

PENGARUH KOMBINASI *PRETREATMENT*, HIDROLISIS, DAN FERMENTASI TERHADAP PRODUKSI BIOETANOL DARI LIMBAH PADAT AREN

Dennis Farina Nury^{1*}, Muhammad Zulfikar Luthfi¹, Tri Widjaja²

¹Program Studi Teknologi Proses Industri Petrokimia, Politeknik Industri Petrokimia Banten, Serang, 42166, Indonesia

²Departemen Teknik Kimia, Fakultas Teknologi Industri dan Rekayasa Sistem, Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya, 60111, Indonesia

*Email: dennis.farina@poltek-petrokimia.ac.id

Abstrak

Keterbatasan sumber daya berbasis fosil mendorong pencarian bahan bakar alternatif yang lebih berkelanjutan, salah satunya bioetanol dari limbah biomassa. Limbah padat aren, hasil samping dari ekstraksi nira, memiliki potensi besar sebagai bahan baku bioetanol meskipun kandungan ligninnya yang tinggi menghambat proses hidrolisis. Penelitian ini bertujuan mengevaluasi pengaruh kombinasi *pretreatment*, hidrolisis, dan fermentasi terhadap produksi bioetanol. *Pretreatment* menggunakan kombinasi asam sulfat (H_2SO_4) 5% dan organosolv dengan etanol dilakukan untuk meningkatkan delignifikasi. Pada hidrolisis, enzim selulase *Trichoderma reesei* dan *xylanase* digunakan untuk mengubah hemiselulosa dan selulosa menjadi gula reduksi. Dalam proses fermentasi, *Saccharomyces cerevisiae* dan *S. cerevisiae - Pichia stipitis* digunakan untuk mengubah gula menjadi bioetanol. Hasil menunjukkan delignifikasi tertinggi dicapai pada *pretreatment* H_2SO_4 5% dan organosolv selama 60 menit. Yield bioetanol tertinggi (0,26%) diperoleh dengan kombinasi *S. cerevisiae* dan *P. stipitis* selama fermentasi 72 jam. Penelitian ini menunjukkan bahwa kombinasi proses *pretreatment* dan hidrolisis secara efektif dapat digunakan untuk mengkonversi limbah padat aren menjadi bioetanol.

Kata Kunci: Aren; Bioetanol; Delignifikasi; Fermentasi; Organosolv

Abstract

The limitations of fossil-based resources encourage the search for more sustainable alternative fuels, one of which is bioethanol from biomass waste. Aren palm solid waste, a by-product of sap extraction, has great potential as a bioethanol feedstock, although its high lignin content inhibits hydrolysis. This study aims to evaluate the effect of a combination of pretreatment, hydrolysis, and fermentation on bioethanol production. Pretreatment using a combination of 5% sulfuric acid (H_2SO_4) and organosolv with ethanol was carried out to improve delignification. Trichoderma reesei cellulase and xylanase enzymes were used in hydrolysis to convert hemicellulose and cellulose into reducing sugars. In the fermentation process, Saccharomyces cerevisiae and S. cerevisiae - Pichia stipitis were used to convert sugar into bioethanol. The results showed the highest delignification was achieved at 5% H_2SO_4 pretreatment and organosolv for 60 min. The highest bioethanol yield (0.26%) was obtained with the combination of S. cerevisiae and P. stipitis during 72-hour fermentation. This study shows that combining pretreatment and hydrolysis processes can convert palm solid waste into bioethanol.

Keywords: Arenga; Bioethanol; Delignification; Fermentation; Organosolv

1. PENDAHULUAN

Produksi bioetanol sebagai bahan bakar alternatif telah menjadi fokus utama dalam upaya mengurangi

ketergantungan pada bahan bakar fosil. Bioetanol generasi kedua, yang berbasis lignoselulosa, menawarkan solusi ramah lingkungan dengan

memanfaatkan limbah biomassa yang melimpah dan tidak bersaing dengan kebutuhan pangan. Salah satu bahan baku yang potensial untuk produksi bioetanol adalah limbah padat aren (*Arenga pinnata*), hasil samping dari proses ekstraksi nira aren. Pohon aren (*Arenga pinnata*) merupakan sejenis pohon palem yang tumbuh di daerah tropis, terutama di Asia Tenggara, termasuk salah satunya di Indonesia (Sanyang et al., 2016). Hampir seluruh bagian dari pohon aren dapat dimanfaatkan untuk kebutuhan manusia seperti daging buahnya sebagai makanan penutup, nira gula aren, dan minuman fermentasi, seratnya sebagai tali dan bahan bakar terbarukan seperti bioetanol (Ansar et al., 2020).

Bagian dari pohon aren yang digunakan sebagai bahan baku bioetanol adalah ampas aren yang merupakan limbah padat yang berasal dari ekstraksi pati aren. Limbah padat aren sangat melimpah karena hanya 4% produksi tepung aren yang menjadi produk dan sisanya merupakan limbah padat berupa ampas yang sudah tidak dapat dimanfaatkan lagi (Purnavita et al., 2017). Limbah padat aren memiliki kandungan selulosa yang tinggi yaitu 60,61%, hemiselulosa yang cukup besar yaitu 15,74% serta lignin sebesar 14,21% yang dapat menghambat proses konversi menjadi bioetanol (Herawati et al., 2016).

Beberapa penelitian sebelumnya telah mengeksplorasi konversi limbah lignoselulosa menjadi bioetanol melalui tahapan *pretreatment*, hidrolisis, dan fermentasi. *Pretreatment* bertujuan untuk menghilangkan lignin dan meningkatkan ketersediaan selulosa untuk hidrolisis. Metode *pretreatment* seperti penggunaan asam sulfat (H_2SO_4) dan organosolv telah dilaporkan mampu meningkatkan delignifikasi (Dewi et al., 2019; Lini et al., 2018). Selain itu, metode organosolv menggunakan pelarut organik seperti etanol dengan tambahan basa atau asam dapat memutus ikatan ester pada lignin, menghasilkan residu yang lebih kaya selulosa (Salapa et al., 2017). Kombinasi asam sulfat dengan organosolv meningkatkan efisiensi delignifikasi hingga 85%, dibandingkan metode tunggal yang hanya mencapai sekitar 60-70%. Oleh karena itu, kombinasi kedua metode ini memberikan substrat yang lebih siap untuk tahap hidrolisis (Mateo et al., 2021).

Pada tahap hidrolisis, penggunaan enzim selulase dari *Trichoderma reesei* dan kombinasi dengan xilanase dari *Aspergillus niger* menunjukkan hasil yang optimal dalam mengonversi selulosa dan hemiselulosa menjadi gula reduksi (Lini et al., 2018). Penelitian Lini (2015) menunjukkan bahwa kombinasi selulase dan xilanase meningkatkan yield gula reduksi hingga 40%, dibandingkan 25% dengan selulase saja, di mana pH, suhu, waktu reaksi, dan konsentrasi enzim menjadi faktor utama efisiensi hidrolisis. Aktivitas optimal enzim selulase terjadi pada pH 4,8–5,5 dan suhu 50–60°C, di mana struktur selulosa lebih mudah diakses oleh enzim (Pandey & Negi, 2015). Peningkatan konsentrasi enzim hingga 20 U/g substrat dapat meningkatkan produksi gula reduksi hingga 35% (Herawati et al., 2016). Waktu reaksi juga berperan penting, dengan hidrolisis selama 36 jam menghasilkan gula reduksi yang lebih tinggi dibandingkan durasi 24

jam, tanpa risiko degradasi gula menjadi produk samping (Yoo et al., 2017). Dengan kombinasi enzim yang tepat dan parameter hidrolisis yang optimal, yield gula reduksi dapat ditingkatkan secara signifikan untuk mendukung fermentasi bioetanol.

Gula reduksi yang dihasilkan dari hidrolisis, terdiri dari pentosa (xilosa) dan heksosa (glukosa), merupakan substrat utama dalam fermentasi bioetanol. Glukosa umumnya difermentasi secara efisien oleh mikroorganisme seperti *Saccharomyces cerevisiae*, sedangkan xilosa membutuhkan mikroorganisme spesifik seperti *Pichia stipitis* atau *Zymomonas mobilis* yang memiliki kemampuan metabolisme pentosa (Dewi et al., 2019). Penelitian oleh Ansar et al., (2021) menunjukkan bahwa pH 5–5,5 dan suhu 30–35°C merupakan kondisi optimal untuk fermentasi pentosa dan heksosa secara simultan, menghasilkan etanol dengan yield tinggi. Selain itu, jumlah inokulum mikroorganisme juga berpengaruh signifikan, di mana peningkatan konsentrasi inokulum hingga 10^8 CFU/mL mampu mempercepat konversi gula reduksi menjadi bioetanol (Widjaja et al., 2019).

Mikroorganisme yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis*, serta kombinasi keduanya. *Saccharomyces cerevisiae* telah banyak digunakan dalam fermentasi etanol karena kemampuannya dalam memfermentasi glukosa (Da Silva Fernandes et al., 2022). Sementara itu, *Pichia stipitis* menawarkan potensi yang menarik dalam konversi xilosa menjadi etanol, terutama dari hidrolisat lignoselulosa (Sritrakul et al., 2017). Kombinasi *Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipitis* dipilih untuk mengeksplorasi sinergi keduanya dalam meningkatkan yield bioetanol dari limbah padat aren.

Saccharomyces cerevisiae efektif dalam fermentasi glukosa, sementara *Pichia stipitis* dapat memfermentasi xilosa yang terdapat dalam limbah lignoselulosa. Keterbaruan dalam penelitian ini terletak pada penggunaan kombinasi *Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipitis* untuk memaksimalkan konversi lignoselulosa dalam limbah padat aren menjadi bioetanol. Pendekatan ini berpotensi meningkatkan efisiensi dan yield bioetanol dibandingkan dengan penggunaan satu jenis mikroorganisme saja, serta mendukung pengembangan energi terbarukan berbasis bahan baku yang melimpah dan berkelanjutan.

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh kombinasi *pretreatment*, hidrolisis, dan fermentasi dari limbah padat aren, dengan fokus pada setiap tahap proses untuk menghasilkan bioetanol.

2. BAHAN DAN METODE

Bahan baku yang digunakan dalam penelitian ini adalah limbah padat aren yang dihasilkan dari industri pengolahan aren di wilayah Jawa Barat, dimana limbah padat aren digiling dan direduksi ukuran partikelnya menjadi 100 mesh, kemudian dioven selama 4 jam pada temperatur 105°C. Bahan lainnya yaitu *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis*, ekstrak yeast, enzim selulase, enzim xilanase, larutan DNS (asam 3-5 dinitrosalisilat),

larutan etanol 51.29% (v/v), MgSO₄·7H₂O, (NH₄)₂SO₄, dan KH₂PO₄.

2.1 Perlakuan Awal Bahan Baku Limbah Padat Aren

Perlakuan awal bahan baku limbah padat aren dilakukan menggunakan dua tahapan, yaitu menggunakan larutan H₂SO₄ encer kemudian dilanjutkan perlakuan menggunakan larutan NaOH 3% dan etanol 51.29% (*organosolv*). Struktur kristal selulosa diamati dengan *X-ray diffraction* (XRD) *PANalytical Xpert Pro diffractometer* dengan pengaturan *scope scan* pada 2θ = 5-50°. *Diffraction peak* ditinjau pada 2θ = 22,50505 dan 2θ = 18,77844. XRD ini bertujuan untuk mengidentifikasi perubahan indeks kristalinitas (CrI) pada biomassa sebelum dan setelah *pretreatment* menggunakan persamaan berikut:

$$CrI = \frac{(I_{002} - I_{am})}{I_{002}} \times 100\% \quad (1)$$

dimana I₀₀₂ adalah intensitas maksimum difraksi pada bidang kristalin (002), yang mewakili bagian kristal dari selulosa, dan I_{am} adalah intensitas minimum antara puncak kristalin (002) dan puncak amorf, yang mencerminkan bagian amorf dari selulosa (Dewi et al., 2019).

Kemudian, kandungan lignoselulosa dianalisis dengan metode Chesson. Limbah padat aren dilakukan perlakuan awal menggunakan variasi larutan H₂SO₄ 1, 2, dan 3% (v/v) dengan perbandingan solid:likuid (1:5) dalam autoklaf pada temperatur 127°C selama 60 menit. Kemudian dilanjutkan dengan perlakuan *organosolv* menggunakan larutan NaOH 3% dan etanol 51.29% dengan rasio limbah padat aren:likuid adalah 1:7 (b/b). *Pretreatment* *organosolv* dilakukan di dalam *autoclave* selama 60 menit pada temperatur 127°C. Residu padat dipisahkan dengan penyaringan dan dicuci dengan air suling sampai pH netral tercapai. Padatan dikeringkan pada temperatur 60°C hingga tercapai berat konstan.

2.2 Hidrolisis Enzimatik Bahan Baku Limbah Aren

Sebanyak 0,5 gram limbah padat aren yang telah dihidrolisis dengan campuran enzim selulase dari *T. reesei* dan xilanase dari *A. niger* (18,6 U/g masing-masing) seperti pada penelitian yang telah dilakukan sebelumnya oleh Dewi et al., (2019). Larutan penyangga asam sitrat 0,1 M (pH 3) ditambahkan hingga volume 30 ml. Hidrolisis dilakukan pada 60°C selama 36 jam dengan kecepatan 125 rpm dalam inkubator shaker. Konsentrasi gula reduksi diukur menggunakan larutan DNS.

2.3 Fermentasi Hidrolisat Dari Limbah Padat Aren Menjadi Etanol

Mekanisme fermentasi hidrolisat limbah padat aren terdiri dari beberapa tahapan yaitu: pengembangan mikroorganisme, pembuatan starter, dan fermentasi etanol.

Tahap aklimatisasi *Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipitis* dilakukan pada media cair yaitu *potato dextrose broth* (PDB) dan nutrisi. Sepuluh *loop* dari masing-masing mikroorganisme di aklimatisasi ke dalam media cair yang memiliki komposisi 100 ml PDB

dan nutrisi (0,3315 gram *yeast extract*; 0,0663 gram MgSO₄·7H₂O; 0,3315 gram (NH₄)₂SO₄; dan 0,828 gram KH₂PO₄) yang telah disterilisasi di dalam inkubator goyang selama 42 jam pada kondisi 35°C dan 125 rpm.

Pada tahap prekultuur, sebanyak 2,5 ml mikroorganisme diinokulasikan ke dalam campuran 18 ml media cair dan 4,5 ml hidrolisat dalam erlenmeyer. Fermentasi etanol dilakukan menggunakan variasi mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipitis* pada jam ke-14, dengan komposisi 25 ml hidrolisat, 65 ml media cair, dan mikroorganisme pada suhu 35°C dalam inkubator goyang selama 72 jam dengan kecepatan 125 rpm.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Perlakuan Awal Limbah Padat Aren

Pretreatment bahan baku dalam penelitian ini dilakukan melalui dua tahap, yaitu *pretreatment* asam dan *organosolv*. Perlakuan asam dapat mengurangi lignin dan hemiselulosa, serta merusak struktur lignin, selulosa, dan hemiselulosa dalam lignoselulosa, membuatnya lebih mudah diakses oleh enzim. Hal ini mempermudah proses hidrolisis dan meningkatkan jumlah gula reduksi yang dihasilkan. Kadar selulosa, hemiselulosa, dan lignin pada limbah padat aren setelah *pretreatment* asam, berdasarkan analisis metode Chesson, dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi lignoselulosa limbah padat aren pada perlakuan awal dengan variasi konsentrasi asam

Variasi	Komponen		
	Hemiselulosa	Selulosa	Lignin
Sebelum perlakuan	13,9783	10,1936	18,4925
Perlakuan 1% H ₂ SO ₄	1,3918	2,24	2,83
Perlakuan 3% H ₂ SO ₄	1,5697	1,84	2,63
Perlakuan 5% H ₂ SO ₄	1,5947	1,861	2,12

Pada *pretreatment* asam, terjadi penurunan lignin untuk setiap konsentrasi asam yaitu 2,837 g untuk penggunaan H₂SO₄ 1%, 2,6384 g untuk penggunaan H₂SO₄ 3% dan 2,1262 g untuk penggunaan H₂SO₄ 5%. Lignin terendah dihasilkan dengan *pretreatment* asam 5% yaitu sebesar 2,1262 g. Penurunan lignin sebesar 84,65% dari massa awal. Semakin tinggi konsentrasi asam yang digunakan akan menghasilkan pelepasan gula pentose yang lebih banyak (Hans et al., 2023).

Semakin tinggi konsentrasi asam, maka semakin tinggi pula nilai α selulosa dan hemiselulosa. Peningkatan ini disebabkan adanya pemisahan lignin sebagai pengikat selulosa sehingga meningkatkan α selulosa dan hemiselulosa. Penurunan hemiselulosa pada penggunaan H₂SO₄ 5% terjadi sebesar 88,59%. Penurunan ini terjadi karena asam dapat melarutkan hemiselulosa sehingga dapat meningkatkan *mean pore size* dan *specific surface area* pada selulosa yang akan meningkatkan konsentrasi gula reduksi yang dihasilkan (Lini et al., 2018; Widjaja et al., 2015).

Limbah padat aren yang telah dilakukan perlakuan awal menggunakan asam, dilanjutkan menggunakan perlakuan organosolv. Selanjutnya dilakukan analisis Chesson dengan tujuan untuk mengetahui kandungan selulosa, hemiselulosa, dan lignin pada sampel yang diperoleh dari kombinasi *pretreatment* asam dan organosolv.

Tabel 2. Komposisi kimia limbah padat aren setelah *pretreatment* asam dan organosolv dengan analisis chesson

Variasi	Komponen		
	Hemiselulosa	Selulosa	Lignin
H ₂ SO ₄ 1% + organosolv 60 menit	0,489	0,565	0,494
H ₂ SO ₄ 3% + organosolv 60 menit	0,350	0,568	0,232
H ₂ SO ₄ 5% + organosolv 60 menit	0,392	0,445	0,618
H ₂ SO ₄ 1% + organosolv 60 menit	0,489	0,565	0,494

Pada penelitian ini digunakan pelarut etanol dengan pertimbangan karena cukup murah, sedikit mengandung racun, mudah di-*recovery* dan konsentrasi yang digunakan dimana dengan variasi etanol 10-50% menunjukkan tren penurunan lignin yang terus meningkat dengan naiknya konsentrasi etanol (Tana et al., 2016).

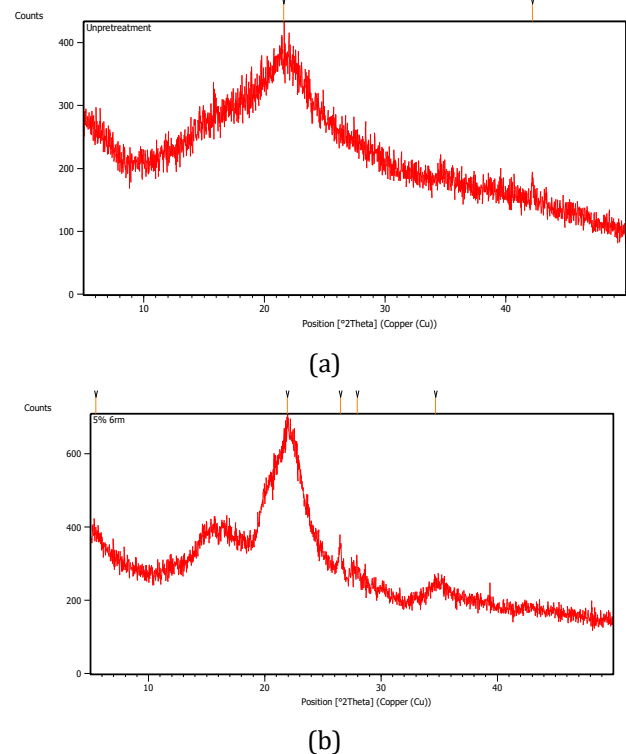
Hasil analisis chesson pada sampel yang telah diperlakukan awal dengan asam dan organosolv menunjukkan bahwa variabel terbaik diperoleh pada konsentrasi asam 5% dan waktu 60 menit, dengan penurunan massa lignin terendah sebesar 98,73% dari massa awal, menghasilkan 0,233 gram lignin. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh dengan Martínez-Trujillo et al. (2020) variasi waktu proses menunjukkan pengaruh yang signifikan pada konsentrasi glukosa yang dihasilkan, yaitu dengan yield gula terbesar pada waktu 60 menit.

Etanol sebagai pelarut organik dapat memutus ikatan internal lignin dan hemiselulosa (ikatan eter dan ikatan ester asam 4-O-metilglukuronat pada karbon alfa unit lignin), sehingga mereduksi lignin dan hemiselulosa (Salapa et al., 2017). Penurunan kandungan lignin mengindikasikan terjadinya kerusakan pada struktur lignin, yang dapat meningkatkan ketersediaan selulosa dalam limbah padat aren untuk proses hidrolisis enzimatik. Namun, jika waktu reaksi terlalu lama, permukaan biomassa akan hangus dan dekomposisi glukosa dapat terjadi (Yoo et al., 2017).

3.2 Analisis X-Ray Diffraction

Analisis *x-ray diffraction* (XRD) dilakukan untuk mengukur *crystallinity index* (CrI), yang berfungsi sebagai parameter untuk menilai aksesibilitas enzim

terhadap biomassa selama proses hidrolisis (Pandey & Negi, 2015). Semakin tinggi tingkat aksesibilitas enzim terhadap biomassa maka akan konsentrasi gula yang dihasilkan akan semakin besar.



Gambar 1. Hasil analisis XRD (a) Bahan baku sebelum perlakuan awal; (b) Hasil perlakuan awal H₂SO₄ 5% dan organosolv 60 menit

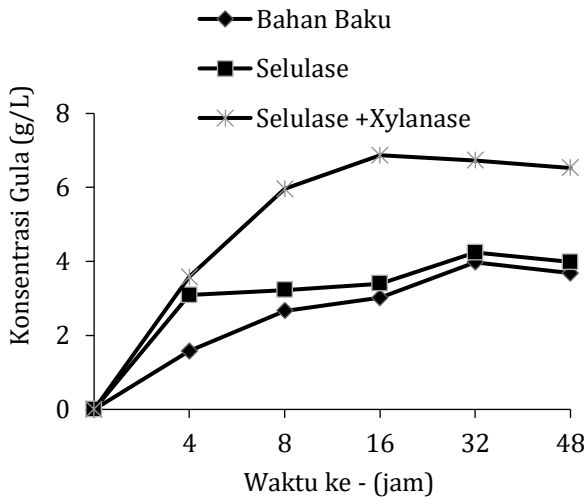
Mengacu pada persamaan 1, analisis menunjukkan bahwa CrI meningkat dari 13,61% menjadi 37,87% setelah *pretreatment*. Peningkatan CrI menunjukkan penghilangan lignin dan hemiselulosa serta kerusakan struktur amorf, sehingga selulosa lebih tersedia untuk hidrolisis enzimatik (Dewi et al., 2019).

Peningkatan ini memberikan bukti kuantitatif bahwa *pretreatment* tidak hanya mengurangi lignin dan hemiselulosa tetapi juga meningkatkan keteraturan struktur kristal selulosa, sehingga meningkatkan efisiensi hidrolisis biomassa untuk fermentasi bioetanol. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Pandey & Negi (2015) dengan sampel batang pohon pinus yang diberi perlakuan dengan menggunakan campuran asam-surfaktan (48,5%) dan menggunakan campuran basa-surfaktan (43,54%), menunjukkan hasil CrI yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan sampel sebelum perlakuan awal sebesar 32,74%. Peningkatan CrI ini mengindikasikan penghancuran ikatan glikosidik selama *pretreatment* yang mengakibatkan penghilangan komponen amorf seperti hemiselulosa dan lignin serta peningkatan fraksi polimer kristalin selulosa.

3.3 Hidrolisis Enzimatik dan Kandungan Gula Reduksi

Proses hidrolisis dilakukan pada suhu 60°C dan pH 5,5 selama 48 jam dengan inkubator goyang pada

kecepatan 125 rpm. Berdasarkan penelitian sebelumnya, kondisi ini menghasilkan hasil optimal karena hidrolisis lebih efektif pada suhu tinggi dan pH rendah. Aktivitas enzim diukur untuk menentukan jumlah enzim selulase dari *T. reesei* dan xilanase dari *A. niger* yang dibutuhkan dalam proses tersebut. Perhitungan aktivitas enzim menunjukkan bahwa konsentrasi enzim yang digunakan adalah 18,6 U enzim selulase murni dan 18,6 U enzim xilanase murni per gram limbah padat aren. Jumlah enzim selulase yang diperlukan adalah 26,57 ml, sedangkan enzim xilanase yang dibutuhkan sebanyak 25,48 ml.



Gambar 2. Analisis gula reduksi hidrolisis limbah padat aren selama 48 jam

Pada Gambar 2 terlihat bahwa hidrolisis menggunakan enzim selulosa dan xilanase menunjukkan hasil yang lebih tinggi dari pada hidrolisa dengan menggunakan enzim selulosa saja yaitu sebesar 38,96%.

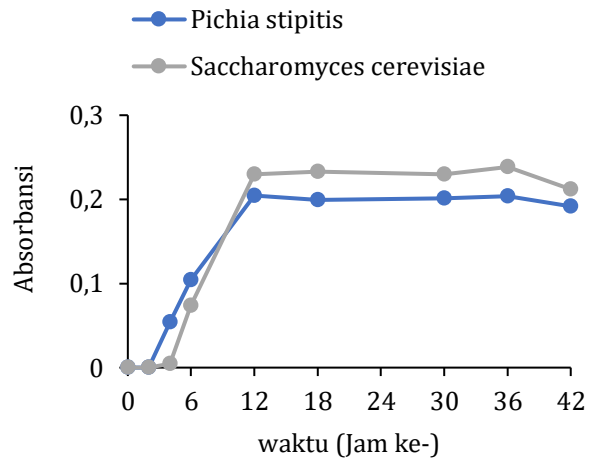
3.4 Produk Etanol Hasil Fermentasi Hidrolisat

Pada proses fermentasi limbah padat aren dibagi menjadi tiga tahapan, yaitu aklimatisasi *Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipitis*, *preculture Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipitis*, serta fermentasi limbah padat aren menjadi etanol dengan *Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipitis*.

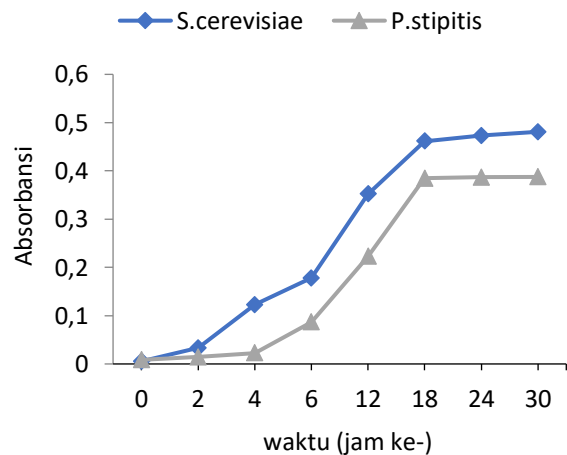
Berdasarkan Gambar 3 dapat diketahui bahwa semua mikroorganisme yang digunakan dapat bertahan hidup pada media yang baru. Hal ini mengindikasikan bahwa aklimatisasi mikroorganisme sudah dilakukan. Penggunaan mikroorganisme untuk tahap *preculture*. Fase log dari *Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipis* berakhir pada jam ke 12.

Tahapan *preculture* mikroorganisme digunakan untuk mengetahui pertumbuhan dari mikroorganisme dalam media yang sudah ditambahkan dengan substrat. Hal ini dilakukan juga untuk mempercepat proses fermentasi karena *lag phase* dari mikroorganisme sudah terjadi pada tahap *preculture* dan penambahan mikroorganisme terjadi pada jumlah mikroorganisme yang maksimal. Pada tahap ini, 2,5 ml

dari masing-masing mikroorganisme diinokulasikan ke dalam campuran dari 18 ml media cair dan 4,5 ml hidrolisat dari proses hidrolisa terbaik (hidrolisa enzimatis sampel *pretreatment* asam 5% dan *organosolv* 60 menit dengan campuran enzim selulase dan xilanase. Tahap *preculture* dilakukan di dalam inkubator goyang pada temperatur 35°C dan kecepatan 125 rpm selama 42 jam. Grafik pertumbuhan dari mikroorganisme dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 3. Grafik pertumbuhan mikroorganisme pada tahap aklimatisasi



Gambar 4. Grafik pertumbuhan mikroorganisme pada media preculture

Berdasarkan Gambar 4, didapatkan rentang dari *log phase* antara jam ke 6 sampai jam ke 18. Oleh karena itu, untuk mempersingkat waktu *lag phase* dan jumlah mikroorganisme pada jumlah yang maksimal pada tahap fermentasi, inokulasi mikroorganisme dari media *preculture* dilakukan dalam rentang dari *log phase*.

Dalam penelitian ini digunakan mikroorganisme dari media *preculture* pada jam ke 14.

Proses fermentasi dilakukan dengan bantuan variasi mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipites* dari media *preculture* pada jam ke 14. Menurut studi oleh Widjaja *et al.* (2017), faktor yang paling signifikan menghasilkan yield etanol tinggi adalah jumlah inokulum dan pH. Jumlah inokulum yang

ditambahkan ke dalam media sebanyak 1.466.666.667 sel, yang dihitung menggunakan metode *counting chamber*. Analisis *optical density* (OD) dilakukan untuk memantau laju pertumbuhan mikroorganisme, sementara analisis dinitrosalisilat (DNS) digunakan untuk mengukur laju penurunan glukosa dalam sampel. Proses fermentasi dilakukan dengan komposisi 25 ml hidrolisat, 65 ml media cair dan mikroorganisme pada inkubator goyang pada temperatur 35°C selama 72 jam dengan kecepatan putar 125 rpm.

Produk etanol dianalisis menggunakan gas kromatografi dan didapatkan kadar (%) (v/v) etanol pada sampel hasil fermentasi menggunakan mikroorganisme tunggal maupun kombinasi yang disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Konsentrasi produk etanol dari proses fermentasi selama 72 jam

Mikroorganisme	Kadar etanol (%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,22
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> - <i>Pichia stipitis</i>	0,26

Berdasarkan Tabel 3, produksi etanol terbaik diperoleh pada kombinasi mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae* – *Pichia stipitis* dengan kadar etanol 0,26%. Kedua mikroorganisme ini memegang peran penting dalam fermentasi hidrolisat lignoselulosa, dengan *S. cerevisiae* mengonversi glukosa (heksosa) menjadi etanol dalam kondisi anaerobik, sementara *P. stipitis* efektif dalam fermentasi xilosa (pentosa), yang banyak ditemukan dalam limbah lignoselulosa. *Saccharomyces cerevisiae* efektif pada konsentrasi gula rendah dan pH asam, namun terbatas dalam memfermentasi xilosa (Nury et al., 2023; Permanasari et al., 2018). Sebaliknya, *P. stipitis* dapat memfermentasi xilosa pada konsentrasi gula yang tinggi, meskipun sensitivitas terhadap etanol tinggi menjadi kendala. Kombinasi *Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipitis* memberikan keuntungan sinergis dalam mengonversi gula dari substrat lignoselulosa, meningkatkan hasil etanol secara signifikan. Pemilihan mikroorganisme yang tepat sangat penting untuk memaksimalkan produksi bioetanol dari biomassa.

4. KESIMPULAN

Penelitian ini menunjukkan bahwa kombinasi *pretreatment* asam dan organosolv, hidrolisis dengan enzim selulase-xilanase, dan fermentasi menggunakan kombinasi *S. cerevisiae* dan *P. stipitis* merupakan pendekatan yang efektif untuk produksi bioetanol dari limbah padat aren. Yield bioetanol tertinggi sebesar 0,26% diperoleh dengan proses fermentasi selama 72 jam. Penggunaan kombinasi *Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipitis* pada fermentasi limbah padat aren menunjukkan peningkatan yield bioetanol dibandingkan dengan penggunaan *Saccharomyces cerevisiae* saja.

5. DAFTAR PUSTAKA

- Ansar, Nazaruddin, Azis, A. D., & Fudholi, A. (2021). Enhancement of bioethanol production from palm sap (*Arenga pinnata* (Wurmb) Merr) through optimization of *Saccharomyces cerevisiae* as an inoculum. *Journal of Materials Research and Technology*, 14, 548–554. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2021.06.085>
- Ansar, Sukmawaty, Abdullah, S. H., Nazaruddin, & Safitri, E. (2020). Physical and chemical properties of a mixture fuel between palm sap (*Arenga pinnata* Merr) bioethanol and premium fuel. *ACS Omega*, 5(22), 12745–12750. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c00247>
- Da Silva Fernandes, F., De Souza, É. S., Carneiro, L. M., Alves Silva, J. P., De Souza, J. V. B., & Da Silva Batista, J. (2022). Current ethanol production requirements for the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Microbiology*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/7878830>
- Dewi, A. S., Stevanus, R. A., Sandra, M. A., Nury, D. F., Pudjiastuti, L., & Widjaja, T. (2019). The effect of mixed culture of *Zymomonas mobilis* and *Pichia stipitis* in ethanol production of sugar palm (*Arenga pinnata*). *Materials Science Forum*, 964 MSF, 145–150. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/MSF.964.145>
- Hans, M., Pellegrini, V. O. A., Filgueiras, J. G., de Azevedo, E. R., Guimaraes, F. E. C., Chandel, A. K., Polikarpov, I., Chadha, B. S., & Kumar, S. (2023). Optimization of dilute acid pretreatment for enhanced release of fermentable sugars from sugarcane bagasse and validation by biophysical characterization. *Bioenergy Research*, 16(1), 416–434. <https://doi.org/10.1007/s12155-022-10474-6>
- Herawati, D. A., Kusumawardhani, E., & Puspawati, N. (2016). Pemanfaatan limbah ampas pati aren menjadi bioetanol secara enzimatik metode konvensional dan SFF (Simultaneous of saccharification and fermentation). *Symposium Nasional RAPI XV*, 37–45.
- Lini, F. Z. (2015). Studi teknik produksi etanol dari limbah kulit buah kopi (Parchment hull/endocarp).
- Lini, F. Z., Widjaja, T., Hendriane, N., Altway, A., Nurkhamidah, S., & Tansil, Y. (2018). The effect of organosolv pretreatment on optimization of hydrolysis process to produce the reducing sugar. *MATEC Web of Conferences*, 154. <https://doi.org/10.1051/mateconf/201815401022>
- Martínez-Trujillo, M. A., Bautista-Rangel, K., García-Rivero, M., Martínez-Estrada, A., & Cruz-Díaz, M. R. (2020). Enzymatic saccharification of banana peel and sequential fermentation of the reducing sugars to produce lactic acid. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 43(3), 413–427. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02237-z>
- Mateo, W., Lei, H., Villota, E., Qian, M., Zhao, Y., Huo, E., Zhang, Q., Lin, X., & Wang, C. (2021). One-step synthesis of biomass-based sulfonated carbon catalyst by direct carbonization-sulfonation for

- organosolv delignification. *Bioresource Technology*, 319.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124194>
- Nury, D. F., Luthfi, M. Z., Farohi, A. R., & Widjaja, T. (2023). Pengaruh pre-treatment kimia dan biologi terhadap produksi biogas dari kulit kopi. *Journal of Research on Chemistry and Engineering*, 4(2), 47–53.
- Pandey, A. K., & Negi, S. (2015). Impact of surfactant assisted acid and alkali pretreatment on lignocellulosic structure of pine foliage and optimization of its saccharification parameters using response surface methodology. *Bioresource Technology*, 192, 115–125.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.054>
- Permanasari, A. R., Yulistiani, F., Purnama, R. W., Widjaja, T., & Gunawan, S. (2018). The effect of substrate and enzyme concentration on the glucose syrup production from red sorghum starch by enzymatic hydrolysis. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 160(1).
<https://doi.org/10.1088/1755-1315/160/1/012002>
- Purnavita, S., Sriyana, herman yoseph, & Hartini, S. (2017). Produksi poli asam laktat dari limbah ampas pati aren sari. *Jurnal Momentum*, 13(21), 53–56.
- Salapa, I., Katsimpouras, C., Topakas, E., & Sidiras, D. (2017). Organosolv pretreatment of wheat straw for efficient ethanol production using various solvents. *Biomass and Bioenergy*, 100, 10–16.
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2017.03.011>
- Sanyang, M. L., Sapuan, S. M., Jawaid, M., Ishak, M. R., & Sahari, J. (2016). Recent developments in sugar palm (*Arenga pinnata*) based biocomposites and their potential industrial applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 54, 533–549.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.10.037>
- Sritrakul, N., Nitisinprasert, S., & Keawsompong, S. (2017). Evaluation of dilute acid pretreatment for bioethanol fermentation from sugarcane bagasse pith. *Agriculture and Natural Resources*, 51(6), 512–519.
<https://doi.org/10.1016/j.anres.2017.12.006>
- Tana, T., Zhang, Z., Moghaddam, L., Rackemann, D. W., Rencoret, J., Gutiérrez, A., Del Río, J. C., & Doherty, W. O. S. (2016). Structural changes of sugar cane bagasse lignin during cellulosic ethanol production process. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 4(10), 5483–5494.
<https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b01093>
- Widjaja, T., Altway, A., Ni'Mah, H., Tedji, N., & Rofiqah, U. (2015). Technique of ethanol food grade production with batch distillation and dehydration using starch-based adsorbent. *AIP Conference Proceedings*, 1699.
<https://doi.org/10.1063/1.4938295>
- Widjaja, T., Altway, A., Nury, D. F., & Iswanto, T. (2019). Optimization of fermentation to enhance ethanol production from palmyra sap (*Borassus flabellifer*) using *Saccharomyces cerevisiae*. *ARNP Journal of Engineering and Applied Sciences*, 14(5), 967–973.
- Widjaja, T., Iswanto, T., Agustiani, E., Altway, A., Martha, B., Silaban, J., & Yuwono, L. F. (2017). Optimization of palmyra palmsap fermentation using co-culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*. 12(23), 6817–6824.
- Yoo, C. G., Li, M., Meng, X., Pu, Y., & Ragauskas, A. J. (2017). Effects of organosolv and ammonia pretreatments on lignin properties and its inhibition for enzymatic hydrolysis. *Green Chemistry*, 19(8), 2006–2016.
<https://doi.org/10.1039/c6gc03627a>