Jurnal Biologi Tropis

Original Research Paper

Bioethanol Production from Cassava Peel Powder Sugar Hydrolysate by Yeasts Saccharomyces cerevisiae and *Pichia anomala*

Dhini Agustin, Peristiwati*, Wahyu Surakusumah, Restu Utari Dewina

Program Studi Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia, Kota Bandung, Jawa Barat;

Article History
Received : August 03th, 2026
Revised : October 21th, 2026
Accepted : October 24th, 2026

*Corresponding Author:
Peristiwati, Program Studi Biologi, Universitas Pendidikan Indonesia. Bandung, Indonesia;
Email: peristiwatidj@upi.edu

Abstract: Heavy reliance on fossil fuels has driven the search for renewable energy, including bioethanol produced from lignocellulosic biomass. Although *Saccharomyces cerevisiae* is the yeast most commonly used for bioethanol because of its high productivity, it cannot efficiently ferment pentose sugars, which restricts its application to lignocellulosic feedstocks. *Pichia anomala*, a non-conventional yeast able to ferment both glucose and xylose, is therefore a promising alternative. This study compared how well S. cerevisiae and P. anomala produce bioethanol from a sugar hydrolysate of cassava (Manihot esculenta) peel powder. The powder was first delignified with 6% NaOH and hydrolyzed with 3 M H_2SO_4, followed by 72 hours of microbial hydrolysis with *Aspergillus niger*. Each yeast was then grown for 96 hours under anaerobic conditions at its own optimum (*S. cerevisiae*: 31°C, pH 4.5; *P. anomala*: 30°C, pH 5), and ethanol was quantified by HPLC. Microbial hydrolysis raised the reducing sugar content from 2.43% to 6.27%. Cell growth, substrate utilization, and ethanol production did not differ significantly between the yeasts ($p > 0.05$); however, *P. anomala* reached a numerically higher ethanol concentration (0.89%) than *S. cerevisiae* (0.60%), suggesting that it could serve as an alternative fermentative yeast. Fermentation efficiency and ethanol yield were 19.6% and 10% for *S. cerevisiae*, and 29.2% and 14.9% for *P. anomala*; both were below values in earlier reports, indicating that the process can still be optimized.

Keywords: Bioethanol; Cassava peel; Lignocellulosic biomass; *Pichia anomala*; *Saccharomyces cerevisiae*.

Pendahuluan

Bioetanol tergolong bahan bakar nabati yang prospektif sebagai pengganti sebagian bahan bakar fosil. Karena terbarukan, bahan bakar ini ikut menyeimbangkan siklus karbon seperti CO_2 yang dilepas saat pembakaran dan dapat diserap kembali oleh tanaman penghasil bahan bakunya (Pristiwanto & Subagyo, 2019; Zabed *et al*., 2017). Etanol dapat dibuat dari biomassa yang kaya gula, pati, ataupun selulosa (Wiratmaja & Elisa, 2020). Di sisi lain, BPS (2021) memperkirakan kebutuhan energi nasional naik dari 2,1 miliar menjadi 2,9 miliar Setara Barel Minyak (SBM) antara 2040 dan 2050, dengan permintaan bahan bakar minyak (BBM) tumbuh rata-rata 2,8% per tahun. Situasi tersebut menjadikan pengembangan energi terbarukan kian mendesak.

Selulosa, hemiselulosa, dan lignin menyusun biomassa lignoselulosa, yang dapat dijadikan bioetanol generasi kedua tanpa bersaing dengan kebutuhan pangan (Robak & Balcerek, 2018). Proses konversinya meliputi perlakuan awal, hidrolisis yang memecah polisakarida menjadi gula sederhana, dan fermentasi oleh mikroorganisme. Perlakuan awal membuka struktur lignoselulosa yang kompleks sehingga selulosa dan hemiselulosa lebih terjangkau pada tahap hidrolisis (Baruah *et al*., 2018), dan NaOH sebagai perlakuan alkali efektif melarutkan lignin (Kim *et al*., 2016). Hidrolisis dapat dilakukan dengan asam sulfat (H_2SO_4) ataupun secara biologis. Hidrolisis asam memang cepat, tetapi dapat menghasilkan furfural dan hidroksimetilfurfural (HMF) yang menghambat fermentasi (Jönsson & Martín, 2016). Sebaliknya, kapang selulolitik seperti *Aspergillus niger* menghasilkan selulase dan xilanase untuk mengubah polisakarida menjadi

This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

© 2026 The Author(s). This article is open access

gula pereduksi (Robak & Balcerek, 2018).

Indonesia, sebagai negara agraris, memiliki biomassa lignoselulosa yang melimpah, namun penanganan limbahnya masih menjadi persoalan. Kulit singkong (*Manihot esculenta*) termasuk limbah agroindustri yang banyak ditemukan: dari produksi singkong nasional di atas 22 juta ton per tahun, sekitar 14 juta ton berupa kulit yang belum termanfaatkan optimal (Djide *et al*., 2023; Yuniarti *et al*., 2024). Komposisi kulit bagian luar terdiri atas 43,63% selulosa, 10,38% hemiselulosa, dan 36,58% pati, sehingga layak dijadikan bahan baku bioetanol generasi kedua sekaligus mengurangi pencemaran lingkungan (Bezerra *et al*., 2024). Persoalan berikutnya ialah pemilihan khamir yang tepat. *Saccharomyces cerevisiae* adalah khamir yang paling banyak digunakan karena tahan kadar alkohol tinggi dan mudah ditumbuhkan, tetapi terbatas dalam memfermentasi gula pentosa (Widyastuti, 2019; Mohd Azhar *et al*., 2017), padahal hidrolisat lignoselulosa umumnya memuat campuran heksosa dan pentosa (*mixed sugar*). Dalam kondisi anaerob, glukosa diubah khamir ini menjadi piruvat melalui glikolisis dan selanjutnya menjadi etanol serta CO_2 (Walker & Stewart, 2016).

Sebagai khamir non-konvensional, *Pichia anomala* dilaporkan mampu memfermentasi glukosa dan xilosa serta bertahan terhadap penghambat dalam hidrolisat lignoselulosa (Zha *et al*., 2013; Sehnem *et al*., 2020). Kemampuannya menghasilkan etanol telah diuji pada glukosa (Fathiah *et al*., 2024) dan pada molase tebu secara ko-fermentasi bersama *S. cerevisiae* (Hawaz *et al*., 2024). Pada kulit singkong, penelitian bioetanol sejauh ini umumnya menggunakan *S. cerevisiae* sesudah hidrolisis asam (Bezerra *et al*., 2024; Maharani & Hasan, 2026). Keterbatasan studi yang membandingkan langsung kedua khamir pada hidrolisat serbuk kulit singkong menjadi landasan dilakukannya penelitian ini, dengan menerapkan kondisi optimum bagi tiap-tiap khamir.

Tujuan penelitian ini adalah membandingkan kinerja kultur tunggal *Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia anomala* dalam memproduksi bioetanol dari gula hidrolisat serbuk kulit singkong, masing-masing pada kondisi fermentasi optimumnya. Peneliti menduga *P. anomala* menghasilkan kadar bioetanol lebih tinggi karena mampu memfermentasi glukosa dan xilosa dalam hidrolisat, sedangkan *S. cerevisiae* hanya optimal pada glukosa. Hasilnya diharapkan membantu pemilihan khamir dalam memanfaatkan limbah kulit singkong sebagai bahan baku bioetanol yang berkelanjutan.

Bahan dan Metode

Waktu dan tempat

Penelitian dilakukan selama Desember 2025 hingga Mei 2026 di Laboratorium Riset Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia, Bandung. Substrat berupa kulit singkong (*Manihot esculenta*) diperoleh dari sisa pengolahan singkong di Desa Cirendeu, Kelurahan Leuwigajah, Kota Cimahi.

Metode penelitian

Rancangan Acak Lengkap (RAL) digunakan dengan dua perlakuan yang masing-masing diulang tiga kali. Perlakuan berupa kultur tunggal khamir pada kondisi optimumnya, yakni *Saccharomyces cerevisiae* pada 31°C dan pH 4,5 serta *Pichia anomala* pada 30°C dan pH 5. Sepanjang 96 jam fermentasi, pengamatan jumlah sel, gula pereduksi, dan etanol dilakukan setiap 12 jam.

Prosedur penelitian

Karakterisasi Morfologi Mikroorganisme

Isolat *S. cerevisiae* dan *A. niger* didapat dari Institut Teknologi Bandung (ITB), sedangkan isolat *P. anomala* berasal dari *Culture Collection* Institut Pertanian Bogor (IPBCC). Tiap isolat diinokulasikan pada medium YEPD agar steril dan diinkubasi 3×24 jam pada 25-30°C. Pengamatan makroskopis khamir dilakukan pada koloni hasil goresan di cawan petri YEPD agar setelah inkubasi 3×24 jam, sedangkan *A. niger* diamati pada agar miring. Pengamatan mikroskopis menggunakan preparat basah: khamir diwarnai dengan *Methylene Blue* dan *A. niger* dengan *Lactophenol Cotton Blue* (LPCB), kemudian diamati pada mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x.

Pembuatan Kurva Pertumbuhan dan Kurva Baku

Fase logaritmik masing-masing khamir ditentukan melalui kurva pertumbuhan. Suspensi khamir 5% (v/v) dalam NaCl 0,85% diinokulasikan ke medium YEPD *broth* pH 5 dan diinkubasi pada 30°C di atas *shaker* 120 rpm, dengan pembacaan absorbansi tiap 2 jam memakai *microplate reader*. Untuk kurva baku,

jumlah sel dihitung dengan *Total Plate Count* (TPC) dari pengenceran 10^{-1} sampai 10^{-7}. Pengenceran 10^{-5} sampai 10^{-7} dipilih karena cenderung memberi 30-300 koloni per cawan setelah 24 jam pada 30°C. Regresi linier kemudian dibuat antara absorbansi dan log jumlah sel. Laju pertumbuhan spesifik (μ) dihitung dengan persamaan berikut (Madigan *et al*., 2018):

$$\mu = (\ln X_2 - \ln X_1) / (t_2 - t_1) \quad \textbf{(1)}$$

Keterangan: μ adalah laju pertumbuhan spesifik (jam^{-1}); X_1 dan X_2 masing-masing jumlah sel (CFU/mL) pada pengamatan pertama dan kedua; t_1 dan t_2 waktu pengamatan pertama dan kedua (jam).

Pembuatan Kurva Standar Glukosa

Larutan glukosa standar 50-400 ppm dipakai untuk menyusun kurva standar. Satu mL tiap larutan direaksikan dengan 1 mL reagen DNS, dipanaskan 5 menit, lalu didinginkan. Absorbansi dibaca pada 540 nm dengan *microplate reader*, dan regresi linier yang dihasilkan menjadi dasar penghitungan gula pereduksi pada sampel (Miller, 1959).

Praperlakuan dan Delignifikasi Kulit Singkong

Kulit singkong bagian luar dijemur satu hari di bawah matahari, dipotong ±3 cm, lalu dioven pada 100°C selama 16 jam. Setelah itu bahan diblender dan diayak (100 mesh). Delignifikasi dilakukan dengan merendam serbuk dalam NaOH 6% (1:10) dan mengautoklafnya pada 121°C selama 15 menit. Campuran disaring, dan residu dicuci dengan akuades berulang sampai pH netral (±7). Jika pH belum turun, ditambahkan sedikit H_2SO_4. Serbuk akhirnya dikeringkan dalam oven 105°C selama 8 jam.

Hidrolisis Asam dan Mikrobiologis

Sebanyak 90 gram serbuk terdelignifikasi dicampur dengan H_2SO_4 3 M, lalu diautoklaf (121°C, 15 psi, 30 menit). Hidrolisat dinetralkan dengan NaOH 6 M sampai pH 5,5, dan gula diukur dengan metode DNS pada 540 nm. Tahap berikutnya adalah hidrolisis mikrobiologis, hidrolisat diberi 10% (v/v) inokulum *A. niger* yang telah dibiakkan 48 jam dalam medium PDB pada *shaker* 135 rpm, kemudian diinkubasi 72 jam (30,5°C, pH 5,5). Pemanasan 100°C menghentikan aktivitas enzim, dan biomassa kapang dibuang dari larutan gula dengan sentrifugasi (5.000 rpm, 10 menit). Gula diukur kembali dengan DNS pada setiap 24 jam.

Pembuatan Starter dan Medium Fermentasi

Starter dibuat dengan menginokulasikan suspensi khamir 5% (v/v) dalam NaCl 0,85% ke YEPD *broth* pH 5, kemudian menginkubasinya pada *shaker* 120 rpm, 30°C, hingga mencapai fase logaritmik. Larutan gula hasil hidrolisis dijadikan substrat dengan 0,1% *yeast extract*, pepton, NH_4Cl, dan KH_2PO_4, serta 0,05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnSO_4 \cdot 5H_2O$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, $FeCl_3 \cdot 2H_2O$, dan $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$. Starter fase logaritmik dari tiap khamir lalu ditambahkan ke medium sebanyak 10% (v/v).

Fermentasi

Botol kaca gelap digunakan untuk fermentasi anaerob selama 96 jam dengan 100 mL media per unit percobaan, pada kondisi optimum masing-masing khamir: *S. cerevisiae* 31°C, pH 4,5 dan *P. anomala* 30°C, pH 5. Setiap khamir diulang tiga kali (RAL). Sampel diambil tiap 12 jam sejak jam ke-0 hingga ke-96, masing-masing dengan tiga ulangan, untuk mengukur jumlah sel, gula pereduksi, dan etanol.

Pengukuran Parameter

Jumlah sel diukur dengan metode *Optical Density* (OD) pada 520 nm menggunakan *microplate reader* (Krishnamurthi *et al*., 2021). Gula pereduksi ditentukan dengan DNS. Absorbansi sampel pada 540 nm diubah menjadi kadar menggunakan persamaan kurva standar glukosa. Etanol dianalisis dengan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) (Nailheli *et al*., 2024). Kemampuan tiap khamir mengonversi gula menjadi etanol dinilai melalui efisiensi fermentasi dan rendemen etanol; etanol teoritis dihitung dari gula pereduksi awal dengan faktor konversi *Gay-Lussac* 0,511, menurut rumus berikut:

$$\text{Efisiensi fermentasi (\%)} = \frac{\text{konsentrasi etanol yang diperoleh}}{\text{konsentrasi etanol teoritis}} \times 100\%$$

$$\text{Rendemen etanol (\%)} = \frac{\text{massa etanol yang terbentuk}}{\text{massa gula awal}} \times 100\%$$

Analisis data

Pengolahan statistik dilakukan dengan IBM SPSS Statistics terhadap data jumlah sel, gula pereduksi, dan etanol. Jenis uji ditentukan setelah uji normalitas dan homogenitas: data normal dibandingkan dengan *Independent Sample t-test*, sedangkan data tidak normal

dengan uji non-parametrik *Mann-Whitney* (taraf signifikansi 5%, α = 0,05). Perbandingan kedua khamir pada ketiga parameter itu bertujuan melihat apakah ada perbedaan nyata dalam jumlah sel, pemanfaatan gula pereduksi, dan produksi etanol pada kondisi optimum masing-masing.

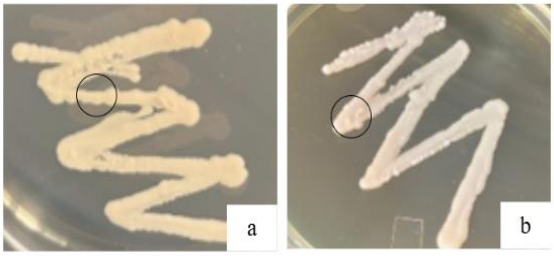
Hasil dan Pembahasan

Karakterisasi Morfologi Mikroorganisme

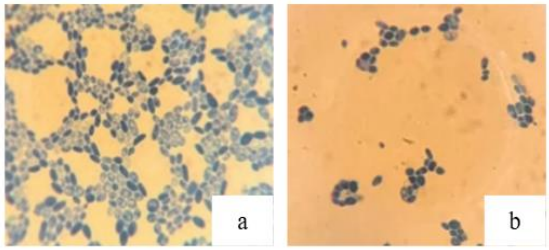
Tabel 1 dan Gambar 1-2 menyajikan hasil pengamatan makroskopis dan mikroskopis kedua isolat khamir.

Tabel 1. Morfologi isolat khamir *Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia anomala*

Isolat	Bentuk Koloni	Warna Koloni	Bentuk Sel
S. cerevisiae	Bulat	Putih kekuningan (krem)	Bulat telur hingga elips
P. anomala	Bulat	Putih susu	Bulat hingga oval



Gambar 1. Pengamatan makroskopis khamir (a) *S. cerevisiae* dan (b) *P. anomala* pada medium YEPD agar

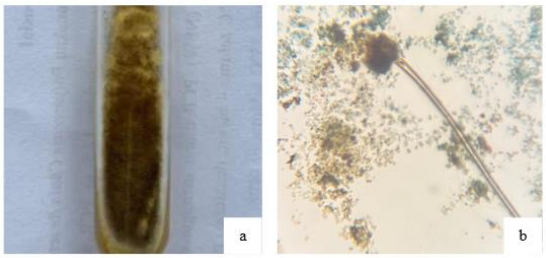


Gambar 2. Pewarnaan metilen biru (perbesaran 400x): (a) *S. cerevisiae*, (b) *P. anomala*

Menurut Tabel 1, kedua khamir berbeda dalam ciri koloni dan morfologi sel. Sel *S. cerevisiae* cenderung berkumpul lebih padat (*cluster*), sementara sel *P. anomala* tersusun lebih renggang. Morfologi *Aspergillus niger* ditampilkan pada Tabel 2 dan Gambar 3.

Tabel 2. Morfologi kapang *Aspergillus niger*

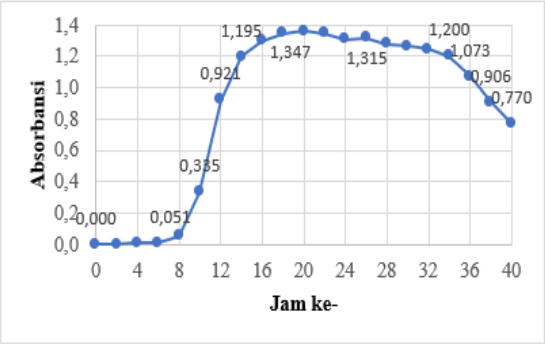
Bentuk Koloni	Warna Koloni	Permukaan	Konidiofor
Memanjang tidak teratur	Cokelat kehitaman	Berbulu	Panjang, tidak bercabang, vesikel bulat, konidia berbentuk bulat, dan tersebar



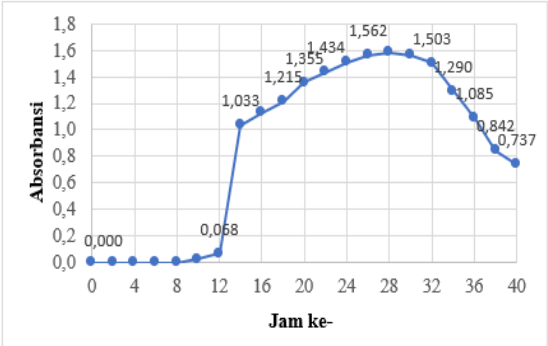
Gambar 3. *A. niger*: (a) makroskopis, (b) mikroskopis dengan LPCB, perbesaran 400x

Laju Pertumbuhan dan Kurva Baku Khamir

Kurva pertumbuhan *S. cerevisiae* dan *P. anomala* pada medium YEPD *broth* (30°C, pH 5) ditampilkan pada Gambar 4 dan Gambar 5.

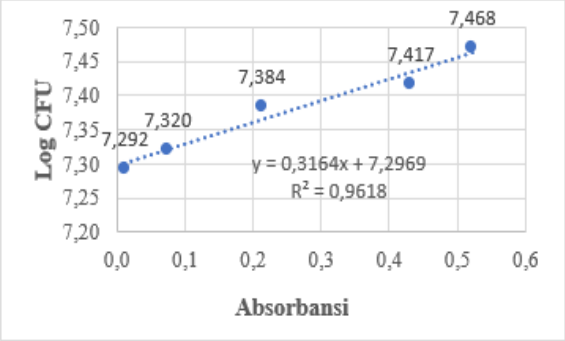


Gambar 4. Pertumbuhan *S. cerevisiae* pada medium YEPD *broth* selama 40 jam

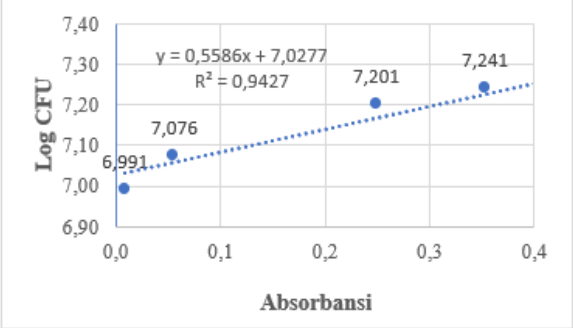


Gambar 5. Pertumbuhan *P. anomala* pada medium YEPD *broth* selama 40 jam

Menurut Gambar 4, *S. cerevisiae* melalui empat fase: lag (jam ke-0 hingga ke-8), eksponensial (jam ke-10 hingga ke-18), stasioner (jam ke-20 hingga ke-26), lalu absorbansi menurun mulai jam ke-28. Fase yang sama tampak pada *P. anomala* (Gambar 5), tetapi fase lag-nya berlangsung dari jam ke-0 hingga ke-10 dan fase eksponensialnya dari jam ke-12 hingga ke-26, sehingga keduanya lebih panjang. Fase eksponensial yang lebih lama menunjukkan *P. anomala* masih tumbuh aktif lebih lama sebelum memasuki fase stasioner. Kurva baku kedua khamir terdapat pada Gambar 6 dan Gambar 7.



Gambar 6. Kurva baku *S. cerevisiae*: hubungan absorbansi (OD 520) dengan log jumlah sel (Log CFU/mL)

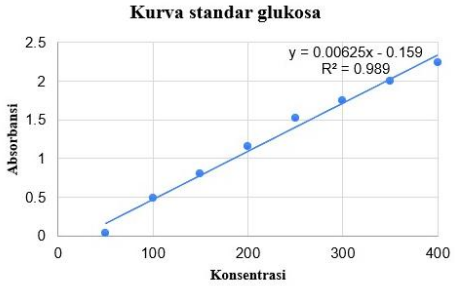


Gambar 7. Kurva baku *P. anomala*: hubungan absorbansi (OD 520) dengan log jumlah sel (Log CFU/mL)

Kedua kurva baku menampilkan korelasi linier positif yang kuat antara absorbansi dan log jumlah sel (R^2 = 0,9618 untuk *S. cerevisiae* dan 0,9427 untuk *P. anomala*). Laju pertumbuhan *S. cerevisiae* paling tinggi pada jam ke-12 (μ = 0,2135 jam^{-1}), maka starter dipanen pada jam itu. Pada *P. anomala*, laju tertinggi dicapai jam ke-14 (μ = 0,6207 jam^{-1}), sehingga starter dipanen pada jam ke-14. Masing-masing waktu tersebut adalah puncak fase eksponensial khamir yang bersangkutan.

Kurva Standar Glukosa

Kurva standar glukosa dari absorbansi larutan standar pada 540 nm ditampilkan pada Gambar 8. Regresi linier y = 0,00625x −0,159 dengan R^2 = 0,989 menggambarkan hubungan positif antara konsentrasi glukosa dan absorbansi. Linearitas yang tinggi ini membuat persamaan tersebut layak dipakai untuk menerjemahkan absorbansi sampel fermentasi menjadi kadar gula pereduksi.



Gambar 8. Kurva standar glukosa (540 nm) pada konsentrasi larutan standar 50-400 ppm

Praperlakuan dan Delignifikasi Kulit Singkong

Praperlakuan menghasilkan serbuk berwarna cokelat dari kulit singkong bagian luar dengan ukuran partikel 100 mesh. Delignifikasi dengan NaOH 6% pada 121°C mengubah warna serbuk menjadi cokelat tua dan menghasilkan lindi hitam (*black liquor*) pada larutan hasil saringan. Setelah pencucian sampai mendekati pH netral dan pengeringan, massa serbuk berkurang dari 325 gram menjadi 175 gram, yang menunjukkan sebagian lignin ikut terlarut.

Hidrolisis Asam dan Mikrobiologis

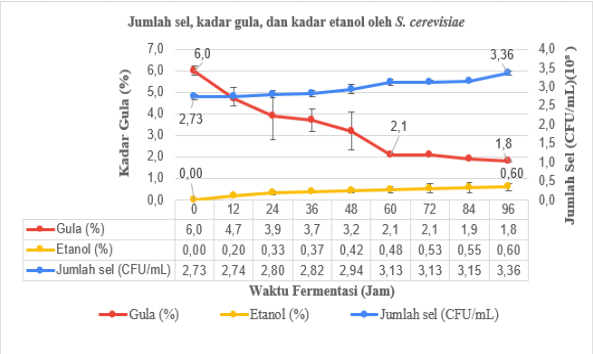
Tabel 3 memuat kadar gula pereduksi setelah hidrolisis asam dan hidrolisis lanjutan oleh *A. niger*. Tabel 3 memperlihatkan kenaikan bertahap gula pereduksi, dari hidrolisis asam hingga hidrolisis mikrobiologis pada jam ke-72. Penambahan *A. niger* menghasilkan gula pereduksi yang lebih tinggi daripada hidrolisis asam saja, dengan puncak pada jam ke-72 inkubasi.

Tabel 3. Kadar gula pereduksi setelah hidrolisis asam dan hidrolisis mikrobiologis *Aspergillus niger* pada serbuk kulit singkong bagian luar

Hidrolisis Asam	Hidrolisis Mikrobiologis *A. niger*		
	24 jam	48 jam	72 jam
2,43± 0,09%	4,38± 0,19%	4,92± 0,10%	6,27± 0,03%

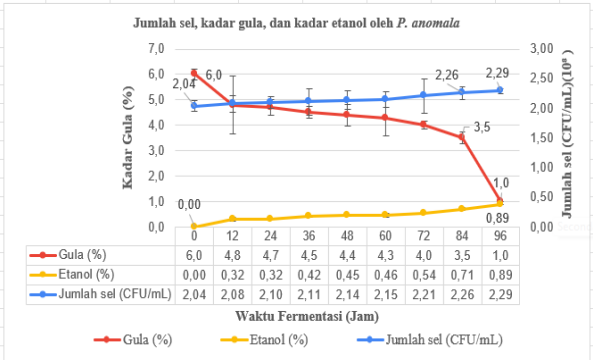
Pertumbuhan Sel, Kadar Gula Pereduksi, dan Kadar Etanol Selama fermentasi

Gambar 9 dan Gambar 10 menyajikan jumlah sel, gula pereduksi, dan etanol selama 96 jam fermentasi oleh *S. cerevisiae* dan *P. anomala*. Kedua khamir menunjukkan pola serupa pada Gambar 9 dan 10: jumlah sel dan etanol meningkat seiring gula pereduksi yang berkurang bertahap. Fase eksponensial *S. cerevisiae* dimulai lebih awal, sedangkan peningkatan jumlah sel *P. anomala* baru terlihat pada jam ke-60 hingga ke-96. Efisiensi fermentasinya masing-masing 19,6% (*S. cerevisiae*) dan 29,2% (*P. anomala*), dengan rendemen etanol 10% dan 14,9%.



	0	12	24	36	48	60	72	84	96
Gula (%)	6,0	4,7	3,9	3,7	3,2	2,1	2,1	1,9	1,8
Etanol (%)	0,00	0,20	0,33	0,37	0,42	0,48	0,53	0,55	0,60
Jumlah sel (CFU/mL)	2,73	2,74	2,80	2,82	2,94	3,13	3,13	3,15	3,36

Gambar 9. Perubahan jumlah sel, gula pereduksi, dan etanol selama fermentasi 96 jam oleh *S. cerevisiae* (31℃, pH 4,5)



	0	12	24	36	48	60	72	84	96
Gula (%)	6,0	4,8	4,7	4,5	4,4	4,3	4,0	3,5	1,0
Etanol (%)	0,00	0,32	0,32	0,42	0,45	0,46	0,54	0,71	0,89
Jumlah sel (CFU/mL)	2,04	2,08	2,10	2,11	2,14	2,15	2,21	2,26	2,29

Gambar 10. Perubahan jumlah sel, gula pereduksi, dan etanol selama fermentasi 96 jam oleh *P. anomala* (30℃, pH 5)

Analisis Data

Data jumlah sel berdistribusi normal pada kedua perlakuan menurut uji *Shapiro-Wilk* (*S. cerevisiae*; p = 0,215 dan *P. anomala*; p = 0,564). Uji *Independent Samples t-test* memberi Sig. = 0,595 (p > 0,05), sehingga jumlah sel kedua khamir tidak berbeda nyata. Sebaliknya, data gula pereduksi tidak normal pada kedua perlakuan (p = 0,000) dan diuji dengan *Mann-Whitney*, yang menghasilkan Sig. = 0,051 (p > 0,05); pemanfaatan gula pereduksi kedua khamir pun tidak berbeda nyata. Untuk etanol, sebaran data normal pada kedua perlakuan (*S. cerevisiae*: p = 0,299; *P. anomala*: p = 0,144) dengan ragam homogen (*Levene* p = 0,660), sehingga digunakan *Independent Sample t-test* (Sig. = 0,277; p > 0,05). Kadar etanol kedua khamir tidak berbeda nyata, meski *P. anomala* secara numerik lebih tinggi (0,89%) dibanding *S. cerevisiae* (0,60%).

Pembahasan

Isolat *S. cerevisiae* membentuk koloni bulat putih kekuningan dengan sel bulat telur hingga elips yang tersusun padat. Ciri ini sesuai dengan deskripsi Muhibuddin & Sektiono (2018) tentang warna putih kekuningan dan permukaan halus, serta laporan Nasution *et al*. (2025) tentang sel bulat telur hingga lonjong yang bereproduksi membentuk kumpulan sel. Adapun *P. anomala* membentuk koloni putih susu yang bulat dengan sel bulat hingga oval dan susunan lebih renggang, seperti dilaporkan Ma *et al*. (2021): koloni putih susu, permukaan kusam, elevasi cembung, dan tepi kasar. *A. niger* membentuk koloni cokelat kehitaman dengan konidiofor panjang dan konidia bulat hitam, sejalan dengan Wahdania *et al*. (2016) yang mencirikan koloni berwarna hitam kecokelatan, bertekstur permukaan kasar, dan berkonidia bulat pada ujung konidiofor. Dengan demikian, ciri morfologi isolat konsisten dengan ketiga spesies acuan.

Fase eksponensial *S. cerevisiae* dimulai lebih cepat (jam ke-10 sampai ke-18) daripada *P. anomala* (jam ke-12 sampai ke-26). Rosmania & Yanti (2020) menerangkan bahwa fase lag adalah masa penyesuaian sel terhadap lingkungan baru, sementara fase eksponensial ditandai pembelahan sel yang aktif. *P. anomala* memiliki fase lag dan eksponensial yang lebih panjang daripada *S. cerevisiae*. Penyebabnya diduga sifat *Crabtree-negatif* (*respiratory yeast*): khamir ini memetabolisme gula secara oksidatif lewat respirasi mitokondria, berbeda dari *S. cerevisiae* yang *Crabtree-positif* dan langsung memfermentasi gula menjadi etanol meskipun oksigen tersedia (Fredlund *et al*., 2004). Respirasi mengharuskan enzim rantai transpor elektron di mitokondria disintesis dan diaktifkan lebih dulu agar sumber karbon dapat dipakai efisien. Hal ini memperpanjang adaptasi awal dan menurunkan laju pembelahan dibanding khamir fermentatif seperti *S. cerevisiae*. Zha *et al*. (2013) juga melaporkan bahwa *P. anomala* toleran terhadap kondisi lingkungan sehingga pertumbuhannya

bertahan lebih lama walaupun lajunya lebih rendah.

Kuatnya hubungan absorbansi dengan jumlah sel tampak dari R^2 kurva baku sebesar 0,9618 (*S. cerevisiae*) dan 0,9427 (*P. anomala*). Madigan *et al*. (2018) menyatakan bahwa semakin banyak sel, semakin besar nilai OD, sehingga OD dapat dipakai menghitung biomassa mikroba. Atas dasar itu, starter dipanen pada puncak fase eksponensial tiap khamir, yaitu jam ke-12 untuk *S. cerevisiae* (μ = 0,2135 jam^{-1}) dan jam ke-14 untuk *P. anomala* (μ = 0,6207 jam^{-1}), karena aktivitas enzimatik sel mencapai optimum pada fase ini (Walker & Stewart, 2016).

Terbentuknya *black liquor* dan penurunan massa serbuk dari 325 gram menjadi 175 gram menandai keberhasilan delignifikasi dengan NaOH 6% pada 121°C. Widyastuti *et al*. (2022) menjelaskan bahwa ion OH^- memutus ikatan lignin lewat depolimerisasi, sementara ion natrium berikatan dengan lignin menjadi natrium fenolat yang mudah larut, sehingga lignin terpisah dari serat dan pindah ke larutan. Kim *et al*. (2016) juga menyatakan bahwa perlakuan alkali, termasuk NaOH, efektif melarutkan lignin dan membuat selulosa lebih terjangkau untuk hidrolisis.

Serbuk kulit singkong yang telah didelignifikasi dihidrolisis untuk memperoleh gula pereduksi sebagai substrat fermentasi. Hidrolisis dengan H_2SO_4 3 M menghasilkan 2,43 ± 0,09% gula pereduksi, berbeda dengan Nursandy (2019) yang mendapatkan 9,876 g/L gula hidrolisat dari jerami padi pada konsentrasi asam yang sama. Perbedaan itu diduga karena sifat lignoselulosa kulit singkong tidak sama dengan jerami padi, serta kemungkinan terbentuknya inhibitor seperti furfural dan HMF yang merusak gula sederhana selama hidrolisis asam (Purwadi, 2024). Hidrolisis lanjutan oleh *A. niger* menaikkan gula pereduksi bertahap hingga 6,27 ± 0,03% pada jam ke-72. Menurut Robak & Balcerek (2018), endo-β-1,4-glukanase, ekso-β-1,4-glukanase, dan β-glukosidase bekerja sinergis menguraikan selulosa, sehingga gula pereduksi dari aktivitas *A. niger* terus bertambah seiring waktu inkubasi. Efisiensi konversi gula pada hidrolisis enzimatis pun lebih tinggi dibanding hidrolisis asam (Robak & Balcerek, 2018).

Gula hasil hidrolisis dipakai sebagai substrat fermentasi oleh kedua khamir, yang menunjukkan pola serupa, yaitu jumlah sel dan etanol naik, gula pereduksi turun bertahap. Keduanya melewati fase lag pada jam ke-0 hingga ke-36; selanjutnya *S. cerevisiae* lebih dahulu masuk fase eksponensial (jam ke-36 hingga ke-60), sedangkan *P. anomala* butuh adaptasi lebih lama pada medium hidrolisat lignoselulosa. Fitriana *et al*. (2018) menyatakan bahwa gula berkurang selama fermentasi karena dipakai khamir sebagai sumber karbon utama bagi metabolisme, reproduksi, dan pemeliharaan sel. Menurut Zabed *et al*. (2017), gula dikonversi khamir menjadi etanol, sehingga penurunan gula disertai kenaikan etanol.

Pada *S. cerevisiae*, glukosa dipecah melalui glikolisis menjadi piruvat, yang kemudian diubah menjadi etanol dan CO_2 oleh piruvat dekarboksilase dan alkohol dehidrogenase (Mohd Azhar *et al*., 2017). *P. anomala* justru cenderung meningkatkan aktivitas fermentatif saat oksigen terbatas (Passoth *et al*., 2006), dan dapat memfermentasi xilosa lewat xylose reductase, xylitol dehydrogenase, dan D-xylulokinase. Dengan demikian, khamir ini berpotensi menggunakan ragam gula substrat lignoselulosa yang lebih luas daripada *S. cerevisiae*, yang hanya memfermentasi glukosa (Zha *et al*., 2013). Perbedaan jalur metabolisme dan pemanfaatan substrat tersebut diduga ikut memengaruhi kadar etanol akhir (0,89% pada *P. anomala*; 0,60% pada *S. cerevisiae*). Kemungkinan lain, oksigen yang terbatas selama fermentasi mendorong *P. anomala* beralih ke jalur fermentatif, sedangkan pada *S. cerevisiae* sebagian substrat lebih banyak terpakai untuk pertumbuhan sel (Mohd Azhar *et al*., 2017).

Efisiensi fermentasi yang dicapai sebesar 19,6% (*S. cerevisiae*) dan 29,2% (*P. anomala*), dengan rendemen etanol 10% dan 14,9%. Kadar etanol penelitian ini lebih rendah daripada temuan Maharani & Hasan (2026), yang memperoleh etanol tertinggi 9,8% pada substrat yang sama, dan Hawaz *et al*. (2024), yang mendapatkan 4,8% dari molase tebu dengan *S. cerevisiae*. Hasil *P. anomala* di sini juga lebih rendah dibanding Fathiah *et al*. (2024) yang melaporkan 5,00 ± 0,42 g/L etanol setelah 48 jam pada glukosa 2%.

Rendahnya kadar etanol diduga terutama berasal dari inhibitor hidrolisis, seperti furfural dan senyawa fenolik, yang menekan metabolisme khamir (Jönsson & Martín, 2016). Zha *et al*. (2013) menyebutkan bahwa walaupun *P. anomala* toleran terhadap hidrolisat biomassa, etanol yang dihasilkan tetap bergantung pada kondisi fermentasi. Zabed *et al*. (2017) menambahkan bahwa sebagian gula tidak berubah menjadi etanol, melainkan dipakai untuk metabolit lain seperti gliserol, asam asetat, dan asam laktat. Perbedaan strain juga dapat

berpengaruh, karena kemampuan fermentatifnya bergantung pada karakter fisiologis dan adaptasi terhadap substrat (Fathiah *et al*., 2024).

Secara statistik, ketiga parameter (jumlah sel, gula pereduksi, dan etanol) tidak berbeda nyata antara kedua khamir ($p > 0,05$), yang mengindikasikan kemampuan tumbuh, memanfaatkan substrat, dan memproduksi etanol yang relatif setara. Etanol *P. anomala* memang lebih tinggi secara numerik daripada *S. cerevisiae*, tetapi selisihnya belum cukup kuat untuk dinyatakan nyata ($p = 0,277$), sehingga dipandang hanya sebagai kecenderungan. Karena itu, *P. anomala* setara dengan *S. cerevisiae* dalam memanfaatkan gula hidrolisat kulit singkong dan dapat dipertimbangkan sebagai khamir alternatif untuk bioetanol dari biomassa lignoselulosa.

Kesimpulan

Secara morfologis, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia anomala*, dan *Aspergillus niger* teridentifikasi dengan baik, dan hidrolisis asam diikuti hidrolisis mikrobiologis pada kulit singkong (*Manihot esculenta*) bagian luar meningkatkan gula pereduksi. Dalam 96 jam fermentasi, jumlah sel, pemanfaatan gula pereduksi, dan etanol kedua khamir tidak berbeda nyata ($p > 0,05$), sehingga kemampuannya relatif sama dalam menghasilkan etanol dari hidrolisat kulit singkong. Pada kondisi optimumnya, *S. cerevisiae* menghasilkan etanol 0,60% (31°C, pH 4,5) dan *P. anomala* 0,89% (30°C, pH 5); selisih numerik tersebut tidak signifikan secara statistik. *P. anomala* berpotensi menjadi khamir fermentatif alternatif untuk bioetanol dari biomassa lignoselulosa. Penelitian ini terbatas pada jumlah ulangan (n=3) dan skala laboratorium yang kecil (100 mL per unit), sehingga kecenderungan perbedaan etanol antara kedua khamir belum dapat dipastikan signifikan.

Ucapan Terima Kasih

Penulis berterima kasih kepada Laboratorium Riset Biologi, Program Studi Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia, atas fasilitas dan dukungan selama penelitian. Terima kasih juga disampaikan kepada Laboratorium Kimia Instrumen, Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Bandung, yang telah membantu analisis kadar etanol dengan instrument *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC).

Referensi

Badan Pusat Statistik. (2021). *Statistik lingkungan hidup Indonesia 2021*. Badan Pusat Statistik. https://www.bps.go.id/publication/2021/11/30/2639657be1e8bd2548469f0f/statistik-lingkungan-hidup-indonesia-2021.html

Baruah, J., Nath, B. K., Sharma, R., Kumar, S., Deka, R. C., Baruah, D. C., & Kalita, E. (2018). Recent trends in the pretreatment of lignocellulosic biomass for value-added products. *Frontiers in Energy Research, 6*, Article 141. https://doi.org/10.3389/fenrg.2018.00141

Bezerra, G. de M., Brandão, M. V. O. R., Fonsceca, É. C. de J., Lima, V. de J. A., Brandão, M. P., Junior, C. E. A. R., Machado, V., Oliveira, C. S., Coelho, R. S., & Alves, C. T. (2024). Enhancing second-generation ethanol production through acid hydrolysis and *Saccharomyces cerevisiae* fermentation: A sustainable approach using cassava peel and manipueira biomass. *Chemical Engineering Transactions, 110*, 145–150. https://doi.org/10.3303/CET24110025

Djide, N. A. N., Sari, N. P., & Pebriani, R. (2023). Pemberdayaan kelompok petani singkong melalui pemanfaatan pangan lokal di Desa Panaikang Kabupaten Gowa. *Jurnal Pengabdian Nasional (JPN) Indonesia, 4*(1), 190–195. https://doi.org/10.35870/jpni.v4i1.142

Fathiah, M. F., Hartono, F. D., Astuti, R. I., Listiyowati, S., & Meryandini, A. (2024). Bioethanol production from non-conventional yeasts *Wickerhamomyces anomalus* (*Pichia anomala*) and detection of *ADH1* gene. *HAYATI Journal of Biosciences, 31*(2), 221–228. https://doi.org/10.4308/hjb.31.2.221-228

Fitriana, F. D., Mustikawati, R. D., & Kaavessina, M. (2018). Pengaruh penambahan jumlah flokulan pada fermentasi alkohol dari molase menggunakan flok *Saccharomyces cerevisiae*. *Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia Ecosmart 2018* (pp. 167–172). https://sntk-ecosmart.ft.uns.ac.id

Fredlund, E., Blank, L. M., Schnürer, J., Sauer, U., & Passoth, V. (2004). Oxygen- and glucose-dependent regulation of central

carbon metabolism in *Pichia anomala*. *Applied and Environmental Microbiology, 70*(10), 5905–5911. https://doi.org/10.1128/AEM.70.10.5905-5911.2004

Hawaz, E., Tafesse, M., Tesfaye, A., Kiros, S., Beyene, D., Kebede, G., Boekhout, T., Groenewald, M., Theelen, B., Degefe, A., Degu, S., Admasu, A., Hunde, B., & Muleta, D. (2024). Bioethanol production from sugarcane molasses by co-fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* isolate TA2 and *Wickerhamomyces anomalus* isolate HCJ2F-19. *Annals of Microbiology, 74*, Article 13. https://doi.org/10.1186/s13213-024-01757-8

Jönsson, L. J., & Martín, C. (2016). Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource Technology, 199*, 103–112. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.009

Kim, J. S., Lee, Y. Y., & Kim, T. H. (2016). A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology, 199*, 42–48. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.085

Krishnamurthi, V. R., Niyonshuti, I. I., Chen, J., & Wang, Y. (2021). A new analysis method for evaluating bacterial growth with microplate readers. *PLOS ONE, 16*(1), Article e0245205. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245205

Ma, Y., Sun, Z., Zeng, Y., Hu, P., Sun, W., Liu, Y., & Tang, Z. (2021). Isolation, identification and function of *Pichia anomala* AR2016 and its effects on the growth and health of weaned pigs. *Animals, 11*(4), Article 1179. https://doi.org/10.3390/ani11041179

Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A. (2018). *Brock biology of microorganisms* (15th ed.). Pearson.

Maharani, M., & Hasan, A. (2026). Analisis produksi bioetanol dari limbah kulit singkong melalui hidrolisis dengan variasi konsentrasi H_2SO_4. *Chemical Engineering Journal Storage (CEJS), 6*(1), 1–9. https://doi.org/10.29103/cejs.v6i01.24198

Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry, 31*(3), 426–428. https://doi.org/10.1021/ac60147a030

Mohd Azhar, S. H., Abdulla, R., Jambo, S. A., Marbawi, H., Gansau, J. A., Mohd Faik, A. A., & Rodrigues, K. F. (2017). Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochemistry and Biophysics Reports, 10*, 52–61. https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.03.003

Muhibuddin, A., & Sektiono, A. W. (2018). Optimalisasi fosfat untuk meningkatkan pertumbuhan kerapatan populasi dan kemampuan antagonis *Saccharomyces cerevisiae* terhadap *Fusarium* sp. *Saintekbu, 10*(2), 27–41. https://doi.org/10.32764/saintekbu.v10i2.206

Nailheli, O., Kolo, S. M. D., Mere, J. K., & Bria, P. M. (2024). Sintesis bioetanol dari limbah pinang (*Areca catechu* L.) dengan microwave irradiasi menggunakan katalis H_2SO_4. *Jurnal Redoks, 9*(1), 23–30. https://doi.org/10.31851/redoks.v9i1.13930

Nasution, A. T. U., Daulay, A. S., Ridwanto, & Rahayu, Y. P. (2025). Isolasi dan identifikasi jamur *Saccharomyces cerevisiae* dari air nira aren daerah Tanjung Morawa. *FARMASAINKES: Jurnal Farmasi, Sains, dan Kesehatan, 4*(2), 184–188. https://doi.org/10.32696/farmasainkes.v4i2.3318

Nursandy, V. D. (2019). *Produksi bioetanol dari gula hidrolisat serbuk jerami padi (Oryza sativa, Linn.) oleh Zymomonas mobilis dan Pichia stipitis* [Skripsi sarjana, Universitas Pendidikan Indonesia]. UPI Repository. https://repository.upi.edu/49087/

Passoth, V., Fredlund, E., Druvefors, U. Ä., & Schnürer, J. (2006). Biotechnology, physiology and genetics of the yeast *Pichia anomala*. *FEMS Yeast Research, 6*(1), 3–13. https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2005.00004.x

Pristiwanto, A. E., & Subagyo, R. (2019). Analisis hasil fermentasi pembuatan bioetanol dengan variasi massa ragi menggunakan bahan (beras ketan hitam, beras ketan putih dan singkong). *JTAM*

ROTARY, 1(2), 157–172. https://ppjp.ulm.ac.id/journals/index.php/rot/article/view/1746

Purwadi, R. (2024). *Pengembangan industri berbasis lignoselulosa* [Orasi ilmiah guru besar Institut Teknologi Bandung]. ITB Press. https://www.itbpress.id/product/orasi-ilmiah-guru-besar-institut-teknologi-bandung-pengembangan-industri-berbasis-lignoselulosa/

Robak, K., & Balcerek, M. (2018). Review of second generation bioethanol production from residual biomass. *Food Technology and Biotechnology, 56*(2), 174–187. https://doi.org/10.17113/ftb.56.02.18.5428

Rosmania, R., & Yanti, F. (2020). Perhitungan jumlah bakteri di laboratorium mikrobiologi menggunakan pengembangan metode spektrofotometri. *Jurnal Penelitian Sains, 22*(2), 76–86. https://doi.org/10.56064/jps.v22i2.564

Sehnem, N. T., Machado, A. da S., Matte, C. R., Morais Junior, M. A. de, & Ayub, M. A. Z. (2020). Second-generation ethanol production by *Wickerhamomyces anomalus* strain adapted to furfural, 5-hydroxymethylfurfural (HMF), and high osmotic pressure. *Anais da Academia Brasileira de Ciências, 92*. https://doi.org/10.1590/0001-3765202020181030

Wahdania, I., Asrul, A., & Rosmini, R. (2016). Uji daya hambat *Aspergillus niger* pada berbagai bahan pembawa terhadap *Phytophthora palmivora* penyebab busuk buah kakao (*Theobroma cacao* L.). *Agrotekbis: Jurnal Ilmu Pertanian, 4*(5), 521–529. https://garuda.kemdiktisaintek.go.id/documents/detail/690482

Walker, G. M., & Stewart, G. G. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* in the production of fermented beverages. *Beverages, 2*(4), Article 30. https://doi.org/10.3390/beverages2040030

Widyastuti, F. K., Deta, A. R. B., Bela, Y. R., & Anggraini, S. P. A. (2022). Pengaruh perlakuan proses delignifikasi klobot jagung terhadap analisa kadar gula reduksi menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis. *Prosiding SENTIKUIN (Seminar Nasional Teknologi Industri, Lingkungan dan Infrastruktur), 5*, A4-1. https://pro.unitri.ac.id/index.php/sentikuin

Widyastuti, P. (2019). Pengolahan limbah kulit singkong sebagai bahan bakar bioetanol melalui proses fermentasi. *Jurnal Kompetensi Teknik, 11*(1), 41–46. https://jurnal.untidar.ac.id/index.php/jkt/article/view/1785

Wiratmaja, I. G., & Elisa, E. (2020). Kajian peluang pemanfaatan bioetanol sebagai bahan bakar utama kendaraan masa depan di Indonesia. *Jurnal Pendidikan Teknik Mesin Undiksha, 8*(1), 1–8. https://doi.org/10.23887/jptm.v8i1.27298

Yuniarti, R., Satria, A. W., Wiandini, W., Zaezarini, N., Achmad, F., & Yusupandi, F. (2024). Pengaruh perlakuan awal terhadap karakteristik bioetanol dari limbah kulit singkong karet (*Manihot glaziovii*). *Jurnal Teknik Kimia USU, 13*(1), 1–8. https://doi.org/10.32734/jtk.v13i1.13174

Zabed, H., Sahu, J. N., Suely, A., Boyce, A. N., & Faruq, G. (2017). Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. *Renewable and Sustainable Energy Reviews, 71*, 475–501. https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.076

Zha, Y., Hossain, A. H., Tobola, F., Sedee, N., Havekes, M., & Punt, P. J. (2013). *Pichia anomala* 29X: A resistant strain for lignocellulosic biomass hydrolysate fermentation. *FEMS Yeast Research, 13*(7), 609–617. https://doi.org/10.1111/1567-1364.12062