



**PENGARUH KONSENTRASI CRUDE ENZIM *Bacillus subtilis*
TERHADAP KADAR GULA DAN BIOETANOL HASIL
FERMENTASI KULIT SINGKONG MENGGUNAKAN
*Zymomonas mobilis***

**Arief Abdillah Nurusman¹, Trianik Widyaningrum^{2*}, Rifda Khairun Nisa³,
& Listiatie Budi Utami⁴**

^{1,2,&3}Program Studi Pendidikan Biologi, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan,
Universitas Ahmad Dahlan, Jalan Ringroad Selatan, Bantul,
Daerah Istimewa Yogyakarta 55191, Indonesia

⁴Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Terapan, Universitas Ahmad
Dahlan, Jalan Ringroad Selatan, Bantul, Daerah Istimewa Yogyakarta 55191,
Indonesia

*Email: trianik.widyaningrum@pbio.uad.ac.id

Submit: 30-10-2023; Revised: 08-12-2023; Accepted: 13-12-2023; Published: 30-12-2023

ABSTRAK: Bioetanol adalah bahan bakar alternatif yang ramah lingkungan dan terbarukan. Penggunaan bahan bakar alternatif diperlukan karena bahan bakar minyak bumi memberikan kontribusi besar terhadap peningkatan konsentrasi gas rumah kaca, khususnya CO₂. Bioetanol dapat diperoleh dari bahan yang mengandung karbohidrat seperti kulit singkong yang mempunyai kandungan karbohidrat tinggi yaitu 4,55%. Tujuan penelitian ini untuk melihat pengaruh konsentrasi crude enzim *Bacillus subtilis* pada hasil kadar gula dan bioetanol fermentasi kulit singkong dengan *Zymomonas mobilis* dan mengetahui konsentrasi crude enzim yang mempunyai pengaruh paling besar. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen dengan variabel bebas yaitu konsentrasi crude enzim selulase *B. subtilis* dengan konsentrasi 0%, 2,5%, 5%, 7,5%, 10%, 12,5%, 15%, dan 17,5%, serta variabel terikatnya adalah kadar gula dari hasil hidrolisis dan kadar bioetanol dari proses fermentasi. Data yang didapat dianalisis dengan uji ANOVA dan uji Duncan. Hasil penelitian tentang pengaruh konsentrasi crude enzim selulase *Bacillus subtilis* dari 8 konsentrasi memiliki pengaruh terhadap jumlah gula dan bioetanol yang dihasilkan dari fermentasi kulit singkong dengan *Zymomonas mobilis*. Crude enzim selulase *Bacillus subtilis* konsentrasi 17,5% mempunyai pengaruh paling besar terhadap kadar gula dan bioetanol dengan perolehan kadar gula sebesar 0,37% dan kadar bioetanol sebesar 1,67%.

Kata Kunci: Bioetanol, Kulit Singkong, *Bacillus subtilis*, *Zymomonas mobilis*.

ABSTRACT: Bioethanol is an environmentally friendly and renewable alternative fuel. The use of alternative fuels is necessary because petroleum fuels make a major contribution to increasing greenhouse gas concentrations, especially CO₂. Bioethanol can be obtained from materials containing carbohydrates such as cassava peel which has a high carbohydrate content, namely 4.55%. The aim of this research was to see the effect of the crude enzyme concentration of *Bacillus subtilis* on the results of sugar and bioethanol content of cassava peel fermentation with *Zymomonas mobilis* and to find out the crude enzyme concentration that had the greatest influence. This research is an experimental study with the independent variable, namely the concentration of crude cellulase enzyme *B. subtilis* with concentrations of 0%, 2.5%, 5%, 7.5%, 10%, 12.5%, 15%, and 17.5%, and the dependent variables are sugar content from hydrolysis and bioethanol content from the fermentation process. The data obtained were analyzed using the ANOVA test and Duncan's test. The results of research on the effect of crude *Bacillus subtilis* cellulase enzyme concentrations of 8 concentrations have an influence on the amount of sugar and bioethanol produced from fermentation of cassava peel with *Zymomonas mobilis*. Crude *Bacillus subtilis* cellulase enzyme with a concentration of 17.5% had the greatest influence on sugar and bioethanol levels with a sugar content of 0.37% and a bioethanol content of 1.67%.

Keywords: Bioethanol, Cassava Skin, *Bacillus subtilis*, *Zymomonas mobilis*.



How to Cite: Nurusman, A. B., Widyaningrum, T., Nisa, R. K., & Utami, L. B. (2023). Pengaruh Konsentrasi Crude Enzim *Bacillus subtilis* terhadap Kadar Gula dan Bioetanol Hasil Fermentasi Kulit Singkong Menggunakan *Zymomonas mobilis*. *Bioscientist : Jurnal Ilmiah Biologi*, 11(2), 1542-1552. <https://doi.org/10.33394/bioscientist.v11i2.9491>



Bioscientist : Jurnal Ilmiah Biologi is Licensed Under a CC BY-SA [Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/).

PENDAHULUAN

Bahan Bakar Minyak (BBM) merupakan jenis bahan bakar yang berasal dari minyak bumi yang tidak bisa diperbaharui dan dapat mencemari lingkungan. Sedangkan kebutuhan masyarakat terhadap BBM semakin tinggi membuat persediaannya semakin berkurang (Hidayat, 2013). Pencemaran lingkungan berupa emisi CO₂ yang merupakan gas rumah kaca, ketika konsentrasinya meningkat dapat menyebabkan terjadinya pemanasan global. Hal tersebut mengakibatkan terbentuknya lapisan di atmosfer yang membuat panas tidak dapat keluar dari bumi sehingga atmosfer bumi akan memanas. Penggunaan berbagai bahan bakar fosil atau BBM memberi sumbangan besar pada peningkatan konsentrasi gas rumah kaca, khususnya CO₂ (Pratama, 2019). Oleh karena itu, perlu adanya penanganan guna mengatasi permasalahan tersebut, salah satunya dengan pemanfaatan bahan bakar alternatif.

Bioetanol merupakan kemajuan bioteknologi yang dapat menjadi solusi dari BBM yang ramah lingkungan dan terbarukan. Artinya bahwa ketersediaan bioetanol tidak terbatas seperti BBM. Pemanfaatan bioetanol sebagai bahan bakar alternatif dapat menurunkan penggunaan bahan bakar sebesar 13,42% dan meningkatkan termal efisiensi sebesar 14,67%. Beberapa keunggulan bioetanol dibandingkan bahan bakar minyak adalah bioetanol mempunyai bilangan oktan lebih tinggi sekitar 106 sampai 110 dibandingkan bensin sebesar 91 hingga 96. Dengan ini bioetanol dapat diimplementasikan untuk campuran dalam mengurangi penggunaan BBM dan mengurangi emisi polutan dalam bentuk oksida nitrogen dan sulfur (Sudiyani *et al.*, 2019).

Bioetanol dapat diperoleh dari bahan yang memiliki kandungan karbohidrat, salah satunya yaitu kulit singkong karena memiliki karbohidrat tinggi sebesar 4,55%. Selain itu, kandungan lignoselulosa dalam kulit singkong sebelum proses delignifikasi, yakni selulosa 43,63%, amilum 36,58%, hemiselulosa 10,38%, lignin 7,65%, dan komponen lainnya sebesar 1,76% (Sastri *et al.*, 2015). Selama ini, tanaman singkong banyak dikonsumsi bagian umbinya saja sedangkan kulitnya kurang dimanfaatkan dengan baik dan menjadi limbah yang terbuang percuma. Karbohidrat yang terkandung pada kulit singkong dapat digunakan untuk pembuatan bioetanol melewati proses hidrolisis dengan memanfaatkan enzim selulase.

Bacillus subtilis merupakan bakteri penghasil enzim selulase yang berperan aktif dalam pengolahan lignoselulosa dengan aktivitas selulase yang lebih tinggi dibanding bakteri lainnya (Bilyartinus & Siswanto, 2021). Pengolahan material lignoselulosa dilakukan melalui dua tahap, yaitu tahap delignifikasi untuk menghilangkan lignin, dan tahap hidrolisis selulosa menggunakan enzim. Enzim



berfungsi sebagai katalis yang mempercepat laju reaksi tanpa ikut bereaksi (Nafiqoh & Suryaningrum, 2020). Enzim selulase memiliki kemampuan mendegradasi selulosa dan menghasilkan gula pereduksi sebagai produk. Gula ini yang nantinya akan diolah menjadi bioetanol melalui proses fermentasi.

Proses pembuatan bioetanol melalui fermentasi yang dapat mengubah glukosa menjadi etanol dilakukan menggunakan bakteri *Zymomonas mobilis*. Bakteri yang dapat menghasilkan etanol dengan kapasitas produksi tinggi dari karbohidat yaitu *Zymomonas mobilis*. Di bidang industri, *Zymomonas mobilis* memiliki beberapa keunggulan yaitu dapat hidup dengan oksigen dan tanpa oksigen, tingkat produksi lebih tinggi, dan daya fermentasi lebih spesifik daripada khamir (Albert *et al.*, 2015). Tujuan penelitian ini yaitu mengetahui pengaruh konsentrasi *crude* enzim *Bacillus subtilis* pada hasil kadar gula dan bioetanol serta mengetahui konsentrasi yang paling mempengaruhi hasil kadar gula dan bioetanol hasil fermentasi kulit singkong dengan *Zymomonas mobilis*.

METODE

Jenis penelitian eksperimen melalui metode RAL dengan 8 perlakuan dan 3 kali pengulangan. Variabel bebas konsentrasi *crude* enzim selulase *Bacillus subtilis* yaitu 0%, 2,5%, 5%, 7,5%, 10%, 12,5%, 15%, dan 17,5%, dan variabel terikatnya kadar gula hasil hidrolisis dengan *crude* enzim selulase *Bacillus subtilis* dan kadar bioetanol hasil fermentasi *Zymomonas mobilis*. Penelitian eksperimen dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Universitas Ahmad Dahlan pada bulan Maret hingga Mei tahun 2023. Data yang didapat dianalisis dengan uji regresi, uji ANOVA, dan uji Duncan.

Sterilisasi Alat

Semua alat yang digunakan dibersihkan lalu disterilisasi dengan oven selama 2 jam pada suhu 170°C. Sterilisasi alat bertujuan untuk mencegah adanya kontaminasi saat pelaksanaan eksperimen karena dapat berpengaruh terhadap hasil yang diberikan.

Penumbuhan *Bacillus subtilis*

2 gram media NA (Natrium Agar) dilarutkan dalam 100 mL aquadest dan disterilisasi dengan autoclave 120°C selama 15 menit. Lalu dituangkan pada 20 tabung reaksi dengan masing-masing tabung reaksi 7 mL, kemudian ditutup kapas dan dibungkus kertas payung. Selanjutnya dibuat agar miring dan didiamkan selama 24 jam. Inokulasi *Bacillus subtilis* pada media NA miring menggunakan kawat ose, lalu diinkubasi selama 1 hari.

Penumbuhan *Zymomonas mobilis*

2 gram media natrium agar dan 100 mL aquades dimasukkan ke dalam erlenmeyer kemudian diaduk dan disterilkan. Larutan tersebut kemudian dituangkan ke dalam 20 tabung reaksi dengan volume masing-masing sebanyak 7 mL. Kemudian dibuat agar miring dan didiamkan selama 24 jam. Selanjutnya setiap tabung reaksi diinokulasikan dengan *Zymomonas mobilis* dan diinkubasi selama 24 jam (Santi & Widyaningrum, 2022).

Pretreatment Sampel

Kulit singkong yang sudah dibersihkan dikeringkan dengan oven pada suhu 55°C selama 1 hari. Kulit singkong yang sudah kering lalu diblender



sehingga diperoleh hasil berbentuk bubuk. 300 gram bubuk singkong direndam dengan larutan NaOH selama 1 jam. Kemudian dicuci menggunakan aquades sampai pH 7. Dilakukannya pengukuran kadar gula reduksi sebelum dan sesudah *pretreatment* dengan metode DNS bertujuan untuk mengetahui perbandingan kadar gula reduksi yang dihasilkan (Widyaningrum & Parahadi, 2020).

Penyiapan Larutan Nutrisi

Bubuk urea 3 g/L, 10g/L $(\text{NH})_2\text{SO}_4$, 3g/L bubuk KH_2PO_4 , 0,5g/L bubuk $\text{MgSO}_7\text{H}_2\text{O}$, dan CaCLH_2O sebanyak 0,5g/L dimasukkan ke dalam gelas kimia 100mL dan ditambahkan aquades 80 mL, kemudian dimagnetic stirrer hingga larutan homogen.

Pembuatan Larutan Tween 80%

3 mL larutan Tween 80% dan aquades steril 300 ml dimasukkan ke dalam labu ukur, lalu diaduk agar tercampur merata. Larutan Tween 80% merupakan surfaktan non ionik berfungsi menurunkan tegangan air dan spora (Safaria *et al.*, 2013).

Pembuatan Larutan DNS

2 gram DNS, sodium sulfat 0,1 gram, dan 2 gram sodium hidroxydi (NaOH) dituangkan ke dalam gelas kimia yang berisikan aquades steril 200 mL. Diaduk hingga homogen dan ditutup menggunakan aluminium foil lalu diletakkan di ruangan yang tidak terkena sinar matahari (Widyaningrum & Parahadi, 2020).

Produksi Crude Enzim

Bubuk kulit singkong sebanyak 20 g dan 100 ml larutan nutrisi dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 500 mL. Selanjutnya disterilisasi dengan suhu 121°C selama 20 menit. Setelah media dingin, kemudian biakan bakteri *Bacillus subtilis* diinokulasi dan diinkubasi selama 4 hari.

Ekstraksi dan Isolasi Enzim

300 mL larutan Tween 80% dituangkan ke dalam sampel kulit singkong yang sudah dibuat, kemudian diletakkan pada magnetic stirrer pada 150 rpm selama 2 jam dengan suhu ruang. Selanjutnya sampel disentrifugasi dengan 3000 rpm selama 10 menit, dan filtratnya akan dipakai sebagai ekstrak enzim kasar (Widyaningrum & Parahadi, 2020).

Hidrolisis Kulit Singkong

Bubuk kulit singkong hasil *pretreatment* diberi aquades 1:10 (300 gram kulit singkong dalam 3 liter aquades), selanjutnya dididihkan dan dilakukan penyaringan dengan kain. 100 mL ekstrak kulit singkong dimasukkan ke dalam botol berukuran 100 mL sebanyak 24 botol. Selanjutnya ditambahkan *crude* enzim *Bacillus subtilis* sebanyak 10% (10 mL) dengan variasi 0%, 2,5%, 5%, 7,5%, 10%, 12,5%, 15%, dan 17,5% dengan pipet ukur 10 ml secara aseptik. Ujung botol ditutupi dengan kapas dan aluminium foil kemudian diinkubasi selama 1 hari pada suhu 37°C . Hasil hidrolisis diukur pH dan kadar gula reduksinya.

Pengukuran Gula Reduksi

Masing-masing sampel hasil hidrolisis diambil sebanyak 0,5 mL, aquades 0,5 mL, dan larutan DNS 1 mL kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi. Lalu dipanaskan dengan *waterbath* sekitar 5 menit, setelah dingin ditambahkan 1/3 dari sampel *garam Rochelle* dan divortex. Tiap sampel larutan kemudian diukur



dengan spektrofotometri panjang gelombang 540 nm (Widyaningrum & Parahadi, 2020).

Perlakuan dengan *Zymomonas mobilis*

5 gram media NB dan aquades 250 mL disterilkan dengan autoclave selama 15 menit pada suhu 121°C. Setelah dingin, biakan *Z. mobilis* dimasukkan dan diinkubasi selama 2 hari. Hasil filtrat kulit singkong setelah hidrolisis kemudian diberi kultur *Z. mobilis* sebanyak 10 mL. Selanjutnya dilakukan fermentasi selama 4 hari. Setelah fermentasi kemudian diukur kadar gula reduksinya menggunakan metode DNS guna melihat perbandingan kadar gula sebelum dan setelah perlakuan dengan *Z. mobilis* (Rahmadani *et al.*, 2017).

Pengukuran Kadar Bioetanol

Pengukuran kadar bioetanol menggunakan alkoholmeter dilakukan setiap selesai destilasi. Substrat diukur volumenya kemudian letakkan pada destilator, ditunggu hingga tetesan selesai. Destilat dimasukkan ke dalam gelas ukur, lalu alkohol meter dimasukkan ke dalam destilat. Alkohol meter akan tenggelam dan batas air di permukaan destilat menandakan kadar etanolnya (Wijaya *et al.*, 2012).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengukuran Kadar Gula Reduksi Sebelum dan Sesudah *Pretreatment*

Pretreatment dilakukan untuk memecah lignin dan membebaskan selulosa dan hemiselulosa. Selulosa dan hemiselulosa ini yang akan menghasilkan gula dan selanjutnya gula tersebut akan dipecah menjadi etanol dengan bantuan mikrobial.

Tabel 1. Kadar Gula Reduksi Sebelum dan Sesudah *Pretreatment*.

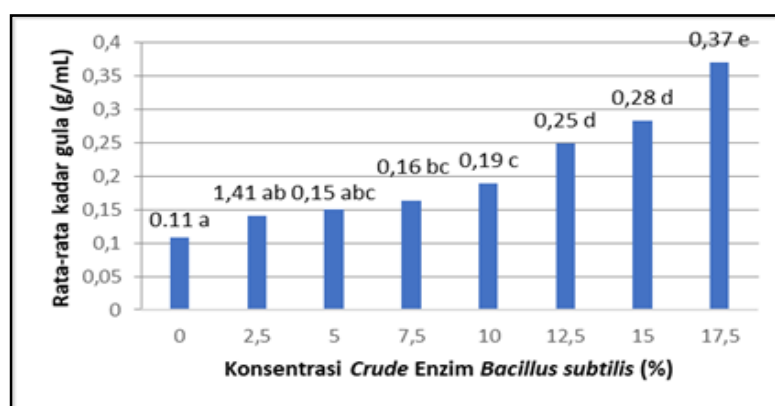
Perlakuan	Kadar Gula Reduksi (g/mL)			Rata-rata Kadar Gula Reduksi	pH
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3		
Kontrol	1.75	1.20	1.16	1.81	7
Sesudah <i>Pretreatment</i>	0.06	0.06	0.05	0.17	7

Kadar gula sebelum *pretreatment* diperoleh rata-rata 1,81 g/mL dan sesudah *pretreatment* diperoleh rata-rata 0,17 g/mL dengan pH 7 yang artinya netral. Adanya penurunan hasil kadar gula reduksi sesudah *pretreatment*. Berdasarkan penelitian Indrianeu & Singkawijaya (2019), menurunnya kadar gula reduksi sesudah *pretreatment* disebabkan terjadinya depolimerasi hemiselulosa dan adanya struktur selulosa yang terbuka dan terdispersi secara bebas dalam NaOH dan diprediksi ikut mengalir terbawa solven (NaOH) pada saat pencucian dan penyaringan. Sehingga jumlah hemiselulosa dan selulosa berkurang yang menyebabkan kadar gula yang dihasilkan menurun.

Pengukuran Kadar Gula Reduksi Kulit Singkong dengan *Crude Enzim Selulase Bacillus subtilis*

Kadar gula reduksi dilakukan dengan 8 perlakuan yaitu konsentrasi 0%, 2,5%, 5%, 7,5%, 10%, 12,5%, 15%, dan 17,5%. Proses hidrolisis masing-masing perlakuan dipengaruhi oleh aktivitas enzim selulase dari *Bacillus subtilis* yang diberikan pada sampel. Berdasarkan hasil pengukuran kadar gula reduksi kulit singkong sesudah penambahan *crude enzim Bacillus subtilis* diperoleh rata-rata

kadar gula tertinggi sebesar 0,37 g/mL pada P8 (konsentrasi 17,5%) dan rata-rata terendah sebesar 0,11 pada P1 (konsentrasi 0%). Penambahan *crude* enzim *Bacillus subtilis* pada setiap perlakuan memiliki pengaruh terhadap kadar gula reduksi yang dihasilkan. Hasil uji regresi diperoleh persamaan positif yang artinya semakin meningkat konsentrasi *crude* enzim *Bacillus subtilis* yang diberikan akan bertambah juga kadar gulanya. Sejalan dengan pendapat Ni'maturohmah & Yunianta (2015) yang menyatakan makin tinggi konsentrasi enzim maka banyaknya substrat yang terhidrolisis dan produksi gula sederhananya ikut bertambah. Hasil pH yang diperoleh yaitu 7, pH yang optimal dapat mempercepat enzim dalam mengkatalis suatu reaksi dengan baik. Enzim tidak akan bekerja optimum pada pH yang terlalu rendah (asam) maupun pH yang terlalu tinggi (basa) (Safaria *et al.*, 2013).



Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata (Duncan 5%).

Gambar 1. Diagram Hasil Rata-rata Kadar Gula Sesudah Perlakuan Crude Enzim *Bacillus subtilis*.

Tabel 2. Hasil Uji ANOVA Kadar Gula Reduksi Sesudah Perlakuan Crude Enzim *Bacillus subtilis*.

	Sum of Squares	df	Mean Square	f	Sig.
Between Groups	.162	7	.023	36.563	.000
Within Groups	.010	16	.001		
Total	.172	23			

Data yang diperoleh pada Gambar 1 dianalisis dengan uji ANOVA untuk melihat pengaruh perbedaan konsentrasi dari enzim tersebut terhadap kadar gula reduksi yang dihasilkan. Hasil uji ANOVA diketahui nilai signifikansi sebesar $0,000 < 0,05$, sehingga H_0 ditolak dan H_1 diterima. Terdapat perbedaan signifikan dan dinyatakan ada pengaruh pada hasil pengukuran gula reduksi pada setiap perlakuan. Oleh karena itu dilakukan uji lanjut Duncan untuk melihat beda nyata pada tiap perlakuan. Hasil uji Duncan dapat dilihat pada Gambar 1.

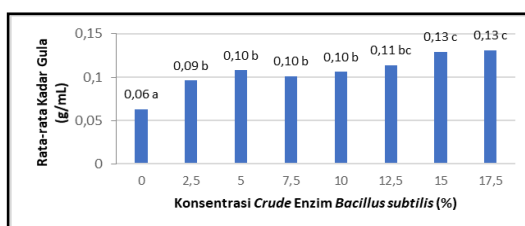
Pengukuran Kadar Gula Reduksi Kulit Singkong Sesudah Fermentasi Menggunakan *Zymomonas mobilis*

Hasil uji kadar gula reduksi kulit singkong sesudah fermentasi dengan *Zymomonas mobilis* dengan konsentrasi yang diberikan yaitu 10%, menghasilkan rata-rata tertinggi sebesar 0,13 g/mL pada P8 (konsentrasi 17,5%) dan rata-rata terendah sebesar 0,06 pada P1 (konsentrasi 0%). Adanya penurunan hasil uji kadar gula reduksi sebelum dan setelah fermentasi menggunakan *Zymomonas mobilis* di setiap perlakuannya. Hal ini karena gula pada media fermentasi digunakan secara terus menerus oleh *Zymomonas mobilis* untuk pertumbuhannya, bereproduksi, serta mempertahankan hidupnya. Adanya gula reduksi sangat penting bagi *Zymomonas mobilis* karena dijadikan sumber energi dalam proses metabolismenya (Rahmadani *et al.*, 2017). Sebanding dengan pendapat Bagaskara *et al.* (2020) yang menyatakan bahwa saat fermentasi terjadi penurunan gula menjadi etanol sehingga kadar gula reduksi turun seiring dengan bertambahnya produksi etanol.

Tabel 3. Hasil Pengukuran pH Kulit Singkong Sesudah Fermentasi Menggunakan *Zymomonas mobilis*.

Konsentrasi Crude Enzim (%)	Nilai pH			Rata-rata pH
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	
0	6	6	6	6
2.5	5	6	6	5.6
5	6	6	6	6
7.5	6	5	6	5.6
10	6	6	6	6
12.5	6	6	5	5.6
15	5	6	6	5.6
17.5	6	6	6	6

pH adalah faktor yang dapat mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme dan pembuatan produk hasil dari proses fermentasi, karena setiap mikroorganisme memiliki kisaran pH optimalnya masing-masing. Hasil pengukuran pH setelah fermentasi dengan *Zymomonas mobilis* diperoleh rata-rata 5,6 dan 6 (asam). Terjadinya penurunan pH setelah fermentasi disebabkan *Zymomonas mobilis* selain memproduksi etanol juga terdapat CO₂ dan asam-asam organik (Fadilah *et al.*, 2018). pH yang terukur sudah sesuai dengan teori Malau *et al.* (2022) bahwa pH optimum saat fermentasi dengan *Zymomonas mobilis* berkisar 4-7.



Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata (Duncan 5%).

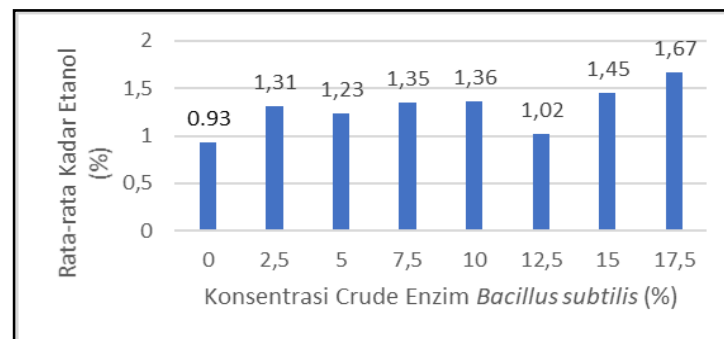
Gambar 2. Diagram Konsentrasi Crude Enzim *Bacillus subtilis* terhadap Kadar Gula Reduksi Hasil Fermentasi Dengan *Zymomonas mobilis*.

Tabel 4. Hasil Uji ANOVA Kadar Gula Reduksi Setelah Fermentasi Kulit Singkong dengan *Zymomonas mobilis*.

	Sum of Squares	df	Mean Square	f	Sig.
Between Groups	.009	7	.001	11.030	.000
Within Groups	.002	16	.000		
Total	.011	23			

Hasil uji ANOVA diperoleh signifikansi sebesar 0,000 artinya nilai 0,000 < 0,05 sehingga H_0 ditolak dan H_1 diterima. Hal ini dinyatakan bahwa terdapat beda nyata antara rerata gula reduksi terhadap gula reduksi pada setiap perlakuan. Selanjutnya dilakukan uji Duncan. Hasil uji Duncan dapat dilihat pada Gambar 2.

Pengukuran Bioetanol Kulit Singkong Menggunakan *Zymomonas mobilis*



Gambar 3. Diagram Hasil Uji Kadar Etanol Kulit Singkong Menggunakan *Zymomonas mobilis*.

Salah satu faktor yang berpengaruh terhadap fermentasi bioetanol yaitu konsentrasi inokulum yang dipakai. Penelitian ini menggunakan inokulum *Zymomonas mobilis* karena lebih toleran terhadap pH rendah, suhu, serta tahan terhadap bioetanol berkonsentrasi tinggi. Pada Gambar 3 dapat disimpulkan bahwa tiap perlakuan menghasilkan kadar etanol yang tidak meningkat secara konsisten. Penurunan kadar bioetanol disebabkan karena etanol telah dikonversikan membentuk senyawa lain yaitu ester. Hasil fermentasi selain menjadi bioetanol yaitu adanya asam asetat yang merupakan asam karboksilat yang mampu bereaksi dengan alkohol membentuk ester, inilah yang menyebabkan turunnya kadar etanol (Herawati *et al.*, 2016). Menurut Rahmadani *et al.* (2017), hal ini juga dapat disebabkan karena semakin tinggi konsentrasi *Z. mobilis* yang digunakan maka selain untuk proses metabolisme (pengubahan substrat menjadi produk), *Z. mobilis* juga lebih banyak mengkonsumsi substrat dan nutrisi untuk proses pertumbuhannya, sehingga tidak mengubah seluruh substrat menjadi produk dan produk yang dihasilkan menjadi berkurang.

Uji kadar bioetanol dengan proses destilasi dari hasil fermentasi dengan *Zymomonas mobilis* diperoleh rata-rata kadar bioetanol tertinggi sebesar 1,67 pada P8 (konsentrasi 17,5) dan terendah sebesar 0,93 pada P1 (konsentrasi 0%). Pada hasil bioetanol P8 (konsentrasi 17,5) sesuai dengan penelitian Azhari (2020) bahwa tingginya kadar glukosa yang ada akan menyebabkan tingginya kadar bioetanol yang didapat. Hasil bioetanol terendah terjadi pada P1 (kontrol) dimana



tidak adanya penambahan *crude* enzim sehingga tidak menghasilkan etanol secara maksimal. Sejalan dengan penelitian Widyaningrum & Parahadi (2020) bahwa kadar bioetanol yang paling kecil ada pada kontrol, pada perlakuan tersebut tanpa adanya enzim selulase yang menyebabkan pemecahan selulosa menjadi glukosa tidak maksimal.

Tabel 5. Hasil Perhitungan Uji ANOVA Kadar Bioetanol dengan *Zymomonas mobilis*.

	Sum of Squares	df	Mean Square	f	Sig.
Between Groups	1.224	7	.175	2.277	.082
Within Groups	1.228	16	.077		
Total	2.452	23			

Perhitungan ANOVA diperoleh nilai signifikansi sebesar $0,082 > 0,05$, sehingga H_0 ditolak dan H_a diterima. Disimpulkan bahwa tidak ada pengaruh konsentrasi *crude* enzim *B. subtilis* terhadap kadar bioetanol yang dihasilkan sehingga tidak dilakukan uji lanjut.

SIMPULAN

Konsentrasi *crude* enzim *B. subtilis* berpengaruh pada hasil kadar gula dan bioetanol hasil fermentasi kulit singkong menggunakan *Zymomonas mobilis*. Konsentrasi *crude* enzim *Bacillus subtilis* yang paling berpengaruh terhadap kadar gula dan bioetanol hasil fermentasi kulit singkong dengan *Z. mobilis* yaitu konsentrasi 17,5% dengan kadar gula reduksi sebesar 0,37 g/mL dan kadar bioetanol sebesar 1,67%.

SARAN

Diharapkan ada penelitian lanjutan dengan mengatur suhu, pH, dan konsentrasi *crude* enzim selulase *Bacillus subtilis* untuk mengetahui kondisi optimum *crude* enzim selulase *Bacillus subtilis* dalam memfermentasi kulit singkong dengan *Z. mobilis* dan menghasilkan kadar gula dan bioethanol yang tinggi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada seluruh pihak yang telah memberikan bantuan, arahan, dan dorongan dalam pelaksanaan penelitian ini, terutama Ibu Dr. Trianik Widyaningrum, M.Si.

DAFTAR RUJUKAN

- Albert., Idiawati, N., & Rudiyanisya. (2015). Pembuatan Bioetanol Menggunakan *Zymomonas mobilis* dari Limbah Tongkol Jagung. *Jurnal Kajian Komunikasi*, 4(2), 72-75.
- Azhari, H. (2020). Pengaruh Volume Inokulum *Zymomonas mobilis* terhadap Konsentrasi Bioetanol dari Pati Buah Lindur (*Burquiera gymnorhiza*) yang Dihidrolisis Menggunakan Asam Klorida 25%. *Repositori Institusi*. Universitas Sumatera Utara.
- Bagaskara, A., Wijaya, I. M. M., & Antara, N. S. (2020). Isolasi dan Karakterisasi
- Uniform Resource Locator: <https://e-journal.undikma.ac.id/index.php/bioscientist>



- Bakteri Penghasil Bioetanol dari Lingkungan Industri Arak di Desa Tri Eka Buana, Kecamatan Sidemen, Karangasem Bali. *Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri*, 8(2), 290-300. <https://doi.org/10.24843/JRMA.2020.v08.i02.p13>
- Bilyartinus, G., & Siswanto, A. (2021). The Effect of *Bacillus subtilis* on Bioethanol Production from Ambon Banana (*Musa paradisiaca* var. sapientum Linn) Peels by Using Fermentation Process. *Journal of Vocational Studies on Applied Research*, 3(2), 26-30. <https://doi.org/10.14710/jvsar.v3i2.11081>
- Fadilah, U., Wijaya, I. M. M., & Antara, N. S. (2018). Studi Pengaruh pH Awal Media dan Lama Fermentasi pada Proses Produksi Etanol dari Hidrolisat Tepung Biji Nangka dengan Menggunakan *Saccharomyces cerevisiae*. *Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri*, 6(2), 92-102. <https://doi.org/10.24843/JRMA.2018.v06.i02.p01>
- Herawati, D. A., Kusumawardhani, E., & Puspawati, N. (2016). Pemanfaatan Limbah Ampas Pati Aren Menjadi Bioetanol Secara Enzimatis Metode Konvensional dan SFF (*Simultaneous of Saccarification and Fermentation*). In *Simposium Nasional RAPI XV* (pp. 37-45). Surakarta, Indonesia: Fakultas Teknik, Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Hidayat, M. R. (2013). Teknologi *Pretreatment* Bahan Lignoselulosa. *Biopropal Industri*, 4(1), 33-48. <https://doi.org/10.36974/jbi.v4i1.807>
- Indrianeu, T., & Singkawijaya. (2019). Potensi Pemanfaatan dan Pengelolaan Limbah Industri Rumah Tangga Tepung Tapioka di Tasikmalaya. In *Prosiding Seminar Nasional Geografi Universitas Muhammadiyah Surakarta 2019* (pp. 117-126). Surakarta, Indonesia: Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Malau, W., Made, M., & Arnata, I. W. (2022). Variasi pH pada Media Tumbuh dan Suhu Fermentasi dalam Memproduksi Etanol oleh Isolat Bu3.111E1. *Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri*, 10(02), 202-210. <https://doi.org/10.24843/JRMA.2022.v10.i02.p08>
- Nafiqoh, N., & Suryaningrum, L. H. (2020). Hidrolisis Ampas Tebu Menggunakan Enzim Selulase dari Bakteri *Bacillus subtilis* dalam Upaya Pemanfaatannya sebagai Bahan Pakan Ikan. In *Prosiding Seminar Nasional Biologi di Era Pandemi Covid-19* (pp. 428-435). Gowa: Indonesia: Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar.
- Ni'maturohmah, E., & Yuniarta. (2015). Hidrolisis Pati Sagu (*Metroxylon sagu* Rottb.) oleh Enzim *B-amilase* untuk Pembuatan Dekstrin. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, 3(1), 292-301.
- Pratama, R. (2019). Efek Rumah Kaca terhadap Bumi. *Buletin Utama Teknik*, 14(2), 1410-4520.
- Rahmadani, S., Muria, S. R., & Utami, S. P. (2017). Produksi Bioetanol dari Mahkota Nanas Menggunakan Bakteri *Zymomonas mobilis* dengan Variasi Konsentrasi Inokulum dan Penambahan Nutrisi. *JOM FTEKNIK*, 4(2), 1639-1642.
- Safaria, S., Idiawati, N., & Zaharah, T. A. (2013). Efektivitas Campuran Enzim



- Selulase dari *Aspergillus niger* dan *Trichoderma reesei* dalam Menghidrolisis Sabut Kelapa. *Jurnal Rekayasa*, 2(1), 46-51.
- Santi, S. N., & Widyaningrum, T. (2022). Produksi Bioetanol dari Limbah Batang Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis*) Menggunakan *Zymomonas mobilis* dengan Perlakuan Crude Enzim *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger*. *Jurnal Biolokus*, 5(1), 18-23. <http://dx.doi.org/10.30821/biolokus.v5i1.1260>
- Sastri, I. G. A. A. D., Anggreni., Aam., & Putra, G. G. (2015). Optimasi Konsentrasi Substrat Kulit Singkong (*Manihot esculenta* Crantz.) dan Lama Fermentasi terhadap Aktivitas Filter Paperase dari Kapang *Trichoderma viride* FNCC 6013. *Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri*, 3(1), 31-38.
- Sudiyani, Y., Amriani, F., Simanungkalit, S. P., Muryanto., Dahnum, D., Abimanyu, H., Triwahyuni, E., Burhani, D., Aiman, S., Mansur, D., Laksmono, J. A., Waluyo, J., Sari, A. A., & Puteri, A. M. H. (2019). *Perkembangan Bioetanol G2: Teknologi dan Perspektif*. Jakarta: LIPI Press.
- Wijaya, I. M. A. S., Arthawan, I. G. K. A., & Sari, A. N. (2012). Potensi Nira Kelapa sebagai Bahan Baku Bioetanol. *Jurnal Bumi Lestari*, 12(1), 85-92.
- Widyaningrum, T., & Parahadi, M. (2020). Kadar Bioetanol Kulit Mangga (*Mangifera indica*) dengan Perlakuan Enzim Selulase dari *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger*. *Life Science*, 9(2), 194-203. <https://doi.org/10.15294/lifesci.v9i2.47162>