

**PENGARUH VARIASI JUMLAH RAGI ROTI (*Saccharomyces cerevisiae*)
DAN LAMA FERMENTASI KERTAS HVS BEKAS PAKAI TERHADAP
KADAR ETANOL**

SKRIPSI

Oleh:
MUHAMMAD NABIL AL MUNTAZHOR
NIM. 15620062



**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2020**

**PENGARUH VARIASI JUMLAH RAGI ROTI (*Saccharomyces cerevisiae*)
DAN LAMA FERMENTASI KERTAS HVS BEKAS PAKAI TERHADAP
KADAR ETANOL**

SKRIPSI

**Oleh:
MUHAMMAD NABIL AL MUNTAZHOR
NIM. 15620062**

**Diajukan kepada:
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)**

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2020**

**PENGARUH VARIASI JUMLAH RAGI ROTI (*Saccharomyces cerevisiae*)
DAN LAMA FERMENTASI KERTAS HVS BEKAS PAKAI TERHADAP
KADAR ETANOL**

SKRIPSI

Oleh:
MUHAMMAD NABIL AL MUNTAZHOR
NIM. 15620062

Telah diperiksa dan disetujui untuk diuji:
Tanggal 27 November 2020

Dosen Pembimbing I



Ir. Liliek Harianie A.R., M.P.
NIP. 19620901 199803 2 001

Dosen Pembimbing II



Dr. Ahmad Barizi, MA
NIP. 19731212 199803 1 008

Mengetahui
Ketua Program Studi Biologi



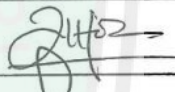
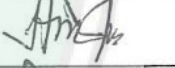
Dr. Evika Sandi Savitri, M.P.
NIP. 19741018 200312 2 002

**PENGARUH VARIASI JUMLAH RAGI ROTI (*Saccharomyces cerevisiae*)
DAN LAMA FERMENTASI KERTAS HVS BEKAS PAKAI TERHADAP
KADAR ETANOL**

SKRIPSI

Oleh:
MUHAMMAD NABIL AL MUNTAZHOR
NIM. 15620062

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S. Si)
Tanggal 08 Desember 2020

Penguji Utama	<u>Dr. Hj. Ulfah Utami, M.Si</u> NIP. 19650509 199903 2 002	()
Ketua Penguji	<u>Prilya Dewi Fitriasari, M.Sc</u> NIP. 19900428 20160801 2 062	()
Sekretaris Penguji	<u>Ir. Liliek Harianie A.R., M.P.</u> NIP. 19620901 199803 2 001	()
Anggota Penguji	<u>Dr. Ahmad Barizi, M.A</u> NIP. 19731212 199803 1 008	()

Mengetahui dan Mengesahkan
Ketua Program Studi Biologi



Dr. Evika Sandi Savitri, M.P
NIP. 19741018 200312 2 002

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Muhammad Nabil Al Muntazhor

NIM : 15620062

Program Studi : Biologi

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Skripsi : Pengaruh Variasi Jumlah Ragi Roti (*Saccharomyces cerevisiae*)
dan Lama Fermentasi Kertas HVS Bekas Pakai terhadap Kadar
Etanol

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambil alihan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 23 Desember 2020

Yang membuat pernyataan



Muhammad Nabil Al Muntazhor
NIM. 15620062

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.



MOTTO

*“Menjadi Mata Air, Yang Terus Mengalir
Selalu Memberi, Karya Terbaik Bagi Bangsa
Menjadi Mata Air, Ciptakan Kedamaian
Menjawab Tantangan, Arah Tujuan Masa Depan”*

INDONESIA

ادْفِنِ وُجُودَكَ فِي أَرْضِ الْحُمُولِ، فَمَا نَبَتَ مِمَّا لَمْ يُدْفَنْ لَا يَتِمُّ نَتَاءُ جُهِ

*“Tanamlah wujudmu dalam bumi ketidakterkenalan, karena sesuatu yang tumbuh dari apa yang tidak ditanam, hasilnya tidaklah sempurna”
-Kitab Al-Hikam, Ibnu Athaillah As-Sakandari-*

Menjadi Orang Besar

Hanya Orang Yang Berjiwa Besar, Yang Bisa Menjadi Orang Besar

Hanya Mereka Yang Meneladani dari Orang Besar, Yang Akhirnya Menjadi Orang Besar

Hanya Mereka Yang Mempunyai Ide Besar, Yang Akhirnya Menjadi Orang Besar

Dan Hanya Yang Bertawakkal pada Dzat Yang Maha Besar, Yang Akhirnya Menjadi Orang Besar

Romo KH. Marzuki Mustamar

HALAMAN PERSEMBAHAN

Sebuah Karya Kecil nan Sederhana ini kupersembahkan untuk

Keluarga tercinta Bapak Harun dan Ibu Siti Qomariyah atas segala support dan dukungan yang tak kenal lelah guna mengantarkan putramu ini menjadi insan yang berilmu dan berakhlak mulia

Adikku tersayang ananda Isyti Munjidah yang telah menjadi penyemangat dan inspirasiku selama ini

Mohon maaf apabila selama ini belum bisa memberikan yang terbaik untuk keluarga



KATA PENGANTAR

Assalamualaikum Wr. Wb.

Syukur Alhamdulillah penulis panjatkan pada Allah SWT atas segala limpahan rahmat, taufiq serta hidayahnya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Pengaruh Variasi Jumlah Ragi Roti (*Saccharomyces cerevisiae*) dan Lama Fermentasi Kertas HVS Bekas Pakai terhadap Kadar Etanol”** ini dengan baik. Selanjutnya shalawat serta salam semoga tetap terlimpahkan pada junjungan kita Nabi Agung Muhammad SAW beserta keluarganya serta para sahabatnya. Semoga kelak kita mendapatkan syafaatnya di hari kiamat nanti, Aamiin.

Tak lupa pula penulis mengucapkan rasa terima kasih yang mendalam pada berbagai pihak yang telah membantu penulis baik secara langsung maupun tidak langsung guna terselesaikannya penulisan skripsi ini. Ucapan terima kasih yang mendalam penulis sampaikan pada:

1. Bapak Prof. Dr. Abdul Haris M.Ag selaku rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
2. Ibu Dr. Sri Harini M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
3. Ibu Dr. Evika Sandi Savitri M.P selaku Ketua Program Studi Biologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
4. Ibu Ir. Liliek Harianie AR M.P dan Bapak Dr. Ahmad Barizi M.A selaku dosen pembimbing skripsi yang telah banyak meluangkan waktu, kesabaran, kesungguhan, serta berbagai saran dan arahan untuk saya selama ini
5. Ibu Dr. Hj. Ulfah Utami M.Si dan Ibu Prilya Dewi Fitriarsari M.Sc selaku dosen penguji yang telah memberikan banyak masukan dan saran dalam penulisan skripsi saya ini
6. Segenap dosen, laboran dan staff administrasi jurusan Biologi yang telah banyak membantu dan memberikan kemudahan dalam proses penyelesaian skripsi
7. Keluarga besar tercinta Bapak Harun dan Ibu Siti Qomariyah serta adikku Isyti Munjidah yang selalu setia memberikan semangat, motivasi, dukungan moril dan materil serta doa yang tulus sehingga penulisan skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik
8. Seluruh teman-teman Biologi angkatan 2015 (Genetist) dan khususnya keluarga besar POBIA yang telah berbagi kebersamaan, baik dalam keadaan suka maupun duka selama ini hingga akhirnya kita selesai menjalani pendidikan kita di Jurusan Biologi ini
9. Seluruh keluarga besar Pondok Pesantren Sabilurrosyad Gasek Malang, beserta para asatidz wa bil khusus pengasuh Romo KH. Marzuki Mustamar, Umik Saidah Mustaghfiroh, Alm. Romo KH. Murtadlo Amin, Romo Kyai Warsito yang telah tak kenal lelah dalam memberikan tauladan dan nasihat serta doa yang tulus bagi para santrinya. Selanjutnya ucapan terima kasih kepada seluruh teman-teman kamar Jamaah Punokawan yang telah berbagi pengalaman, keseruan, persahabatan dan kebersamaan selama ini.
10. Seluruh keluarga besar PCI (Pure Consciousness Indonesia) Semarang, khususnya Bang Aswar, Mas Haidar, Mbak Osi, Mas Iqbal, Mbak Nurur,

Bu Quin, Bu Dini, Mas Fian, Teh Putri, Kak Jenny, Mbak Pipit, Pak Jodhy, Bu Tri dan seluruh teman-teman yang telah menemani perjalanan evolusi jiwa saya serta memberikan semangat dalam menyelesaikan skripsi ini

11. Semua pihak yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu yang telah banyak membantu dalam terselesaikannya skripsi ini.

Semoga Allah SWT memberikan balasan yang terbaik untuk kalian semuanya dan semoga karya tulis ini dapat memberikan manfaat dan menjadi inspirasi untuk semuanya, Aamiin.

Malang, 23 November 2020

Penulis



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	iv
PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI	v
HALAMAN MOTTO	vi
HALAMAN PERSEMBAHAN	vii
KATA PENGANTAR.....	viii
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
ABSTRAK.....	xv
ABSTRACT	xvi
مستخلص البحث.....	xvii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	6
1.3. Tujuan Penelitian.....	6
1.4. Hipotesis	7
1.5. Manfaat Penelitian.....	7
1.6. Batasan Masalah.....	8
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	9
2.1 Pentingnya Menjaga Lingkungan Menurut Islam	9
2.2 Bioetanol.....	10
2.3 Biomassa Lignoselulosa	11
2.3.1 Selulosa	12
2.3.2 Hemiselulosa.....	13
2.3.3 Lignin	14
2.4 Kertas HVS Bekas	15
2.5 Bakteri <i>Bacillus subtilis</i>	16
2.5.1 Taksonomi <i>Bacillus subtilis</i>	16
2.5.2 Morfologi dan Fisiologi <i>Bacillus subtilis</i>	17
2.5.3 Ekologi dan Habitat <i>Bacillus subtilis</i>	18
2.6 Enzim Selulase	18
2.7 Fermentasi Etanol.....	20
2.8 Ragi Roti	25
2.9 Destilasi Bioetanol.....	26
BAB III METODE PENELITIAN	28
3.1 Rancangan Penelitian.....	28

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian	29
3.3 Variabel Penelitian	29
3.4 Alat dan Bahan	29
3.4.1 Alat	29
3.4.2 Bahan.....	29
3.5. Prosedur Penelitian	29
3.5.1. Penyiapan Substrat Kertas HVS Bekas	29
3.5.2 Delignifikasi Kertas HVS Bekas	30
3.5.3 Penyiapan Kultur Bakteri <i>Bacillus subtilis</i>	30
3.5.3.1 Pembuatan Media NA (<i>Nutrient Agar</i>)	30
3.5.3.2 Pembuatan Media NB (<i>Nutrient Broth</i>)	30
3.5.3.3 Peremajaan Isolat Bakteri <i>Bacillus subtilis</i>	30
3.5.3.4 Pengembangbiakan Bakteri <i>Bacillus subtilis</i>	31
3.5.4 Produksi Enzim Selulase Kasar <i>Bacillus subtilis</i>	31
3.5.5 Hidrolisis Kertas HVS Bekas dengan Enzim Selulase Kasar.....	31
3.5.6 Fermentasi Larutan Glukosa Hasil Hidrolisis.....	32
3.5.7 Destilasi Larutan Hasil Fermentasi	32
3.5.8 Pengukuran Kadar Etanol dengan Metode Berat Jenis Menggunakan Piknometer	32
3.5.8.1 Pembuatan Larutan Standar Etanol.....	32
3.5.8.2 Pembuatan Kurva Standar Etanol	32
3.5.8.3 Pengukuran Kadar Etanol Sampel Menggunakan Piknometer	33
3.5.9 Analisis Data.....	33
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	35
4.1. Produk Enzim Selulase Kasar <i>Bacillus subtilis</i> dan Hidrolisis Kertas HVS Bekas.....	35
4.2. Pengaruh Interaksi Jumlah Ragi Roti (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) dan Lama Fermentasi terhadap Kadar Etanol dari Kertas HVS Bekas.....	37
4.3. Pengaruh Jumlah Ragi Roti (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) terhadap Kadar Etanol dari Kertas HVS Bekas.....	43
4.4. Pengaruh Lama Fermentasi terhadap Kadar Etanol dari Kertas HVS Bekas	47
4.5 Pemanfaatan Kertas HVS Bekas sebagai Bioetanol dalam Perspektif Islam	51
BAB V PENUTUP.....	55
5.1 Kesimpulan	55
5.2 Saran	55
DAFTAR PUSTAKA.....	56
LAMPIRAN	66

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Karakteristik Bioetanol	11
Tabel 2.2 Kandungan Selulosa, Hemiselulosa, dan Lignin pada Berbagai Jenis Kertas	15



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Struktur bahan lignoselulosa	12
Gambar 2.2 (a) Struktur Rantai Selulosa	13
Gambar 2.2 (b) Struktur Kristalin dan Amorf dari Selulosa	13
Gambar 2.3 (a) Struktur Xylan; (b) Glukomannan	14
Gambar 2.4 Struktur Lignin	14
Gambar 2.5 (a) Gambaran sel <i>Bacillus subtilis</i> secara mikroskopis; (b) Koloni <i>Bacillus subtilis</i> yang tumbuh pada media agar	17
Gambar 2.6 Mekanisme enzim selulosa dalam menghidrolisis selulosa secara enzimatis	19
Gambar 2.7 Fermentasi glukosa melalui tahap glikolisis jalur <i>Embden Meyerhof-Parnas Pathway</i>	21
Gambar 4.1 Enzim selulase kasar <i>Bacillus subtilis</i>	36
Gambar 4.2 Grafik Pengaruh Interaksi Jumlah Ragi Roti (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) dan Lama Fermentasi terhadap Kadar Etanol dari Kertas HVS Bekas	38
Gambar 4.3 Pengaruh Jumlah Ragi Roti (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) terhadap Kadar Etanol dari Kertas HVS Bekas	44
Gambar 4.4 Grafik Pengaruh Lama Fermentasi terhadap Kadar Etanol dari Kertas HVS Bekas	47

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Data Berat Jenis Sampel	66
Lampiran 2. Grafik Kurva Standar Etanol	67
Lampiran 3. Data Kadar Bioetanol Hasil Pengukuran dengan Piknometer	69
Lampiran 4. Hasil Uji Normalitas	69
Lampiran 5. Hasil Statistika Deskriptif	70
Lampiran 6. Analisis Pengaruh Interaksi Variasi Jumlah Ragi Roti (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) dan Lama Fermentasi terhadap Kadar Etanol	70
Lampiran 7. Analisis Pengaruh Variasi Jumlah Ragi Roti (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) terhadap Kadar Etanol	71
Lampiran 8. Analisis Pengaruh Lama Fermentasi terhadap Kadar Etanol	72
Lampiran 9. Dokumentasi Penelitian	73

ABSTRAK

Al Muntazhor, Muhammad Nabil. 2020. **Pengaruh Variasi Jumlah Ragi Roti (*Saccharomyces cerevisiae*) dan Lama Fermentasi Kertas HVS Bekas Pakai terhadap Kadar Etanol**. Skripsi. Program Studi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing (I): Ir. Liliek Harianie AR M.P. Pembimbing (II): Dr. Ahmad Barizi M.A.

Kata Kunci: Jumlah Ragi Roti; Lama Fermentasi; Kertas HVS Bekas; Kadar Etanol

Bioetanol merupakan salah satu sumber energi alternatif terbarukan yang dapat dikembangkan secara lebih luas untuk mengurangi ketergantungan pada penggunaan bahan bakar fosil yang jumlahnya terbatas di alam. Bioetanol dapat dibuat dari berbagai macam substrat, salah satunya adalah kertas HVS bekas. Kertas HVS bekas mengandung selulosa yang cukup tinggi yang dapat dibuat menjadi bioetanol melalui serangkaian proses hidrolisis dan fermentasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh variasi jumlah ragi roti (*Saccharomyces cerevisiae*) dan lama fermentasi kertas HVS bekas pakai terhadap kadar etanol. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial dengan 2 faktor. Faktor pertama adalah jumlah ragi roti (*Saccharomyces cerevisiae*) yaitu 3 gram, 4 gram, dan 5 gram. Faktor kedua adalah lama fermentasi yaitu 2 hari, 4 hari, 6 hari, dan 8 hari. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA) kemudian dilanjutkan dengan uji lanjut *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) 5%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa interaksi variasi jumlah ragi roti (*Saccharomyces cerevisiae*) dan lama fermentasi tidak berpengaruh terhadap kadar etanol. Rata-rata kadar etanol tertinggi (2,18%) diperoleh dari jumlah ragi roti 5 gram dan lama fermentasi 4 hari. Selanjutnya, variasi jumlah ragi roti (*Saccharomyces cerevisiae*) berpengaruh terhadap kadar etanol. Rata-rata kadar etanol tertinggi (1,97%) diperoleh dari jumlah ragi roti 5 gram. Kemudian yang terakhir, lama fermentasi berpengaruh terhadap kadar etanol. Rata-rata kadar etanol tertinggi (1,85%) diperoleh dari lama fermentasi 6 hari, namun secara statistik kadar etanol yang optimal dalam penelitian ini diperoleh dari lama fermentasi 4 hari yaitu 1,71%.

ABSTRACT

Al Muntazhor, Muhammad Nabil. 2020. **The Influence of Variations of Bread Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) Number and the Fermentation Time of Used HVS Paper toward Ethanol Levels**. Thesis. Study Program of Biology, Faculty of Science and Technology, Maulana Malik Ibrahim State Islamic University of Malang. Supervisor (I): Ir. Liliek Harianie AR M.P. Supervisor (II): Dr. Ahmad Barizi M.A.

Keywords: Bread Yeast Number; Fermentation Time; Used HVS Paper; Ethanol Content

Bioethanol is one of the renewable alternative energy sources that can be developed more broadly to reduce the dependence on the use of limited fossil fuels in nature. Bioethanol can be made from a variety of substrates, one of which is the used HVS paper. Used HVS paper contains high enough cellulose which can be made into bioethanol through sequence of hydrolysis and fermentation processes. The research aims at determining the influence of variations of bread yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) number and the fermentation time of used HVS paper toward ethanol content. The research used a completely randomized design (CRD) factorial pattern with 2 factors. The first factor is the number of bread yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), namely 3 grams, 4 grams, and 5 grams. The second factor is the fermentation time, namely 2 days, 4 days, 6 days, and 8 days. The data were analyzed using Analysis of Variance (ANOVA) then was continued with further test of the *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) 5%. The research results showed that the interaction of variations of bread yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) number and fermentation time did not affect the ethanol content. The highest average ethanol content (2,18%) was obtained from the bread yeast number of 5 grams and fermentation time of 4 days. Furthermore, the variation of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) number affected the ethanol content. The highest average ethanol content (1,97%) was obtained from bread yeast number of 5 grams. The last, fermentation time affected the ethanol content. The highest average ethanol content (1,85%) was obtained from the fermentation time of 6 days of, but the optimal ethanol content in this study was obtained from the fermentation time of 4 days statistically, it was 1,71%.

مستخلص البحث

المنتظر، محمد نبيل. 2020. تأثير التباين في كمية خميرة الخباز (*Saccharomyces cerevisiae*) ووقت التخمير لورق HVS المستخدم على مستويات الإيثانول. رسالة الجامعي. قسم علم الحياة. كلية العلوم والتكنولوجيا. جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. المشرف (1) ليلى حرياني، الماجستير. المشرف (2) الدكتور أحمد باريزي، الماجستير

الكلمات المفتاحية: كمية خميرة الخباز، وقت التخمير، ورق HVS المستخدم، مستويات الإيثانول

الإيثانول الحيوي هو مصدر طاقة بديل متجدد يمكن تطويره على نطاق أوسع لتقليل الاعتماد على استخدام الوقود الأحفوري المحدودة في العالم. يمكن تصنيع الإيثانول الحيوي من مجموعة متنوعة من الركائز، أحدها ورق HVS المستخدم. يحتوي ورق HVS المستخدم على نسبة عالية من السليلوز بدرجة كافية يمكن تحويلها إلى إيثانول حيوي من خلال عمليات التحلل المائي والتخمير. الهدف من هذا البحث لمعرفة تأثير التباين في كمية خميرة الخباز (*Saccharomyces cerevisiae*) ووقت التخمير لورق HVS المستخدم على مستويات الإيثانول. استخدم الباحث في هذا البحث التصميم العشوائي الكامل العامل بالعاملين. العامل الأول هو كمية خميرة الخباز (*Saccharomyces cerevisiae*) هي 3 جرام، 4 جرام، و 5 جرام. والعامل الثاني هو وقت التخمير وهم يومان و 4 أيام و 6 أيام و 8 أيام. تم تحليل البيانات التي تم الحصول عليها باستخدام تحليل التباين (ANOVA) ثم استمر مع اختبار Duncan متعدد المدى (DMRT) بنسبة 5 في المائة. دلت النتائج على أن تفاعل الاختلافات في كمية خميرة الخبز (*Saccharomyces cerevisiae*) ووقت التخمير لم يؤثر على محتوى الإيثانول. تم الحصول على أعلى متوسط لمحتوى إيثانول (2.1752 في المائة) من كمية خميرة الخبز 5 جرام ووقت التخمير 4 أيام. وبعد ذلك، إن الاختلاف في كمية الخميرة (*Saccharomyces cerevisiae*) يؤثر على محتوى الإيثانول. وتم الحصول على أعلى متوسط لمحتوى إيثانول (1.9695 في المائة) من كمية خميرة الخبز 5 جرام. والأخير، وقت التخمير يؤثر على محتوى الإيثانول. وأعلى متوسط لمحتوى الإيثانول (1.8527 في المائة) من وقت التخمير لمدة 6 أيام، ولكن إحصائياً تم الحصول على محتوى الإيثانول الأمثل في هذا البحث من وقت التخمير لمدة 4 أيام، أي 1.7144 في المائة.

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Bahan bakar fosil merupakan sumber energi tak terbarukan. Bahan bakar ini dihasilkan dari proses penyulingan minyak bumi. Ketersediaan bahan bakar fosil sangatlah terbatas di alam dan bisa habis bila digunakan terus-menerus dalam waktu yang lama (Hidayat, 2013). Berdasarkan pada data dari Kementerian ESDM kebutuhan energi dalam negeri selama periode tahun 2012 telah menembus angka 1,189 juta SBM, dan sebanyak 46% nya berasal dari minyak bumi. Kementerian ESDM memprediksi akan terjadi lonjakan kebutuhan energi dalam negeri dimana pada tahun 2010 diperkirakan akan meningkat sebanyak 712 juta SBM, kemudian diprediksi akan terjadi peningkatan kebutuhan energi lagi pada tahun 2019 dengan peningkatan sebesar 7,1% sampai menembus angka 1316 juta SBM. Adanya peningkatan kebutuhan energi ini sejalan dengan angka pertumbuhan penduduk di Indonesia yang meningkat selama periode tahun 2009-2019 dari angka 231 juta orang menjadi 256 juta orang. Hal yang menjadi permasalahan dalam usaha pemenuhan kebutuhan minyak bumi (BBM) di Indonesia terlihat dari tingkat konsumsi bahan bakar minyak di masyarakat yang tinggi (>1 juta barel/hari), namun disisi lain tidak didukung oleh produksi BBM yang mencukupi (Ma'arif, 2014). Mengingat jumlah dan ketersediaannya yang terbatas, maka penggunaan yang masif dalam jangka panjang akan mengakibatkan kelangkaan energi yang terjadi akibat adanya ketimpangan antara kebutuhan dengan ketersediaannya. Dalam Al-Quran Allah SWT telah mengisyaratkan tentang ketidakseimbangan alam sebagai akibat dari perbuatan manusia yang ceroboh dalam mengeksploitasi alam. Allah SWT telah menggambarkan hal ini dalam Al-Quran surat Ar-Rum ayat 41:

ظَهَرَ الْفَسَادُ فِي الْبَرِّ وَالْبَحْرِ بِمَا كَسَبَتْ أَيْدِي النَّاسِ لِيُذِيقَهُمْ بَعْضَ الَّذِي عَمِلُوا لَعَلَّهُمْ يَرْجِعُونَ (الروم : ٤١)

Artinya:

“Telah tampak kerusakan di darat dan di laut disebabkan karena perbuatan tangan manusia; Allah menghendaki agar mereka merasakan sebagian dari (akibat) perbuatan mereka, agar mereka kembali (ke jalan yang benar)”(QS. Ar-Rum: 41).

Penjelasan dari ayat diatas menurut Al-Qurthubi (2009) Ibnu Abbas RA mengemukakan pendapat bahwa makna **الْفَسَادُ** (kerusakan) ialah kekeringan, hasil tanaman yang sedikit, serta hilangnya keberkahan. Kemudian Ibnu Abbas RA. juga menambahkan penjelasan tentang ayat ini, Beliau berkata, “Kurangnya berkah pada pekerjaan hamba, agar mereka bertobat.”. An-Nuhas mengatakan bahwa "Ini adalah makna terbaik tentang ayat ini." Selanjutnya Ibnu Athiyah berpendapat tentang ayat ini, "Maksudnya, apabila curah hujan berkurang maka berkurang juga kedalaman air laut, para nelayan merugi dan binatang-binatang laut menjadi tidak berkembang biak". Sedangkan menurut Tafsir Tematik Departemen Agama (2009) secara umum, terjadinya degradasi lingkungan hidup (LH) ada dua penyebab yaitu penyebab yang bersifat langsung dan tidak langsung. Faktor penyebab yang tidak langsung pada kenyataannya merupakan penyebab yang sangat dominan terhadap kerusakan lingkungan. Artinya rusaknya ekosistem dalam hal ini manusia tidak memiliki peran misalnya gunung meletus, gempa bumi, tsunami, dan lain-lain. Sedangkan yang bersifat langsung terbatas ulah manusia yang terpaksa mengeksploitasi lingkungan secara berlebihan karena desakan kebutuhan, keserakahan, atau mungkin kekurangsadaran akan pentingnya menjaga lingkungan misalnya menebang hutan secara illegal, membuang sampah sembarangan, membendung aliran sungai sehingga menciut, dan lain-lain.

Berdasarkan pada ayat diatas, Allah SWT telah memperingatkan manusia atas akibat dari perbuatan yang mereka lakukan yang dapat merusak lingkungan. Tujuannya adalah agar mereka kembali ke jalan yang benar dengan melakukan perbaikan dan pelestarian alam. Salah satu permasalahan yang penting untuk diperhatikan saat ini adalah mengenai penggunaan bahan bakar fosil yang kurang ramah lingkungan, tidak dapat diperbarui dan memiliki persediaan yang terbatas di alam. Apabila terus dibiarkan, maka akan mengakibatkan kelangkaan energi akibat adanya ketidakseimbangan antara pasokan dan kebutuhan yang diperlukan. Oleh sebab itu, penting untuk dilakukan penelitian tentang sumber energi alternatif terbarukan, ramah lingkungan serta ketersediannya melimpah di alam. Diantara sekian banyaknya sumber energi alternatif yang potensial untuk diteliti dan dikembangkan salah satunya adalah bioetanol.

Bioethanol adalah jenis alkohol yang dibuat dengan cara memfermentasikan komponen gula yang ada pada tumbuhan (Shah dan Sen, 2011). Proses fermentasi tersebut melibatkan peran ragi *Saccharomyces cerevisiae* dalam mengubah gula menjadi alkohol dan karbondioksida. Bioethanol pada umumnya diproduksi dari bahan-bahan hasil pertanian yang mengandung gula. Bahan baku bioethanol ini dapat diklasifikasikan sebagai bahan baku bioethanol generasi pertama berupa gula dan pati dan bahan baku bioethanol generasi kedua berupa lignoselulosa (Vohra *et.al.*, 2014). Secara konvensional, bioethanol telah diproduksi dari bahan yang mengandung kadar gula dan pati yang tinggi (produk hasil pertanian berupa bahan pangan) yang dikenal sebagai bioethanol generasi pertama. Namun hal ini akan menimbulkan permasalahan atau konflik terkait dengan produksi bahan makanan dan pakan. Sebagai alternatif untuk bioethanol generasi pertama, maka mulai banyak penelitian yang berfokus pada pengembangan bioethanol generasi kedua yang memanfaatkan residu lignoselulosa dari hasil tanaman pertanian dan berbagai jenis limbah seperti ampas tebu, jerami, brangkasan, batang tanaman, dedaunan dan biji (Sharma dan Sharma, 2018).

Biomassa lignoselulosa adalah bahan baku yang potensial untuk produksi bioethanol karena biaya bahan baku relatif rendah, jumlahnya melimpah dan dapat tersedia secara berkelanjutan (Kikas *et.al.*, 2017). Selain itu, biomassa lignoselulosa dapat diperoleh dalam jumlah yang banyak dari bahan-bahan seperti limbah perkotaan (kertas bekas, karton, sampah sayuran, dsb), limbah industri, kayu, dan limbah pertanian (Xu *et.al.*, 2017). Salah satu jenis biomassa lignoselulosa yang dapat digunakan dalam proses pembuatan bioethanol adalah kertas HVS bekas.

Kertas bekas banyak kita temui dilingkungan sekitar kita yang seringkali hanya dibuang karena masih dianggap kurang memiliki manfaat. Sampah kertas bekas yang dibuang ke lingkungan apabila dibiarkan terus menerus maka akan mengakibatkan penumpukan sampah kertas, sehingga menimbulkan dampak negatif bagi lingkungan. Penanganan sampah kertas bekas dengan cara dibakarpun masih dianggap kurang tepat, karena asap dari pembakaran sampah kertas bekas tersebut dapat mengakibatkan pencemaran udara, sedangkan disisi

lain kertas bekas yang dibuang secara sembarangan akan mengakibatkan pencemaran lingkungan (Fuadi dkk., 2015). Hal lain yang perlu dipertimbangkan adalah harga jual kertas bekas yang pada umumnya relatif rendah, sehingga diperlukan alternatif dalam pemanfaatan kertas bekas tersebut, solusi alternatifnya adalah dapat dibuat sebagai bahan baku bioetanol. Sehingga harapannya adalah nilai guna dari kertas tersebut dapat ditingkatkan (Kalpatari dkk., 2019).

Kertas HVS memiliki kandungan selulosa yang cukup tinggi bila dibandingkan dengan hemiselulosa ataupun ligninnya. Sehingga kertas HVS sangat potensial untuk digunakan sebagai substrat dalam pembuatan bioetanol (Fuadi dkk., 2015). Menurut Howard *et.al* (2003) kertas HVS bekas mengandung selulosa sebesar 85-99%, hemiselulosa 0%, dan lignin 0-15%. Selanjutnya menurut Pereira Jr *et.al* (2008) kandungan selulosa, hemiselulosa dan lignin pada kertas HVS bekas adalah 43% selulosa, 13% hemiselulosa, dan 6% lignin. Sedangkan menurut Loelovich (2014) kertas HVS bekas mengandung komponen selulosa sebanyak 62%, hemiselulosa 5% dan lignin 1%. Berdasarkan beberapa literatur diatas, maka dapat diketahui bahwa kertas HVS bekas merupakan substrat yang potensial untuk dibuat menjadi bioetanol karena kandungan selulosanya yang masih cukup tinggi.

Pembuatan bioetanol dari bahan lignoselulosa melalui beberapa tahap, diantaranya adalah proses hidrolisis. Proses hidrolisis dilakukan secara enzimatik untuk memecah dan menguraikan komponen selulosa yang ada pada kertas HVS bekas guna menghasilkan produk akhir berupa glukosa, yang selanjutnya akan difermentasi oleh khamir menjadi etanol. Menurut Fuadi dkk., (2015) proses hidrolisis menggunakan enzim mempunyai berbagai keuntungan apabila dibandingkan dengan hidrolisis menggunakan asam antara lain: tidak menyebabkan penurunan kadar glukosa setelah proses hidrolisis, suasana reaksi *mild process* (berlangsung secara lembut pada suhu 45-50°C dan pH sekitar 4,7-4,8), lebih ramah lingkungan, tanpa adanya reaksi sampingan, serta tidak menyebabkan korosi pada peralatan yang digunakan karena tidak menggunakan bahan-bahan yang bersifat korosif sehingga biaya perawatan dan pemeliharaan alat menjadi lebih rendah.

Enzim yang dapat digunakan untuk menghidrolisis selulosa adalah selulase. Selulase adalah enzim yang dapat diinduksi yang disintesis oleh mikroorganisme selama pertumbuhannya pada substrat yang mengandung bahan selulosa. Selulase adalah enzim yang menghidrolisis ikatan β -1,4- glikosidik dan disintesis oleh mikroorganisme selama masa pertumbuhannya pada bahan selulosa. Proses hidrolisis enzimatis pada bahan selulosa dapat berlangsung secara sempurna didukung oleh berbagai jenis enzim selulase; yaitu endoglucanase, (1,4-D-glukan-4-glukanohidrolase; EC 3.2.1.4), eksoselobiohidrolase (1, 4-D-glukan glukohidrolase; EC 3.2.1.74) dan glukosidase (D-glukosida glukohidrolase; EC 3.2.1.21). (Saranraj *et.al*, 2012). Ketiga jenis komponen enzim tersebut akan menghidrolisis selulosa menjadi glukosa secara sinergi dan bertahap (Melati dkk., 2014).

Sebagian besar enzim selulase yang diproduksi secara komersial menggunakan fungi dan bakteri (Orji *et. al.*, 2016). Akan tetapi, produksi enzim selulase dalam penelitian ini menggunakan bakteri, karena berbagai alasan diantaranya adalah laju pertumbuhan bakteri lebih tinggi apabila dibandingkan dengan fungi, mampu mengkatalis reaksi hidrolisis secara lebih efektif, mudah direkayasa secara genetik, serta dapat tumbuh dengan baik pada berbagai macam substrat (Sivakumar *et.al.*, 2018), stabil pada kondisi suhu dan pH yang ekstrim, kurang adanya hambatan selama hidrolisis, dan mampu bertahan pada berbagai macam kondisi stress lingkungan (Goyal *et.al.*, 2013). Enzim selulase dapat diproduksi dari bakteri *Bacillus subtilis*. Menurut Baysal dan Yildiz (2017) *Bacillus subtilis* memiliki beberapa kelebihan, antara lain: mampu beradaptasi dengan baik terhadap perubahan kondisi lingkungan, tergolong organisme yang aman, non toksik, dan mampu menghasilkan enzim dalam jumlah banyak, serta merupakan jenis bakteri yang paling banyak diteliti bila dibandingkan dengan jenis bakteri lainnya terkait kemampuannya dalam menghasilkan enzim ekstraseluler dalam jumlah yang banyak.

Hasil penelitian sebelumnya telah dilakukan untuk menguji aktivitas selulase dari *Bacillus* sp BPPT CC RK2 didalam menghidrolisis limbah dari hasil pengolahan kertas dengan hasil terbaik diperoleh pada suhu 37°C, pH 5,5, dan lama waktu hidrolisis selama 96 jam dengan nilai aktivitas enzim selulase

tertinggi sebesar 15,4U/mg (Amelia, 2012). Oleh sebab itu, maka dalam penelitian ini menggunakan enzim selulase *Bacillus subtilis* sebagai penghidrolisis selulosa pada suhu 37°C, pH 5,5, dan lama waktu hidrolisis selama 96 jam untuk menghasilkan glukosa. Kemudian setelah proses hidrolisis selesai dilakukan, maka dilanjutkan dengan fermentasi menggunakan ragi roti (*Saccharomyces cerevisiae*) untuk menghasilkan etanol. *Saccharomyces cerevisiae* dipilih dalam penelitian ini karena kadar etanol yang dihasilkan tinggi, tahan pada konsentrasi etanol yang tinggi, cukup stabil saat proses fermentasi, tahan terhadap suhu tinggi, dan pH rendah (Putri dan Utami, 2017).

Jumlah ragi dan lama fermentasi adalah salah satu faktor yang berpengaruh dalam fermentasi bioetanol. Berbagai penelitian sebelumnya telah dilakukan oleh Kalpatari (2019) membuat bioetanol dari kertas HVS bekas dengan jumlah ragi yang digunakan sebanyak 1 gr, 3 gr, dan 5 gr, dan lama fermentasi selama 2 hari (48 jam), 4 hari (96 jam), 6 hari (144 jam), dan 8 hari (192 jam). Kadar etanol tertinggi didapatkan pada konsentrasi ragi 5 gram, lama fermentasi 6 hari (144 jam) sebanyak 6% (v/v).

Berdasarkan latar belakang diatas, maka perlu dilakukan penelitian tentang “Pengaruh Variasi Jumlah Ragi Roti (*Saccharomyces cerevisiae*) dan Lama Fermentasi Kertas HVS Bekas Pakai Terhadap Kadar Etanol”.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas, maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Apakah interaksi variasi jumlah ragi roti (*Saccharomyces cerevisiae*) dan lama fermentasi berpengaruh terhadap kadar etanol pada proses fermentasi glukosa hasil hidrolisis kertas HVS bekas?
2. Apakah variasi jumlah ragi roti (*Saccharomyces cerevisiae*) berpengaruh terhadap kadar etanol pada proses fermentasi glukosa hasil hidrolisis kertas HVS bekas?
3. Apakah lama fermentasi berpengaruh terhadap kadar etanol pada proses fermentasi glukosa hasil hidrolisis kertas HVS bekas?

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah:

1. Untuk mengetahui pengaruh interaksi variasi jumlah ragi roti (*Saccharomyces cerevisiae*) dan lama fermentasi terhadap kadar etanol pada proses fermentasi glukosa hasil hidrolisis kertas HVS bekas.
2. Untuk mengetahui pengaruh variasi jumlah ragi roti (*Saccharomyces cerevisiae*) terhadap kadar etanol pada proses fermentasi glukosa hasil hidrolisis kertas HVS bekas.
3. Untuk mengetahui pengaruh lama fermentasi terhadap kadar etanol pada proses fermentasi glukosa hasil hidrolisis kertas HVS bekas.

1.4. Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Interaksi variasi jumlah ragi roti (*Saccharomyces cerevisiae*) dan lama fermentasi berpengaruh terhadap kadar etanol pada proses fermentasi glukosa hasil hidrolisis kertas HVS bekas
2. Variasi jumlah ragi roti (*Saccharomyces cerevisiae*) berpengaruh terhadap kadar etanol pada proses fermentasi glukosa hasil hidrolisis kertas HVS bekas.
3. Lama fermentasi berpengaruh terhadap kadar etanol pada proses fermentasi glukosa hasil hidrolisis kertas HVS bekas.

1.5. Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan dari penelitian ini adalah:

1. Diharapkan mampu mengurangi permasalahan sampah kertas yang menumpuk dan dapat mengurangi pencemaran lingkungan.
2. Dapat memproduksi bioetanol dari substrat yang lebih murah dan tersedia melimpah untuk menunjang ketersediaan bahan bakar alternatif yang ramah lingkungan.
3. Dapat meningkatkan nilai guna dari kertas.
4. Dapat menjadi solusi untuk mengatasi kenaikan harga bahan bakar minyak.
5. Penggunaan bioetanol diharapkan dapat mengurangi polusi udara dan gas emisi hidrokarbon yang menjadi penyebab pemanasan global.
6. Penggunaan bioetanol diharapkan mampu mengurangi ketergantungan terhadap bahan bakar fosil yang tak terbarukan dan terbatas jumlahnya.

7. Sebagai solusi alternatif dalam mengatasi masalah krisis energi dan mendukung ketahanan energi nasional di masa depan.

1.6. Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini antara lain:

1. Kertas yang digunakan adalah kertas HVS bekas pakai yang mengandung tulisan didalamnya yang diperoleh dari Pondok Pesantren Sabilurrosyad, Gasek, Kelurahan Karangbesuki, Kecamatan Sukun, Kota Malang.
2. Substrat yang digunakan dalam penelitian ini adalah glukosa hasil hidrolisis selulosa dari kertas HVS bekas.
3. Proses pretreatment pada substrat untuk delignifikasi menggunakan NaOH 2 %.
4. Isolat *Bacillus subtilis* didapatkan dari koleksi Laboratorium Kedokteran Universitas Brawjaya, Malang.
5. Pengukuran kadar etanol menggunakan alat piknometer.
6. Ragi roti yang digunakan bermerk “Saf-Instant” dengan variasi jumlah ragi 3, 4, dan 5 gram.
7. Lama fermentasi yang digunakan adalah 2, 4, 6, dan 8 hari.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Pentingnya Menjaga Lingkungan Menurut Islam

Lingkungan adalah tempat tinggal bagi manusia, hewan dan tumbuhan. Semua makhluk di bumi ini akan hidup dalam harmoni dan keselarasan saat kondisi lingkungan terjaga dengan baik. Oleh karena itu, Allah SWT telah memerintahkan kepada manusia agar senantiasa menjaga dan melestarikan lingkungan serta dilarang membuat kerusakan didalamnya. Hal tersebut telah Allah SWT terangkan dalam Al-Quran Surat Al-A'raf ayat 56 sebagaimana berikut:

وَلَا تُفْسِدُوا فِي الْأَرْضِ بَعْدَ إِصْلَاحِهَا وَادْعُوهُ خَوْفًا وَطَمَعًا إِنَّ رَحْمَتَ اللَّهِ قَرِيبٌ مِّنَ الْمُحْسِنِينَ
(الأعراف: ٥٦)

Artinya:

Dan janganlah kamu berbuat kerusakan di bumi setelah (diciptakan) dengan baik. Berdoalah kepada-Nya dengan rasa takut dan penuh harap. Sesungguhnya rahmat Allah sangat dekat kepada orang yang berbuat kebaikan. (QS. Al-A'raf: 56).

Menurut At-Thabari (2008) Abu Ja'far berkata: Maksud firman-Nya, وَلَا تُفْسِدُوا فِي الْأَرْضِ بَعْدَ إِصْلَاحِهَا yang artinya: “Dan janganlah kamu membuat kerusakan di muka bumi, setelah (Allah) memperbaikinya” adalah: Janganlah kamu mempersekutukan Allah di bumi dan janganlah melakukan kemaksiatan di bumi. Firman Allah selanjutnya , بَعْدَ إِصْلَاحِهَا yang artinya: “Setelah (Allah) memperbaikinya”, maksudnya adalah setelah Allah memperbaiki bumi untuk orang-orang yang taat kepada-Nya dengan mengutus para rasul kepada mereka, yang bertugas menyeru kebenaran dan menjelaskan bukti-bukti kebenaran. Kemudian dilanjutkan dengan ayat, وَادْعُوهُ خَوْفًا وَطَمَعًا yang artinya: “Dan berdoalah kepada-Nya dengan rasa takut (tidak akan diterima) dan harapan (akan dikabulkan)”, maksudnya adalah, bersikap ikhlaslah dalam berdoa dan beramal. Janganlah mempersekutukan Allah dengan apa pun dalam perbuatanmu, dan janganlah mempersekutukannya dengan tuhan-tuhan, berhala-berhala, dan lainnya. Akan tetapi takutlah kamu terhadap hukuman-Nya dan harapkanlah balasan pahala dari-Nya. Lalu pada akhir ayat Allah SWT berfirman, إِنَّ رَحْمَتَ اللَّهِ قَرِيبٌ مِّنَ الْمُحْسِنِينَ yang artinya: “Sesungguhnya rahmat Allah sangat dekat kepada orang-orang yang berbuat baik.” Dia berfirman,

"Sesungguhnya balasan pahala dari Allah yang telah Dia janjikan kepada orang-orang yang baik atas perbuatan baik yang telah mereka lakukan di dunia, sangatlah dekat dari mereka. Itulah rahmat Allah. Jarak antara mereka dengan rahmat yang dijanjikan Allah hanyalah terpisahnya roh dari jasad mereka."

Menurut Tafsir Tematik Departemen Agama (2009) ayat ini menunjukkan larangan untuk berbuat kerusakan atau tidak bermanfaat dalam bentuk apa pun, baik menyangkut perilaku, seperti merusak, membunuh, mencemari sungai, dan lainlain, maupun menyangkut akidah, seperti kemusyrikan, kekufuran, dan segala bentuk kemaksiatan. Akan tetapi, term *islah* di sini, sebagai poros yang berlawanan dari *fasād*, menurut para ulama menyangkut akidah bukan perbaikan fisik. Artinya Allah telah memperbaiki bumi ini dengan mengutus Rasul, menurunkan Al-Qur'an, dan penetapan syariat. Melihat hal ini, terjadinya kerusakan mental akan menjadi sebab terjadinya kerusakan fisik.

Intisari yang dapat dipetik dari ayat ini adalah Allah SWT melarang manusia melakukan perbuatan yang merusak bumi. Akan tetapi sebaliknya, Allah menyukai hamba-hambanya yang melakukan perbuatan baik. Salah satu bentuknya adalah dengan menjaga dan melestarikan lingkungan. Maka sudah selayaknya seorang muslim mulai membangkitkan semangat dalam rangka pelestarian lingkungan yang ditunjukkan melalui perbuatan yang nyata. Dalam konteks ekologi maka ayat ini mengisyaratkan untuk melakukan perbaikan dan pelestarian lingkungan. Jika makna dalam ayat ini dimaknai secara kontekstual untuk kemudian diimplementasikan dalam penelitian ini, maka pengolahan kertas HVS bekas menjadi bioetanol merupakan suatu bentuk ikhtiar dalam menjaga dan melestarikan lingkungan serta mampu mengurangi dampak negatif dari menumpuknya sampah kertas dilingkungan. Bioetanol yang dibuat dari kertas bekas ini diharapkan mampu dikembangkan sebagai alternatif solusi dalam mengatasi permasalahan lingkungan saat ini berupa meningkatnya suhu bumi akibat pemanasan global, menipisnya cadangan energi dari bahan bakar fosil serta pemanfaatan sampah kertas yang belum maksimal.

2.2 Bioetanol

Bioetanol merupakan senyawa kimia yang mempunyai rumus C_2H_5OH dengan rumus bangunnya CH_3-CH_2-OH namun sering ditulis dengan EtOH.

Pembuatan senyawa etanol jenis ini melalui proses fermentasi yang dibantu oleh khamir (Arlianti, 2018). Salah satu mikroorganisme yang biasa digunakan dalam pembuatan bioetanol adalah *Saccharomyces cerevisiae*. Mikroorganisme ini dapat menggunakan gula sebagai sumber karbon untuk metabolisme sehingga dapat menghasilkan etanol (Wartini dkk., 2017). Etanol memiliki beberapa karakteristik antara lain: jernih, tidak berwarna, mudah menguap pada suhu ruang, dan beraroma khas. Etanol banyak dimanfaatkan pada berbagai sektor industri antara lain: industri farmasi, kosmetik, industri turunan alkohol, digunakan sebagai bahan campuran minuman keras, dan lain sebagainya (Winarno, 2011). Adapun karakteristik dari bioetanol secara lebih rinci diuraikan dalam tabel 2.1.

Tabel 2.1 Karakteristik Bioetanol

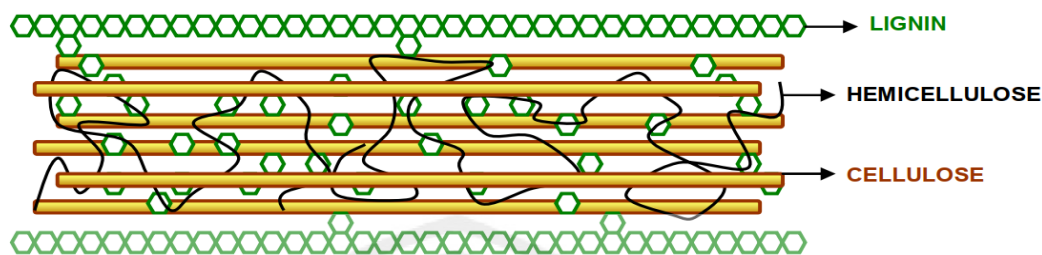
Sifat Fisika dan Sifat Kimia	Nilai
Berat molekul, g/mol	46,1
Titik beku, °C	- 114,1
Titik didih normal, °C	78,32
Densitas, g/ml	0,7983
Viskositas (20 °C), mPa.s (Cp)	1,17
Panas penguapan normal, J/g	839,31
Panas pembakaran pada 25 °C, J/g	29676,6
Panas jenis pada 25 °C, J (g °C)	2,42
Nilai Oktan	106 – 111
Wujud pada suhu kamar	cair
Dicampur dengan natrium	bereaksi
Kelarutan dalam air	larut sempurna
Dapat terbakar	ya

Penggunaan bioetanol memiliki beberapa kelebihan bila dibandingkan dengan bensin karena kandungan O₂ nya lebih tinggi (35%), memiliki nilai oktan tinggi (118), emisi gas CO yang dihasilkan lebih rendah dibandingkan BBM yaitu sebesar 19-25 persen sehingga lebih ramah lingkungan. Dengan berbagai kelebihan tersebut maka bioetanol dapat dikembangkan sebagai bahan bakar alternatif pengganti bensin (Jamilatun, 2010).

2.3 Biomassa Lignoselulosa

Biomassa Lignoselulosa adalah komponen utama yang ada pada tumbuhan yang membentuk struktur dinding sel tumbuhan. Lignoselulosa pada umumnya tersusun tiga jenis polimer penyusun yaitu: selulosa (30%-60%), hemiselulosa (20%-40%) dan lignin (10%-25%) yang saling berikatan dan membentuk matriks yang heterogen. Kira-kira sekitar 90% bahan lignoselulosa tersusun atas selulosa,

hemiselulosa dan lignin dan sisanya terdiri atas abu dan zat ekstraktif (Kumar *et.al.*, 2016). Struktur lignoselulosa seperti pada gambar.2.1.

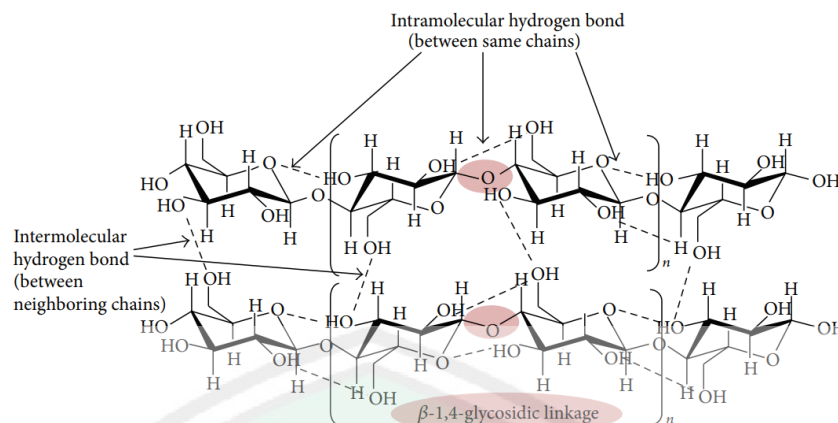


Gambar.2.1. Gambaran struktur bahan lignoselulosa (Musato dan Texeira, 2010)

Berbagai penelitian tentang pemanfaatan biomassa lignoselulosa sebagai sumber energi semakin intensif dilakukan yang dalam hal ini adalah bioetanol, karena didorong oleh banyak faktor. Faktor pertama karena meningkatnya kebutuhan energi setiap tahun, sedangkan sumber daya alam penghasil energi semakin menipis sehingga bila dibiarkan berkelanjutan akan memicu pada terjadinya kelangkaan energi. Hal ini terjadi karena sumber energi yang digunakan saat ini sebagian besarnya merupakan sumber daya alam tak terbarukan seperti minyak bumi, batu bara, dan gas. Adapun faktor ke dua adalah karena tingkat efisiensi pembakaran bioetanol cenderung lebih optimal di bandingkan BBM sehingga mampu mereduksi emisi gas rumah kaca di atmosfer. Faktor ketiga karena ketersediaan biomassa lignoselulosa melimpah di alam serta belum dimanfaatkan secara optimal. Selain itu, bahan ini juga tidak digunakan sebagai bahan pangan sehingga tidak akan mempengaruhi pasokan bahan pangan.

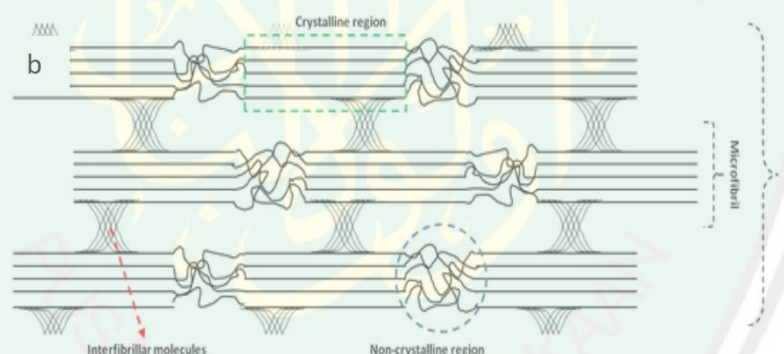
2.3.1 Selulosa

Selulosa adalah suatu homopolisakarida yang tersusun atas unit-unit β -D-piranos, yang dihubungkan melalui ikatan β -1,4-glikosida. Selobiosa adalah unit terkecil yang terbentuk dari 2 monomer glukosa. Rantai selulosa berbentuk memanjang tersusun atas banyak mikrofibril yang saling berikatan dengan ikatan hidrogen dan ikatan van der Waals (gambar 2.2 (a)) (De Bari *et.al.*, 2012). Pada tiap dua unit molekul glukosa akan terjadi eliminasi 1 molekul air sehingga unit glukosa yang saling berdekatan dapat menyatu (Hermiati dkk., 2010).



Gambar 2.2 (a). Struktur rantai selulosa (Lee *et.al.*, 2014)

Struktur selulosa ada yang berbentuk kristalin dan ada yang berbentuk amorf (gambar 2.2 (b)). Menurut Kumar *et.al* (2016) selulosa kristalin memiliki struktur yang kompak, lurus dan rapi sehingga lebih sulit untuk didegradasi, sedangkan pada selulosa amorf memiliki struktur yang lebih longgar dan tidak terlalu rapat sehingga lebih mudah untuk didegradasi. Tingkat kekristalan selulosa dapat mempengaruhi kemampuan hidrolisis dari enzim maupun dari bahan kimia tertentu (Octavia dkk., 2011).

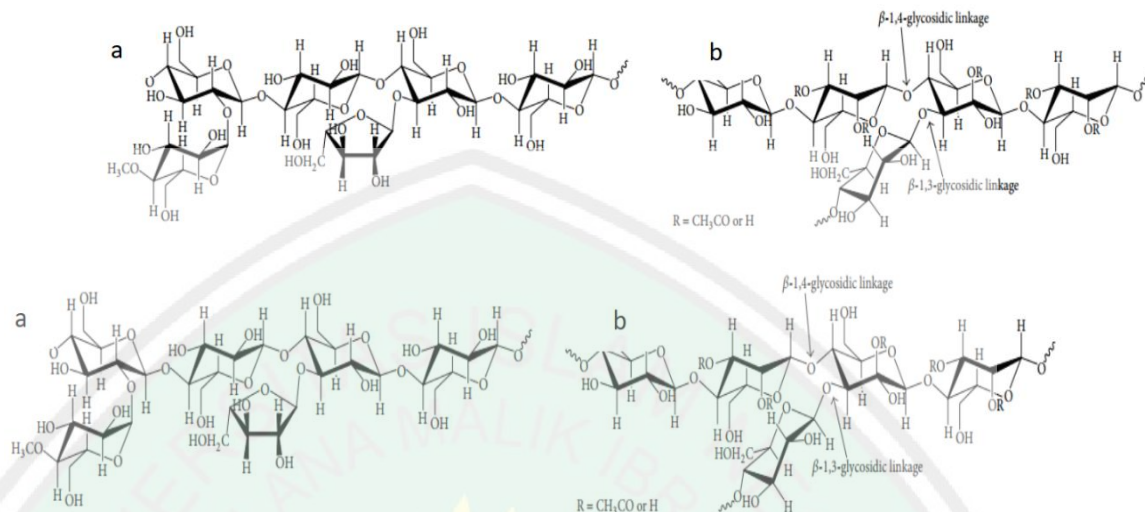


Gambar 2.2 (b). Struktur kristalin dan amorf dari selulosa (Borjesson dan Westman, 2015)

2.3.2 Hemiselulosa

Komponen hemiselulosa menyusun biomassa lignoselulosa dengan komposisi sebesar 20-50%. Hemiselulosa merupakan jenis polisakarida yang dapat larut dalam basa (alkali). Ada dua jenis ikatan yang terdapat pada polimer hemiselulosa yaitu ikatan β -(1,4)-glikosida dan β -(1,3)-glikosida. Hemiselulosa tersusun dari beberapa jenis gula (gambar 2.3) seperti gula pentosa/berat atom C-5 (xylosa, rhamnosa dan arabinosa) dan gula heksosa/berat atom C-6 (glukosa, mannosa, dan galaktosa). Selain itu, dalam hemiselulosa juga terkandung asam

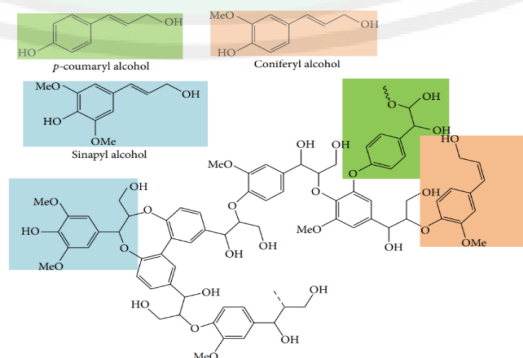
uronat seperti 4-O-methylglucuronic, D-galactouronic dan D-glucuronic. Selain itu, hemiselulosa juga memiliki berat molekul dan tingkat kristalinitas yang lebih rendah dibandingkan selulosa (Fatriasari dan Hermiati, 2016).



Gambar 2.3 (a) Struktur xylan; (b) glukomannan (Lee *et.al.*, 2014)

2.3.3 Lignin

Lignin adalah senyawa aromatik yang tersusun atas unit-unit fenil propana. Unit-unit fenil propana tersebut antara lain: p-coumaryl alcohol, coniferyl alcohol, dan sinapyl alcohol yang dihubungkan oleh ikatan eter C-O-C dan ikatan karbon C-C (gambar 2.4). selain itu, lignin juga mengandung senyawa methoxyl, fenolik, hidroksil dan senyawa golongan aldehid pada rantai sampingnya. Lignin berperan sebagai perekat dan pengisi matriks diantara selulosa dan hemiselulosa dalam struktur biomassa lignoselulosa sehingga dapat membentuk struktur yang kompak (Kumar *et.al.*, 2016). Selain itu, lignin juga berperan sebagai pelindung sel tumbuhan dari kerusakan dan tahan terhadap serangan mikroorganisme (Lee *et.al.*, 2014).



Gambar 2.4 Struktur lignin (Lee *et.al.*, 2014)

2.4 Kertas HVS Bekas

Kertas merupakan suatu produk berbentuk lembaran-lembaran yang tipis dan rata karena telah melalui tahapan pengepresan. Bahan baku pembuatan kertas adalah serat alami yang mengandung selulosa yang berasal dari dinding sel tumbuhan. Kertas banyak dimanfaatkan dalam kegiatan sehari-hari oleh manusia (Hadi, 2008).

Bahan baku untuk pembuatan kertas berasal dari serat, baik serat dari bahan kayu maupun non kayu. Pada umumnya kertas diproduksi dari bahan baku serat dari kayu (Nata dkk., 2013). Dalam bahan kayu maupun non kayu terdapat komponen selulosa, hemiselulosa dan lignin. Kandungan selulosa pada kertas jauh lebih tinggi dibandingkan dengan kandungan hemiselulosa ataupun ligninnya (Fuadi dkk., 2015). Kandungan selulosa, hemiselulosa, dan lignin pada berbagai jenis kertas di sajikan dalam tabel 2.2.

Tabel 2.2 Komposisi Selulosa, Hemiselulosa, dan Lignin pada Berbagai Jenis Kertas

Jenis Kertas	Selulosa (%)	Hemiselulosa (%)	Lignin (%)	Referensi
Kertas Kardus	61	12	18	Loelovich, 2014
	47	25	12	Pereira Jr. <i>et.al</i> , 2008
Kertas Koran	38	15	21	Loelovich, 2014
	62	16	21	Pereira Jr. <i>et.al</i> , 2008
	40-55	25-40	18-30	Howard <i>et.al.</i> , 2003
	61	16	21	Olsson dan Hagerdal, 1996; Anindyawati, 2009
Kertas Kemasan	60	11	7	Loelovich, 2014
Kertas Serbet	58	6	4	Loelovich, 2014
Kertas Isap	81	6	4	Loelovich, 2014
Kertas Kantor (HVS)	62	5	1	Loelovich, 2014
	43	13	6	Pereira Jr. <i>et.al</i> , 2008
	85-99	0	0-15	Howard <i>et.al.</i> , 2003

Limbah Kertas dari Industri Kertas	60-70	10-20	5-10	Howard <i>et.al.</i> , 2003
Kertas Bekas	47	25	12	Anindyawati, 2009
Kertas Bekas Limbah Rumah Tangga	43	13	6	Anindyawati, 2009

Pemanfaatan kertas bekas sebagai bahan baku bioetanol diharapkan mampu menjadi solusi alternatif agar kertas bekas dapat ditingkatkan nilai ekonominya karena selama ini pemanfaatan kertas bekas sebagian besar hanya untuk didaur ulang. Pada sektor industri modern saat ini, proses pembuatan kertas telah mengalami banyak perkembangan dari sisi teknologi maupun bahan bakunya (Fuadi dkk., 2015).

Pengelolaan sampah kertas perlu perhatian dan strategi pengelolaan yang baik agar sampah kertas bisa dimanfaatkan secara maksimal mengingat sampai saat ini hanya ada sekitar 70% saja sampah kertas yang dapat didaur ulang atau dimanfaatkan kembali. Padahal jumlah sampah kertas yang ada bisa mencapai 10% dari jumlah sampah seluruhnya. Sampah kertas yang ada di lingkungan dapat terdiri dari beberapa jenis, antara lain: kertas HVS, kertas karton, kertas minyak, kertas Kraft, dan lain sebagainya. Sampah kertas yang dihasilkan juga akan berbeda-beda tergantung dari aktivitas manusia, contohnya pada lingkungan industri dan pertokoan akan menghasilkan banyak sampah kertas karton, sementara itu sedangkan pada lingkungan kantor dan sekolah akan menghasilkan banyak sampah kertas bekas (Wahyono, 2001).

2.5 Bakteri *Bacillus subtilis*

2.5.1 Taksonomi *Bacillus subtilis*

Menurut Gordon (1981) dalam Hatmanti (2000) genus *Bacillus* pertama kali dideskripsikan pada tahun 1872 oleh Cohn pada spesies bakteri *Bacillus subtilis*. Bakteri ini pada awalnya diberi nama *Vibrio subtilis* oleh Ehrenberg pada tahun 1835. Menurut Djaenuddin dan Muis (2015) bakteri ini dapat membentuk

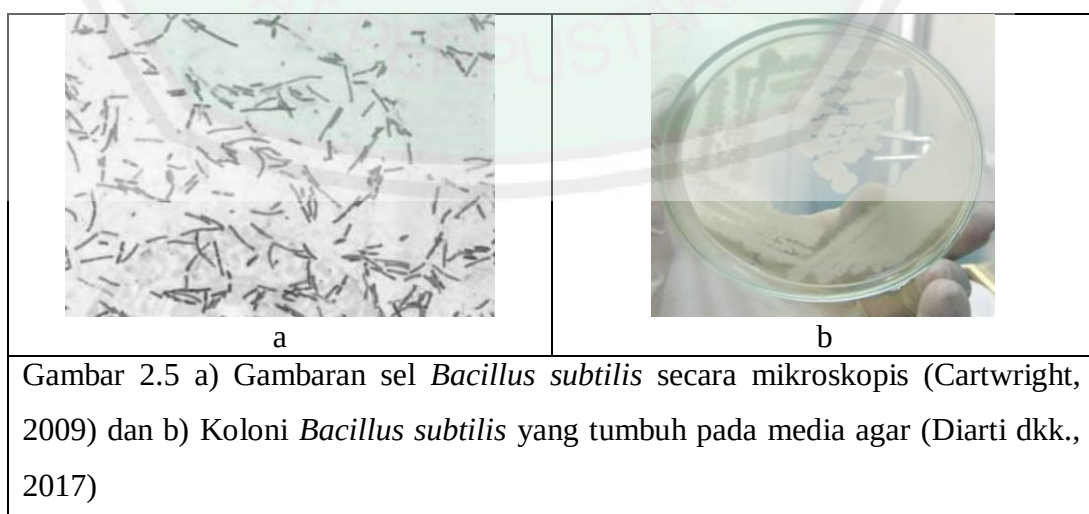
spora sehingga merupakan suatu keuntungan untuk diaplikasikan pada bidang industri dan bioteknologi.

Klasifikasi dari *Bacillus subtilis* adalah sebagai berikut (Fritze, 2004):

Kingdom : Bacteria
 Phylum : Firmicute
 Class : Bacilli
 Ordo : Bacillales
 Family : Bacillaceae
 Genus : Bacillus
 Species : *Bacillus subtilis*

2.5.2 Morfologi dan Fisiologi *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis adalah bakteri berbentuk batang (Gambar 2.1 (a)) dengan ukuran sel 0,8-0,7 / 2–3 um, gram-positif, aerobik, tidak berkapsul, bersifat mobil, dan dapat membentuk endospora pada kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan serta banyak ditemukan di alam. Koloni bakteri ini memiliki permukaan putih atau agak kekuningan, permukaan kasar dan buram, serta tergolong kedalam bakteri mesofilik yang mampu tumbuh pada kisaran suhu 25-35 °C. Dengan adanya spora maka bakteri ini memiliki ketahanan pada berbagai macam kondisi lingkungan seperti pada kondisi kekurangan nutrisi, kondisi asam, basa, osmotik, kondisi oksidatif panas, dan etanol (Saleh *et. al.*, 2014). Adapun gambaran sel *Bacillus subtilis* secara mikroskopis dan pertumbuhan koloninya pada media agar dapat dilihat pada gambar 2.5.



2.5.3 Ekologi dan Habitat *Bacillus subtilis*

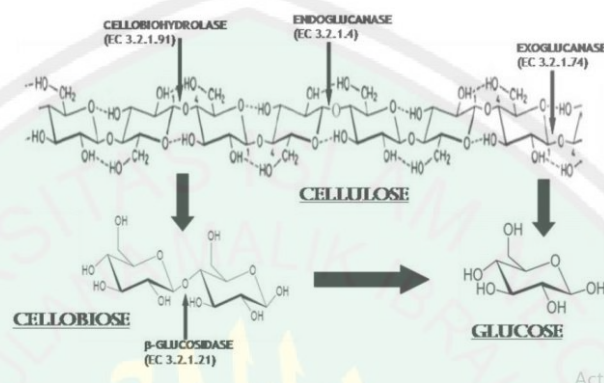
Bakteri *Bacillus subtilis* secara alami dapat ditemukan pada tanah dan tumbuhan. Pada tumbuhan, bakteri ini dapat digunakan sebagai fungisida karena kemampuannya dalam memproduksi kitinase. *B. subtilis* merupakan salah satu bakteri non patogen yang hidup sebagai flora normal pada sistem pencernaan manusia (Saleh *et.al.*, 2014). Menurut Earl *et.al.*, (2008) *Bacillus subtilis* dapat menghasilkan endospora. Endospora berperan sebagai pelindung bakteri dari kondisi lingkungan yang kurang menguntungkan, seperti pada kondisi kekurangan nutrisi, kondisi pH dan suhu yang ekstrim. Hal inilah yang memungkinkan bakteri *Bacillus subtilis* mudah beradaptasi pada berbagai macam kondisi lingkungan (Nicholson, 2002).

2.6 Enzim Selulase

Nama Selulase merupakan gabungan dari kata cellul(ose) dengan akhiran -ase. Nama ini muncul sekitar tahun 1900-1905, sedangkan nama “selulase” sendiri telah muncul antara tahun 1745-1755. Selulase memiliki nomor enzim EC 3.2.1.4, enzim ini mampu mengkatalis reaksi hidrolisis dengan cara memecahkan ikatan 1,4- β -D-glikosidik pada selulosa, likenin, dan cereal β -D-glukan. Secara lebih luas lagi, exoglucanase (EC3.2.1.74 dan EC3.2.1.91) dan β -glukosidase (EC3.2.1.21) juga diklasifikasikan kedalam kelompok selulase (Wu dan Yan, 2013).

Selulase adalah enzim yang mampu menghidrolisis selulosa dengan cara memecah ikatan β -1,4-glikosidik yang ada pada substrat selulosa tersebut. Enzim ini diproduksi oleh mikroorganisme selama masa pertumbuhannya pada medium yang mengandung selulosa (Saranraj *et.al.*, 2012). Proses pemecahan secara biologis atau degradasi pada selulosa (selulolisis) adalah proses sinergis yang dikendalikan secara enzimatis. Tiga jenis enzim yang berperan dalam hidrolisis atau penguraian ikatan glikosida yaitu: endo- β -1,4-glukanase (EG; EC. 3.2.1.4), selobiohidrolase exo- β -1,4-cellobiohydrolase (CBH; EC. 3.2.1.91), dan β -glukosidase (EC. 3.2.1.21), ketiga jenis enzim tersebut terlibat dalam proses hidrolisis selulosa. Untuk menurunkan tingkat polimerisasi rantai selulosa, ikatan β -1,4glikosidik dari untaian selulosa dipecah secara acak oleh endo- β -1,4-glukanase. Selanjutnya, exo- β -1,4-cellobiohydrolase melepaskan selobiosa atau

glukosa dengan menghilangkan subunit di kedua ujung rantai selulosa yang mereduksi dan tidak mereduksi. Kemudian untuk melengkapi proses biodegradasi selulosa, glukosa diproduksi melalui hidrolisis oleh β -glukosidase dari selobiosa atau selodekstrin yang mudah larut (Chatterjee *et.al*, 2015). Adapun mekanisme enzim selulosa dalam menghidrolisis substrat selulosa dapat digambarkan sebagai berikut (Morana, 2011):



Gambar 2.6 Mekanisme enzim selulase dalam menghidrolisis selulosa secara enzimatis (Morana, 2011)

Enzim selulase adalah jenis enzim inducible yang diproduksi oleh mikroorganisme yang memiliki kemampuan dalam menghidrolisis dan menguraikan selulosa. Mikroorganisme yang dapat memproduksi enzim selulase sebagian besar merupakan bakteri dari genus *Acetivibrio*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Thermomonospora*, *Microbispora*, *Streptomyces*, *Ruminococcus*, dsb dan juga beberapa jenis fungi dari genus *Fusarium*, *Chaetomium*, *Penicillium*, *Myrothecium*, *Aspergillus* dan *Trichoderma* (Fariq, 2016).

Mikroorganisme baik jamur maupun bakteri telah diteliti terkait kemampuannya dalam menghasilkan enzim selulase. Sebagian besar produksi enzim selulase telah menggunakan jamur karena kemampuannya untuk menghasilkan enzim selulase dalam jumlah besar dan memiliki struktur enzim selulase yang lebih sederhana dibandingkan enzim selulase yang dihasilkan oleh bakteri sehingga mudah untuk dilakukan ekstraksi dan pemurnian. Namun, pada beberapa penelitian terbaru saat ini, mulai dilakukan isolasi dan karakterisasi enzim selulase yang dihasilkan oleh bakteri. Riset ini didasarkan atas berbagai alasan antara lain: laju pertumbuhan bakteri lebih tinggi dibandingkan jamur yang

memungkinkan untuk produksi enzim yang lebih tinggi, enzim selulase bakteri memiliki struktur yang seringkali lebih kompleks berupa multienzim sehingga dapat meningkatkan kemampuannya dalam menghidrolisis substratnya, bakteri dapat ditemukan pada berbagai macam kondisi lingkungan seperti lingkungan yang panas (termofilik atau psikrofilik, lingkungan dengan pH basa maupun asam (alkalifilik atau asidofilik) dan lingkungan dengan kadar garam tinggi (halofilik) sehingga dapat strain bakteri yang tahan terhadap kondisi stress lingkungan. Strain bakteri ini mampu bertahan hidup dan menghasilkan enzim selulolitik dalam kondisi lingkungan yang keras sehingga dapat digunakan dalam proses biokonversi. Hal ini diharapkan dapat meningkatkan kemampuan hidrolisis enzimatis, fermentasi, dan, pemulihan produk. Para peneliti saat ini sedang berfokus pada pemanfaatan dan peningkatan kemampuan enzim ini untuk digunakan dalam industri biofuel dan bioproduk (Maiti dan Sadhu, 2013).

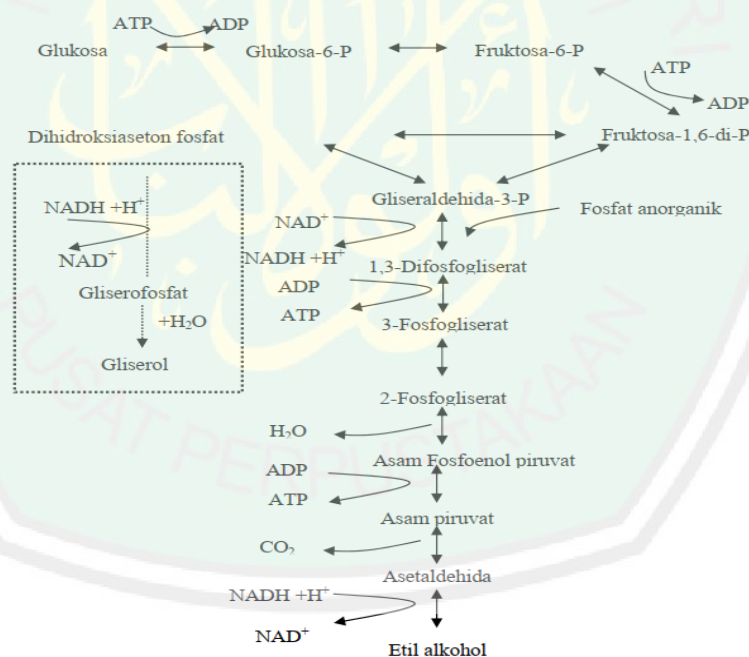
2.7 Fermentasi Etanol

Fermentasi alkohol adalah proses bioteknologi yang dilakukan oleh ragi, beberapa jenis bakteri, atau beberapa mikroorganisme lain untuk mengubah gula menjadi etil alkohol dan karbon dioksida. Dalam proses fermentasi ini, ragi banyak digunakan sebagai biokultur dalam proses produksi minuman beralkohol. Dalam proses fermentasi alkohol, ragi umumnya melakukan proses fermentasi aerobik, tetapi ragi juga dapat memfermentasi bahan mentah dalam kondisi anaerobik. Dengan tidak adanya oksigen, fermentasi alkohol terjadi di dalam sitosol ragi. Fermentasi alkohol dimulai dengan pemecahan gula oleh ragi untuk membentuk molekul piruvat, yang juga dikenal sebagai glikolisis. Pada setiap proses glikolisis, dari pemecahan 1 molekul glukosa akan menghasilkan dua molekul asam piruvat. Dua molekul asam piruvat kemudian direduksi menjadi dua molekul etanol dan 2 CO₂ (Malakar *et.al*, 2020)

Langkah pertama dari jalur fermentasi alkohol melibatkan piruvat, yang dibentuk oleh ragi melalui jalur EMP. (Ciani *et.al*, 2013). Jalur Embden-Meyenhorf-Parnas (EMP), rangkaian reaksi yang berlangsung sempurna di dalam sitosol, merupakan proses transformasi intraseluler glukosa (dan fruktosa) menjadi piruvat bersama dengan pembentukan ATP dan NADH. Awalnya, heksosa diangkut di dalam sel, dengan difusi terfasilitasi tanpa perlu konsumsi

energi (Sarris dan Papanikolao, 2016). Proses glikolisis dan fermentasi etanol secara lengkap ada pada gambar 2.7.

Tahap pertama glikolisis adalah pengubahan glukosa menjadi fruktosa 1,6-bifosfat, membutuhkan 2 molekul ATP, yang terdiri dari tiga langkah: fosforilasi awal glukosa menuju pembentukan glukosa 6-fosfat, yang dikatalisasi oleh sekelompok enzim yang disebut heksokinase (PI heksokinase tidak aktif sampai fase stasioner, karena sebagian tertekan oleh glukosa; PII heksokinase sangat penting dan terutama aktif selama fase log dalam media konsentrasi gula tinggi). Reaksi ini mengkonsumsi ATP, tetapi menjaga konsentrasi heksosa intraseluler rendah dan dengan demikian mendukung pengangkutan gula secara terus menerus ke dalam sel melalui pengangkut membran plasma. Setelah itu, terjadi isomerisasi glukosa 6-fosfat menjadi fruktosa-6-fosfat oleh isomerase fosfoglukosa, diikuti oleh fosforilasi fruktosa-6-fosfat oleh aksi fosfofruktokinase (PFK), membentuk fruktosa-1,6-bifosfat dan mengkonsumsi satu ATP molekul Sarris dan Papanikolao, 2016).



Keterangan : ATP	= Adenin trifosfat
ADP	= Adenin difosfat
NAD	= Nikotinamida adenin dinukleotida
NADP	= Nikotinamida adenin dinukleotida fosfat
NADH	= Nikotinamida adenin dinukleotida tereduksi

Gambar 2.7 Fermentasi glukosa melalui tahap glikolisis jalur *Embden Meyerhof-Parnas Pathway* (Subekti, 2006).

Pada tahap kedua glikolisis (jalur C3), dua isomer triosa fosfat, yaitu gliseraldehida-3-fosfat (G3P) dan dihidroksiaseton fosfat terbentuk ketika fruktosa 1,6-bifosfat dipecah oleh aksi katalitik aldolase. Reaksi ini menghasilkan proporsi yang jauh lebih besar dari dihidroksiaseton fosfat (DHAP) (96%), yang dengan cepat diubah menjadi G3P oleh triosa fosfat isomerase. Kemudian, G3P diubah menjadi 1,3-bifosfoglisarat (1,3-BGP), reaksi dikatalisis oleh gliseraldehida 3-fosfat dehidrogenase. Reaksi ini melibatkan sintesis satu mol NADH. Setelah itu, 1,3-BGP diubah menjadi 3-fosfoglisarat, reaksi dikatalisis oleh fosfoglisarat kinase, dengan pelepasan satu mol ATP secara bersamaan. Langkah terakhir glikolisis mengubah 3-fosfoglisarat menjadi piruvat yang merupakan produk akhir glukolisis. Fosfoglikero-mutase mengkatalisis konversi 3-fosfo-gliserat menjadi 2-fosfoglisarat yang didehidrasi oleh enzim enolase, membentuk fosfoenolpiruvat (PEP). Akhirnya, PEP diubah menjadi asam piruvat, reaksi yang dikatalisis oleh piruvat kinase, dengan pembentukan mol ATP lain secara simultan. Dengan cara ini, dari satu mol glukosa, glikolisis menghasilkan dua mol asam piruvat, empat mol ATP dan dua mol NADH. Karena dua molekul ATP telah segera digunakan untuk mengaktifkan molekul heksosa baru, perolehan energi bersih dari glikolisis untuk sel adalah dua molekul ATP per molekul heksosa yang dimetabolisme. Piruvat yang diproduksi oleh glikolisis dapat digunakan oleh ragi untuk beberapa jalur metabolisme. Pada kenyatannya, mikroorganisme harus meregenerasi NAD^+ dari NADH untuk membangun kembali potensi reduksi oksido sel. Ini bisa dilakukan dengan fermentasi atau respirasi. Tahap ini menandai akhir glikolisis (Sarris dan Papanikolao, 2016).

Daya reduksi NADH yang dihasilkan melalui glikolisis harus ditransfer ke akseptor elektron untuk meregenerasi NAD^+ yang digunakan dalam glikolisis. Dalam kasus *S. cerevisiae* dan spesies ragi lainnya, proses ini disebut fermentasi alkohol dan berlangsung didalam sitoplasma, dimana asetaldehida (etanal; produk dekarboksilasi asam piruvat) berfungsi sebagai akseptor elektron terminal. Sehubungan dengan glikolisis, fermentasi alkohol mengandung dua reaksi enzimatik tambahan. Piruvat awalnya dekarboksilasi menjadi asetaldehida oleh dekarboksilase piruvat. Kofaktornya adalah tiamin pirofosfat (TPP) dan magnesium. Kemudian asetaldehida direduksi menjadi etanol daur ulang NADH

menjadi NAD⁺. Reaksi ini dikatalisis oleh alkohol dehidrogenase menggunakan zinc sebagai kofaktor. Kedua produk akhir fermentasi alkohol, etanol dan karbon dioksida, diangkut ke luar sel melalui difusi sederhana (Sarris dan Papanikolao, 2016).

Menurut Azhar *et.al* (2017) Terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi produksi bioetanol diantaranya suhu, konsentrasi gula, pH, lama fermentasi. Selain itu, menurut Hasanah (2008) faktor lainnya yang berpengaruh yaitu nutrient, aerasi, dan jenis mikroba yang digunakan.

a. Suhu

Tingkat pertumbuhan mikroorganisme secara langsung dipengaruhi oleh suhu. Tinggi suhu yang tidak mendukung pertumbuhan sel menjadi factor stres mikroorganisme (Azhar *et.al*, 2017). Suhu merupakan faktor yang sangat penting untuk diperhatikan selama fermentasi karena dapat berpengaruh pada proses fermentasi dan produksi etanol oleh mikroorganisme. Mikroorganisme yang digunakan dalam fermentasi memiliki rentang suhu optimal agar pertumbuhannya dapat berlangsung dengan baik. Secara umum, suhu yang ideal selama fermentasi adalah antara 20-35°C. Suhu optimal untuk pertumbuhan khamir *S. cerevisiae* adalah mendekati 30°C (Zabed *et.al.*, 2014).

b. Konsentrasi Gula

Faktor lainnya yang berperan selama fermentasi adalah konsentrasi gula. konsentrasi gula merupakan faktor yang penting dalam fermentasi karena dapat mempengaruhi laju fermentasi oleh mikroba. Laju fermentasi akan meningkat dengan peningkatan konsentrasi gula pada medium sampai pada level tertentu. Akan tetapi, konsentrasi gula yang terlalu tinggi akan menghambat kemampuan mikroba dalam memfermentasikan gula (Zabed *et.al.*, 2014).

c. Derajat Keasaman (pH)

Produksi etanol dipengaruhi oleh pH medium yang dapat berpengaruh pada kontaminasi bakteri, pertumbuhan khamir, laju fermentasi dan pembentukan produk sampingan. Derajat keasaman (pH) merupakan salah satu faktor kunci dalam proses fermentasi karena dapat berpengaruh langsung terhadap proses seluler mikroorganisme selama fermentasi (Zabed *et.al.*, 2014). Menurut Fadilah dkk., (2018) setiap mikroorganisme memiliki nilai pH tertentu agar

pertumbuhannya dapat berlangsung secara optimal. pH dalam medium fermentasi dapat mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme dan pembentukan produk akhir hasil fermentasi. Produksi bioetanol dapat ditingkatkan dengan mengatur pH pada medium fermentasi pada kisaran nilai tertentu. Secara umum, konsentrasi ion H^+ pada medium fermentasi dapat mempengaruhi permeabilitas dan transpor nutrisi ke dalam sel. Permeabilitas beberapa nutrisi penting menjadi sel dipengaruhi oleh konsentrasi H^+ dalam larutan. Apalagi kelangsungan hidup dan pertumbuhan khamir dipengaruhi oleh pH dalam kisaran 2,75–4,25. Dalam produksi bioetanol, kisaran pH optimum *S. cerevisiae* adalah 4,0–5,0. Saat pH di bawah 4,0, diperlukan masa inkubasi yang lebih lama, namun konsentrasi etanol tidak berkurang secara signifikan. Namun, bila kemudian pH di atas 5,0, konsentrasi etanol akan berkurang secara substansial (Azhar *et.al*, 2017).

d. Lama Fermentasi

Lama fermentasi biasanya ditentukan oleh jenis substrat dan jenis ragi yang digunakan. Proses fermentasi akan berhenti yang ditandai dengan tidak terbentuk lagi CO_2 . Kadar etanol akan yang dihasilkan akan semakin tinggi pada waktu fermentasi yang optimal dan setelah itu kadar etanol akan menurun (Judoamidjojo, 1990). Menurut Hidayat dkk., (2006) fermentasi alkohol membutuhkan waktu sekitar 30–40 jam. Sementara itu, Menurut Wahyudi (1997) lama waktu fermentasi bioetanol yang optimum adalah pada saat hari ke-7. Sementara itu, Menurut Utami dkk., (2012) fermentasi bioetanol dapat berlangsung sempurna dalam kurun waktu 6 hari.

e. Nutrien

Mikroorganisme memerlukan nutrien yang terdiri atas unsur makro dan mikro untuk mendukung pertumbuhannya. Menurut Halimatuddahlia (2003) Nutrien makro terdiri dari unsur karbon, nitrogen, fosfor dan kalium. Sedangkan unsur mikro terdiri dari vitamin, dan beberapa jenis mineral antara lain: kalsium, magnesium, natrium, sulfur, klorida, besi, mangan, tembaga, kobalt, boron, seng, molibdenum, dan aluminium (Iriyanto, 2007).

f. Aerasi

Aerasi merupakan salah satu faktor yang berpengaruh pada fermentasi. Hal ini didasarkan pada kemampuan mikroorganisme dalam menggunakan

oksigen bebas. Berdasarkan kemampuannya dalam menggunakan oksigen bebas, mikroorganisme diklasifikasikan menjadi tiga kelompok yaitu : anaerob (mikroorganisme yang dapat hidup pada kondisi tidak adanya oksigen), aerob (mikroorganisme yang memerlukan oksigen bebas untuk mendukung pertumbuhannya) dan fakultatif (mikroorganisme yang tetap bisa tumbuh dengan baik saat tersedianya O₂ bebas maupun tidak). Fardiaz (1988) menyatakan bahwa sebagian besar khamir tergolong kedalam mikroorganisme aerob. Kemampuan khamir aerob dalam menghasilkan alkohol lebih banyak dibanding dengan khamir anaerob. Menurut Hidayat dkk., (2006) Aerasi merupakan hal penting yang harus diperhatikan dan dijaga selama proses fermentasi karena dapat berpengaruh terhadap bioetanol yang dihasilkan. Oleh karena itu, maka aerasi harus dilakukan secara tepat dan tidak berlebihan.

g. Jenis mikroba yang digunakan

Sejak ribuan tahun yang lalu, ragi seperti *S. cerevisiae* telah digunakan dalam produksi alkohol terutama di industri pembuatan bir dan anggur. Hal ini untuk menjaga biaya distilasi tetap rendah dan memberikan hasil etanol yang tinggi, produktivitas tinggi dan dapat toleran terhadap konsentrasi etanol yang tinggi. Saat ini, ragi digunakan untuk menghasilkan bahan bakar etanol dari sumber energi terbarukan. Strain ragi tertentu seperti *Pichia spites*, *S. cerevisiae* dan *Kluyveromyces fragilis* dilaporkan sebagai penghasil etanol yang baik dari berbagai jenis gula. *S. cerevisiae* adalah ragi yang paling umum digunakan dalam produksi etanol industri karena mampu mentoleransi berbagai macam kondisi pH. Ragi roti secara tradisional digunakan sebagai kultur starter dalam produksi etanol karena biayanya yang rendah dan ketersediaannya yang mudah (Azhar *et.al*, 2017).

2.8 Ragi Roti

Ragi *Saccharomyces cerevisiae* merupakan mikroorganisme yang dikembangkan untuk pertama kali dalam proses produksi minuman beralkohol. Ragi *Saccharomyces cerevisiae* memiliki nilai komersial yang tinggi karena kemampuannya dalam menghasilkan alkohol dari proses fermentasi karbohidrat. Oleh karena itu, ragi ini memiliki peranan penting dalam industri fermentasi di Indonesia. Sejalan dengan kemajuan ilmu pengetahuan dan

teknologi, ragi *Saccharomyces cerevisiae* tidak hanya digunakan pada bidang bioteknologi tradisional, namun telah meluas ke berbagai sektor komersil seperti: makanan, minuman, farmasi, pertanian, industri enzim, dan dalam pembuatan bahan bakar alternatif (biofuel) (Senam, 2009).

Taksonomi dari *Saccharomyces cerevisiae* adalah (Rehm dan Reed, 1983):

Kingdom	:Fungi
Divisi	:Eumicotina
Kelas	:Hemiascomycetes
Ordo	:Endomycetales
Famili	:Saccharomycetaceae
Genus	:Saccharomyces
Spesies	: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Khamir *Saccharomyces cerevisiae* mampu memfermentasikan gula menjadi etanol karena adanya peran dari dua jenis enzim yaitu enzim invertase dan enzim zimase. sehingga mikroba ini mampu. Enzim invertase berperan dalam menghidrolisis disakarida (contohnya sukrosa) menjadi mono sakarida, sedangkan enzim zimase berperan dalam mengubah mono sakarida (glukosa) menjadi alkohol dan karbondioksida. Dengan adanya kedua jenis enzim tersebut, maka *Saccharomyces cerevisiae* mampu mengkonversikan gula baik dari kelompok monosakarida (glukosa) maupun dari kelompok disakarida (sukrosa) (Judoamidjojo dkk., 1992).

2.9 Destilasi Bioetanol

Metode destilasi merupakan metode pemisahan suatu larutan dari campurannya berdasarkan pada perbedaan titik didihnya atau berdasarkan kemampuan zat untuk menguap. Selama proses destilasi, larutan akan dipanaskan sampai mendidih. Zat cair yang memiliki titik didih lebih rendah akan menguap terlebih dahulu dibandingkan dengan zat cair yang memiliki titik didih lebih tinggi, sehingga kedua zat tersebut dapat dipisahkan (Seftian dkk., 2012). Lalu uap yang dihasilkan akan dialirkan ke dalam kondensor. Selanjutnya akan terjadi pengembunan dan zat cair yang telah mengembun tersebut ditampung dalam wadah khusus. (Al Zenius dkk., 2016). Cairan hasil destilasi yang keluar dari

kondensor disebut sebagai destilat sedangkan cairan yang masih tertinggal di dalam labu destilasi disebut sebagai residu (Jhonprimen dkk., 2012).



BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial yang terdiri dari 2 faktor. Faktor pertama adalah variasi jumlah ragi roti (*Saccharomyces cerevisiae*) yang terdiri dari 3 taraf yaitu 3 gram, 4 gram, dan 5 gram. Faktor kedua adalah variasi lama fermentasi yang terdiri dari 4 taraf yaitu 2 hari, 4 hari, 6 hari, dan 8 hari. Pada masing-masing faktor dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Berdasarkan pada kedua faktor tersebut, maka akan didapatkan 12 kombinasi perlakuan sebagai berikut:

Lama Fermentasi (F)	Jumlah Ragi (R)		
	R1	R2	R3
F1	R1F1	R2F1	R3F1
F2	R1F2	R2F2	R3F2
F3	R1F3	R2F3	R3F3
F4	R1F4	R2F4	R3F4

Keterangan:

R1F1: Jumlah ragi 3 gram, lama fermentasi 2 hari

R1F2: Jumlah ragi 3 gram, lama fermentasi 4 hari

R1F3: Jumlah ragi 3 gram, lama fermentasi 6 hari

R1F4: Jumlah ragi 3 gram, lama fermentasi 8 hari

R2F1: Jumlah ragi 4 gram, lama fermentasi 2 hari

R2F2: Jumlah ragi 4 gram, lama fermentasi 4 hari

R2F3: Jumlah ragi 4 gram, lama fermentasi 6 hari

R2F4: Jumlah ragi 4 gram, lama fermentasi 8 hari

R3F1: Jumlah ragi 5 gram, lama fermentasi 2 hari

R3F2: Jumlah ragi 5 gram, lama fermentasi 4 hari

R3F3: Jumlah ragi 5 gram, lama fermentasi 6 hari

R3F4: Jumlah ragi 5 gram, lama fermentasi 8 hari

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Desember 2019-Februari 2020 di dua laboratorium yaitu proses pembuatan enzim selulase di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi, proses hidrolisis substrat dan fermentasi di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi, proses destilasi bioetanol di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia, dan proses pengukuran kadar etanol di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.3 Variabel Penelitian

Variabel yang ada pada penelitian ini terdiri dari dua variabel yaitu variabel bebas dan variabel terikat.

1. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi jumlah ragi roti (3 gram, 4 gram, dan 5 gram) dan lama fermentasi (2 hari, 4 hari, 6 hari, dan 8 hari).
2. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar etanol.

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: ember, saringan, blender, baskom, oven, neraca analitik, gelas beker, tabung reaksi, kawat ose, gunting, cawan petri, bunsen, shaker inkubator, laminar air flow, sentrifus, autoclave, mikro pipet, blue tip, tube 15 ml, botol selai, selang kecil, isolasi, picnometer, alat destilasi, pH meter digital dan termometer.

3.4.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: air, kertas HVS bekas, aquades, NaOH 2%, Alkohol 70%, media NA, media NB, isolat *Bacillus subtilis*, CMC, peptone, yeast extract, K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnCl_4 \cdot 4H_2O$, KH_2PO_4 , $(NH_4)_2SO_4$, plastisin, ragi roti komersil merk “Saf-Instant”, dan tissue.

3.5. Prosedur Penelitian

3.5.1. Penyiapan Substrat Kertas HVS Bekas

Disiapkan kertas HVS bekas, lalu kertas digunting kecil-kecil dengan ukuran 1x1 cm. Kemudian ditimbang sebanyak satu kilogram kertas, lalu dimasukkan dalam 20 liter air (rasio 1:20), kemudian dilakukan perendaman

selama 24 jam. Selanjutnya disaring dan dihancurkan menggunakan blender sampai menjadi bubur kertas (pulp) (Asokan *et. al.*, 2018). Kemudian sampel pulp dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C selama semalaman. Kertas yang telah kering selanjutnya diblender sampai menjadi serbuk yang halus (Saeed *et. al.*, 2018).

3.5.2 Delignifikasi Kertas HVS Bekas

Serbuk kertas HVS bekas didelignifikasi menggunakan larutan NaOH 2% dengan perbandingan serbuk kertas:air (1:20 b/v) selama 4 jam pada suhu ruang. Proses ini bertujuan untuk mengurangi kandungan lignin pada serbuk kertas. Setelah proses delignifikasi selesai, selanjutnya dibilas hingga pH netral dan dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C untuk mendapatkan berat yang konstan (Akhtar *et.al.*, 2001).

3.5.3 Penyiapan Kultur Bakteri *Bacillus subtilis*

3.5.3.1 Pembuatan Media NA (Nutrient Agar)

Pembuatan Media NA (*Nutrient Agar*) dilakukan dengan cara ditimbang media NA (*Nutrient Agar*) sebanyak 2,3 gram, kemudian dimasukkan kedalam gelas beker, lalu ditambah 100 mL aquadest. Kemudian larutan tersebut dipanaskan diatas hotplate sambil diaduk-aduk sampai media NA larut dengan sempurna. Selanjutnya media NA disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit. Selanjutnya, Media NA (*Nutrient Agar*) yang telah disterilisasi siap untuk digunakan (Sholihati dkk., 2015).

3.5.3.2 Pembuatan Media NB (Nutrient Broth)

Pembuatan media NB (*Nutrient Broth*) dilakukan dengan cara ditimbang *Nutrient Broth* sebanyak 8 gr, lalu dilarutkan dalam 1 liter aquades dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* hingga homogen. Selanjutnya media disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Pratiwi, 2015).

3.5.3.3 Peremajaan Isolat Bakteri *Bacillus subtilis*

Proses peremajaan isolat bakteri *Bacillus subtilis* dilakukan dengan cara diambil sebanyak satu ose stok isolat secara aseptik, lalu diinokulasikan kedalam media NA (*Nutrient Agar*) miring steril, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Rahmi dkk., 2013).

3.5.3.4 Pengembangbiakan Bakteri *Bacillus subtilis*

Isolat bakteri *Bacillus subtilis* dikembangkan dan diperbanyak dengan cara diambil sebanyak 1 ose penuh isolat bakteri *Bacillus subtilis* dari media NA miring yang telah berumur 24 jam secara aseptis lalu diinokulasikan kedalam 25 mL media NB steril. Setelah itu, dimasukkan kedalam shaker inkubator dan diinkubasi pada suhu 37°C dengan kecepatan agitasi 140 rpm selama 24 jam. Sel bakteri yang telah dikembangkan dan diperbanyak selanjutnya dapat digunakan sebagai inokulum (Arshad *et.al.*, 2017).

3.5.4 Produksi Enzim Selulase Kasar *Bacillus subtilis*

Prosedur yang dilakukan untuk memproduksi enzim selulase kasar dari *Bacillus subtilis* adalah dibuat 50 mL medium produksi dengan komposisi: CMC 18gr/l, yeast extract 5gr/l, pepton 8gr/l, MgSO₄·7H₂O 0.25gr/l, K₂HPO₄ 1gr/l, FeSO₄·7H₂O 0.25gr/l, dan MnCl₂·4H₂O 0.5gr/l, lalu dicampur dengan aquades dan diaduk sampai benar-benar larut. Medium kemudian di sterilisasi menggunakan autoklaf dengan temperatur 121°C selama 15 menit. Selanjutnya diambil 2 persen (v/v) inokulum ditambahkan kedalam medium produksi, lalu di inkubasi dalam shaker incubator pada temperatur 37 °C, dengan kecepatan agitasi 140 rpm selama 48 jam. Dilakukan proses sentrifugasi dingin pada suhu 4°C dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit, kemudian dipisahkan antara supernatan dan peletnya. Diambil bagian supernatan yang merupakan enzim selulase kasar (Sholihati dkk., 2015).

3.5.5 Hidrolisis Kertas HVS Bekas dengan Enzim Selulase Kasar

Proses hidrolisis kertas HVS bekas menggunakan enzim selulase kasar *Bacillus subtilis*. Tujuan dari proses hidrolisis enzimatik ini adalah untuk menghidrolisis selulosa menjadi glukosa. Langkah-langkah yang dilakukan adalah serbuk kertas HVS bekas ditimbang sebanyak 5 gr ke dalam erlenmeyer 250 mL yang sudah disterilisasi kemudian ditambahkan aquades sebanyak 200 mL dan 7 mL enzim *selulase* lalu dihomogenkan (Fuadi dkk., 2015). Selanjutnya diatur pH nya hingga 5,5 kemudian diinkubasi selama 96 jam pada suhu 37° C (Amelia, 2012).

3.5.6 Fermentasi Larutan Glukosa Hasil Hidrolisis

Proses fermentasi bertujuan untuk mengubah glukosa menjadi etanol dengan bantuan khamir dari ragi roti. Proses fermentasi dilakukan dengan cara dimasukkan larutan glukosa hasil hidrolisis sebanyak 200 mL dalam labu Erlenmeyer. Lalu di tambah dengan 0.2 gram KH_2PO_4 , 0.2 gram $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 gram $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dan diaduk hingga homogen. Kemudian larutan disterilisasi dengan *autoclave* selama 1 jam pada temperatur 121°C , lalu didiamkan sampai menjadi dingin. Ragi roti ditambahkan sebanyak 3 gram, 4 gram dan 5 gram. Selanjutnya dilakukan fermentasi selama 2, 4, 6, dan 8 hari pada masing-masing variasi jumlah ragi (Susanto dkk., 2012).

3.5.7 Destilasi Larutan Hasil Fermentasi

Proses destilasi dilakukan dengan cara dimasukkan larutan hasil fermentasi ke dalam alat destilasi. Selanjutnya larutan dipanaskan pada suhu 79°C agar campuran antara alkohol dan air dapat dipisahkan, karena titik didih alkohol berkisar pada suhu $78\text{--}80^\circ\text{C}$ sedangkan titik didih air pada suhu 100°C . Selanjutnya uap hasil destilasi dialirkan kedalam kondensor agar mengalami pengembunan. Cairan yang telah mengembun selanjutnya ditampung dalam Erlenmeyer (Kurniawati, 2009).

3.5.8 Pengukuran Kadar Etanol dengan Metode Berat Jenis Menggunakan Piknometer

3.5.8.1 Pembuatan Larutan Standar Etanol

Pembuatan larutan standar etanol menggunakan larutan etanol absolut. Larutan standar etanol dibuat dengan metode pengenceran untuk mengetahui perbandingan antara jumlah volume larutan etanol stok dengan volume aquades yang dibutuhkan. Larutan standar etanol dibuat dalam konsentrasi 0%, 2%, 4%, 6%, 8%, dan 10% (Muhammad, 2014).

3.5.8.2 Pembuatan Kurva Standar Etanol

Pembuatan kurva standar etanol menggunakan larutan etanol absolut yang digunakan sebagai larutan stok. Pembuatan kurva standar etanol dilakukan menggunakan piknometer dengan cara menghitung berat jenis dari masing-masing konsentasi larutan etanol yang telah dibuat sebelumnya. Prosedur pengukuran berat jenis dilakukan dengan cara mula-mula dibersihkan piknometer, lalu di

keringkan dan ditimbang beratnya. Selanjutnya diisi dengan aquades sampai penuh. Kelebihan cairan yang tumpah dibersihkan dan di lap dengan tissue. Selanjutnya piknometer berisi aquades tersebut ditimbang dan dicatat beratnya. Cara demikian dilakukan juga untuk larutan baku etanol. Prosedur penghitungan berat jenis ini dapat di nyatakan dalam rumus sebagai berikut (Muhamad, 2014):

$$\text{Berat jenis sampel: } \frac{\text{Berat Larutan Baku Etanol} - \text{Berat Piknometer}}{\text{Berat Aquades} - \text{Berat Piknometer}}$$

Setelah didapatkan data hasil pengukuran berat jenis, maka dibuatlah persamaan kurva baku etanol dengan cara membuat plot hubungan berat jenis dengan konsentrasi dari tiap-tiap larutan etanol. Setelah kurva telah berhasil dibuat, maka akan muncul rumus persamaan linier sebagai berikut:

$$y = ax + b$$

Keterangan:

y= Berat jenis sampel

x= Kadar etanol sampel

3.5.8.3 Pengukuran Kadar Etanol Sampel Menggunakan Piknometer

Prosedur pengukuran kadar etanol sampel menggunakan piknometer dilakukan dengan cara dikeringkan piknometer pada suhu 100°C selama 10 menit dalam oven, selanjutnya dibiarkan dingin hingga mencapai suhu ruang. Setelah itu, ditimbang berat piknometer menggunakan neraca analitik. Kemudian dimasukkan sampel hasil destilasi sampai memenuhi piknometer. Apabila ada cairan sampel yang tumpah pada puncak pipa kapiler, maka kelebihan cairan tersebut dibersihkan dengan tissue. Selanjutnya ditimbang piknometer berisi sampel tersebut dan dicatat beratnya. Cara serupa di lakukan juga terhadap aquades sebagai pembandingnya (Suherman, 2017). Pada saat piknometer ditimbang, dicatat juga suhu ruangnya. Kemudian diukur berat jenis etanol dengan piknometer. Kadar etanol pada sampel di tentukan berdasarkan persamaan dari kurva baku etanol yang telah dibuat sebelumnya (Muhammad, 2014).

3.5.9 Analisis Data

Penelitian ini menggunakan rancangan percobaan berupa Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial. Data pengaruh variasi jumlah ragi roti dan lama fermentasi kertas HVS bekas pakai terhadap kadar etanol dianalisis secara statistik menggunakan ANOVA (*Analysis of Variance*). Selanjutnya untuk mengetahui

apakah perlakuan yang diberikan berpengaruh nyata terhadap parameter maka dilakukan uji lanjut *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf 5%.



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Produk Enzim Selulase Kasar *Bacillus subtilis* dan Hidrolisis Kertas HVS Bekas

Pada tahap awal, dilakukan proses penghancuran kertas HVS bekas menjadi ukuran yang lebih kecil untuk memudahkan dalam proses pembuatan serbuk kertas HVS bekas. Proses selanjutnya adalah dilakukan delignifikasi menggunakan alkali (NaOH). Proses delignifikasi bertujuan untuk mendegradasi kandungan lignin sehingga selulosa dalam kertas dapat dihidrolisis. Menurut Dinca *et.al* (2017) *pretreatment* alkali melibatkan penggunaan basa, seperti natrium, kalium, kalsium, dan amonium hidroksida, untuk perlakuan awal biomassa lignoselulosa. Penggunaan alkali menyebabkan degradasi rantai samping ester dan glikosidik yang menghasilkan perubahan struktur lignin, pengembangan selulosa, dekrystalisasi parsial selulosa dan larutnya sebagian hemiselulosa. Sasmal & Mohanty (2018) menambahkan bahwa reaksi utama selama proses *pretreatment* alkali adalah disosiasi (terpisahnya) lignin dari molekul gula (selulosa dan hemiselulosa) melalui reaksi saponifikasi antar molekul ester. Selain itu, proses proses *pretreatment* menggunakan alkali memiliki beberapa kelebihan. Menurut Sasmal & Mohanty (2018) proses *pretreatment* alkali dapat dilakukan pada suhu rendah dibandingkan proses *pretreatment* lainnya, senyawa basa dapat bereaksi langsung pada lignin sehingga komponen gula menjadi tidak terpengaruh. Hal tersebut merupakan tujuan utama untuk setiap proses produksi biofuel. Hasil yang diharapkan dari tahapan delignifikasi ini adalah berkurangnya kandungan lignin, larutnya sebagian hemiselulosa dan berkurangnya tingkat kristalinitas (kerapatan) selulosa sehingga memudahkan dalam proses hidrolisis.

Proses produksi enzim selulase kasar *Bacillus subtilis* dilakukan pada medium yang mengandung selulosa dan diperkaya dengan tambahan nutrisi lainnya. Hal ini dilakukan karena *Bacillus subtilis* mampu memproduksi enzim selulase apabila ditumbuhkan dalam medium yang mengandung selulosa. Menurut Saranraj *et.al.*, (2012) enzim selulase dapat diproduksi oleh mikroorganisme selama masa pertumbuhannya pada medium yang mengandung

selulosa. Untuk memperoleh enzim selulase kasar dari *Bacillus subtilis*, maka medium produksi enzim disentrifugasi dingin (4°C) untuk memisahkan supernatan dan pelet. Sentrifugasi pada suhu dingin dilakukan untuk menjaga agar enzim tidak rusak atau terdegradasi. Setelah keduanya terpisahkan, maka diambil bagian supernatan yang merupakan enzim selulase kasar *Bacillus subtilis*. Hasil enzim selulase kasar dari *Bacillus subtilis* dapat dilihat pada gambar 4.1. Enzim selulase kasar *Bacillus subtilis* yang dihasilkan dalam penelitian ini sebanyak 260 ml, dengan karakteristik warna orange, viskositas encer, dan bau yang khas. Enzim selulase kasar ini selanjutnya digunakan dalam proses hidrolisis enzimatik kertas HVS bekas.



Gambar 4.1 Enzim selulase kasar *Bacillus subtilis*

Proses hidrolisis enzimatik kertas HVS bekas menggunakan enzim selulase kasar *Bacillus subtilis*. Hidrolisis enzimatik dipilih karena berbagai keunggulannya antara lain: proses hidrolisis berlangsung secara lebih lembut (*mild process*), berlangsung pada suhu yang tidak terlalu tinggi, tidak menimbulkan korosi pada peralatan yang digunakan dan tidak menghasilkan residu yang berbahaya bagi lingkungan sehingga lebih ramah lingkungan. Hal tersebut didukung oleh pernyataan Fuadi dkk., (2015) bahwa proses hidrolisis menggunakan enzim mempunyai berbagai keuntungan apabila di bandingkan dengan hidrolisis menggunakan asam antara lain: tidak menyebabkan penurunan kadar glukosa setelah proses hidrolisis, suasana reaksi mild process (berlangsung lebih lunak pada suhu 45°–50°C dan pH sekitar 4,7-4,8), lebih ramah lingkungan, tidak mengakibatkan terjadinya reaksi samping, dan tidak menyebabkan korosi pada peralatan yang digunakan karena tidak menggunakan bahan-bahan yang

bersifat korosif sehingga biaya perawatan dan pemeliharaan alat menjadi lebih rendah.

Enzim yang digunakan dalam proses hidrolisis adalah enzim selulase yang dihasilkan oleh bakteri *Bacillus subtilis*. Selulase adalah enzim yang mampu menghidrolisis selulosa dengan cara memecah ikatan β -1,4-glikosidik yang ada pada substrat selulosa tersebut (Saranraj *et.al.*, 2012).

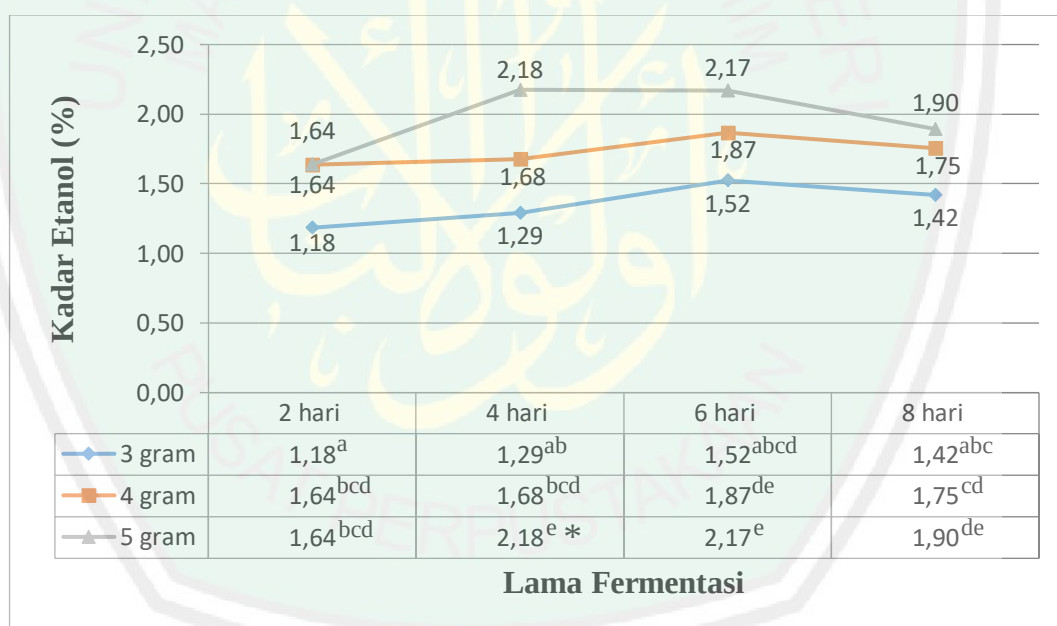
Proses pemecahan secara biologis atau degradasi pada selulosa/selulolisis adalah proses sinergis yang dikendalikan secara enzimatik. Ada tiga jenis enzim yang berperan dalam hidrolisis atau penguraian ikatan glikosida yaitu: endo- β -1,4-glukanase (EG; EC.3.2.1.4), selobiohidrolase exo- β -1,4-cellobiohydrolase (CBH; EC. 3.2.1.91), dan β -glukosidase (EC. 3.2.1.21), ketiga jenis enzim tersebut terlibat dalam proses hidrolisis selulosa. Untuk menurunkan tingkat polimerisasi rantai selulosa, ikatan β -1,4glikosidik dari untai selulosa dipecah secara acak oleh endo- β -1,4-glukanase. Selanjutnya, exo- β -1,4-cellobiohydrolase melepaskan selobiosa atau glukosa dengan menghilangkan subunit di kedua ujung rantai selulosa yang mereduksi dan tidak mereduksi. Kemudian untuk melengkapi proses biodegradasi selulosa, glukosa diproduksi melalui hidrolisis oleh β -glukosidase dari selobiosa atau selodekstrin yang mudah larut (Chatterjee *et.al*, 2015). Hasil yang diharapkan dari proses hidrolisis enzimatik ini adalah glukosa dari hasil pemecahan selulosa yang ada pada kertas HVS bekas.

4.2 Pengaruh Interaksi Jumlah Ragi Roti (*Saccharomyces cerevisiae*) dan Lama Fermentasi terhadap Kadar Etanol dari Kertas HVS Bekas

Glukosa yang telah dihasilkan dari proses hidrolisis kertas HVS bekas kemudian difermentasi menggunakan khamir (*Saccharomyces cerevisiae*) yang diperoleh dari ragi roti. Proses fermentasi dilakukan dalam kondisi anaerob pada suhu ruang ($\pm 27^{\circ}\text{C}$) karena secara umum, suhu yang ideal selama fermentasi adalah antara $20\text{--}35^{\circ}\text{C}$ sedangkan suhu optimal untuk pertumbuhan khamir *S. cerevisiae* adalah mendekati 30°C (Zabed *et.al.*, 2014). Dalam proses fermentasi alkohol, ragi umumnya melakukan proses fermentasi aerobik, tetapi ragi juga dapat memfermentasikan gula dalam kondisi anaerobik. Dengan tidak adanya oksigen, fermentasi alkohol terjadi di dalam sitosol ragi. Fermentasi alkohol dimulai dengan pemecahan gula oleh ragi untuk membentuk molekul piruvat,

yang juga dikenal sebagai glikolisis. Pada setiap proses glikolisis, dari pemecahan 1 molekul glukosa akan menghasilkan dua molekul asam piruvat. Dua molekul asam piruvat kemudian direduksi menjadi dua molekul etanol dan 2 CO₂ (Malakar *et.al*, 2020).

Berdasarkan hasil uji statistik menggunakan ANOVA (Lampiran 6) didapatkan nilai signifikansi sebesar $(0,466) > 0,05$ yang itu artinya tidak ada pengaruh yang signifikan (nyata) interaksi jumlah ragi roti (*Saccharomyces cerevisiae*) dan lama fermentasi glukosa hasil hidrolisis kertas HVS bekas terhadap kadar etanol. Maka kemudian untuk mengetahui perlakuan terbaik dari beberapa perlakuan, dilakukanlah uji lanjut *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) dengan taraf 5% (0,05). Adapun hasil uji lanjut *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) sekaligus grafik pengaruh interaksi jumlah ragi roti (*Saccharomyces cerevisiae*) dan lama fermentasi glukosa hasil hidrolisis kertas HVS bekas terhadap kadar etanol disajikan pada Gambar 4.2.



Keterangan: Notasi huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata perlakuan yang diberikan
(*) Tanda bintang menunjukkan perlakuan yang optimal

Gambar 4.2 Grafik Pengaruh Interaksi Jumlah Ragi Roti (*Saccharomyces cerevisiae*) dan Lama Fermentasi terhadap Kadar Etanol dari Kertas HVS Bekas

Gambar 4.2 menunjukkan hasil pengaruh interaksi jumlah ragi roti (*Saccharomyces cerevisiae*) dan lama fermentasi glukosa hasil hidrolisis kertas

HVS bekas terhadap kadar etanol, hampir semua perlakuan memiliki notasi huruf yang sama. Hal tersebut menunjukkan bahwa interaksi pengaruh jumlah ragi dan lama fermentasi tidak berpengaruh signifikan terhadap kadar etanol. Hasil kadar etanol tertinggi didapatkan pada perlakuan jumlah ragi 5 gram dan lama fermentasi 4 hari sebesar 2,18%, namun secara statistik tidak berbeda nyata dengan perlakuan jumlah ragi 5 gram dan lama fermentasi 6 hari sebesar 2,17% karena memiliki notasi huruf yang sama (e). Sedangkan hasil terendah didapatkan pada perlakuan jumlah ragi 3 gram dan lama fermentasi 2 hari sebesar 1,18%. Apabila mengacu pada hasil statistik deskriptif (Lampiran 5) maka dapat dilihat adanya nilai standar deviasi yang cukup besar, sehingga hasil antara perlakuan satu dengan yang lainnya akan saling bertautan (*cross-linked*). Oleh karena itu, maka interaksi antara variasi jumlah ragi roti (*Saccharomyces cerevisiae*) dan lama fermentasi glukosa hasil hidrolisis kertas HVS bekas tidak berpengaruh signifikan (nyata) terhadap kadar etanol.

Berdasarkan pada gambar 4.2, terjadi peningkatan kadar etanol yang dihasilkan seiring dengan bertambahnya jumlah ragi yang diberikan dan semakin lamanya waktu fermentasi dilakukan. Apabila jumlah ragi yang diberikan semakin banyak, maka jumlah sel khamir yang berperan dalam merombak glukosa menjadi etanol akan semakin banyak, sehingga kadar etanol yang dihasilkan pun akan semakin tinggi. Demikian juga dengan semakin lamanya waktu fermentasi dilakukan, maka akan menghasilkan kadar etanol yang semakin tinggi sampai pada waktu fermentasi yang optimum. Menurut Asngad dkk. (2009) semakin lama proses fermentasi dan semakin banyak dosis ragi yang diberikan maka kadar bioetanol semakin meningkat. Hal ini menunjukkan bahwa pada waktu tersebut aktivitas khamir *Saccharomyces cerevisiae* bekerja secara optimal serta kegiatan enzimatik tidak terhambat. Setyohadi (2006) menambahkan bahwa semakin tinggi jumlah ragi dan semakin lama waktu fermentasi, mikroorganisme yang terdapat pada bahan semakin tinggi. Hal ini berarti semakin besar jumlah mikroba perombak glukosa menjadi etanol, sehingga kadar etanol yang dihasilkan akan semakin tinggi. Namun setelah lama fermentasi 6 hari, mulai terjadi penurunan kadar etanol yang dihasilkan sampai pada hari ke-8. Hal ini disebabkan karena nutrisi dalam medium sudah mulai habis sehingga mengancam kelangsungan

hidup sel khamir, dan pada akhirnya banyak sel khamir yang mengalami kematian. Menurut Purwoko (2007) setelah kondisi optimum tercapai, konsentrasi bioetanol yang diperoleh cenderung menurun, karena nutrisi yang diperlukan oleh mikroba juga semakin menurun. Selain itu konsentrasi bioetanol yang menurun dipengaruhi oleh konsentrasi glukosa yang semakin berkurang, sehingga *yeast* kehabisan nutrisi untuk bertahan hidup dan mengalami fase kematian. Selanjutnya bioetanol yang dihasilkan terkonversi menjadi asam-asam organik lainnya akibat terjadi reaksi oksidasi bioetanol.

Hasil interaksi antara jumlah ragi dan lama fermentasi yang optimum dalam penelitian ini adalah jumlah ragi 5 gram dan lama fermentasi 4 hari dengan kadar etanol yang dihasilkan sebesar 2,18%. Sementara itu, hasil penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh Kalpatari dkk. (2019) menunjukkan kadar bioetanol tertinggi diperoleh dari jumlah ragi 5 gram dan lama fermentasi 6 hari (144 jam) sebanyak 6% v/v. Dalam penelitian tersebut Kalpatari dkk (2019) menggunakan hidrolisis asam pada substrat kertas HVS menggunakan asam sulfat. Berdasarkan hal tersebut, maka proses hidrolisis pada substrat kertas HVS juga perlu diperhatikan dengan baik karena dapat berpengaruh terhadap kadar etanol yang dihasilkan. Proses hidrolisis yang optimal dapat menghasilkan kadar glukosa yang optimal sehingga saat dilakukan proses fermentasi akan mampu menghasilkan kadar etanol yang tinggi. Apabila dibandingkan dengan hidrolisis asam, maka hidrolisis enzimatik dalam penelitian ini masih perlu dioptimalkan lagi agar mampu mendukung dihasilkannya kadar etanol yang tinggi.

Apabila ditinjau dari segi keamanan, maka hidrolisis enzimatik relatif lebih aman karena tidak menghasilkan residu yang berbahaya berupa limbah asam yang dapat membahayakan lingkungan apabila tidak dinetralkan dan ditangani dengan baik. Selain itu, penggunaan asam dapat menyebabkan korosi pada peralatan yang digunakan. Meninjau lebih jauh lagi, hidrolisis enzimatik memiliki berbagai keunggulan apabila dibandingkan dengan hidrolisis asam. Menurut Fuadi dkk., (2015) hidrolisis menggunakan enzim mempunyai berbagai keuntungan apabila di bandingkan dengan hidrolisis menggunakan asam antara lain: tidak menyebabkan penurunan kadar glukosa setelah proses hidrolisis, suasana reaksi mild process (berlangsung lebih lunak pada suhu 45°–50°C dan pH

sekitar 4,7-4,8), lebih ramah lingkungan, tidak mengakibatkan terjadinya reaksi samping, dan tidak menyebabkan korosi pada peralatan yang digunakan karena tidak menggunakan bahan-bahan yang bersifat korosif sehingga biaya perawatan dan pemeliharaan alat menjadi lebih rendah.

Berbagai penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh Asrianti (2017) memproduksi bioetanol dari limbah kertas dengan proses hidrolisis enzimatis menggunakan enzim selulase dari *Candida utilis* dan jumlah ragi 4 gram. Kadar bioetanol tertinggi dihasilkan pada hari ke tujuh fermentasi dengan kadar etanol sebanyak 0,9627 %. Byadgi & Kalburgi (2016) membuat bioetanol dari kertas koran bekas menggunakan hidrolisis enzimatis dengan enzim selulase dari bakteri *Cytophaga hutchisonni* dengan 5% inokulum ragi. Persentase maksimum bioethanol yang didapatkan pada lama fermentasi 144 jam (6 hari) sebesar 6,849% v/v (kultur murni) dan 6,031% v/v (kultur yang diisolasi). Selanjutnya hasil penelitian Sholikhah dkk. (2018) membuat bioetanol dari kertas HVS bekas menggunakan proses hidrolisis enzimatis dengan enzim selulase jamur tiram, lama fermentasi 14 hari, menggunakan ragi roti dan tape 3 gr, kadar etanol tertinggi adalah 0,54% pada ragi tape dan 0,02% pada ragi roti. Kemudian Guerfali *et.al* (2014) membuat bioetanol dari kertas HVS bekas dengan hidrolisis enzimatis menggunakan enzim selulase *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger* dengan jumlah inokulum ragi 5% v/v. Kadar bioetanol tertinggi yang diperoleh sebanyak 0,88%. Apabila dibandingkan dengan berbagai penelitian sebelumnya, maka proses hidrolisis enzimatis menggunakan enzim selulase kasar dari *Bacillus subtilis* dalam penelitian ini sudah cukup baik, namun masih perlu dioptimalkan lagi.

Menurut Madadi *et.al* (2017) hidrolisis enzimatis dari biomassa lignoselulosa dapat terhambat oleh berbagai faktor yang dapat membatasi kerja enzim. Faktor utama yang mempengaruhi hidrolisis enzimatis dapat dibagi menjadi 2 yaitu: faktor substrat dan faktor yang berhubungan dengan enzim. Faktor yang berhubungan dengan substrat antara lain: kandungan lignin dan hemiselulosa, ukuran partikel, luas area permukaan yang dapat diakses oleh enzim, tingkat kristalinitas selulosa dan derajat polimerisasi. Sedangkan faktor

yang berhubungan dengan enzim antara lain: aktivitas selulase, biaya produksi enzim, dan kompleks susunan enzim.

Proses pretreatment substrat kertas HVS bekas pada penelitian ini menggunakan basa NaOH. Hasil penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh Ali dan Mohd (2011) melaporkan kadar etanol tertinggi sebesar 2,8% dengan proses pretreatment menggunakan basa (NaOH 1%) selama 2 jam dan lama fermentasi 6 hari. Sementara itu, penelitian Chansoliya *et.al* (2016) melaporkan kadar etanol dari substrat kertas koran sebesar 22% dengan pretreatment menggunakan NaOH 0,1M pada suhu 121 °C selama 1 jam yang didapatkan setelah 2 hari fermentasi. Berdasarkan beberapa hasil penelitian tersebut, maka proses pretreatment dalam penelitian ini masih belum optimal, sehingga perlu dioptimalkan lagi. Selain menggunakan basa, proses pretreatment substrat lignoselulosa dapat pula menggunakan asam. Hasil penelitian Ramayanti & Giasmara (2017) membuat bioetanol dari kertas HVS bekas dengan pretreatment menggunakan asam sulfat 4% mampu menghasilkan kadar etanol tertinggi sebesar 8,13% setelah 7 hari fermentasi. Hasil penelitian Byadgi dan Kalburgi (2016) membuat bioetanol dari kertas koran dengan pretreatment menggunakan asam sulfat 1,5% pada suhu 121°C selama 45 menit mampu menghasilkan kadar etanol tertinggi sebesar 6,849%. Maka berdasarkan hasil penelitian sebelumnya, dapat disimpulkan bahwa proses pretreatment menggunakan asam terlihat lebih efektif dibandingkan dengan pretreatment menggunakan basa.

Menurut El-Naggar *et.al* (2014) pretreatment adalah langkah pertama yang diperlukan untuk memecah bahan lignoselulosa menjadi komponen lignin, selulosa dan hemiselulosa dan/atau memodifikasi pori-pori dalam bahan untuk memungkinkan enzim menembus ke dalam serat selulosa agar dapat dihidrolisis secara enzimatik. Madadi *et.al* (2017) menambahkan bahwa pretreatment merupakan langkah penting untuk menghilangkan lignin karena kemampuan enzim dalam mengakses substrat biomassa lignoselulosa untuk hidrolisis sangat bergantung pada jenis pretreatment yang digunakan.

Menurut Harmsen *et.al* (2010) terdapat beberapa faktor hambatan dalam proses pretreatment yang ada antara lain: pemisahan selulosa dan lignin yang belum maksimal (yang mengurangi keefektifan hidrolisis enzimatik selulosa pada

tahap selanjutnya), pembentukan produk sampingan yang menghambat fermentasi etanol (misalnya asam asetat dari hemiselulosa, furan dari gula dan senyawa fenolik dari fraksi lignin), penggunaan bahan kimia dan/atau energi yang tinggi, dan produksi limbah yang cukup besar. Berdasarkan hal tersebut, maka banyak aspek yang perlu dipertimbangkan dalam memilih metode pretreatment yang tepat. Selain itu, proses pretreatment juga perlu dioptimalkan agar mampu mendukung dalam produksi bioetanol dengan kadar yang tinggi.

Menurut Hidayat (2013) pemilihan metode pretreatment yang tepat sangat penting dilakukan karena tahap ini menentukan metode hidrolisis dan fermentasi apa yang akan dipakai selanjutnya. Sehingga pada akhirnya pemilihan metode pretreatment ini sangat mempengaruhi keseluruhan biaya operasional produksi bioetanol. Penggunaan metode pretreatment yang tidak optimal akan menyebabkan degradasi hemiselulosa dan lignin secara parsial serta menghasilkan senyawa beracun yang dapat menghambat pertumbuhan khamir. Pemilihan teknologi pretreatment tergantung juga pada bahan baku lignoselulosa yang digunakan. Karena tiap bahan baku memiliki komposisi selulosa, hemiselulosa, dan lignin yang berbeda.

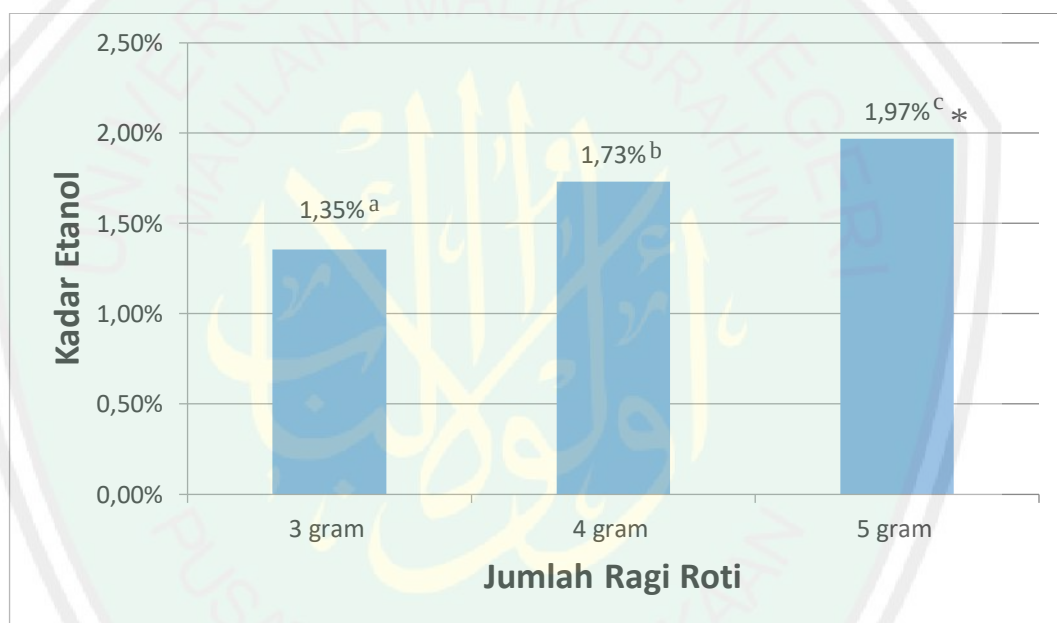
Penelitian pembuatan bioetanol dari biomassa lignoselulosa memerlukan tahapan proses yang cukup panjang meliputi: pretreatment atau perlakuan awal, hidrolisis (menggunakan asam ataupun enzim), fermentasi, dan destilasi untuk memperoleh bioetanol. Melihat banyaknya tahapan yang dilakukan, maka kadar etanol yang dihasilkan dipengaruhi oleh banyak faktor, meliputi kandungan lignin, hemiselulosa dan selulosa dalam biomassa, pemilihan jenis dan metode pretreatment yang tepat dan optimal, pemilihan metode hidrolisis yang paling baik dengan tingkat konversi yang tinggi, proses fermentasi dengan segala aspek pendukungnya yang perlu dioptimalkan, dan pemilihan metode destilasi yang mampu menghasilkan bioetanol dengan kadar yang tinggi.

4.3. Pengaruh Jumlah Ragi Roti (*Saccharomyces cerevisiae*) terhadap Kadar Etanol dari Kertas HVS Bekas

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, diperoleh data pengaruh jumlah ragi roti (*Saccharomyces cerevisiae*) terhadap kadar etanol dari kertas

HVS bekas. Untuk mengetahui adanya pengaruh tersebut maka dilakukan analisis statistik menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA).

Berdasarkan hasil uji statistik menggunakan ANOVA (Lampiran 7) didapatkan nilai signifikansi sebesar $(0,000) < 0,05$. Hal tersebut menunjukkan bahwa ada pengaruh jumlah ragi roti (*Saccharomyces cerevisiae*) terhadap kadar etanol dari kertas HVS bekas. Selanjutnya untuk mengetahui perlakuan terbaik dari beberapa perlakuan yang diberikan, maka dilakukan uji lanjut *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) dengan taraf 5% (0,05). Adapun hasil uji lanjut *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) sekaligus diagram pengaruh jumlah ragi roti (*Saccharomyces cerevisiae*) terhadap kadar etanol dari kertas HVS bekas disajikan pada gambar 4.3.



Keterangan: Notasi huruf yang berbeda menunjukkan berbeda nyata perlakuan yang diberikan

(*) Tanda bintang menunjukkan perlakuan yang optimal

Gambar 4.3 Pengaruh Jumlah Ragi Roti (*Saccharomyces cerevisiae*) terhadap Kadar Etanol dari Kertas HVS Bekas

Berdasarkan pada hasil uji lanjut Duncan pada gambar 4.3 untuk pengaruh jumlah ragi roti terhadap kadar etanol dari kertas HVS bekas menunjukkan adanya perbedaan yang cukup signifikan, hal tersebut dapat dilihat dari perbedaan notasi huruf dari masing-masing perlakuan jumlah ragi. Pada perlakuan jumlah ragi 3 gram rata-rata kadar etanol yang dihasilkan sebesar 1,35%, sedangkan pada jumlah ragi 4 gram sebesar 1,73%, dan pada jumlah ragi 5 gram sebesar 1,97%.

Ketiga perlakuan jumlah ragi yang diberikan menunjukkan hasil yang berbeda nyata antara satu dengan yang lainnya. Hasil tersebut menunjukkan bahwa semakin banyak ragi roti yang ditambahkan, maka kadar etanol yang dihasilkan pun juga semakin tinggi.

Berdasarkan pada Gambar 4.3, dapat dilihat adanya peningkatan kadar etanol yang dihasilkan dari ketiga perlakuan jumlah ragi roti yang diberikan. Hasil uji statistik Duncan menunjukkan kadar etanol tertinggi didapatkan pada perlakuan jumlah ragi 5 gram yaitu sebesar 1,97%. Hal ini menunjukkan bahwa jumlah ragi roti yang diberikan berpengaruh terhadap kadar etanol yang dihasilkan. Apabila jumlah ragi roti yang diberikan semakin banyak, maka jumlah khamir *Saccharomyces cerevisiae* yang berperan dalam proses fermentasi untuk mengubah glukosa menjadi etanol pun semakin banyak, akibatnya kadar etanol yang dihasilkan juga akan semakin tinggi. Hasil ini sesuai dengan penelitian Kalpatari dkk. (2019) yang membuat bioetanol dari kertas HVS bekas dengan variasi jumlah ragi 1 gram, 3 gram dan 5 gram. Hasil tertinggi diperoleh dari jumlah ragi 5 gram dengan kadar bioetanol sebesar 6% v/v. Berdasarkan hasil penelitian tersebut, maka dapat disimpulkan bahwa semakin banyak jumlah ragi yang diberikan, maka kadar etanol yang dihasilkan pun akan semakin tinggi.

Hasil penelitian yang lain dengan menggunakan substrat lignoselulosa yang berbeda telah dilakukan oleh Djana (2016) membuat bioetanol dari substrat enceng gondok dengan variasi jumlah ragi 2, 4, dan 6 gram didapatkan kadar bioetanol tertinggi dari jumlah ragi 6 gram dan lama fermentasi 7 hari sebesar 4,05%. Hasil penelitian Yuniarti dkk. (2018) membuat bioetanol dengan substrat ampas tebu dengan variasi jumlah ragi 1 gram, 3 gram dan 5 gram, dihasilkan kadar bioetanol tertinggi pada jumlah ragi 5 gram dan lama fermentasi 7 hari sebesar 4,91%. Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya yang telah dipaparkan, terdapat hasil yang sesuai dengan penelitian ini yaitu semakin banyak ragi yang ditambahkan maka kadar bioetanol yang dihasilkan akan semakin tinggi. Menurut Asngad dkk. (2009) semakin lama proses fermentasi dan semakin banyak dosis ragi yang diberikan maka kadar bioetanol semakin meningkat. Hal ini menunjukkan bahwa pada waktu tersebut aktivitas khamir *Saccharomyces cerevisiae* bekerja secara optimal serta kegiatan enzimatis tidak terhambat.

Kalpatari dkk. (2019) menambahkan bahwa pada waktu fermentasi yang tetap, digunakan ragi yang semakin bertambah maka enzim yang mengubah glukosa menjadi bioetanol semakin banyak sehingga bioetanol yang dihasilkan akan mempunyai kadar yang tinggi. Tetapi jika penambahan ragi berlebihan maka kadar bioetanol yang diperoleh akan menurun.

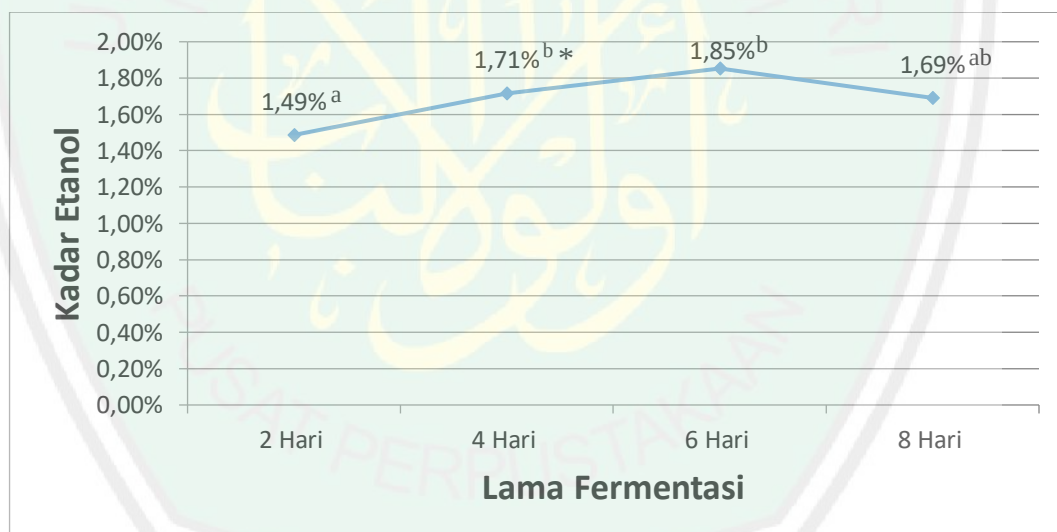
Khamir *Saccharomyces cerevisiae* mampu memfermentasikan glukosa menjadi etanol karena didukung oleh peran enzim yang dimilikinya, yaitu enzim invertase dan zimase. Menurut Manwar *et.al* (2013) Yeast *S. cerevisiae* mengandung enzim invertase yang mampu menghidrolisis sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa. Selanjutnya enzim zymase akan mengubah glukosa menjadi etanol dan karbon dioksida. 1 mol sukrosa diubah menjadi 4 mol etanol dan 4 mol karbon dioksida. Judoamidjojo dkk., (1992) menambahkan bahwa khamir *Saccharomyces cerevisiae* mampu memfermentasikan gula menjadi etanol karena adanya peran dari dua jenis enzim yaitu enzim invertase dan enzim zimase. Enzim invertase berperan dalam menghidrolisis disakarida (contohnya sukrosa) menjadi mono sakarida, sedangkan enzim zimase berperan dalam mengubah mono sakarida (glukosa) menjadi alkohol dan karbondioksida. Dengan adanya kedua jenis enzim tersebut, maka *Saccharomyces cerevisiae* mampu mengkonversikan gula baik dari kelompok monosakarida (glukosa) maupun dari kelompok disakarida (sukrosa).

Ragi roti merupakan salah satu contoh ragi komersil yang banyak digunakan dalam kehidupan sehari-hari, termasuk dalam proses fermentasi bioetanol. Penggunaan ragi komersil ini memiliki beberapa kelebihan. Menurut Jayus *et. al* (2016) ragi komersil memiliki beberapa kelebihan antara lain: dapat disimpan dalam waktu lama (lebih dari satu tahun), memiliki viabilitas (daya hidup) yang tinggi (mampu mencapai 4.6×10^{10} sel khamir/gr), tingkat efisiensi tinggi, kontaminasi mikroba rendah atau bahkan tidak ada kontaminan, harganya relatif murah, dan memiliki karakteristik yang baik dan mumpuni (toleran terhadap suhu tinggi, konsentrasi gula tinggi, toleran terhadap kadar alkohol yang tinggi dan toleran terhadap perubahan pH).

4.4. Pengaruh Lama Fermentasi terhadap Kadar Etanol dari Kertas HVS Bekas

Berdasarkan pada penelitian yang telah dilakukan, diperoleh data pengaruh lama fermentasi terhadap kadar etanol dari kertas HVS bekas. Selanjutnya untuk mengetahui adanya pengaruh lama fermentasi terhadap kadar etanol tersebut maka dilakukan analisis statistik menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA).

Berdasarkan hasil uji statistik menggunakan ANOVA (Lampiran 8) didapatkan nilai signifikansi sebesar $(0,012) < 0,05$. Hal tersebut menunjukkan bahwa ada pengaruh lama fermentasi terhadap kadar etanol dari kertas HVS bekas. Selanjutnya untuk mengetahui perlakuan terbaik dari beberapa perlakuan yang diberikan, maka dilakukan uji lanjut *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) dengan taraf 5% (0,05). Adapun hasil uji lanjut *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) sekaligus grafik pengaruh lama fermentasi terhadap kadar etanol dari kertas HVS bekas disajikan pada gambar 4.4.



Keterangan: Notasi huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata perlakuan yang diberikan

(*) Tanda bintang menunjukkan perlakuan yang optimal

Gambar 4.4 Grafik Pengaruh Lama Fermentasi terhadap Kadar Etanol dari Kertas HVS Bekas

Berdasarkan hasil uji lanjut Duncan pada gambar 4.4, pengaruh lama fermentasi terhadap kadar etanol dari kertas HVS bekas menunjukkan adanya perbedaan. Rata-rata kadar etanol yang dihasilkan pada lama fermentasi 2 hari sebesar 1,49%, lama fermentasi 4 hari sebesar 1,71%, lama fermentasi 6 hari

1,85% dan lama fermentasi 8 hari sebesar 1,69%. Hasil kadar bioetanol tertinggi didapatkan pada lama fermentasi 6 hari yaitu sebesar 1,85%, namun hasil tersebut tidak berbeda nyata dengan lama fermentasi 4 hari dengan kadar etanol yang dihasilkan sebesar 1,71% karena keduanya memiliki notasi huruf yang sama (b). Berdasarkan hasil tersebut, maka dapat diketahui bahwa hasil yang optimal diperoleh dari lama fermentasi 4 hari.

Gambar 4.4 menunjukkan adanya peningkatan kadar etanol yang dihasilkan seiring bertambahnya lama waktu fermentasi yang dilakukan selama 2 hari, 4 hari dan 6 hari. Kemudian pada hari ke 8, mulai terjadi penurunan kadar etanol yang dihasilkan. Berdasarkan hasil uji statistik Duncan menunjukkan kadar etanol tertinggi didapatkan pada lama fermentasi 6 hari sebesar 1,85%, namun secara statistik tidak berbeda nyata dengan lama fermentasi 4 hari dengan kadar etanol yang dihasilkan sebesar 1,71% karena keduanya memiliki notasi huruf yang sama (b). Berdasarkan hasil uji lanjut tersebut, maka lama fermentasi yang optimal dalam penelitian ini adalah 4 hari. Hal ini menunjukkan bahwa lama fermentasi berpengaruh terhadap kadar etanol yang dihasilkan. Hasil penelitian sebelumnya pembuatan bioetanol dari kertas HVS bekas yang dilakukan oleh Kalpatari dkk. (2019) melaporkan diperoleh kadar etanol tertinggi pada waktu lama fermentasi 144 jam (6 hari) sebesar 6%. Kemudian hasil penelitian yang lain pembuatan bioetanol dari kertas bekas dari Ramayanti & Giasmara (2017) melaporkan kadar etanol tertinggi diperoleh pada lama fermentasi 7 hari dengan kadar etanol 8,17%. Berdasarkan pada hasil penelitian sebelumnya, maka dapat disimpulkan bahwa semakin lama fermentasi, maka kadar etanol yang dihasilkan juga semakin tinggi sampai pada waktu fermentasi yang optimum. Menurut Judoamidjojo (1990) lama fermentasi biasanya ditentukan oleh jenis substrat dan jenis ragi yang digunakan. Berhentinya proses fermentasi ditandai dengan tidak terbentuknya lagi CO₂. Pada waktu fermentasi yang optimal, kadar etanol yang dihasilkan akan semakin tinggi dan setelah itu kadar etanol akan menurun.

Menurut Ramayanti & Giasmara (2017) kenaikan kadar etanol ini juga terjadi karena lama fermentasi berhubungan erat dengan kurva pertumbuhan mikroba. Menurut Belart (2013) ketika khamir ditumbuhkan dalam medium kultur, maka pertumbuhannya dapat dibagi menjadi empat fase berbeda yaitu: fase

lag (fase adaptasi), fase log (fase pertumbuhan eksponensial), fase stasioner dan fase kematian.

Berdasarkan pada gambar 4.4, saat lama fermentasi 2 hari kadar etanol yang dihasilkan sebesar 1,49%, hasil ini masih rendah bila dibandingkan dengan lama fermentasi 4 hari (1,71%) dan lama fermentasi 6 hari (1,85%). Kadar etanol yang dihasilkan pada saat lama fermentasi 2 hari masih rendah karena kemungkinan khamir masih berada dalam fase adaptasi (fase lag) sehingga kadar etanol yang dihasilkan masih belum optimal. Hasil penelitian dari Kalpatari dkk. (2019) juga menunjukkan hal yang sama saat lama fermentasi 48 jam (2 hari) kadar bioetanol yang dihasilkan juga masih rendah yaitu sebesar 4% pada jumlah ragi 5 gram. Hasil penelitian Ramayanti & Giasmara (2017) dalam pembuatan bioetanol kertas bekas melaporkan bahwa pada hari pertama, kedua, dan ketiga etanol yang dihasilkan belum optimal karena yeast *Saccharomyces cerevisiae* berada pada tahap lag phase dan exponential phase. Tahap lag phase merupakan tahap adaptasi mikroba terhadap lingkungan dan exponential phase adalah tahap dimana mikroba mulai melakukan pertumbuhan. Dengan demikian aktivitas untuk pembentukan produk etanol belum optimal. Berdasarkan pada hasil penelitian sebelumnya yang telah dipaparkan, maka kemungkinan saat lama fermentasi 2 hari ini khamir memasuki fase lag (adaptasi). Menurut Fardiaz (1988) pada fase adaptasi, kecepatan pembelahan sel mikroba masih sangat lambat sehingga pada waktu fermentasi 24-48 jam (1-2 hari) peningkatan kadar etanol yang dihasilkan masih rendah karena khamir harus melakukan adaptasi terhadap lingkungan baru.

Berdasarkan gambar 4.4, pada waktu lama fermentasi 4 hari terlihat adanya peningkatan kadar etanol yang dihasilkan sebesar 1,71%, dan saat lama fermentasi 6 hari kadar etanol yang dihasilkan mencapai hasil tertinggi yaitu 1,85%. Selain itu, dari segi grafik juga mengalami kenaikan sampai puncaknya saat lama fermentasi 6 hari. Kemungkinan saat lama fermentasi 4 hari khamir mengalami fase eksponensial dan dilanjutkan fase stasioner saat lama fermentasi 6 hari. Hasil penelitian pembuatan bioetanol dari kertas HVS bekas oleh Kalpatari dkk. (2019) melaporkan bahwa kadar bioetanol tertinggi 6 % (v/v) didapatkan pada perlakuan waktu fermentasi selama 96 jam (4 hari) dan 144 jam (6 hari) dan jumlah ragi *Saccharomyces cerevisiae* sebanyak 5 gram. Dengan waktu

fermentasi optimum pada jam ke-144. Hal ini menjelaskan bahwa *Saccharomyces cerevisiae* berada pada fase stasioner yaitu fase dimana pertumbuhan mikroorganisme mencapai keadaan yang maksimum dan mikroba yang aktif dan mati relatif seimbang karena sumber makanan dan nutrisi relatif sedikit. Sementara itu, hasil penelitian pembuatan bioetanol kertas bekas oleh Ramayanti & Giasmara (2017) melaporkan bahwa pada hari ke-7 fase pertumbuhan mikroba telah menghasilkan kadar etanol optimum. Sehingga pada hari ke-7 diperoleh kadar etanol tertinggi sebesar 8,16 %. Fase ini merupakan fase untuk pembentukan produk etanol yang terbesar. Saat hari ke-7 mikroba mengalami fase stasioner, dimana jumlah mikroba yang tumbuh sama banyaknya dengan mikroba yang mati sehingga tidak ada penambahan jumlah mikroba yang akan mengubah substrat menjadi etanol sehingga etanol yang terbentuk cenderung konstan.

Berdasarkan gambar 4.4, pada waktu lama fermentasi 8 hari kadar etanol yang dihasilkan mengalami penurunan yaitu sebesar 1,69%. Hasil ini disebabkan karena kemungkinan pada saat lama fermentasi 8 hari khamir mengalami fase kematian akibat nutrisi dalam medium yang mulai habis, selain itu akumulasi produk etanol hasil fermentasi juga berpengaruh terhadap kehidupan sel khamir. Hasil penelitian pembuatan bioetanol dari kertas HVS oleh Kalpatari dkk. (2019) melaporkan bahwa aktifitas mikroorganisme menurun setelah jam ke-144 menunjukkan bahwa *Saccharomyces cerevisiae* mengalami fase kematian. Kadar bioetanol yang dihasilkan mengalami penurunan saat lama fermentasi 8 hari yaitu sebesar 5%. Sementara itu, hasil penelitian pembuatan bioetanol dari kertas bekas oleh Ramayanti & Giasmara (2017) melaporkan penurunan kadar bioetanol yang dihasilkan pada saat hari ke-8 sebesar 1,06%. Menurut Yulis (2009) semakin lama waktu fermentasi, konsentrasi bioetanol yang dihasilkan juga semakin meningkat. Namun setelah kondisi optimum tercapai, konsentrasi bioetanol yang diperoleh cenderung menurun, karena nutrisi yang diperlukan oleh mikroba juga semakin menurun. Selain itu konsentrasi bioetanol yang menurun dipengaruhi oleh konsentrasi glukosa yang semakin berkurang, sehingga *yeast* kehabisan nutrisi untuk bertahan hidup dan mengalami fase kematian. Selanjutnya bioetanol yang dihasilkan terkonversi menjadi asam-asam organik lainnya akibat terjadi reaksi oksidasi bioetanol (Purwoko, 2007).

Mahreni dan Suhenry (2011) menyatakan bahwa fase kematian disebabkan oleh inhibisi dan akumulasi produk metabolit yang dihasilkan dari proses fermentasi yang semakin lama semakin banyak. Akibatnya sebagian sel tidak tahan terhadap daya racun produk metabolit tersebut sehingga pada waktu tertentu pertumbuhan sel akan berhenti dan sel-sel khamir akan mati. Menurut Medrano *et.al* (2017) etanol yang dihasilkan selama fermentasi diketahui dapat menghambat pertumbuhan khamir yang pada akhirnya, dapat berpengaruh terhadap kelangsungan hidup sel khamir. Etanol mempengaruhi banyak aspek pada kelangsungan hidup khamir, seperti fluiditas membran plasmatik, morfologi vakuola, aktivitas enzim glikolitik, dan DNA mitokondria. Etanol juga menyebabkan denaturasi protein hidrofilik dan hidrofobik pada membran sel, mempengaruhi berbagai sistem transportasi seperti asam amino permease dan proses pengambilan glukosa.

Selain itu, menurut Yuda dkk. (2018) bahwa semakin lama proses fermentasi dilakukan, maka akan terbentuk produk samping seperti gliserol dan asam asetat, sehingga dapat menurunkan pH medium. Medrano *et.al* (2017) menambahkan bahwa asam lemah seperti asam asetat dalam bentuk bebas dapat terakumulasi di dalam sel khamir dan berdifusi ke dalam sel khamir sehingga menyebabkan penurunan pH dalam sitosol. Asam lemak rantai sedang, seperti asam heksanoat, oktanoat, dan dekanat, dan juga etil esternya masing-masing telah terbukti berpengaruh negatif terhadap kelangsungan hidup dan kapasitas pertumbuhan *yeast*.

Menurut Azhar *et.al* (2017) terdapat beberapa faktor yang berpengaruh terhadap proses fermentasi bioetanol diantaranya suhu, konsentrasi gula, pH, lama fermentasi. Selain itu, Hasanah (2008) menambahkan faktor lainnya yang berpengaruh yaitu nutrisi, aerasi, dan jenis mikroba yang digunakan. Meninjau berdasarkan literatur tersebut, maka masih banyak aspek yang perlu dioptimalkan lagi selama proses fermentasi bioetanol agar dihasilkan kadar etanol yang tinggi.

4.5. Pemanfaatan Kertas HVS Bekas sebagai Bioetanol dalam Perspektif Islam

Allah SWT telah menciptakan segala sesuatu di dunia ini untuk diambil manfaatnya oleh manusia. Segala sesuatu yang telah Allah SWT ciptakan tidak

ada yang sia-sia dan tanpa hikmah, semuanya bermanfaat bagi kehidupan. Dalam hidup ini, manusia tidak bisa lepas dari kebutuhan akan sumber energi. Dalam Al-Quran Allah SWT telah menjelaskan tentang kebutuhan manusia terhadap sumber energi. Hal ini berdasarkan firman Allah SWT yang telah termaktub dalam Al-Quran surat Yasin ayat 80:

الَّذِي جَعَلَ لَكُم مِّنَ الشَّجَرِ الْأَخْضَرِ نَارًا فَإِذَا أَنتُم مِّنْهُ تُوقِدُونَ ﴿٨٠﴾

“Yaitu Tuhan yang menjadikan untukmu api dari kayu yang hijau, Maka tiba-tiba kamu nyalakan (api) dari kayu itu”.

Firman Allah SWT الَّذِي جَعَلَ لَكُم مِّنَ الشَّجَرِ الْأَخْضَرِ نَارًا “Yaitu Tuhan yang menjadikan untukmu api dari kayu yang hijau.” Allah memperingatkan akan keesaan-Nya. Ayat ini menunjukkan pada kesempurnaan kekuasaan-Nya dalam menghidupkan orang mati dengan apa yang mereka saksikan, seperti mengeluarkan api dari yang kering kemudian api itu membakar kayu yang masih hijau. Ayat ini sekaligus sebagai jawaban dari perkataan orang-orang kafir yang berkata, "Berdasarkan tabiat kehidupan, air mani itu hangat dan basah, sehingga keluar sesuatu yang hidup darinya. Sedangkan tulang basah akan kering jika telah mati, maka bagaimana bisa keluar kehidupan darinya." Maka kemudian Allah menurunkan firman-Nya, الَّذِي جَعَلَ لَكُم مِّنَ الشَّجَرِ الْأَخْضَرِ نَارًا “Yaitu Tuhan yang menjadikan untukmu api dari kayu yang hijau” Maksudnya sesungguhnya pohon yang hijau itu mengandung air dan air itu basah, dingin, dan lembab, kebalikan dari api dan keduanya tidak mungkin bersatu. Akan tetapi Allah mengeluarkan api dari pohon yang hijau itu. Karena Dia manpu untuk mengeluarkan lawan dari lawannya, dan Dia Maha Kuasa atas segala sesuatu (Al-Qurthubi, 2009).

Menurut Al-Qurthubi (2009) dalam kitabnya Tafsir Al-Qurthubi maksud dari ayat ini seperti yang terdapat dalam pepatah Arab tentang *al marakh* dan *al ifaar*, diantaranya seperti perkataan mereka, "Pada setiap pohon terdapat api, maka carilah kebahagiaan pada “*al marakh* dan *al ifaar*”. *Al marakh* adalah batang kayu basah bawah dan *Al ifaar* adalah batang kayu yang bagian atas. Dari kedua batang itu diambil dua ranting seperti dua kayu siwak, lalu ditetaskan

aimya, kemudian antara satu dan lairmya digesekkan sehingga keluarlah api dari keduanya.

Menurut pakar botanik Muslim dari Universitas Suez Canal, Mesir, Al-Miliji, ayat ini mengisyaratkan dua peristiwa penting yaitu: yang pertama adalah proses pembentukan energi dari unsur-unsur dalam daun kemudian disimpan dalam bentuk susunan kimiawi yang dikenal dengan anabolism, yang salah satu fenomenanya adalah fotosintesis. Proses itu disimpulkan dari penggalan ayat yang berbunyi, *“alladzī ja‘ala lakum minasy-syajaril akhdhari nāran”*. Yang kedua, proses mengeluarkan energi dari unsur kimiawi dalam bentuk energi kalori yang dibutuhkan oleh setiap makhluk hidup. Proses yang dikenal dengan catabolism ini terambil dari ungkapan, *“fa'idzā antum minhu tūqidūn”*. Kedua peristiwa ini disebut juga metabolisme (Al-Miliji, 2005).

Menurut Tafsir Tematik Departemen Agama (2009) para ulama penyusun Tafsir Al-Muntakhab menjelaskan: “Energi surya dapat berpindah ke dalam tumbuh-tumbuhan melalui proses fotosintesis. Sel tumbuh-tumbuhan yang mengandung zat hijau daun (klorofil) mengisap karbondioksida dari udara. Sebagai akibatnya terjadilah interaksi antara gas karbondioksida dan air yang diserap oleh tumbuh-tumbuhan dari dalam tanah akan dihasilkan zat karbohidrat berkat bantuan sinar matahari. Dari situ kemudian terbentuk kayu yang pada dasarnya terdiri atas komponen kimiawi yang mengandung karbon, hidrogen, dan oksigen. Dari kayu itu, manusia kemudian membuat arang sebagai bahan bakar. Daya yang tersimpan di dalam arang itu akan keluar ketika ia terbakar. Daya itu sendiri dapat dimanfaatkan untuk keperluan memasak, penghangatan, penerangan, dan lain-lain. Batu bara yang kita kenal itu pun pada mulanya adalah pohon yang tumbuh dan membesar melalui proses asimilasi sinar, kemudian mengalami penghangatan dengan cara tertentu sehingga berubah menjadi batu bara setelah berjuta tahun lamanya akibat faktor geologi seperti panas, tekanan udara, dan sebagainya.

Berdasarkan penjelasan dari ayat diatas, maka dapat diambil hikmah dan pelajaran bahwa pada mulanya manusia memanfaatkan api sebagai sumber energi. Api ini dihasilkan dari dua batang kayu yang saling digesekkan sehingga timbullah panas dan kemudian menyala api. Hikmah yang dapat dipetik dari ayat

diatas adalah kayu dapat digunakan sebagai sumber energi, untuk dimanfaatkan dalam kehidupan sehari-hari. Apabila dikaitkan dengan konteks kehidupan di zaman modern seperti saat ini, kayu telah diolah menjadi berbagai macam produk turunan yang bermanfaat. Salah satu produk turunannya adalah kertas HVS. Kertas merupakan suatu produk berbentuk lembaran-lembaran yang tipis dan rata karena telah melalui tahapan pengepresan. Bahan baku pembuatan kertas adalah serat alami yang mengandung selulosa yang berasal dari dinding sel tumbuhan. Kertas banyak dimanfaatkan dalam kegiatan sehari-hari oleh manusia (Hadi, 2008).

Menurut Nata dkk (2013) bahan baku untuk pembuatan kertas berasal dari serat, baik serat dari bahan kayu maupun non kayu. Pada umumnya kertas diproduksi dari bahan baku serat dari kayu. Dalam bahan kayu maupun non kayu terdapat komponen selulosa, hemiselulosa dan lignin. Kandungan selulosa pada kertas jauh lebih tinggi dibandingkan dengan kandungan hemiselulosa ataupun ligninnya (Fuadi dkk., 2015). Penelitian yang telah dilakukan ini berfokus pada pemanfaatan selulosa dari kertas HVS bekas untuk dijadikan substrat dalam pembuatan bioetanol. Menurut Fuadi dkk. (2015) pemanfaatan kertas bekas sebagai bahan baku bioetanol diharapkan mampu menjadi solusi alternatif agar kertas bekas dapat ditingkatkan nilai ekonominya karena selama ini pemanfaatan kertas bekas sebagian besar hanya untuk didaur ulang.

Manfaat yang dapat diperoleh dari pemanfaatan kertas HVS bekas sebagai bahan dalam pembuatan bioetanol selain dapat mengurangi penumpukan sampah kertas di lingkungan, juga dapat menghasilkan bioetanol yang dapat digunakan sebagai sumber energi terbarukan dan ramah lingkungan. Bioetanol mempunyai manfaat yang banyak dalam kehidupan sehari-hari. Bioetanol banyak digunakan juga dalam berbagai bidang industri. Menurut Winarno (2011) Etanol banyak dimanfaatkan pada berbagai sektor industri antara lain: industri farmasi, kosmetik, campuran bahan bakar minyak, dan lain sebagainya.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan pada penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Interaksi variasi jumlah ragi roti (*Saccharomyces cerevisiae*) dan lama fermentasi tidak berpengaruh nyata terhadap kadar etanol yang dihasilkan pada proses fermentasi glukosa hasil hidrolisis kertas HVS bekas. Perlakuan yang optimal adalah interaksi antara jumlah ragi 5 gram dan lama fermentasi 4 hari yang menghasilkan kadar etanol tertinggi sebesar 2,18%.
2. Variasi jumlah ragi roti (*Saccharomyces cerevisiae*) berpengaruh nyata terhadap kadar etanol yang dihasilkan pada proses fermentasi glukosa hasil hidrolisis kertas HVS bekas. Perlakuan yang optimal diperoleh dari jumlah ragi 5 gram dengan kadar etanol sebesar 1,97%.
3. Lama fermentasi berpengaruh nyata terhadap kadar etanol yang dihasilkan pada proses fermentasi glukosa hasil hidrolisis kertas HVS bekas. Perlakuan yang optimal diperoleh dari lama fermentasi 4 hari dengan kadar etanol sebesar 1,71%.

5.2 Saran

Saran dari penelitian ini antara lain:

1. Dalam penelitian selanjutnya sebaiknya perlu dilakukan pemilihan metode pretreatment yang paling baik dan efisien untuk mendukung pembuatan bioetanol dari biomassa lignoselulosa
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dalam mengoptimalkan proses hidrolisis substrat kertas HVS menggunakan enzim selulase dari mikroba yang lain
3. Perlu dilakukan penelitian mengenai variasi jumlah ragi yang berbeda guna mengoptimalkan proses fermentasi
4. Dalam penelitian selanjutnya sebaiknya perlu ditambahkan perlakuan kontrol selama proses fermentasi

DAFTAR PUSTAKA

- Akhtar, Muhammad Saleem., Mahjabeen Saleem., & M. Waheed Akhtar. 2001. Saccharification of Lignocellulosic Materials by the Cellulases of *Bacillus subtilis*. *Int. J. Agri. Biol.*, Vol. 3, No. 2.
- Al Zenius., Jenny Delly., & Muhammad Hasbi. 2016. Analisa Bioetanol dari Nira Aren Menggunakan Destilasi Fraksinasi Ganda sebagai Bahan Bakar. *Enthalpy*. Vol. 2, No.2
- Ali, M.N., & Mohd, M.K., 2011. Production of Bioethanol Fuel from Renewable Agro Based Cellulosic Wastes and Waste Newspapers. *Int. J. Eng. Sci. Technol.* 3, 884-893.
- Al-Miliji, Sayyed Abdul Sattar. 2005. *Ilmu an-Nabāt fil-Qur'ānil-Karīm*. Kairo: Al-Hay'at al-Mishriyyah al-Ammah lil-Kitāb
- Al-Qurthubi, I. 2009. *Tafsir Al-Qurthubi*. Penerjemah: Fathurrahman Abdul Hamid, Dudi Rosyadi, dan Marwan Affandi. Jakarta: Pustaka Azzam.
- Amelia, Aam. 2012. Pengaruh Variasi Konsentrasi Enzim dan Substrat Terhadap Sakarifikasi Limbah Pengolahan Kertas Menggunakan Enzim Selulase dari *Bacillus* sp. BPPT CC RK2. *Skripsi*. Jakarta: UIN Syarif Hidayatullah
- Anindyawati, T. 2009. Prospek Enzim dan Limbah Lignoselulosa untuk Produksi Bioetanol. *BS*. Vol 44. No 1
- Arlianti, Lily. 2018. Bioetanol sebagai Sumber *Green Energy* Alternatif yang Potensial di Indonesia. *Unistek*. Edisi 5. No.1
- Arshad, Mohsin., Muhammad Irfan., Asad-Ur-Rehman., Muhammad Nadeem., Zile Huma., Hafiz Abdullah Shakir., & Quratulain Syed. 2017. Optimization of Medium and Substrate for CMCase Production by *Bacillus subtilis*-BS06 in Submerged Fermentation and its Applications in Saccharification. *Punjab Univ. J. Zool.*, Vol. 32 (2), pp. 179-188.
- Asngad, A., dan Suparti. 2009. Lama Fermentasi dan Dosis Ragi yang Berbeda pada Fermentasi Gaplek Ketela Pohon Varietas Mukibat terhadap Kadar Glukosa dan Bioetanol. *Jurnal Penelitian Sains & Teknologi*, Vol. 10, No. 1: 1 – 9. Universitas Muhammadiyah. Surakarta.
- Asokan, Athira., Anshumanwarior, C.Shobhitha., Dosapati Hasini., & Merline Sheral Noronha. 2018. Microwave & Sonication Assisted Pretreatment for The Production of Bio-Ethanol from Waste Paper. *Asian Journal Of Applied Science And Technology (AJAST)*
- Asrianti. 2017. Optimalisasi Suhu dan Waktu Hidrolisis Enzimatik Limbah Kertas dengan Menggunakan Selulase dari *Candida utilis* pada Produksi Bioetanol. *Skripsi*. Makassar: UIN Alauddin Makassar

- Ath-Thabari, Abu Ja'far Muhammad Bin Jarir. 2008. *Tafsir Ath-Thabari*. Terjemah: Ahsan. Jakarta: Pustaka Azzam.
- Azhar, Siti Hajar Mohd., Rahmath Abdulla., Siti Azmah Jambo., Hartinie Marbawi., Jualang Azlan Gansau., Ainol Azifa Mohd Faik., & Kenneth Francis Rodrigues. 2017. Yeasts in Sustainable Bioethanol Production: A Review. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 10: 52–61.
- Baysal, Ömür., & Ayşegül Yildiz. 2017. *Bacillus subtilis*: An Industrially Important Microbe for Enzymes Production. *EC Microbiology* 5.4: 148-156.
- Belart, Zoel Salvadó. 2013. Wine Yeast: The Challenge of Low Temperature. *Doctoral Thesis*. Tarragona: Universitat Rovira I Virgili
- Borjesson, M., & Westman, G. (2015) Crystalline Nanocellulose Preparation, Modification, and Properties. *Cellulose-Fundamental Aspects and Current Trends, INTECH*, 159-191.<https://doi.org/10.5772/61899>.
- Byadgi, Shruti A., & P. B. Kalburgi. 2016. Production of Bioethanol from Waste Newspaper. *Procedia Environmental Sciences* 35:555 – 562.
- Cartwright, P. 2009. *Bacillus subtilis*-Identification and Safety. United Kingdom: Human Microbiota Specialist Probiotics International Utd Somerset.
- Chansoliya, Pooja Raj., Rahul Anand., & Sunita Sharma. 2016. Analysis of Bioethanol Production from Newspaper by *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis*. *IJEDR*. Volume 4: 3. ISSN: 2321-9939
- Chatterjee, Soumya., Sonika Sharma., Rajesh Kumar Prasad., Sibnarayan Datta., Dharmendra Dubey., Mukesh K. Meghvansi., Mohan G. Vairale., & Vijay Veer. 2015. Cellulase Enzyme Based Biodegradation of Cellulosic Materials: An Overview. *South Asian J Exp Biol*; 5 (6): 271-282.
- Ciani, M., F. Comitini., & I. Mannazzu. 2013. *Encyclopedia of Ecology*, Volume 2. USA: Academic Press
- De Bari, Isabella., Alessandra Verardi, Emanuele Ricca., & Vincenza Calabrò 2012. Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass: Current Status of Processes and Technologies and Future Perspectives. *Bioethanol*. ISBN: 978-953-51-0008-9.
- Departemen Agama. 2009. *Tafsir Al-Quran Tematik: Pelestarian Lingkungan Hidup Seri 4*. Lajnah Pentashihan Mushaf Al-Qur'an Badan Litbang dan Diklat Departemen Agama RI
- Diarti, Maruni Wiwin., Rohmi., Yuri Syaffitri Kinanti Achmad., & Yunan Jiwintarum. 2017. Karakteristik Morfologi, Koloni dan Biokimia Bakteri yang diisolasi dari Sedimen Laguna Perindukan Nyamuk. *Jurnal Kesehatan Prima* Vol. 11, No.2.

- Dincă M., Ferdeş M., Paraschiv G., Ungureanu N., Vlăduţ V., Moiceanu G., & Zăbavă B. 2017. Lignocellulosic Biomass Pretreatment For Biofuel Production. *Analele Universităţii din Craiova, seria Agricultură-Montanologie-Cadastru (Annals of the University of Craiova - Agriculture, Montanology, Cadastre Series) Vol. XLVII.*
- Djaenuddin, Nurashiah., & Amran Muis. 2015. Karakteristik Bakteri Antagonis *Bacillus subtilis* dan Potensinya Sebagai Agens Pengendali Hayati Penyakit Tanaman. *Prosiding Seminar Nasional Serealia.*
- Djana, Miftahul. 2016. Pengaruh Massa Ragi dan Lama Fermentasi terhadap Pembuatan Etanol dari Enceng Gondok. *Integrasi Vol. 1 No. 2*
- Earl, A.M., R. Losick., & R. Kolter. 2008. Ecology and Genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends In Microbiology Vol.16 No.6.269-275*
- El-Naggar, Noura El-Ahmady., Sahar Deraz., & Ashraf Khalil. 2014. Bioethanol Production from Lignocellulosic Feedstocks Based on Enzymatic Hydrolysis: Current Status and Recent Developments. *Biotechnology 13 (1): 1-21.*
- Fadilah, U., I M. M. W., & Semadi N. A. 2018. Studi Pengaruh pH Awal Media dan Lama Fermentasi pada Proses Produksi Etanol dari Hidrolisat Tepung Biji Nangka dengan Menggunakan *Saccharomyces cerevisiae*. *Rekayasa dan Manajemen Agroindustri, 6 (2): 92-102.*
- Fardiaz, Srihandi. 1988. *Fisiologi Fermentasi*. Bogor: Pusat Antar Universitas, Institut Pertanian Bogor.
- Fariq, Anila. 2016. Microbial Cellulases: Production and Applications. *Journal of Biotechnology Science Research;3(1):122-127.*
- Fatriasari, Widya., & Euis Hermiati. 2016. Lignocellulosic Biomass for Bioproduct: Its Potency and Technology Development. *J. Lignocellulose Technol. 01, 1-14*
- Fritze, D. 2004. Taxonomy of The Genus *Bacillus* and Related Genera: The Aerobic Endospore-Forming Bacteria. *The American Phytopathological Society. vol. 94, No. 11.*
- Fuadi, AM., Kun Harismah., & Adi Setiawan. 2015. Hidrolisis Enzimatis Kertas Bekas dengan Variasi Pemanasan Awal. *University Research Colloquium. ISSN 2407-9189*
- Fuadi. AM. 2015. Hidrolisis Enzimatis Kertas Bekas dengan Variasi Pemanasan Awal. *Skripsi*. Surakarta: Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Goyal, Arun., Deepmoni Deka., Saprativ P. Das., Naresh Sahoo., Debasish Das., Mohammad Jawed., & Dinesh Goyal. 2013. Enhanced Cellulase Production

from *Bacillus subtilis* by Optimizing Physical Parameters for Bioethanol Production. *ISRN Biotechnology Volume 2013, Article ID 965310*.

Guerfali, Mohamed., Adel Saidi., Ali Gargouri., & Hafedh Belghith. 2014. Enhanced Enzymatic Hydrolysis of Waste Paper for Ethanol Production Using Separate Saccharification and Fermentation. *Appl Biochem Biotechnol*. DOI 10.1007/s12010-014-1243-1

Hadi, Mochammad. 2008. Pembuatan Anti Kertas Anti Rayap Ramah Lingkungan dengan Memanfaatkan Ekstrak Daun Kirinyuh (*Eupatorium odoratum*). *Bioma* 6, no. 2: h. 12-18.

Halimatuddahlia. 2003. *Pencegahan korosi dan Scale Pada Proses Produksi Minyak Bumi*. Teknik Kimia, Universitas Sumatera Utara Digital Library

Harmsen, Paulien., Wouter Huijgen., Laura Bermudez., & Robert Bakker. 2010. *Literature Review of Physical and Chemical Pretreatment Processes for Lignocellulosic Biomass*. Netherlands: Wageningen UR Food & Biobased Research

Hasanah, H. 2008. Pengaruh Lama Fermentasi Terhadap Kadar Alkohol Tape Ketan Hitam (*Oryza sativa* L var forma glutinosa) dan Tape Singkong (*Manihot utilissima* Pohl). *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri (UIN) Malang.

Hatmanti, A. 2000. Pengenalan *Bacillus* spp. *Oseana*. Volume Xxv, Nomor 1: 31 – 41 ISSN 0216-1877.

Hermiati, E., Mangunwidjaja, D., Sunarti, T.C., Suparno, O., & Prasetya, B. 2010. Pemanfaatan Biomassa Lignoselulosa Ampas Tebu untuk Produksi Bioetanol. *Jurnal Litbang Pertanian*, 29 (4): 121-130

Hidayat, Mohamad Rusdi. 2013. Teknologi Pretreatment Bahan Lignoselulosa dalam Proses Produksi Bioetanol. *Biopropal Industri* Vol. 4 No. 1.

Hidayat, N., Padaga, M. C., & Suhartini, S. 2006. *Mikrobiologi Industri*. Yogyakarta: Andi

Howard R., Abotsi E., Jansen Van Rensburg E., & Howard S. 2003. Lignocellulose Biotechnology : Issues of Bioconversion and Enzyme Production. *African Journal of Biotechnology*. 2(12), 602-619.

Iriyanto, K. 2007. *Mikrobiologi: Menguk Dunia Mikroorganisme*. Bandung: CV Yrama Widya.

Jamilatun, Makhabbah. 2010. Rekayasa Metabolik Mikroorganisme untuk Tujuan Produksi Bioetanol. *Jurnal Ekosains*. Vol. II. No. 2

- Jayus., Nurhayati., Ayu Mayzuhroh., Sabrina Arindhani., & Charoen Caroenchai. 2016. Studies on Bioethanol Production of Commercial Baker's and Alcohol Yeast under Aerated Culture Using Sugarcane Molasses as The Media. *Agriculture and Agricultural Science Procedia* 9:493 – 499.
- Jhonprimen, H. S., Turnip, A., & Dahlan, M.H. 2012. Pengaruh Massa Ragi, Jenis Ragi dan Waktu Fermentasi pada Bioethanol dari Biji Durian. *Jurnal Teknik Kimia*, 18 (2), 230-237.
- Judoamidjojo, M., Darwis, A. A., & Said, E. G. 1992. *Teknologi Fermentasi*. Jakarta: Rajawali Pers.
- Judoamidjojo, R. Mulyono. 1990. *Biokonversi*. Bogor : Depdikbud. Dirjen Dikti Pusat Antar Universitas Bioteknologi
- Kalpatari, Sisi Oktadira., Chairul., & Yelmida. 2019. Biokonversi Kertas HVS Bekas menjadi Bioetanol dengan Variabel Konsentrasi *Saccharomyces cerevisiae*. *Jom FTEKNIK Volume 6 Edisi 1*
- Kikas, T., L. Rocha–Meneses., M. Raud., & K. Orupöld.. 2017. Second-Generation Bioethanol Production: A Review of Strategies for Waste Valorisation. *Agronomy Research* 15(3), 830–847.
- Kumar, A., Gautam, A., & Dutt, D. 2016. Biotechnological Transformation of Lignocellulosic Biomass into Industrial Products: An Overview. *Advances In Bioscience And Biotechnology*, 7, 149-168.
- Kurniawati, I. 2009. Kualitas Bioetanol Limbah Padat Tapioka dengan Perlakuan Lama Fermentasi dan Dosis Ragi yang Ditambah H₂SO₄. *Skripsi*. Surakarta: Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Lee, H.V., Hamid, S.B.A., & Zain, A.K. 2014. Conversion of Lignocellulosic Biomass to Nanocellulose: Structure and Chemical Process. *Scientific World Journal*: 631013. DOI: 10.1155/2014/631013.
- Loelovich, Michael. 2014. Waste Paper as Promising Feedstock for Production of Biofuel. *Journal of Scientific Research & Reports* 3(7): 905-916, 2014; Article No. JSRR.2014.002
- Ma'arif, Syamsul. 2014. Kebijakan Perminyakan Nasional: Dari Kendali Negara Menuju Kapitalisme Pasar. *Jurnal Administrasi Negara, Volume 3, Nomor 1, Sept-Des 2014, Halaman 46-55*
- Madadi, Meysam., Yuanyuan Tu., & Aqleem Abbas. 2017. Recent Status on Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass for Bioethanol Production. *Electronic Journal of Biology*, Vol.13 (2): 135-143

- Mahreni, dan Suhenry, Sri. 2011. Kinetika Pertumbuhan Sel *Sacharomyces cerevisiae* dalam Media Tepung Kulit Pisang. *Seminar Rekayasa Kimia dan Proses*, 26 Juli 2011. ISSN : 1411-4216.
- Maier, R. M. 2008. *Environmental Microbiology*. New York: Academic Press.
- Maiti, Tushar Kanti., & Sadhu, Sangrila. 2013. Cellulase Production by Bacteria: A Review. *British Microbiology Research Journal*3(3): 235-258.
- Malakar, Santanu., Sanjib Kr. Paul., & K.R. Jolvis Pou. 2020. *Biotechnological Progress and Beverage Consumption*. Elsevier.
- Manwar J., Mahadik K., & Paradkar A. 2013. Plackett-Burman Design: A Statistical Method for the Optimization of Fermentation Process for the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Isolated from the Flowers of *Woodfordia fruticosa*. *Ferment Technol.* 1: 109.
- Medrano, Sofía M. Arvizu., Dalia E. Miranda Castilleja., Jesús A. Aldrete Tapia., Montserrat Hernández Iturriaga., Lourdes Soto Muñoz., & Ramón Á. Martínez Peniche. 2017. *Yeast - Industrial Applications*. Mexico: InTech Open
- Melati, Irma., Mulyasari., Mas Tri Djoko Sunarno., Maria Bintang., & Titin Kurniasih. 2014. Produksi Enzim Selulase dari Bakteri TS2B yang Diisolasi dari Rumput Laut dan Pemanfaatannya dalam Menghidrolisis Kulit Ubi Kayu dan Daun Ubi Kayu sebagai Bahan Baku Pakan Ikan. *J. Ris. Akuakultur Vol. 9 No. 2*: 263-270.
- Morana, A. M. 2011. *Cellulase From Fungi and Bacteria and Their Biotechnological Aplications*. In A. E. Golan, *Cellulase: type and action, mechanism, and use* (p. 6). New York: Nova Science Publishers, Inc.
- Muhammad, Ronald. 2014. Pengaruh Variasi Konsentrasi Bekatul pada Proses Produksi Etanol Menggunakan Singkong Karet (*Manihot glaziovii*) dengan Metode Fermentasi Menggunakan *Saccharomyces cerevisiae*. *Skripsi*. Bengkulu: Jurusan Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Bengkulu
- Mussatto, S.I. & Teixeira, J.A., 2010. Lignocellulose as Raw Material in Fermentation Processes. *Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, Pp.897-907.
- Nata, Iryanti Fatyasari., Helda Niawati., & Choir Muizliana. 2013. Pemanfaatan Serat Selulosa Eceng Gondok (*Eichhornia crassipes*) Sebagai Bahan Baku Pembuatan Kertas: Isolasi dan Karakterisasi. *Konversi. Volume 2, No. 2*.
- Nicholson, W.L. 2002. Roles of Bacillus Endospores in The Environtment . *Cell. Mol. Life. Sci.* 59. 410-416

- Octavia, S. Soerawidjaja, T.H., Purwadi, R., & Putrawan, I.D.G Arsa. 2011. Pengolahan Awal Lignoselulosa Menggunakan Amoniak untuk Meningkatkan Perolehan Gula Fermentasi. *Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia, "Pengembangan Teknologi Kimia untuk Pengolahan Sumber Daya Alam Indonesia"*. Yogyakarta. ISSN 1693-4393.
- Orji, Frank Anayo., Ekaette Nduka Dike., Adekunle Kolawole Lawal., Abdulateef Omoniyi Sadiq., Yewande Suberu., Ariyo Caleb Famotemi., Agatha Isioma Ugbana., Folake Fashola., Blossom Ita., Samuel Olakiitan Olatope., Emoleila Ejiya Itoandoan., Abimbola Olajumoke Adefiranye., & Gloria Nwakaegho Elemo. 2016. Properties of Bacillus Species Cellulase Produced using Cellulose from Brewers Spent Grain (BSG) as Substrate. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, Vol. 7, 142-148.
- Pereira JR., Nei, Maria Antonieta Peixoto G. Couto, & LÍdia Maria Melo Santa Anna. 2008. *Series on Biotechnology*. Brazil: Brazilian National Library
- Pratiwi, Arini E. 2015. Isolasi, Seleksi dan Uji Aktivitas Antibakteri Mikroba Endofit dari Daun Tanaman *Garcinia benthami* Pierre terhadap *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, dan *Salmonella typhimurium*. *Skripsi*. (tidak dipublikasikan). Jakarta: Program Studi Farmasi. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UIN Syarif Hidayatullah Jakarta.
- Purwoko, Tjahjadi. 2007. *Fisiologi Mikroba*. Jakarta: Bumi Aksara.
- Putri, Charisma Nurwiyono & Budi Utami. 2017. Pembuatan Bioetanol dengan Cara Hidrolisis Menggunakan Kertas Koran Bekas serta Pemurnian Menggunakan Agen Pengering (MgSO_4 , Na_2SO_4 , dan CaCl_2). *Journal Cis-Trans (JC-T) Volume 1, Nomor 1*. E-ISSN 2549-6573.
- Rahmi, A., Nurmiati., & Anthoni A. 2013. Uji Antimikroba Curcuma spp. Terhadap Pertumbuhan *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, dan *Escherichia coli*. *Jurnal Biologi Universitas Andalas*. Hal 1-7.
- Ramayanti, Cindi., & Giasmara, Ketty R. 2017. Pembuatan Bioetanol Berbahan Baku Kertas Bekas menggunakan Metode Hidrolisis Asam dan Fermentasi. *Indo. J. Chem. Res.*, 5(1), 17-21
- Rehm, H. J., & Reed, G. 1983. *Biotechnology Vol III: Industrial Microbiology*. Westport Connecticut: AVI Publishing Company Inc.
- Saeed, Osama, F. Rafid A. Abdulkareem., & Shatha K. Muallah. 2018. Treatment of Waste Paper Using Ultrasound and Sodium Hydroxide for Bioethanol Production. *Journal of Biotechnology Research Center*. Vol. 12. No. 1
- Saleh, F., Kheirandish F., Azizi H., & Azizi M. 2014. Molecular Diagnosis and Characterization of *Bacillus subtilis* Isolated from Burn Wound in Iran. *Res Mol Med*. Vol. 2 (2): 40-44

- Saranraj, P., D. Stella., & D. Reetha. 2012. Microbial Cellulases and its Applictions: A Review. *International Journal Of Biochemistry & Biotech Science*; 1: 1-12.
- Sarris, Dimitris., & Papanikolaou, Seraphim. 2016. Biotechnological Production of Ethanol: Biochemistry, Processes and Technologies. *Eng. Life Sci.* 16, 307–329.
- Sasmal S., & Mohanty K. 2018. Pretreatment of Lignocellulosic Biomass Toward Biofuel Production. In: Kumar S., Sani R. (eds) Biorefining of Biomass to Biofuels. *Biofuel and Biorefinery Technologies*, vol 4. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-67678-4_9
- Seftian, D., F. Antonius, & M. Faizal. 2012. Pembuatan Etanol dari Kulit Pisang Menggunakan Metode Hidrolisis Enzimatik dan Fermentasi. *Jurnal Teknik Kimia*. 18(1): 10-16.
- Senam. 2009. Prospek Bioetanol sebagai Bahan Bakar yang Terbarukan dan Ramah Lingkungan. *Prosiding Seminar Nasional Penelitian, Pendidikan dan Penerapan MIPA*. Fakultas MIPA, Universitas Negeri Yogyakarta.
- Setyohadi. 2006. *Proses Mikrobiologi Pangan (proses kerusakan dan pengolahan)*. Medan: USU Press.
- Shah, Yatri R., & Dhruvo Jyoti Sen. 2011. Bioalcohol as Green Energy - A Review. *Int J Cur Sci Res*. 2011; 1(2): 57 – 62.
- Sharma, Nisha & Nivedita Sharma. 2018. Second Generation Bioethanol Production from Lignocellulosic Waste and Its Future Perspectives: A Review. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* 7(5): 1285-1290
- Sholihati, Al Maratun., Maswati Baharuddin., & Santi. 2015. Produksi dan Uji Aktivitas Enzim Selulase dari Bakteri *Bacillus subtilis*. *Jurnal Al-Kimia*
- Sholikhah, Siti Maskurotus., Nanik Wijayati., Supartono., & Suhartono. 2018. Produksi Bioetanol dari Kertas HVS Bekas melalui Hidrolisis Enzim Selulase Jamur Tiram. *Indo. J. Chem. Sci.* 7 (1)
- Sivakumar, Nallusamy., Ahlam S. Al Azkawi., & Saif Al Bahry. 2018. Bioprocessing of Cardboard Waste for Cellulase Production. *Biomass Conversion And Biorefinery* (2018) 8:597–606
- Subekti, H. 2006. Produksi Etanol dari Hidrolisat Fraksi Selulosa Tongkol Jagung oleh *Saccharomyces cerevisiae*. *Skripsi*. Bogor: Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
- Suherman, Eman. 2017. Pengaruh Berbagai Jenis Substrat Limbah Buah dan Lama Fermentasi Terhadap Volume dan Kadar Bioetanol. *Skripsi*. Malang: UIN Malang.

- Susanto, F., Yusak, Y., & Bulan, R. 2012. Pengaruh Penambahan Ragi Roti dan Waktu Fermentasi Terhadap Glukosa Hasil Hidrolisis Selulosa Ampas Tebu (*Saccharum Officinarum*) Dengan HCL 30% dalam Pembuatan Bioetanol. *Jurnal Saintia Kimia*. 1 (1): 1-8.
- Talaro, P.K. 2008. *Foundations in Microbiology Basic Principles* Edisi 6. New York: Mc Graw-Hill Companies Inc.
- Vohra, Mustafa., Jagdish Manwar., Rahul Manmode., Satish Padgilwar., & Sanjay Patil. 2014. Bioethanol Production: Feedstock and Current Technologies. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 2:573–584
- Wahyono, Sri. 2001. Pengolahan Sampah Kertas di Indonesia. *Teknologi Lingkungan* 2, No. 3: h. 276-280.
- Wahyudi. 1997. Produksi Alkohol oleh *Saccharomyces cerevisiae* dengan Tetes Tebu (Molase) sebagai Bahan Baku Utama. *Skripsi Diterbitkan*. Bogor: Fakultas Teknik Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
- Wartini, Ni Ketut., Paulus H. Abram., & Nurdin Rahman. 2017. Pembuatan Etanol dari Buah Salak (*Salacca zalacca*) Melalui Proses Fermentasi. *J. Akademika Kim*. 6(4): 237-240.
- Wiley, J.M., Sherwood L.M., & Woolverton, C.J. 2008. *Harleys and Klem's Microbiology*. New York: Mc Graw-Hill Inc.
- Winarno, Joko. 2011. Studi Eksperimental Pengaruh Penambahan Bioetanol pada Bahan Bakar Pertamina terhadap Unjuk Kerja Motor Bensin. *Jurnal Teknik* Vol. 1 No. 1.
- Wu, Guang., & Shaomin Yan. 2013. Secretory pathway of cellulase: a mini-review. *Biotechnology for Biofuels* 6:177.
- Xu, Jiuping., Meihui Li., & Ting Ni. 2017. Feedstock for Bioethanol Production From a Technological Paradigm Perspective. *Bioresources* 10(3), 6285-6304.
- Yuda, I Gede Yogi Wikrama., I Made Mahaputra Wijaya., & Ni Putu Suwariani. 2018. Studi Pengaruh pH Awal Media dan Konsentrasi Substrat pada Proses Fermentasi Produksi Bioetanol dari Hidrolisat Tepung Biji Kluwih (*Actinocarpus communis*) dengan Menggunakan *Saccharomyces cerevisiae*. *Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri*, Vol. 6. No. 2. (115-124). ISSN: 2503-488x.
- Yulis, Aswar H. 2009. Konversi Limbah Kertas menjadi Etanol Menggunakan Kombinasi Enzim Selulase dan Selobiase melalui Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak. *Skripsi*. Jakarta: Universitas Indonesia.

Yuniarti, Dewi Putri., Surya Hatina., & Winta Efrinalia. 2018. Pengaruh Jumlah Ragi dan Waktu Fermentasi pada Pembuatan Bioetanol dengan Bahan Baku Ampas Tebu. *Jurnal Teknik Kimia Volume 3, Nomor 2*

Zabed, Hossain., Golam Faruq., Jaya Narayan Sahu., Mohd Sofian Azirun., Rosli Hashim., & Amru Nasrulhaq Boyce. 2014. Bioethanol Production from Fermentable Sugar Juice. *E-Scientific World Journal Volume 2014. Article ID 957102.*



LAMPIRAN

Lampiran 1. Data Berat Jenis Sampel

SAMPEL	ULANGAN KE-1			ULANGAN KE-2			ULANGAN KE-3		
	I	BS-BP	BJ	II	BS-BP	BJ	III	BS-BP	BJ
A1B1	17,9965	5,0147	0,9987	17,9986	5,0168	0,9991	17,9989	5,0171	0,9992
A2B1	17,9931	5,0113	0,9980	17,9884	5,0066	0,9971	17,9934	5,0116	0,9981
A3B1	17,9840	5,0022	0,9962	17,9952	5,0134	0,9984	17,9956	5,0138	0,9985
A1B2	18,0021	5,0203	0,9998	17,9928	5,0110	0,9979	17,9946	5,0128	0,9983
A2B2	17,9921	5,0103	0,9978	17,9910	5,0092	0,9976	17,9901	5,0083	0,9974
A3B2	17,9842	5,0024	0,9962	17,9861	5,0043	0,9966	17,9819	5,0001	0,9958
A1B3	17,9937	5,0119	0,9981	17,9933	5,0115	0,9980	17,9927	5,0109	0,9979
A2B3	17,9905	5,0087	0,9975	17,9874	5,0056	0,9969	17,9873	5,0055	0,9969
A3B3	17,9806	4,9988	0,9955	17,9886	5,0068	0,9971	17,9833	5,0015	0,9961
A1B4	17,9939	5,0121	0,9982	17,9965	5,0147	0,9987	17,9936	5,0118	0,9981
A2B4	17,9908	5,0090	0,9976	17,9888	5,0070	0,9972	17,9904	5,0086	0,9975
A3B4	17,9868	5,0050	0,9968	17,9888	5,0070	0,9972	17,9884	5,0066	0,9971

Rumus Berat Jenis (*Specific Gravity/SG*):

$$\frac{\text{Berat larutan baku atau sampel} - \text{berat piknometer}}{\text{berat aquades} - \text{berat piknometer}}$$

Berat piknometer kosong = 12,9818 gr

Berat piknometer berisi Aquades = 18,0031 gr

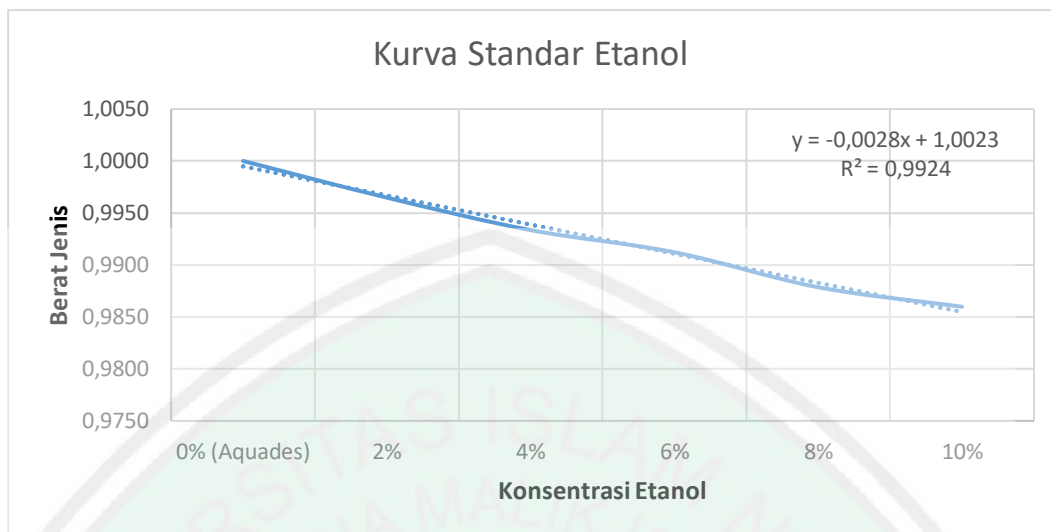
Keterangan:

BS= Berat Sampel (gr)

BP= Berat Piknometer Kosong (gr) = 12,9818 gr

BJ= Berat Jenis Sampel (gr/cm³)

Lampiran 2. Grafik Kurva Standar Etanol



Data Berat Jenis Larutan Standar Etanol

Konsentrasi Etanol (%)	Berat Jenis (<i>Specific Gravity</i>)
0 % (Aquades)	1,0000
2 %	0,9965
4 %	0,9933
6 %	0,9912
8 %	0,9879
10 %	0,9860

Rumus Kurva Standar Etanol

$$y = -0,0028x + 1,0023$$

Keterangan:

y= berat jenis sampel

x= kadar etanol

Contoh Perhitungan Kadar Etanol Sampel (jumlah ragi 5 gram, lama fermentasi 4 hari):

Perhitungan Berat Jenis Sampel (*Specific Gravity*)

Berat larutan sampel= 17,9842 gr

Berat piknometer berisi Aquades= 18,0031 gr

Berat piknometer kosong= 12,9818 gr

$$\begin{aligned}\text{Berat Jenis (Specific Gravity/SG)} &= \frac{17,9842 - 12,9818}{18,0031 - 12,9818} \\ &= \frac{5,0024}{5,0213} \\ &= 0,996236034 \text{ gr/cm}^3\end{aligned}$$

Lalu data hasil berat jenis sampel tersebut kemudian dimasukkan kedalam rumus persamaan kurva standar etanol yang telah dibuat sebelumnya

$$y = -0,0028x + 1,0023$$

berat jenis sampel= 0,996236034 gr/cm³

$$0,996236034 = -0,0028x + 1,0023$$

$$0,996236034 - 1,0023 = -0,0028x$$

$$-0,006063966 = -0,0028x$$

$$x = \frac{0,006063966}{0,0028}$$

$$x = 2,16570214$$

$$x = 2,17 \% \text{ (dibulatkan)}$$

Lampiran 3. Data Kadar Bioetanol Hasil Pengukuran dengan Piknometer

FAKTOR PERLAKUAN		KADAR BIOETANOL				
LAMA FERMENTASI	JUMLAH RAGI	ULANGAN			JUMLAH	RATA-RATA
		1	2	3		
2 HARI	3 GR	1,29%	1,14%	1,12%	3,55%	1,18%
	4 GR	1,53%	1,87%	1,51%	4,91%	1,64%
	5 GR	2,18%	1,38%	1,35%	4,92%	1,64%
4 HARI	3 GR	0,89%	1,55%	1,43%	3,87%	1,29%
	4 GR	1,60%	1,68%	1,75%	5,03%	1,68%
	5 GR	2,17%	2,03%	2,33%	6,53%	2,18%
6 HARI	3 GR	1,49%	1,52%	1,56%	4,57%	1,52%
	4 GR	1,72%	1,94%	1,95%	5,60%	1,87%
	5 GR	2,42%	1,85%	2,23%	6,50%	2,17%
8 HARI	3 GR	1,48%	1,29%	1,50%	4,26%	1,42%
	4 GR	1,70%	1,84%	1,72%	5,26%	1,75%
	5 GR	1,98%	1,84%	1,87%	5,69%	1,90%

Lampiran 4. Hasil Uji Normalitas
NPar Tests
One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		LAMA FERMENTASI	JUMLAH RAGI	KADAR ETANOL
N		36	36	36
Normal Parameters ^a	Mean	2.5000	2.0000	1.686003
	Std. Deviation	1.13389	.82808	.3494748
Most Extreme Differences	Absolute	.170	.220	.084
	Positive	.170	.220	.084
	Negative	-.170	-.220	-.058
Kolmogorov-Smirnov Z		1.022	1.318	.504
Asymp. Sig. (2-tailed)		.247	.062	.961

a. Test distribution is Normal.

Lampiran 5. Hasil Statistika Deskriptif**Descriptive Statistics**

Dependent Variable: KADAR ETANOL

LAM...	JU...	Mean	Std. Deviation	N
2 HARI	3 GR	1.1842E0	.0930166	3
	4 GR	1.6370E0	.1994730	3
	5 GR	1.6393E0	.4683309	3
	Total	1.4868E0	.3441949	9
4 HARI	3 GR	1.2908E0	.3507966	3
	4 GR	1.6773E0	.0712663	3
	5 GR	2.1752E0	.1495764	3
	Total	1.7144E0	.4301600	9
6 HARI	3 GR	1.5232E0	.0357823	3
	4 GR	1.8669E0	.1294040	3
	5 GR	2.1680E0	.2895129	3
	Total	1.8527E0	.3217873	9
8 HARI	3 GR	1.4212E0	.1134020	3
	4 GR	1.7531E0	.0752527	3
	5 GR	1.8954E0	.0752905	3
	Total	1.6899E0	.2246149	9
Total	3 GR	1.3548E0	.2109731	12
	4 GR	1.7336E0	.1435162	12
	5 GR	1.9695E0	.3372391	12
	Total	1.6860E0	.3494748	36

Lampiran 6. Analisis Pengaruh Interaksi Variasi Jumlah Ragi Roti (*Saccharomyces cerevisiae*) dan Lama Fermentasi terhadap Kadar Etanol**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: Kadar Etanol

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	3.186 ^a	11	.290	6.385	.000
Intercept	102.334	1	102.334	2.256E3	.000
Lama Fermentasi	.615	3	.205	4.516	.012
Jumlah Ragi	2.307	2	1.154	25.435	.000
Lama Fermentasi*Jumlah Ragi	.264	6	.044	.970	.466
Error	1.089	24	.045		
Total	106.608	36			
Corrected Total	4.275	35			

a. R Squared = .745 (Adjusted R Squared = .629)

Post Hoc Test

KADAR_ETANOL

Duncan

RAGI LAM A ...	N	Subset				
		1	2	3	4	5
F1R1	3	1.1842E0				
F2R1	3	1.2908E0	1.2908E0			
F4R1	3	1.4212E0	1.4212E0	1.4212E0		
F3R1	3	1.5232E0	1.5232E0	1.5232E0	1.5232E0	
F1R2	3		1.6370E0	1.6370E0	1.6370E0	
F1R3	3		1.6393E0	1.6393E0	1.6393E0	
F2R2	3		1.6773E0	1.6773E0	1.6773E0	
F4R2	3			1.7531E0	1.7531E0	
F3R2	3				1.8669E0	1.8669E0
F4R3	3				1.8954E0	1.8954E0
F3R3	3					2.1680E0
F2R3	3					2.1752E0
Sig.		.085	.060	.104	.072	.117

Lampiran 7. Analisis Pengaruh Variasi Jumlah Ragi Roti (*Saccharomyces cerevisiae*) terhadap Kadar Etanol

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Kadar Etanol

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Jumlah Ragi	2.307	2	1.154	25.435	.000

Post Hoc Test

KADAR_ETANOL

Duncan

JUMLAH RAGI	N	Subset		
		1	2	3
3 GR	12	1.3548E0		
4 GR	12		1.7336E0	
5 GR	12			1.9695E0
Sig.		1.000	1.000	1.000

Lampiran 8. Analisis Pengaruh Lama Fermentasi terhadap Kadar Etanol

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Kadar Etanol

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Lama Fermentasi	.615	3	.205	4.516	.012

Post Hoc Test

KADAR_ETANOL

Duncan

LAMA FERMENTASI	N	Subset	
		1	2
2 HARI	9	1.4868E0	
8 HARI	9	1.6899E0	1.6899E0
4 HARI	9		1.7144E0
6 HARI	9		1.8527E0
Sig.		.054	.138

Lampiran 9. Dokumentasi Penelitian



Serbuk Kasar Kertas HVS Bekas



Proses Delignifikasi Kertas HVS Bekas



Isolat Bakteri *Bacillus subtilis* untuk
Produksi Enzim Selulase



Enzim Selulase *Bacillus subtilis*



Proses Hidrolisis Kertas HVS Bekas
Menggunakan Enzim Selulase
Bacillus subtilis



Larutan Glukosa Hasil Hidrolisis



Proses Fermentasi Larutan Glukosa
Hasil Hidrolisis



Proses Destilasi Bioetanol



Sampel Etanol Hasil Destilasi



Pengukuran Kadar Etanol Menggunakan
Piknometer



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
PROGRAM STUDI BIOLOGI
Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp./ Faks. (0341) 558933
Website: <http://biologi.uin-malang.ac.id> Email: biologi@uin-malang.ac.id

Form Checklist Plagiasi

Nama : Muhammad Nabil Al Muntazhor
NIM : 15620062
Program Studi : Biologi
Pembimbing : Ir. Liliek Harianie A.R., M.P.
Judul Skripsi : Pengaruh Variasi Jumlah Ragi Roti (*Saccharomyces cerevisiae*) dan Lama Fermentasi Kertas HVS Bekas Pakai terhadap Kadar Etanol

No	Tim Check Plagiasi	Skor Plagiasi	TTD
1	Azizatur Rohmah, M.Sc		
2	Berry Fakhry Hanifa, M.Sc		
3	Bayu Agung Prahardika, M.Si	22 %	

Mengetahui,
Ketua Prodi Biologi,

Dr. Evika Sandi Savitri, M.P
NIP. 19741018 200312 2 002



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
PROGRAM STUDI BIOLOGI
Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp (0341) 558933, Fax. (0341) 558933

BUKTI KONSULTASI SKRIPSI

Nama : Muhammad Nabil Al Muntazhor
NIM : 15620062
Program Studi : S1 Biologi
Semester : Ganjil TA 2020/2021
Pembimbing : Ir. Liliek Harianie A.R., M.P.
Judul Skripsi : Pengaruh Variasi Jumlah Ragi Roti (*Saccharomyces cerevisiae*)
Dan Lama Fermentasi Kertas HVS Bekas Pakai Terhadap
Kadar Etanol

No	Tanggal	Uraian Materi Konsultasi	Ttd. Pembimbing
1.	13 Februari 2019	Konsultasi Judul, BAB I, II, dan III	1.
2.	11 Maret 2019	Revisi BAB I, II, dan III	2.
3.	13 Maret 2019	ACC BAB I, II, dan III	3.
4.	20 Maret 2020	Konsultasi BAB IV	4.
5.	21 Agustus 2020	Konsultasi BAB IV	5.
6.	18 September 2020	Konsultasi BAB IV	6.
7.	30 Oktober 2020	Revisi BAB IV	7.
8.	10 November 2020	Konsultasi BAB IV	8.
9.	18 November 2020	Revisi BAB IV	9.
10.	25 November 2020	ACC Skripsi	10.

Pembimbing Skripsi,

Ir. Liliek Harianie A.R., M.P.
NIP. 19620901 199803 2 001

Malang, 25 November 2020
Ketua Prodi Biologi,

Dr. Evika Sandi Savitri, M.P.
NIP. 19741018 200312 2 002



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
PROGRAM STUDI BIOLOGI
Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp (0341) 558933, Fax. (0341) 558933

KARTU KONSULTASI AGAMA SKRIPSI

Nama : Muhammad Nabil Al Muntazhor
NIM : 15620062
Program Studi : S1 Biologi
Semester : Ganjil TA 2020/2021
Pembimbing : Dr. Ahmad Barizi, MA
Judul Skripsi : Pengaruh Variasi Jumlah Ragi Roti (*Saccharomyces cerevisiae*) dan Lama Fermentasi Kertas HVS Bekas Pakai terhadap Kadar Etanol

No	Tanggal	Uraian Materi Konsultasi	Ttd. Pembimbing
1	11 Maret 2019	Konsultasi integrasi ayat Al-Quran BAB I dan II	1.
2	15 Maret 2019	ACC integrasi ayat Al-Quran BAB I dan II	2.
3	26 November 2020	Konsultasi integrasi ayat Al-Quran BAB IV	3.
4	27 November 2020	ACC integrasi ayat Al-Quran BAB IV	4.

Pembimbing Agama Skripsi,

Dr. Ahmad Barizi, MA
NIP. 19731212 199803 1 008

Malang, 27 November 2020
Ketua Prodi Biologi,

Dr. Evika Sandi Savitri, M.P
NIP. 19741018 200312 2 002