat (holoselulosa) dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C sampai berat konstan dan kemudian digunakan sebagai substrat pada SSF.

3.3.2.1 Analisis Komponen TKKS dengan Metode TAPPI

Setengah gram sampel hasil *pretreatment* basa yang sudah dikeringkan hingga berat konstan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 mL. Sebanyak 100 mL akuades ditambahkan kemudian sampel direndam selama 2 jam pada suhu 100°C dan disaring dengan kertas saring sambil dibilas dengan akuades hingga filtrat menjadi bening. Kertas saring dan residu dikeringkan hingga berat konstan. Berat konstan tersebut dikurangi dengan berat kertas saring awal disebut berat A.

Residu berat A dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 mL dan ditambahkan 100 mL H₂SO₄ 1 N, direndam selama 2 jam dalam suhu 100°C. Larutan disaring dan dibilas dengan akuades sebanyak 150 mL hingga filtrat kembali jernih. Residu dan kertas saring kemudian dikeringkan hingga berat konstan. Berat konstan tersebut dikurangi berat kertas saring awal disebut berat B.

Residu berat B dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 mL dan ditambahkan H₂SO₄ 72% sebanyak 5 mL dan disimpan pada suhu ruang selama 4 jam. Setelah itu, 75 mL H₂SO₄ 1 N ditambahkan dan direndam selama 2 jam pada suhu 100°C lalu disaring dengan kertas saring sambil dibilas akuades 150 mL sampai filtrat jernih. Residu dan kertas dikeringkan hingga berat konstan. Berat konstan dikurangi dengan berat kertas saring awal disebut berat C. Prosedur yang sama dilakukan pada serbuk TKKS tanpa *pretreatment*. Perhitungan kadar komponen holoselulosa yang terukur dari berat A, B, C dilakukan berdasarkan metode TAPPI T264 cm tes standar-97 (TAPPI, 2007) sesuai dengan Persamaan 1 dan 2.

$$\text{Kadar Lignin} = \frac{A - B}{\text{Berat Sampel}} \times 100 \% \quad (1)$$

$$\text{Kadar Selulosa} = \frac{B - C}{\text{Berat Sampel}} \times 100 \quad (2)$$

3.3.3 Analisis Karakteristik Substrat

Pengukuran kristalinitas tepung tandan kosong kelapa sawit dilakukan dengan analisis XRD. Analisis dilakukan untuk mengetahui struktur kristal selulosa pada tepung tandan kosong kelapa sawit yang melalui proses *pretreatment* secara fisika.

Indeks kristalinitas selulosa dapat dihitung dengan metode empiris yang dihitung dengan rumus pada Persamaan 3.

$$\text{CrI} = \frac{\text{Area fase kristalin}}{\text{Area total fase kristalin dan amorf}} \times 100\% \quad (3)$$

3.3.4 Isolasi *Actinomyces Indigenus*

3.3.4.1 Pembuatan NaCl Fisiologis 0,85 %

Garam NaCl ditimbang sebanyak 0,85 gram lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan akuades hingga tanda tera kemudian dihomogenkan. Selanjutnya dilakukan proses sterilisasi menggunakan autoclave selama 15 menit pada suhu 121°C (Karkouri *et a.*, 2019)..

3.3.4.2 Pembuatan Media *International Streptomyces Medium 2 (ISP-2)*

Media *International Streptomyces Medium (ISP-2)* digunakan sebagai tempat bertumbuhnya *Actinomyces* hasil isolasi. Media dibuat dengan cara menimbang 5 gram *malt extract agar*, 0,4 gram *yeast extract*, 0,4 gram glukosa dalam 100 mL akuades. Kemudian bahan-bahan tersebut dimasukkan kedalam Erlemeyer 300 mL dan dilarutkan dalam 100 mL akuades. Media tersebut disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Media kemudian dituang pada cawan petri yang sudah disterilkan dan dilakukan di dalam LAF. Didiamkan pada suhu ruang hingga media memadat dan siap digunakan.

3.3.4.3 Kultivasi *Actinomyces Indigineous*

Isolasi *Actinomyces* dilakukan dengan metode *spread plate*. Sampel sedimen yang diperoleh dari lingkungan mangrove disimpan pada botol sampel. Sebanyak 1 gram sampel tanah disuspensikan pada 10 mL larutan garam fisiologis (0,85% NaCl) steril. Pengenceran terhadap suspensi sampel dilakukan secara bertingkat

hingga pengenceran 10^{-8} . Masing-masing pengenceran diambil 0,1 mL dan diinokulasikan ke media ISP-2 dengan metode *spread plate* lalu media diinkubasi pada suhu 37°C selama 7 hari. Kemudian koloni tunggal *Actinomycetes* dimurnikan menggunakan metode *streak plate* pada medium ISP-2. Isolat murni yang diperoleh dilakukan penapisan untuk mengetahui aktivitas selulolitiknya.

3.3.4.4 Penapisan Isolat Indigineous *Actinomycetes* Mangrove

Penapisan isolat *Actinomycetes* dilakukan untuk memperoleh bakteri yang memiliki aktivitas selulolitik. Penapisan dilakukan dengan menggunakan media ISP-2 yang mengandung 0,4 gram glukosa, 0,4 gram *yeast extract*, 5 gram *malt extract agar* dalam 100 mL akuades dan ditambahkan CMC 0,5 gram. Media disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit lalu ditambahkan ampisilin sebagai antibakteri sebanyak 4 mL dan 1,5 tetes kandistatin dan didiamkan hingga mengeras. Isolat murni hasil isolasi ditotolkan pada media yang telah disiapkan dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 3-7 hari. Setelah isolat inkubasi tercapai, media yang telah ditumbuhi bakteri disiram menggunakan *congo-red* selama 15 menit yang berfungsi menghidrolisis selulosa pada media CMC menjadi glukosa membentuk zona bening disekitar koloni dan dibilas menggunakan NaCl 1 % untuk memperjelas zona bening yang terbentuk di sekitar koloni bakteri menunjukkan bahwa bakteri memiliki aktivitas selulolitik. Setelah didapatkan zona bening, indeks aktivitas selulolitik diukur dengan Persamaan 4.

$$\text{Indeks Aktivitas} = \frac{A-B}{B} \quad (4)$$

Keterangan :

A = diameter zona bening (mm)

B = diameter koloni (mm)

3.3.5 Produksi dan Uji Aktivitas Enzim Selulase

3.3.5.1 Produksi Enzim Selulase dari Isolat *Actinomycetes*

Produksi enzim selulase dari isolat *Actinomycetes* diperoleh dengan cara menginokulasi isolat terpilih pada media fermentasi. Media fermentasi *Yeast Malt Broth* (YMB) mengandung glukosa 0,8%, 0,8% yeast extract, *malt extract* 2%, dan CMC 2% dalam akuades. Bahan tersebut dilarutkan dengan bantuan pemanasan menggunakan *hotplate* kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm. Isolat *Actinomycetes* diinokulasi pada media tersebut, diinkubasi pada *shaker* dan dilakukan pemanenan enzim setiap 24 jam sekali selama 5 hari. Enzim selulase yang diperoleh dipisahkan dengan selnya dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 20 menit.

3.3.5.2 Uji Aktivitas Enzim Selulase dari Isolat *Actinomycetes*

Uji aktivitas enzim selulase dilakukan menggunakan metode Mandels. Metode ini didasarkan kepada jumlah gula pereduksi yang terbentuk (Mandels *et al.*, 1981). Sebanyak 0,5 mL media CMC 0,1% ditambahkan dengan 0,5 mL ekstrak kasar enzim selulase dan dimasukkan ke dalam tabung. Kemudian diinkubasi pada suhu 55 °C selama 15 menit dengan *waterbath*. Sebanyak 1 mL reagen DNS ditambahkan untuk menghentikan reaksi dan dididihkan dalam *waterbath* pada suhu 100 °C selama 10 menit. Selanjutnya, tabung reaksi didinginkan dan diukur menggunakan spektrofotometer UV-*Vis* pada panjang gelombang 540 nm.

3.3.6. Pembuatan Kurva Standar Glukosa

Kurva standar glukosa dibuat dengan menggunakan larutan induk konsentrasi 5 g/L yang kemudian dibuat deret standar dengan konsentrasi berturut-turut adalah 0,2 g/L ; 0,4 g/L ; 0,6 g/L ; 0,8 g/L ; dan 1 g/L. Masing-masing larutan kemudian ditambah pereaksi DNS dan diukur menggunakan Spektrofotometer UV-*Vis*.

3.3.7 Produksi Bietanol

3.3.7.1 Persiapan Starter *S. Cereviceiae*

Pembuatan starter *S. Cereviceae* dilakukan menurut metode yang dilakukan oleh Scholar dan Benedidikte (1999) dan Suh *et al.*, (2007). Sebanyak 1,75 gram media *Potato Dextrose Agar* (PDA) dilarutkan dalam 50 mL akuades dan dihomogenkan menggunakan *hotplate* dan *magnetic stirer* hingga larutan menjadi bening.

Larutan media PDA tersebut disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit.

Media PDA yang telah disterilisasi dituang ke dalam tabung reaksi ukuran 20 mL masing-masing sebanyak 10 mL dan didinginkan dalam keadaan miring hingga memadat pada kondisi steril. Satu gram ragi roti fernipan dilarutkan dalam 10 ml aquadest dan dihomogenkan menggunakan vortex, kemudian satu loop larutan ragi digoreskan pada media agar PDA miring, diinkubasi selama 48 jam pada suhu 30°C untuk mengaktifkan ragi. Dua lop koloni yeast dari media miring diinokulasikan pada 50 mL media cair yang mengandung 5% YMB dan kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 48 jam.

3.3.7.2 *Simoultaneous Saccharification and Fermentation* (SSF)

Proses SSF dilakukan menurut metode yang dilakukan oleh Sita *et al* (2023) sebanyak 5,27 g serbuk TKKS *pretreatment* ditimbang dalam labu 250 mL. Kemudian disterilkan terlebih dahulu dengan cara dipanaskan pada tekanan 121°C selama 15 menit di autoklaf . Setelah dingin, labu berisi serbuk TKKS yang telah steril ditimbang kembali untuk ditentukan hilangnya air akibat pemanasan bertekanan. Media fermentasi (5 mL) terdiri dari 100 g/L ekstrak ragi, 100 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 100 g/L $(NH_4)_2HPO_4$. buffer sitrat pH 4,5 (2,5 mL), dan 10% (v/v) inokulum ragi *S.Cereviceae*, beserta ekstrak kasar selulase (ActDM-2) , ditambahkan ke erlenmeyer yang berisi serbuk TKKS yang telah diolah sebelumnya. Akuades steril ditambahkan ke dalam labu sampai berat total campurannya mencapai 50 gram. Kecuali enzim, media fermentasi dan larutan buffer disterilkan pada suhu 121°C selama 15 menit di autoklaf. Proses SSF

dilakukan *dishaker* dengan kecepatan 150 rpm dan suhu 38°C selama 72 jam. Sampel filtrat diambil sebanyak 5 mL interval setiap 24 jam selama 72 jam untuk menganalisis gula dan konsentrasi etanol. Sampel yang diperoleh setelah fermentasi disentrifugasi pada 5.000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh digunakan untuk mengukur konsentrasi gula pereduksi dan etanol. Konsentrasi gula pereduksi ditentukan dengan menggunakan Metode Dinitro Salicylic Acid (DNS) (Miller 1959) dan diukur menggunakan spektrofotometer UV-*Vis* pada 540 nm.

3.3.8. Analisis Bioetanol

3.3.8.1 Analisis Kualitatif Bioetanol

Uji kualitatif etanol hasil SSF dilakukan dengan cara oksidasi kalium dikromat ($K_2Cr_2O_7$). Disiapkan tabung reaksi lalu ditambahkan 2 mL $K_2Cr_2O_7$ 2%, 5 tetes H_2SO_4 pekat dan 1 mL sampel. Adanya etanol pada sampel ditandai dengan perubahan warna dari jingga menjadi hijau (Bahroni *and* Istianah, 2017).

3.3.8.2 Analisis Kuantitatif Bioetanol

Analisis kadar Etanol dilakukan dengan menggunakan spektrofotometri UV-*Vis*. Larutan pereaksi kalium dikromat dibuat dengan pengenceran 56 mL H_2SO_4 6 N sampai batas volume 100 mL, kemudian larutan tersebut ditambahkan 0,2942 g padatan $K_2Cr_2O_7$ dan diencerkan hingga batas volume 200 mL. Larutan pereaksi terbentuk berwarna jingga. Kadar etanol hasil fermentasi ditentukan menggunakan kurva standar etanol. Larutan standar dibuat dengan konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50 gL^{-1} . Sebanyak 0,5 mL etanol hasil distilasi diambil dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer, lalu 15 mL akuades dan 12,5 mL larutan pereaksi ditambahkan ke dalamnya dan dihomogenkan. Sebanyak 10 mL larutan yang dihasilkan diambil dan ditempatkan dalam labu ukur 25 mL. Setelah itu, larutan dipanaskan pada temperatur 62,5°C selama 20 menit. Setelah didinginkan pada temperatur ruang, larutan ditambahkan akuades ke dalam labu ukur sampai

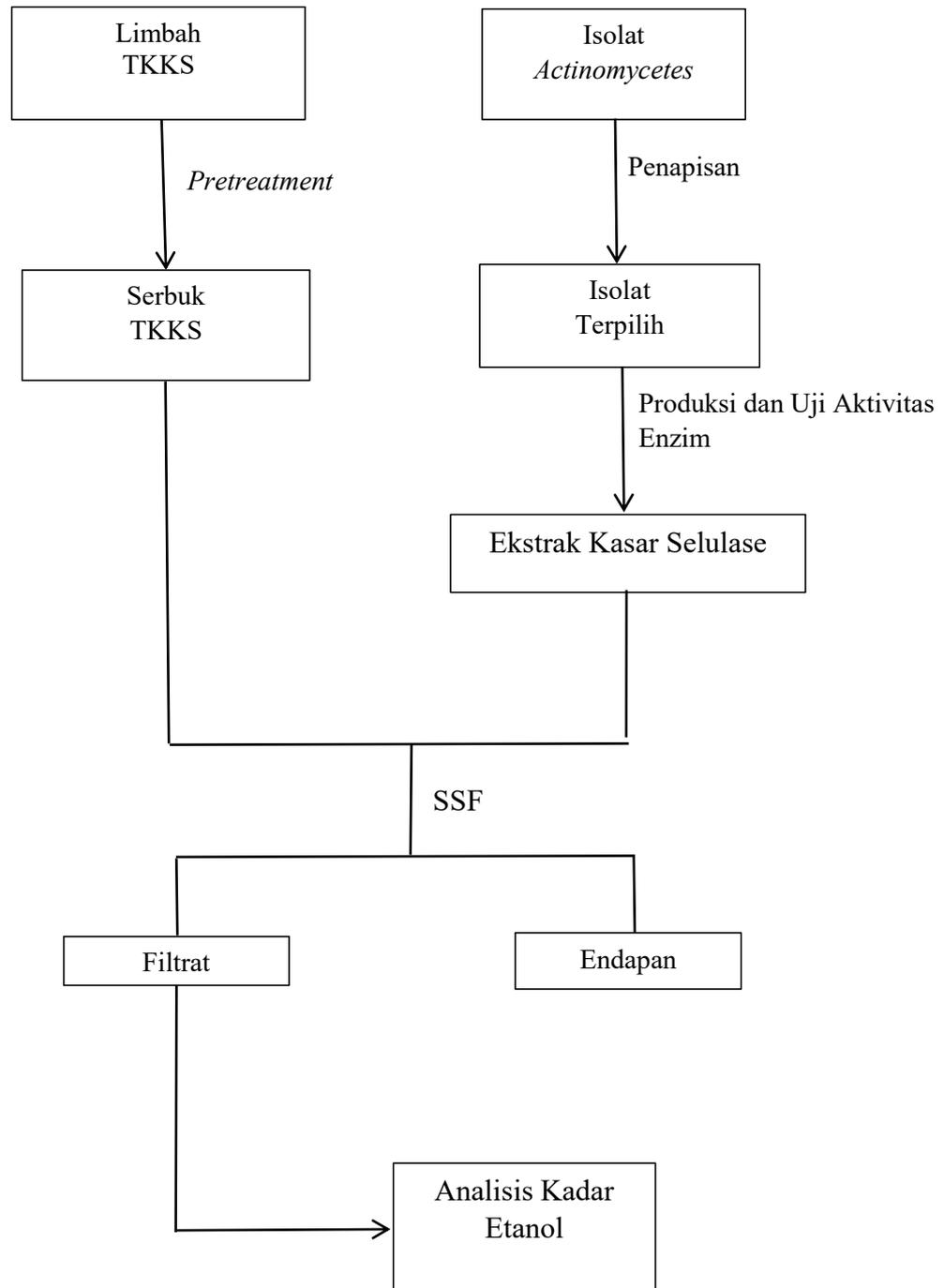
batas volume 25 mL dan dihomogenkan. Sebanyak 5 mL larutan dipipet ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 2,5 mL . Selanjutnya, campuran dianalisis dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm - 610 nm . Panjang gelombang optimum diperoleh sebesar 601 nm (Kolo *et al.*, 2022).

3.3.8.4 Analisis Kadar Glukosa

Supernatan hasil SSF interval *sampling* 24-72 jam selanjutnya diukur kadar glukosanya. Sebanyak 125 μ L sampel dan 125 μ L akuades dipipetkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian 500 μ L reagen DNS ditambahkan ke dalam tabung tersebut. Penangas air disiapkan untuk memanaskan larutan dan dididihkan selama 5 menit, larutan dipindahkan ke dalam wadah berisi air untuk didinginkan. Kemudian ditambahkan 5 mL akuades ke dalam masing-masing erlenmeyer. Diukur dengan spektrofotometer UV-*Vis* dengan panjang gelombang 540 nm (Miller, 1959). Pengujian dilakukan sebanyak duplo.

3.4 Diagram Alir

Adapun diagram alir pada penelitian ini adalah sebagai berikut :



V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.2 Kesimpulan

Berdasarkan hasil yang diperoleh dari penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan bahwa :

1. Isolat *Actinomyces* terpilih diperoleh dengan kode ActDM-2 yang diisolasi dari sedimen mangrove memiliki indeks selulolitik 0,722 dengan aktivitas selulase sebesar $2,2618 \text{ U.mL}^{-1}$
2. Kandungan kimia pada limbah TKKS hasil *pretreatment* telah dianalisis dengan metode TAPPI yang terdiri dari 54,28% selulosa, 18,86% hemiselulosa, dan 26,86% senyawa lain
3. Produksi etanol melewati SSF didapatkan waktu optimum pada jam ke-48 dengan konsentrasi etanol $0,755 \text{ g.L}^{-1}$ dan persen efisiensi yang didapatkan sebesar 83,74%.

5.2 Saran

Penelitian yang telah dilakukan dapat menghasilkan etanol yang dihasilkan dari metode biokonversi secara SSF. Parameter fermentasi yang sudah diamati adalah waktu, sedangkan parameter lainnya seperti konsentrasi enzim, konsentrasi inokulum, dan konsentrasi substrat belum diamati lebih jauh. Pemurnian etanol juga perlu dilakukan seperti dialisis untuk meningkatkan *yield* etanol yang dihasilkan. Hal tersebut disarankan untuk dilakukan pada penelitian selanjutnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, N., Sulaiman, F. 2013. The Properties of the washed empty fruit bunches of oil palm. *Journal of Physical Science*. **24**(2):117-137.
- Ahrens, T., A. Crotteau, C. Maloney and T. Viswanathan. 2018. Process and Method for Simultaneous Saccharification and Fermentation Using Microalgae. US Patent 0265900 A1.
- Akhtar N, Goyal D, Goyal A. 2017. Characterization of microwave-alkaliacid pre-treated rice straw for optimization of ethanol production via Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF). *Energy Convers Manag.***141**(2): 133-144.
- Alonso, D.M., Stephanie G.W. and James A.D. 2012. *Bimetallic Catalysts for Upgrading of Biomass to Fuels and Chemicals*. Royal Society of Chemistry. London.
- Andi S, editors. 2013. Conf. and Exhibition Indonesia Renewable Energy & Energy Conservation. *Energy Procedia*. **47**(1): 268-272.
- Arifwan, Erwin, and Kartika, R., 2016. Pembuatan Bioetanol Dari Singkong Karet (Manihot Glaziovii Muell) Dengan Hidrolisis Enzimatik Dan Difermentasi Menggunakan *Saccharomyces cerevisiae*. *Jurnal Atomik*.**1**:10–12.
- A. Tesfaw and F. Assefa. 2014. Current Trends in Bioethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae* : Substrate, Inhibitor Reduction, Growth Variables, Coculture, and Immobilization. *International Science Research* **2**(3): 1–11.
- Bains, W. 1998. *Biotechnology from A to Z Second Edition*. Oxford University Press Inc. New York.
- Batie, C.J., G. Crabb, G.W. Aux, E.S. Cates, J.A. Dinwiddie, A.L. Silverstone, R. Quadt dan C.A. Miller. 2008. Process for Starch Liquefaction and Fermentation. US Patent 0299256 A1.
- B. Bhadana and M. Chauhan. 2016. “Bioethanol Production Using *Saccharomyces cerevisiae* with Different Perspectives: Substrates, Growth Variables, Inhibitor Reduction and Immobilization,” *Ferment. Technol.* **5**(2): 2–5.

- Bhartie dan M. Chauca. 2016. Bioetanol Production Using *Saccharomyces cerevisiae* with Different Perspectives: Substrates, Growth Variables, Inhibitor Reduction and Immobilization. *Fermentation Technology*. **5**(2): 2
- Chaudhary, L., Pradhan, P., Soni, N., Singh, P., and Tiwari, A. 2014. Algae as a *Chinese Journal of Chemical Engineering*. **28**(2). 502–517.
- D. A. Permata, A. Kasim, A. Asben, and Yusniwati. 2021. Delignification of lignocellulosic biomass. *World J. Adv. Res. Rev.* **12**(2): 462–469.
- Dashtban, M., Schraft, H., Qin, W. 2009. Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residue: Opportunities & Perspectives. *International Journal Biology Science*. **2**(2): 578-595.
- Direktorat Jendral Perkebunan. 2015. Statistik Perkebunan Indonesia Komoditas Kelapa Sawit 2014 - 2016. Jakarta.
- Elevri, P.A., dan Putra, S.R. 2006. Produksi Etanol Menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* yang Diamobilisasi dengan Agar Batang. *Akta Kimindo*. **1**(2): 05–114.
- El Karkouri A, Assou SA, El Hassouni M. 2019. Isolation and screening of *Actinomycetes* producing antimicrobial substances from an extreme moroccan biotope. *Pan Afr Med J*. **33**. 329.
- Fatriasari W, Raniya R, Oktaviani M, Hermiati E. 2018. The improvement of sugar and bioethanol production of oil palm empty fruit bunches (*Elaeis guineensis Jacq*) through microwave-assisted maleic acid pretreatment. *Bioresources* **13** (2): 4378-4403.
- Fauzi, Y., E.W. Yustina., S. Iman., dan R. Hartono. 2005. Kelapa Sawit : Budidaya, Pemanfaatan Hasil dan Limbah, Analisis Usaha dan Pemasaran. Penebar Swadaya. Jakarta. *Aspergillus niger* FNU 6018. *Teknologi*. **34**. 1–9.
- Gauss, WE, Suzuki S, Takagi M. 1986. Manufacture of alcohol from cellulosic material using plural fermenters. *International Journal of ChemTech Research*. **6** (2). 381–1389.
- Gozan, M. 2014. *Teknologi Bioetanol Generasi Kedua*. Erlangga. Jakarta.
- Hermiati, E., Djumali, M., Titi, C. S., Ono, S., Bambang, P. 2017. Pemanfaatan Biomassa Lignoselulosa Ampas Tebu Untuk Produksi Bioetanol. *Jurnal Litbang Pertanian*. **29**(4): 121-130.
- Hitz, D.W., T. Huang, A.K. Iverson, B.G. Lefebvre, C. Mitchinson. 2009. Process for Simultaneous Saccharification and Fermentation for Production of Ethanol. EP Patent 2516658 A2
- Isikgor, F.H., and Becer, C. R. 2015. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polymchem*. **6**. 4497-4559.

- Kanti A. 2005. Actinomycetes Selulolitik dari Tanah Hutan Taman Nasional Bukit Dua Belas Jambi. *Biodiversitas*. **6**(2):85-89.
- Kolo, S.M.D., Pardosi, L., and Baru, A.E. 2022. The Effect of Hydrolysis Time Using Microwave on Bioethanol Production from Sorghum Waste (Sorghum Bicolor L.). *Jurnal Sains dan Terapan Kimia*. **16**, 28.
- Lehninger, A.L. 1998. *Dasar-Dasar Biokimia Jilid 1*, Erlangga. Jakarta.
- Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. 2019. *Perkembangan Bioetanol G2 : Teknologi dan Perspektif*. Jakarta. LIPI Press.
- Lubis, A. 2008. *Kelapa sawit (Elaeis guineensis Jacq.) di Indonesia Edisi 2*. Pusat Penelitian Kelapa Sawit Press. Medan.
- Mahliani, E. 2022. *Konversi Nanoselulosa dari Limbah Kulit Pisang Kepok Menjadi Gula Alkohol Menggunakan Nanokatalis $LaCr(1-x)FeO_3$ yang Diradiasi Sinar UV*. (Skripsi). University of Lampung.
- Muryanto, M. Sahlan, Y. Sudiyani. 2012. Simultaneous Saccharification and Fermentation of Oil Palm Empty Fruit Bunch for Bioethanol Production by *Rhizopus oryzae*. *International Journal of Environment and Bioenergy*. **3**(2): 111- 120.
- Mussatto, S.I., Fernandes, M., Adriane, M.F., Milagres, Roberto, I.C., 2008. Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. *Enzyme and Microbial Technology*. **43**:124–129
- Nagarajan, Sanjay et al. 2017. Cellulose II as Bioethanol Feedstock and Its Advantages over Native Cellulose. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*.
- Noval, Edi Suryanto¹, dan Lidya I. 2020. Karakterisasi Fisikokimia dan Aktivitas Antioksidan Serat Pangan dari Ampas Empulur Sagu Baruk (*Arenga Microcarpha* B.). *Chemistry Progress*. **13**. 1
- Novia, A. Windarti., dan Rosmawati. 2014. Pembuatan Bioetanol dari Jerami Padi. dengan Metode Ozonolisis – Simultaneous Saccharomyces and Fermentation (SSF). *Jurnal Teknik Kimia*. **20**(3). 38-48.
- Nurmayani, D. 2007. Isolasi dan uji potensi mikroorganisme selulolitik asal tanah gambut dan kayu sedang melapuk dalam mendekomposisikan kayu. Skripsi: Universitas Sumatera Utara.
- Nursalim, N., Herliany, N.E., Studi, P., Kelautan, I., Bengkulu, U., dan Limun, K. 2019. Potensi *Nannochloropsis oculata* dan *Tetraselmis chuii* Sebagai Bahan Baku Bioetanol. *Jurnal Ilmu Kelautan*. **1**. 23–31.
- Pemberton, M. S., S. Kans, S. D. Crawford, I. Mo. 1978. Method Forethanol Fermentation. US Patent 4.224.410.

- Perez, J., Munoz-Dorado, J. 2002. Biodegradation and biological treatment of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiol.* **5**: 53-63.
- Pranoto, S. 2017. Pemanfaatan Selulosa Bagas untuk Produksi Etanol melalui Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak dengan Enzim Xylanase. *Makara Teknologi*.**5**(1) : 17-24.
- Rismanto, Ngangi, J., dan Moko, E. (2020). Analisis Komponen Serat Jerami Padi Menggunakan Pretreatment Biologis dan Kimiawi. *Jurnal Nukleus Biosains*, **1**(1). 26-30.
- Ropiah, D. 2010. Pemanfaatan Hidrolisat Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS) untuk Produksi Etanol Dengan *Pichia Stipitis*. (Skripsi). Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah. Jakarta.
- Satria, H., Nurhasanah, dan Martasih, F. 2010. Aktivitas Selulase Isolat *Actinomyces* Terpilih pada Fermentasi Pada Jerami Padi. Prosiding: *Seminar Nasional Sains & Teknologi*.
- Sumada, E. 2011. Pembuatan Etanol Generasi Kedua Dengan Memanfaatkan limbah Rumpuk Laut *Eucheuma Cottonii* Sebagai Bahan Baku. *lmiah Teknik Mesin Cakram*. **2**(1) : 75
- Solahuddin, Hanifa, Nisa Isneni, Deccati, R. F., & Muliasari, H. 2021. Isolasi dan Uji Aktivitas Enzim Selulase dari Rumen Sapi (*Bibos javanicus*). *Journal of Science, Technology, and Entrepreneurship*. **3**(1): 1–7.
- Suryanto, H. 2017. Analisis Struktur Serat Selulosa dari Bakteri. In *Seminar Nasional Teknologi Terapan (MESIN)*. **3**(1). 17-22.
- Taherzadeh, M. J. and Karimi, K. 2007. Pretreatment Of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. *International Journal of Molecular Science*. **9**(9). 1621-1651.
- Tan, H. T., Lee, K. T., & Mohamed, A. R. 2010. Second-generation bio-ethanol (SGB) from Malaysian palm empty fruit bunch: Energy and exergy analyses. *Bioresource Technology*. **101**(14): 5719–5727.
- Tan, I.S., Lam, M.K., Foo, H.C.Y., Lim, S., and Lee, K.T. 2020. Advances of Wahono SK, Darsih C, Rosyida VT, Maryana R, Pratiwi D. Optimization of cellulose enzyme in the simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresource Technology*. **101**: 57-59.
- Trisakti, B., Yustina, Br. S., Irvan. 2015. Pembuatan Bioetanol Dari Tepung Ampas Tebu Melalui Proses Hidrolisis Termal Dan Fermentasi Serta Recycle Vinasse (Pengaruh Konsentrasi Tepung Ampas Tebu, Suhu Dan Waktu Hidrolisis). *Jurnal Teknik Kimia*. **4**(3). 17-22.
- T. Tsoutsos, D. Bethanis, and V. Gekas. 2007. *Simulation of Fermentable Sugar Production*. Cellulose.

- Wayan, G.I.B., Made, W.N., Dewi, A.A.A.M., dan Made, S.P. 2011. Delignifikasi Ampas Tebu dengan Larutan Natrium Hidroksida Sebelum Proses Sakarifikasi Secara Enzimatis Menggunakan Enzim Selulase Kasar dari *Aspergillus niger* FNU 6018. *Teknologi*. **34**: 1–9.
- Zhang, M., Xie, L., Yin, Z., Khanal, S.K., and Zhou, Q. 2016. Biorefinery approach for cassava-based industrial wastes: Current status and opportunities. *Bioresource Technology*. **215**: 50–62.