



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### II.1 Bioetanol

Bioetanol adalah etanol yang diproduksi menggunakan biomassa yang mengandung gula, pati atau selulosa. Etanol umumnya digunakan sebagai kombinasi untuk minuman keras, misalnya, sake atau gin, bahan baku industri turunan alkohol, serta komponen obat dan kosmetika. Terdapat tiga tingkat etanol berdasarkan kandungan alkohol, yang pertama adalah grade industri dengan kandungan alkohol 90-94%, yang kedua adalah grade netral dengan kandungan alkohol 96-99,5% yang digunakan untuk komponen alkohol atau bahan baku obat, dan fuel grade dengan kandungan alkohol di atas 99,5 – 100% (Hendrawati, 2019). Dalam pembuatan bioetanol, bahan baku yang dapat digunakan dibagi menjadi tiga kelompok, yaitu:

1. Gula sederhana yang diperoleh dari gula tebu, pemanis mentah, dan molase
2. Pati berasal dari *custard* (maizena), kentang, biji-bijian, dan lain sebagainya.
3. Selulosa diperoleh dari kayu, limbah kertas dan beberapa limbah hortikultura

(Demirbas, 2005)

Suatu bahan dapat difermentasi secara langsung apabila bahan tersebut mengandung monosakarida, namun apabila suatu bahan yang mengandung disakarida, pati maupun karbohidrat kompleks harus melalui tahap hidrolisis terlebih dahulu agar menjadi komponen yang lebih sederhana yaitu monosakarida. Maka dari itu, untuk mendapatkan hasil yang optimum pada tahap fermentasi sebaiknya bahan-bahan yang akan digunakan harus melalui *pretreatment* sebelum memasuki sistem fermentasi (Budiyanto, 2002). Berdasarkan SNI mengenai densitas, viskositas serta kadar etanol yang dihasilkan pada percobaan harus memenuhi SNI untuk dapat didistribusikan. Nilai densitas, viskositas serta kadar



etanol yang sesuai SNI berturut-turut sebesar 0,7851 gr/mL, 0,0122 poise, 94 % (Donuata, 2019).

## II.2 Jenis-Jenis Bioetanol

### 1. Bioetanol Generasi Pertama (G1)

Bioetanol yang dikategorikan menjadi Generasi Pertama (G1) merupakan bioetanol yang dibuat dari pati kemudian dilanjutkan dengan proses fermentasi dengan bahan yang mengandung glukosa. Urutan proses pembuatan bioetanol G1 yakni persiapan bahan baku, pemisahan pati dari serat, hidrolisis pati menjadi glukosa, fermentasi glukosa menjadi alkohol, proses distilasi dan dehidarasi sehingga dihasilkan etanol untuk bahan bakar. Pembuatan bioetanol generasi pertama akhir-akhir ini banyak digunakan kembali karena dapat menaikkan harga komoditi pangan.

### 2. Bioetanol Generasi Kedua (G2)

Bioetanol yang dikategorikan sebagai generasi kedua (G2) ialah bioethanol yang dibuat dari komponen biomassa seperti selulosa dan hemiselulosa, sehingga bioethanol generasi kedua ini sering disebut etanol selulosa. Biokonversi dari komponen lignoselulosa menjadi etanol dihambat oleh struktur dan kompleksitas senyawa kimia biomassa itu sendiri. Agar biomassa dapat dimanfaatkan, matrix biomassa yang terdiri dari lignin, hemiselulosa dan selulosa harus dipecah dan komponen dipisahkan. Selulosa serta hemiselulosa dikonversi menjadi senyawa gula yang dapat difermentasi agar menghasilkan produk akhir berupa etanol, sedangkan lignin yang jumlahnya cukup besar relatif sulit dihancurkan.

### 3. Bioetanol Generasi Ketiga (G3)

Bioetanol yang dikategorikan sebagai generasi ketiga (G3) merupakan bioethanol yang terbuat dari alga, baik mikro maupun makro alga sehingga sering disebut sebagai etanol alga. Secara garis besar, alga bisa mengandung hingga 50 % (dari berat sel kering) karbohidrat atau 25-77 % asam lemak dan sejumlah protein. Pembuatan bioetanol dari alga

dilakukan melalui dua pendekatan yakni yang pertama, pertumbuhan alga dilakukan didalam fotobioreaktor melalui proses fotosintesis dengan memanfaatkan CO<sub>2</sub>, sinar matahari dan nutrient lain sehingga menghasilkan etanol. Pendekatan kedua yaitu memanfaatkan masa mikroalga itu sendiri sebagai bahan baku untuk menghasilkan etanol.

#### 4. Bioetanol Generasi Keempat(G4) atau *Advanced Biofuel*

Bioetanol yang dikategorikan sebagai generasi keempat (G4) merupakan bioetanol yang dihasilkan melalui biomassa yang telah mengalami modifikasi genetika (GMO), dimana didalam matrix biomassa itu sendiri (*autohydrolysis*) sehingga akan mempermudah proses *pretreatment* (Aiman, 2014).

### II.3 Jenis-Jenis Millet

Salah satu bahan dasar untuk membuat bioethanol yang sangat bagus adalah millet. Ada 3 macam millet, yaitu proso millet (*Panicum miliaceum*), pearl millet (*Pennisetum glaucum*), dan foxtail millet (*Setaria italica*).

#### 1. Proso millet (*Panicum miliaceum*)

Proso millet atau sering disebut sebagai millet putih adalah tanaman serelia ekonomi keempat setelah beras, gandum dan jagung. Kandungan karbohidrat dan protein dalam biji millet putih tidak kalah dengan padi. Kandungan zat gizi tepung millet putih secara terpisah adalah air, abu, lemak, protein, pati, karbohidrat dan serat kasar sebesar 9,19%, 1,80%, 2,58%, 11,29%, 56,53%, 74,52% dan 2,01% (Anandito, 2016).



Gambar II.1 Proso Millet (*Panicum miliaceum*)

(Crown, 2020)

## 2. Pearl millet (*Pennisetum glaucum*)

Bagi masyarakat di negara dunia ketiga, terutama di Afrika dan Asia, Pearl millet (*Pennisetum glaucum*) merupakan sumber makanan yang penting untuk tubuh, dimana dapat memberikan keamanan nutrisi. Pearl millet juga digunakan sebagai sumber mikronutrien yang sangat baik seperti besi dan zinc. Biasanya pearl millet dikonsumsi dalam bentuk bola besar yang digulung dengan tepung atau difermentasi menjadi minuman. Kandungan protein dalam pearl millet berkisar antara 9-21 % dimana sebanding dengan gandum (11,8 g/100g) tetapi lebih tinggi dibandingkan dalam sorgum (10,4g/100g), beras (6,8g/100g) dan jagung (4,7g/100g). Pearl millet juga kaya akan kandungan lemak (5-7 g/100 g) daripada beras, jagung, gandum dan sorgum. Selain itu, sekitar 70 % dari biji-bijian kering juga mengandung karbohidrat yang terdiri dari 56-65 % pati dimana 20-22 % adalah amilosa (Krishnan, 2018).



Gambar II.2 Pearl Millet (*Pennisetum glaucum*)

(Halstead, 2018)

## 3. Foxtail millet (*Setaria italica*)

Foxtail millet (*Setaria italica*) atau yang sering disebut orang Indonesia sebagai biji-bijian adalah tanaman lahan kering yang cocok untuk lahan kecil dan menghasilkan 3-4 ton/hektar. Jewawut adalah sejenis sereal yang dibudidayakan kecil dengan zat gizi yang sebanding dengan tanaman pangan yang penting. Kandungan karbohidrat dari millet foxtail adalah 84,2%, yang hampir identik dengan beras, yaitu 87,7% dalam 100 g (Anandito, 2016).



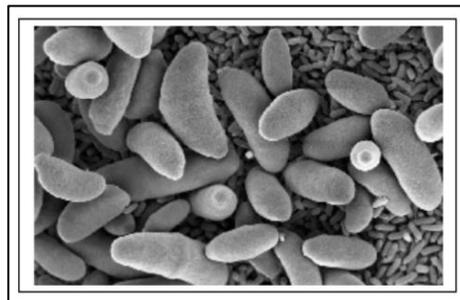
Gambar II.3 Foxtail millet (*Setaria italica*)

(Saraswathi, 2018)

#### II.4 *Zymomonas Mobilis*

*Zymomonas mobilis* tergolong dalam mikroba gram negatif dengan sifat anaerobik fakultatif. *Zymomonas mobilis* memiliki bentuk seperti tangkai dengan lebar 1,0-2,0 nm dan panjang 2,0-6,0 nm dan umumnya berpasangan. Mikroba ini memiliki kecepatan pengambilan glukosa dan pembuatan etanol yang lebih tinggi melalui Entner-Doudoroff dalam keadaan anaerob (Cazetta, 2007).

Spesies *Zymomonas mobilis* termasuk kelompok bakteri dalam divisi *proteobacteria* dari kelas *alpha probacteria*, ordo *sphingomonadales*, famili *sphingomonadaceae* dan genus *zymomonas*. Genus *Zymomonas* memiliki satu spesies dengan dua subspecies, yaitu *Z. Mobilis* subsp.*mobilis* dan *Z. Mobilis* subsp.*pomaceae*.. Berikut adalah bentuk dari bakteri *Zymomonas mobilis* :



Gambar II.4 Bentuk Bakteri *Zymomonas mobilis* Melalui Mikroskop Elektron

*Zymomonas mobilis* adalah mikroorganisme yang memiliki sifat yang dapat menghasilkan etanol secara produktif. *Z. Mobilis* memiliki waktu fermentasi 3-4 kali lebih cepat daripada ragi dan kemampuan mengubah glukosa menjadi etanol meningkat dari 90-95%. Mikroorganisme ini dapat menghasilkan etanol mencapai 92-94% sedangkan ragi/khamir sekitar 88-90%. Dapat juga dikatakan bahwa



organisme mikroskopis ini bagaimanapun juga dapat menghasilkan etanol dengan baik (Tao, 2005). Organisme mikroskopis ini toleran terhadap konsentrasi substrat tinggi hingga 30% glukosa. Organisme mikroskopis ini memiliki suhu ideal 25-30°C, dan toleran terhadap suhu tinggi hingga 40 ° C (Hanidah, 2016). Koloni ini akan mengkilat, putih atau krem dalam variasi dan lebar 1-2 mm setelah 2 hari pada suhu 30°C (Kurniasari, 2011).

## II.5 Hidrolisa

Hidrolisis adalah interaksi antara reaktan dan air sehingga suatu senyawa pecah atau hancur. Reaksi ini merupakan reaksi orde pertama karena air yang digunakan berlebih, sehingga penyesuaian reaktan dapat diabaikan. Berikut macam-macam hidrolisa, yaitu :

1. Hidrolisis murni

Hidrolisis ini hanya menggunakan air sebagai reaktan. Kekurangan dari hidrolisis ini adalah interaksinya lambat dan hasilnya buruk. Biasanya ditambahkan katalisator dalam industri. Umumnya yang menjadi katalis adalah termasuk industri. Untuk mempercepat reaksi, digunakan *steam* pada temperatur tinggi.

2. Hidrolisis dengan katalis larutan asam

Hidrolisis semacam ini dapat menggunakan asam encer atau pekat. Asam sebagai katalis dengan memberlakukan air dari asam yang melemah. Dalam industri, asam yang biasa digunakan adalah H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dan HCl. Hidrolisis menggunakan katalis asam, kecepatan reaksinya kurang kuat dan hasilnya buruk jika digunakan pada konsentrasi tinggi.

3. Hidrolisis dengan katalis larutan basa

Hidrolisis ini biasanya menggunakan basa lemah, basa pekat, dan basa kuat. Reaksi yang terjadi dengan basa kuat setara dengan reaksi dengan basa cair. Hidrolisis dengan menggunakan katalis larutan basa lebih sempurna atau lebih reaktif, tetapi hanya digunakan untuk tujuan tertentu, misalnya, cara paling umum untuk peleburan benzena menjadi fenol.

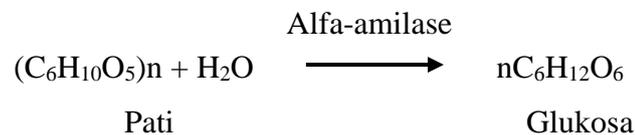


#### 4. Hidrolisis katalis enzim

Zat yang dibawa oleh mikroorganisme biasanya digunakan dalam hidrolisis ini (Susanti, 2013). Hidrolisis dengan enzim memiliki beberapa manfaat, khususnya kondisi proses dapat dikendalikan, biaya pemurnian lebih murah, produk samping yang dihasilkan lebih sedikit (Triyono, 2010). Selain itu, kondisi proses lebih ringan (suhu rendah dan pH netral) dan tidak ada penurunan kadar gula yang terjadi karena hidrolisis (Fatimah, 2017). Proses hidrolisis katalis dibagi menjadi 2 fase, yaitu:

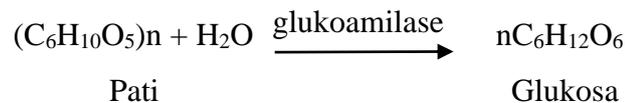
##### a. Tahap Likuifikasi

Tahap Likuifikasi adalah tahap pencampuran larutan pati dengan protein  $\alpha$ -amilase menjadi partikel yang lebih sederhana seperti maltosa, glukosa dan dekstrin. Tahap likuifikasi dapat diselesaikan pada suhu  $105^{\circ}\text{C}$ , pH 6 selama 5 menit atau pada suhu  $90-97^{\circ}\text{C}$ , pH 6 selama 1-3 jam. Tahap likuifikasi menggunakan enzim  $\alpha$ -amilase terbaik pada konsentrasi 0,045% (b/b) selama 90 menit dengan kadar gula pereduksi 24,64% dan DE sebesar 91,80. Reaksi yang terjadi :



##### b. Tahap Sakarifikasi

Tahap sakarifikasi merupakan tahap pencampuran larutan pati dengan enzim glukoamilase untuk menghasilkan glukosa. Tahap sakarifikasi dilakukan selama 72 jam dengan pH 4-4,6. Tahap sakarifikasi menggunakan senyawa dekstroyme (kombinasi glukoamilase dan pullulanase) paling baik pada konsentrasi 0,08% (b/b) dan waktu hidrolisis 24 jam dengan kadar gula menurun 24,88% dan nilai DE 92,14. Reaksi yang terjadi:



(Sulastriani, 2017)



## II.6 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Hidrolisis

Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi proses hidrolisis adalah sebagai berikut :

### 1. Kandungan Karbohidrat Bahan Baku

Kandungan karbohidrat dalam bahan baku sangat mempengaruhi hasil hidrolisis. Jika kandungan patinya sedikit, maka karbohidrat yang dihasilkan juga sedikit, begitu juga sebaliknya. Kandungan karbohidrat yang terlalu tinggi, maka kekentalan hasil hidrolisis akan bertambah, sehingga frekuensi tumbukan antar molekul karbohidrat dan partikel air berkurang maka berkurangnya kecepatan reaksi untuk pembentukan glukosa (Osvaldo, 2012). Banyaknya bahan baku yang digunakan dengan volume pelarut adalah 1:5. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Putra (2017) dengan perbandingan bahan baku tepung jowawut dengan volume aquadest 1:5 didapatkan kadar glukosa setelah proses likuifikasi sebesar 50,2610%.

### 2. pH Hidrolisis

pH berpengaruh terhadap jumlah produk hidrolisa. pH berkaitan erat dengan efektifitas kerja enzim. Pada umumnya, pH optimum hidrolisis adalah 5,6-6,0. Semakin rendah pH maka kerja enzim akan lambat sehingga proses hidrolisa berlangsung lama dan kadar glukosa yang dihasilkan sedikit. Pada penelitian yang dilakukan oleh Sulastriani (2017) dengan pH 6, suhu inkubasi 60°C didapatkan kadar gula reduksi sebesar 28,47% sedangkan pada suhu inkubasi 70°C gula reduksi yang dihasilkan sebesar 31,3%.

### 3. Waktu Hidrolisis

Waktu yang digunakan untuk interaksi hidrolisis adalah sekitar 1 sampai 3 jam. Semakin lama waktu hidrolisis, semakin tinggi kadar glukosa yang diberikan. Hal ini dikarenakan semakin lama waktu hidrolisis maka semakin ideal kontak antara pati dan reaktan, sehingga dihasilkan kadar glukosa yang besar. Apabila melampaui waktu ideal, terbentuknya inhibitor



pada glukosa sehingga kadar glukosa yang dihasilkan akan lebih kecil (Fachry, 2013).

#### 4. Suhu

Suhu ideal untuk hidrolisis dengan katalis alfa-amilase adalah 90-105 °C. Suhu yang lebih tinggi dari keadaan ideal akan menghambat dan merusak enzim, sedangkan suhu yang terlalu rendah dari keadaan ideal akan menyebabkan gelatinisasi pati yang terjadi tidak sempurna sehingga akan memperlambat hidrolisis.

## II.7 Enzim

Enzim adalah biomolekul yang memiliki kemampuan sebagai katalis (senyawa yang mempercepat proses reaksi tanpa habis bereaksi) dalam reaksi kimia. Senyawa bekerja dengan menempel pada lapisan luar partikel zat yang merespons, sehingga mempercepat reaksi. Proses peningkatan kecepatan terjadi karena senyawa tersebut menurunkan energi pengaktifan yang akan membentuk reaksi. Sebagian besar katalis bekerja dengan sangat baik, menyiratkan bahwa setiap jenis protein dapat menangani satu jenis reaksi senyawa atau zat. Ini dikarenakan perbedaan struktur kimia pada setiap enzim yang bersifat tetap. Misalnya, bahan kimia alfa-amilase harus digunakan selama waktu yang dihabiskan untuk memisahkan pati menjadi glukosa. Berikut adalah beberapa macam protein penghidrolisis pati:

#### 1. Enzim $\alpha$ -amilase

Katalis  $\alpha$ -amilase ( *$\alpha$ -1,4-glucan 4-glucanohydrolase*) adalah endoenzim yang menghidrolisis  $\alpha$ -(1,4)- ikatan glikosida dari dalam secara acak baik pada amilosa maupun amilopektin. Enzim  $\alpha$ -amilase disebut juga  *$\alpha$ -retaining double displacement*. Enzim  $\alpha$ -amilase dibagi menjadi dua kelompok, menjadi termotabil spesifik (aman terhadap panas) dan termolabil (tidak aman terhadap panas). Enzim  $\alpha$ -amilase termotabil dapat diperoleh dari *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, dan *Bacillus amyloliquefaciens*. Untuk yang termolabil diperoleh dari jamur, misalnya



*Aspergillus oryzae* dan *Aspergillus niger*. Enzim alfa-amilase dapat bekerja pada suhu hingga 105-110°C dengan cakupan pH 5,1-5,6 selama 60-180 menit. Enzim alfa-amilase memiliki keadaan ideal pada suhu 90-105°C dengan pH 5,6-6,0.

2. Enzim glukoamilase

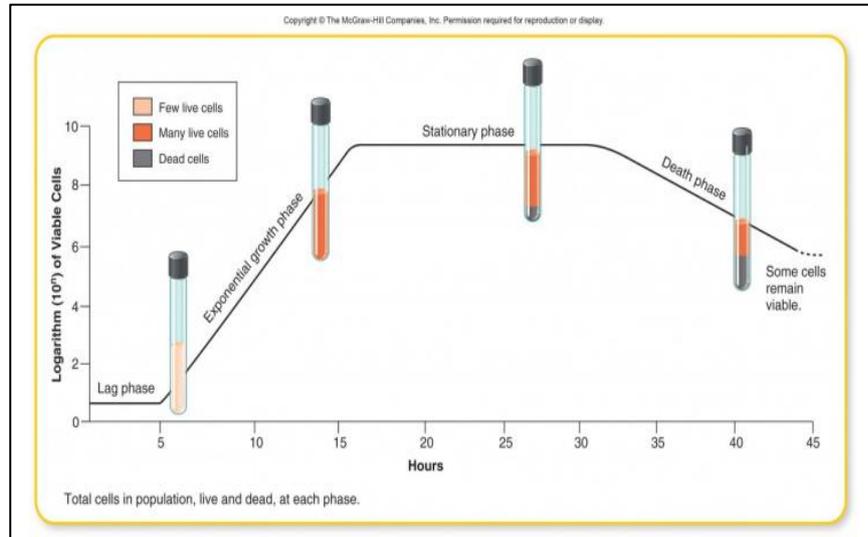
Glukoamilase disebut juga amiloglukosidase atau  $\alpha$ -(1,4)- D-glukan glukohidrolase. Glukoamilase dapat diperoleh dari jamur: *Aspergillus spp*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus niveus*, dari yeast :*Saccharomycopsis fibuligera*, *Saccharomyces diasticus*, dan dari bakteri : *Clostridium acetobutylicum*.. Glukoamilase yang diperoleh dari *Aspergillus awanori* dan *Aspergillus niger* bersifat termostabil dan memiliki kisaran pH yang lebih ideal. Kedua mikroorganisme ini sekarang banyak digunakan untuk sakarifikasi pati. Glukoamilase murni umumnya digunakan untuk pembuatan sirup glukosa dari maltodekstrin yang dibuat oleh  $\alpha$ -amilase dari pemurnian pati. Enzim glukoamilase berada pada kondisi ideal yaitu pada suhu 40-60°C, pH ideal 4,5 dan waktu hidrolisis sekitar 48-96 jam.

3. Enzim pullulanase

Pullulanase (*pullulan 6-glucanohydrolase*) adalah eksoenzim yang mengkatalisis hidrolisis  $\alpha$ -1,6-linker pullulan dan polisakarida yang berbeda untuk menghasilkan maltotriosa sebagai hasil akhir. Pullulanase dengan  $\alpha$ -amilase dapat bersinergi untuk menghasilkan potongan partikel gula yang ideal. Pullulanase adalah protein monomer dengan massa sub-atom dalam lingkup 60-140 kDa. Katalis ini dapat didapatkan dalam ekstrak beras dan kacang-kacangan. Selain dari tumbuhan, pullulanase dapat dihasilkan dari mikroba mesofilik, misalnya *Klebsiella*, *Escherichia coli*, *Streptococcus*, *Bacillus*, dan *Streptomyces*. Pullulanase yang dibuat oleh mikroorganisme mesofilik adalah senyawa yang tidak tahan terhadap suhu tinggi. Suhu yang diinginkan terbesar adalah 60°C. Apabila suhu yang digunakan lebih dari suhu maksimum maka enzim akan terdenaturasi.

(Rahmawati, 2015)

## II.8 Pertumbuhan Bakteri



Gambar II.5 Kurva Pertumbuhan Bakteri

Siklus pertumbuhan bakteri mengalami 4 fase yaitu :

- Fase Lag : pada fase ini bakteri tidak akan segera membelah diri tetapi mengalami periode adaptasi, dengan sejumlah aktivitas metabolic.
- Fase Log (Logaritme, eksponensial) : pada saat ini terjadi pembelahan sel yang amat cepat, yang ditentukan oleh kondisi lingkungan.
- Fase Stasioner : fase ini dialami ketika jumlah nutrisi menurun dengan cepat atau terbentuknya produk-produk racun yang dapat menyebabkan pertumbuhan melambat hingga jumlah sel baru yang dihasilkan seimbang dengan jumlah sel yang mati. Pada saat ini bakteri mencapai kepadatan sel maksimal.
- Fase Penurunan atau Fase kematian : yang ditandai dengan menurunnya jumlah bakteri hidup.

(Putri, 2017)

## II.9 Landasan Teori

### II.9.1 Fermentasi

Fermentasi adalah suatu cara untuk memberikan energi dalam sel dalam keadaan anaerobik (tanpa oksigen). Fermentasi alkohol adalah cara untuk



memisahkan gula menjadi etanol dan karbon dioksida (CO<sub>2</sub>) yang dihasilkan oleh aktivitas sejenis mikroorganisme yang disebut ragi dalam keadaan anaerob. Fermentasi adalah reaksi oksidasi-reduksi dalam ilmu pengetahuan yang menghasilkan energi di mana kontributor elektron dan akseptor adalah senyawa organik. Senyawa organik yang biasa digunakan adalah gula. Senyawa-senyawa ini akan diubah melalui reaksi reduksi dengan biokatalis (protein) menjadi campuran yang berbeda, seperti aldehida dan kemudian dapat dioksidasi menjadi asam. Katalis ini dihasilkan oleh pergerakan sel mikroba (Osvaldo, 2012).

### **II.9.2 Proses Pembuatan Bioetanol**

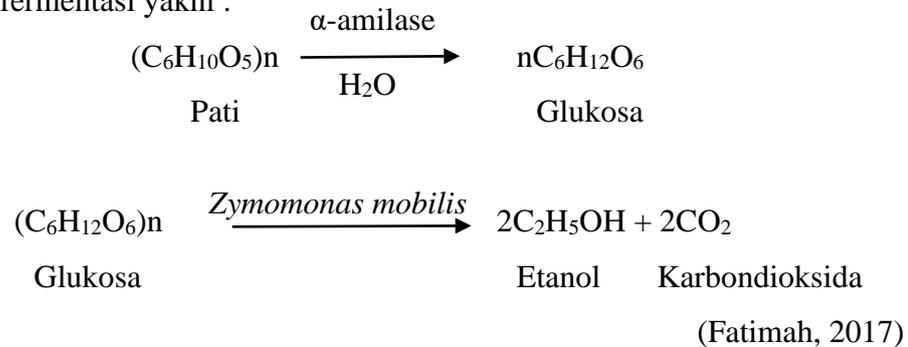
Metode yang terlibat dalam pembuatan bioetanol terdiri dari tiga fase, yaitu hidrolisis, fermentasi dan distilasi. Yang pertama adalah proses hidrolisis, yaitu proses untuk mengubah pati menjadi glukosa. Dalam prosesnya memanfaatkan tahap likuifikasi dengan Enzim  $\alpha$ -amilase. Enzim  $\alpha$ -amilase memutuskan  $\alpha$ -(1,4)glikosidik secara acak di bagian dalam substrat dan menghasilkan penurunan gula dan dekstrin dengan jumlah rantai glukosa yang sederhana. Proses selanjutnya adalah tahap fermentasi yang bertujuan untuk mengubah glukosa (gula) menjadi etanol dan CO<sub>2</sub> dengan mencampurkan *Zymomonas mobilis* ke dalam susunan etanol pada suhu kamar. Proses terakhir adalah distilasi. Sistem distilasi dilakukan untuk memisahkan alkohol dengan pemanasan pada suhu 78°C dan akan menguap melalui kondensor (Fatimah, 2017). Diketahui bahwa titik didih etanol murni adalah 78°C. Pada suhu ini etanol akan menghilang atau menguap, namun air tidak akan menguap. Uap etanol dialirkan ke distilator dan bioetanol akan keluar dari pipa pengeluaran sebagai destilat (Donuata, 2019).

### **II.9.3 Reaksi yang Terjadi**

Proses fermentasi yang terjadi melibatkan reaksi kimia oleh mikroorganisme, salah satunya yaitu *Zymomonas mobilis*. *Zymomonas mobilis* merupakan jamur dan bakteri yang dapat menghasilkan etanol. *Zymomonas mobilis*



dapat mengubah glukosa, sukrosa dan fruktosa menjadi etanol. Reaksi yang terjadi pada proses fermentasi yakni :



#### II.9.4 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Fermentasi

##### 1. Jumlah Mikroorganisme

Jumlah mikroorganisme yang digunakan merupakan penentu keberhasilan suatu fermentasi. Semakin banyak jumlah mikroorganisme yang ditambahkan pada hasil hidrolisis maka semakin tinggi bioetanol yang dihasilkan. Konsentrasi mikroorganisme yang digunakan tidak lebih dari 20 % (v/v). Hal tersebut dapat menyebabkan penurunan produksi bioetanol karena jumlah sel yang besar menjelang awal fermentasi menyebabkan persaingan substrat untuk pengembangan sel dengan tujuan bahwa jumlah karbon yang dapat diakses untuk perubahan menjadi etanol lebih sedikit.

##### 2. Waktu Fermentasi

Waktu yang ideal untuk melakukan fermentasi adalah 7 hari untuk mendapatkan hasil fermentasi yang luar biasa. Fermentasi berlangsung dua hingga tiga minggu dan digambarkan oleh tidak adanya CO<sub>2</sub>. Rentang fermentasi terkait erat dengan jumlah mikroorganisme dan kandungan etanol yang dihasilkan. Semakin lama waktu fermentasi, nutrisi dalam medium akan semakin berkurang karena jumlah sel yang semakin banyak membuat mikroorganisme memasuki tahap kematian. Hasil metabolisme mikroorganisme dapat menghambat pembelahan sel dan proses fermentasi yang dapat menyebabkan jumlah etanol sedikit. Menurut Kusumaningati (2013) dalam penelitiannya dengan variabel pengelompokan



## Laporan Hasil Penelitian “Pembuatan Bioetanol Dari Fermentasi Biji Proso Millet (*Panicum mileaceum*) Menggunakan *Zymomonas mobilis*”

---

mikroorganisme (0; 5; 10; dan 15%) dan waktu fermentasi (0, 2, 4, 6, 8 hari) didapatkan hasil kadar bioetanol semakin meningkat. Kadar bioetanol tertinggi pada konsentrasi inokulum 10% dengan umur 6 hari, yaitu sebesar 9,50% (v/v).

### 3. Derajat Keasaman (pH)

Secara umum, pertumbuhan optimum mikroba *Zymomonas mobilis* berada pada kisaran pH 5,6-7,5. Untuk mengubah pH agar berada pada kondisi optimum, NaOH dapat digunakan untuk menaikkan dan asam nitrat untuk menurunkan pH.. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Ernes (2014) mengatakan bahwa setelah proses inokulasi dengan penambahan konsentrasi inokulum 15 %, pH media turun menjadi sekitar 6 dari kondisi pH awal yaitu 7. Hal tersebut terjadi karena dihasilkan produk samping berupa asam laktat dan asam format sebagai hasil pemecahan piruvat sehingga menyebabkan penurunan pH selama proses fermentasi berlangsung. Oleh sebab itu, semakin tinggi nilai pH semakin kecil hasil samping yang dihasilkan sehingga kadar bioetanol yang didapatkan semakin tinggi.

### 4. Kadar Gula

Kadar gula optimum pada proses fermentasi menggunakan bakteri *Zymomonas mobilis* berkisar antara 10 – 18 %. Kadar gula yang terdapat selama proses fermentasi akan mempengaruhi kadar bioetanol yang didapatkan. Semakin cepat proses fermentasi berlangsung maka semakin tinggi kadar glukosa yang terdapat pada proses fermentasi sehingga semakin tinggi kadar bioetanol yang dihasilkan. Pada penelitian yang dilakukan oleh Ernes (2014) menyatakan bahwa terjadi penurunan glukosa dari 15% menjadi 4% pada jam ke-24. Hal ini terjadi karena tingkat konsumsi glukosa oleh bakteri *Zymomonas mobilis* relative cepat. Sehingga kadar bioetanol yang dihasilkan semakin rendah.



## 5. Suhu

Suhu optimum yang dapat dilakukan proses fermentasi dengan menggunakan bakteri *Zymomonas mobilis* adalah 25-30°C. Dari penelitian yang dilakukan oleh Septiani (2020) pada suhu 30°C dan pH 6 didapatkan kadar etanol tertinggi pada waktu fermentasi 7 hari yakni 64,32% (v/v). Berdasarkan penelitian tersebut, semakin tinggi suhu pada proses fermentasi, maka semakin cepat proses fermentasi berlangsung sehingga menyebabkan kadar bioetanol yang dihasilkan semakin tinggi.

### II.10 Hipotesis

Pada penelitian ini, diharapkan biji proso millet dapat diolah menjadi bioetanol. Semakin lama waktu fermentasi dan semakin tinggi konsentrasi *Zymomonas mobilis* maka kadar bioetanol yang dihasilkan semakin tinggi.