

**FERMENTASI LIMBAH PENGOLAHAN ALGA LAUT  
*Kappaphycus alvarezii* UNTUK PRODUKSI BIOETANOL  
MENGUNAKAN *Pichia kudriavzevii* MELALUI OPTIMALISASI  
NUTRISI FERMENTASI**

FERMENTATION OF PROCESSING MARINE ALGAE WASTE  
*Kappaphycus alvarezii* FOR BIOETHANOL PRODUCTION USING *Pichia*  
*kudriavzevii* THROUGH FERMENTATION NUTRITION OPTIMIZATION

**ALKAWI**



**PROGRAM STUDI MAGISTER BIOLOGI  
SEKOLAH PASCASARJANA  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2023**

**FERMENTASI LIMBAH PENGOLAHAN ALGA LAUT  
*Kappaphycus alvarezii* UNTUK PRODUKSI BIOETANOL  
MENGUNAKAN *Pichia kudriavzevii* MELALUI OPTIMALISASI  
NUTRISI FERMENTASI**

Tesis

sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar magister

Program Studi Magister Biologi

Disusun dan diajukan oleh

ALKAWI

H052211009

Kepada

**PROGRAM STUDI MAGISTER BIOLOGI  
SEKOLAH PASCASARJANA  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2023**

**TESIS**

**FERMENTASI LIMBAH PENGOLAHAN ALGA LAUT *Kappaphycus alvarezii*  
UNTUK PRODUKSI BIOETANOL MENGGUNAKAN *Pichia kudriavzevii*  
MELALUI OPTIMALISASI NUTRISI FERMENTASI**

**ALKAWI**

**NIM. H052211009**

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka  
Penyelesaian Studi Program Magister Program Studi Magister Biologi  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Hasanuddin  
Pada tanggal 20 Desember 2023  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

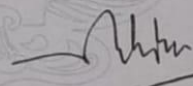
**Menyetujui**

**Pembimbing Utama**



**Dr. Sulfahri, M.Si.  
NIP. 19890126 201404 1 001**

**Pembimbing Pendamping**



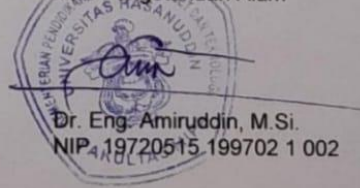
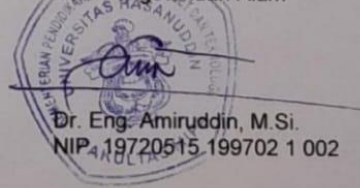
**Dr. Nur Haedar, M.Si.  
NIP. 19680129 199702 2 001**

**Ketua Program Studi  
Magister Biologi**



**Dr. Jannah, M.Si.  
NIP. 19631231 198810 2 001**

**Dekan Fakultas Matematika dan  
Ilmu Pengetahuan Alam**



**Dr. Eng. Amiruddin, M.Si.  
NIP. 19720515 199702 1 002**

## PERNYATAAN KEASLIAN TESIS DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, tesis berjudul Fermentasi Limbah Pengolahan Alga Laut *Kappaphycus alvarezii* Untuk Produksi Bioetanol Menggunakan *Pichia kudriavzevii* Melalui Optimalisasi Nutrisi Fermentasi adalah benar karya saya dengan arahan dari komisi pembimbing Dr. Sulfahri, M.Si dan Dr. Nur Haedar, M.Si. Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka tesis ini. Sebagian dari isi tesis ini telah dipublikasikan di Journal Biofuels, Taylor & Francis sebagai artikel dengan judul "Performance of fungal hydrolysis and bioethanol fermentation of marine alga processing waste under the regulation of fermentation nutrients".

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya berupa tesis ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 20 Desember 2023



Alkawi

NIM. H052211009

## UCAPAN TERIMA KASIH

*Assalamu'alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh*

Puji Syukur Atas Kehadirat Allah SWT, yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis akhirnya dapat menyelesaikan penulisan tesis yang berjudul "Fermentasi Limbah Pengolahan Alga Laut *Kappaphycus alvarezii* Untuk Produksi Bioetanol Menggunakan *Pichia kudriavzevii* Melalui Optimalisasi Nutrisi Fermentasi" sebagai salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan dan memperoleh gelar Magister Sains di Departemen Magister Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar.

Proses penyelesaian tesis ini merupakan suatu rangkaian perjuangan yang cukup panjang bagi penulis. Selama proses penelitian dan penyusunan tesis ini tidak sedikit kendala yang penulis hadapi, banyak hal serta kendala yang penulis harus lewati. Berkat usaha dan doa yang disertai motivasi, bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak akhirnya penelitian dan penyusunan tesis ini dapat diselesaikan oleh penulis. Oleh karena itu, penulis merasa sangat bersyukur dan mengucapkan banyak terima kasih kepada semua pihak yang telah banyak membantu dalam proses penyelesaian tesis ini.

Penulis mengucapkan terima kasih yang sedalam-dalamnya kepada keluarga terkhusus kepada kedua orang tua, ayahanda Piyt supu dan Ibunda Sumiati. Terima kasih atas dukungan yang telah diberikan kepada penulis baik moril dan materil serta selalu mendoakan.

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Bapak Sulfahri, M.Si selaku pembimbing utama dan Ibu Nur Haedar, M.Si selaku pembimbing pertama, penulis mengucapkan banyak terima kasih atas bimbingan dan arahnya berupa kritik dan saran yang membangun dan memotivasi yang telah diberikan selama penulis melaksanakan proposal, penelitian, hingga ketahap penyusunan tesis ini. Terima kasih karena telah meluangkan waktu untuk terus memberikan bimbingan dan arahan yang sangat membantu hingga selesainya tesis ini.

Penulis juga mengucapkan banyak terima kasih kepada:

1. Rektor Universitas Hasanuddin Bapak Prof. Dr. Ir. Jamaluddin Jompa, M.Si beserta jajarannya.
2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Bapak Dr. Eng. Amiruddin, M.Sc., beserta staf yang telah membantu dan mengarahkan penulis dalam hal akademik dan administrasi.
3. Ketua Departemen Magister Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Ibu Dr. Juhriah, M.Si., atas ilmu, masukan dan saran-saran kepada penulis.
4. Dosen penguji tesis Ibu Dr. Syahribulan, M.Si., Ibu Dr. Juhriah, M.Si dan Bapak Dr. Eddyman W. Ferial, M.Si atas bimbingan dan arahan yang diberikan kepada penulis dari awal studi hingga penyusunan tesis ini.
5. Pembimbing akademik Ibu Dr. Nur Haedar, M.Si. Terima kasih atas segala saran dan ilmunya.
6. Bapak/Ibu dosen Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, yang telah mendidik dan memberikan ilmu kepada penulis selama proses perkuliahan. Serta staf dan pegawai Departemen Biologi yang telah membantu dalam bidang administrasi.
7. Kepada teman-teman seperjuangan program Magister Biologi angkatan 2021, terima kasih atas kebersamaan, dukungan, motivasi, serta bantuan yang tidak dapat penulis jabarkan satu per satu.
8. Kepada semua pihak yang tidak dapat penulis tuliskan namun telah membantu penulis selama proses perkuliahan hingga penyusunan tesis ini. Penulis tidak dapat membalas kebaikan bapak/ibu/saudara sekalian. Dengan penuh rasa hormat penulis mempersembahkan tesis ini dan semoga dapat bermanfaat dalam pengembangan ilmu pengetahuan.

Makassar, 20 Desember 2023

Penulis

## ABSTRAK

**ALKAWI. Fermentasi Limbah Pengolahan Alga Laut *Kappaphycus alvarezii* Untuk Produksi Bioetanol Menggunakan *Pichia kudriavzevii* Melalui Optimalisasi Nutrisi Fermentasi** (dibimbing oleh, Sulfahri dan Nur Haedar).

*K. alvarezii* merupakan spesies alga laut yang paling banyak dibudidayakan di Indonesia karena penggunaan utamanya untuk produksi karagenan. Limbah yang dihasilkan dari produksi karagenan masih mengandung selulosa yang tinggi. Kandungan selulosa tersebut dapat diubah menjadi bioetanol. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh nutrisi fermentasi, konsentrasi nutrisi dan lama fermentasi limbah alga *K. alvarezii* terhadap kadar bioetanol. Produksi bioetanol dapat dilakukan dengan hidrolisis dan fermentasi. Hidrolisis limbah alga *K. alvarezii* dilakukan menggunakan *Trichoderma reesei* yang menghasilkan enzim selulase untuk menghidrolisis selulosa, selanjutnya limbah alga *K. alvarezii* difermentasi dengan *P. kudriavzevii* menggunakan nutrisi *yeast extract* dan Gandasil-D<sup>®</sup> dengan konsentrasi 0,0 g/L, 0,2 g/L, 0,6 g/L dan 1,0 g/L. Hasil penelitian menunjukkan bahwa jenis nutrisi, konsentrasi nutrisi dan waktu fermentasi berpengaruh terhadap kadar bioetanol yang dihasilkan. Nutrisi fermentasi yang paling optimal yaitu dengan pemberian nutrisi Gandasil-D<sup>®</sup> dibandingkan dengan nutrisi *yeast extract*. Konsentrasi nutrisi dan waktu fermentasi yang paling optimal yaitu dengan pemberian Gandasil-D<sup>®</sup> 0,6 g/L menghasilkan bioetanol sebesar 6,87% selama 48 jam dan nutrisi *yeast extract* 0,0 g/L kadar bioetanol yang dihasilkan sebesar 5,30% selama 96 jam. Efisiensi fermentasi untuk *yeast extract* dan Gandasil-D<sup>®</sup> masing-masing sebesar 61% dan 75%.

**Kata Kunci:** Limbah *K. alvarezii*, *P. kudriavzevii*, nutrisi *yeast extract*, nutrisi Gandasil-D<sup>®</sup>

## ABSTRACT

ALKAWI. **Fermentation of Marine Algae Processing Waste *Kappaphycus alvarezii* For Bioethanol Production Using *Pichia kudriavzevii* Through Optimization of Fermented Nutrients** (supervised by, Sulfahri and Nur Haedar).

*K. alvarezii* is the most widely cultivated marine algae species in Indonesia because its main use is for carrageenan production. Waste resulting from carrageenan production still contains high levels of cellulose. The cellulose content can be converted into bioethanol. This research aims to determine the effect of fermentation nutrition, nutrient concentration, and fermentation time of *K. alvarezii* algal waste on bioethanol content. Bioethanol production can be done by hydrolysis and fermentation. Hydrolysis of *K. alvarezii* algae waste was carried out using *Trichoderma reesei*, which produces cellulase enzymes to hydrolyze cellulose, then *K. alvarezii* algae waste was fermented with *P. kudriavzevii* using nutritional yeast extract, and Gandasil-D<sup>®</sup> with concentrations of 0,0 g/L, 0,2 g/L, 0,6 g/L, and 1,0 g/L. The research results show that the type of nutrient, nutrient concentration, and fermentation time influence bioethanol content. The most optimal fermentation nutrition is by providing Gandasil-D<sup>®</sup> nutrition compared to yeast extract nutrition. The most optimal nutrient concentration and fermentation time is by administering 0,6 g/L of Gandasil-D<sup>®</sup> to produce 6,87% bioethanol for 48 hours and yeast extract nutrition of 0,0 g/L, the bioethanol content made is 5,30% for 96 hours. The fermentation efficiency for yeast extract and Gandasil-D<sup>®</sup> was 61% and 75%, respectively.

**Keywords:** *K. alvarezii* waste, *P. kudriavzevii*, yeast extract nutrition, Gandasil-D<sup>®</sup> nutrition



## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL .....	i
PERNYATAAN PENGAJUAN .....	ii
HALAMAN PENGESAHAN .....	iii
PERNYATAAN KEASLIAN DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA .....	iv
UCAPAN TERIMA KASIH .....	v
ABSTRAK .....	vii
ABSTRACT .....	viii
DAFTAR ISI .....	ix
DAFTAR TABEL .....	xi
DAFTAR GAMBAR .....	xii
BAB I PENDAHULUAN .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	4
1.3 Tujuan Penelitian .....	4
1.4 Manfaat Penelitian .....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....	5
2.1 Bioetanol .....	5
2.2 Biomassa Produksi Bioetanol .....	6
2.3 Biomassa Alga .....	7
2.4 Polisakarida Alga.....	8
2.5 Alga <i>K. alvarezii</i> .....	9
2.6 Keunggulan Alga untuk Produksi Bioetanol .....	10
2.7 Limbah <i>K. alvarezii</i> .....	11
2.8 <i>Pichia Kudriavzevii</i> .....	12
2.9 Produksi Bioetanol .....	13
2.9.1 Hidrolisis .....	13
2.9.2 Fermentasi .....	15
2.10 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Produksi Bioetanol .....	17
2.11 Kerangka Pikir .....	19
BAB III METODE PENELITIAN .....	20
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian .....	20
3.2 Alat dan Bahan .....	20
3.1.1 Alat Penelitian .....	20
3.1.2 Bahan Penelitian .....	20
3.3 Prosedur Penelitian .....	20
3.3.1 Pretreatment Limbah <i>K. alvarezii</i> .....	20

3.3.2 Aktivasi <i>T. reesei</i> .....	21
3.3.3 Hidrolisis Limbah <i>K. alvarezii</i> .....	21
3.3.4 Proses Fermentasi .....	21
3.3.5 Pengukuran Kadar Bioetanol .....	21
3.3.6 Pengukuran pH dan Kadar Gula .....	22
3.4 Tabel Penelitian .....	22
3.5 Analisis Data .....	22
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>23</b>
4.1 Limbah Alga <i>K. alvarezii</i> .....	23
4.2 Pengaruh Nutrisi Fermentasi Terhadap Kadar Bioetanol .....	24
4.3 Pengaruh Nutrisi Fermentasi Terhadap Kadar Gula .....	31
4.4 Pengaruh pH Selama Proses Fermentasi .....	34
4.5 Kinetika Fermentasi .....	36
4.5.1 Etanol Yield ( $Y_p/s$ ) .....	36
4.5.2 Efisiensi Fermentasi .....	38
<b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>43</b>
5.1 Kesimpulan .....	43
5.2 Saran .....	43
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>44</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>55</b>

## DAFTAR TABEL

Nomor urut	Halaman
Tabel 1. Kandungan Karbohidrat dari Alga hijau, Coklat dan Merah .....	7
Tabel 2. Komposisi Karbohidrat dari Beberapa Spesies Makroalga .....	8
Tabel 3. Komposisi Kimia <i>K. alvarezii</i> .....	10
Tabel 4. Perbandingan Hidrolisis Asam dan Enzimatik .....	15
Tabel 5. Tabel Penelitian .....	22
Tabel 6. Rerata Kadar Bioetanol (%) .....	27
Tabel 7. Perbandingan Kadar Bioetanol dari Beberapa Referensi .....	29
Tabel 8. Rerata Kadar Gula di Awal dan di Akhir Fermentasi .....	34
Tabel 9. Nilai Yp/s .....	37
Tabel 10. Nilai Efisiensi Fermentasi .....	38
Tabel 11. Perbandingan Efisiensi Fermentasi Bioetanol .....	39

## DAFTAR GAMBAR

Nomor urut	Halaman
Gambar 1. Alga laut <i>K. alvarezii</i> .....	9
Gambar 2. Struktur Selulosa.....	12
Gambar 3. Jalur Glikolisis EMP dan Leloir .....	16
Gambar 4. Kerangka Pikir .....	19
Gambar 5. Grafik Rerata Kadar Bioetanol dengan Nutrisi <i>Yeast Extract</i> .....	25
Gambar 6. Grafik Rerata Kadar Bioetanol dengan Nutrisi Gandasil-D®.....	26
Gambar 7. Histogram Kadar Gula Selama Fermentasi dengan Nutrisi <i>Yeast extract</i> .....	32
Gambar 8. Histogram Kadar Gula Selama Fermentasi dengan Nutrisi Gandasil-D®.....	32
Gambar 9. Grafik Nilai pH pada Medium Fermentasi dengan Nutrisi <i>Yeast Extract</i> .....	35
Gambar 10. Grafik Nilai pH pada Medium Fermentasi dengan Nutrisi Gandasil-D®.....	35
Gambar 11. Grafik Bioetanol dan Kadar Gula Pada Perlakuan Terbaik .....	40

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Pemanasan global dan perubahan iklim merupakan isu yang selalu ramai diperbincangkan. Salah satu penyebab pemanasan global dan perubahan iklim adalah polusi udara yang ditimbulkan oleh transportasi dan industri. Perkembangan jumlah alat transportasi darat seperti mobil dan motor yang menggunakan bahan bakar minyak bumi menyumbang polusi udara yang luar biasa. Sektor transportasi menyumbang lebih dari setengah emisi karbon monoksida (CO) dan nitrogen oksida (NOx) (Tong dan Azevedo, 2020). Selain masalah pencemaran udara, masalah lainnya adalah kebutuhan bahan bakar minyak (BBM) yang terus meningkat. Kebutuhan bahan bakar minyak semakin meningkat seiring dengan bertambahnya populasi manusia. Saat ini, bahan baku utama untuk bahan bakar minyak berasal dari fosil. Hal ini mendorong penggunaan bahan bakar fosil yang berlebihan. Praktik ini pada akhirnya menyebabkan kelangkaan bahan bakar fosil (Ramachandra dan Hebbale, 2020).

Tingkat konsumsi minyak dunia pada tahun 2030 diperkirakan akan meningkat dari 21% menjadi 60% dan diperkirakan antara tahun 2069 dan 2088 akan habis seluruhnya (Ishika *et al.*, 2017). Berdasarkan data dari Satuan Kerja Khusus Pelaksana Kegiatan Hulu Minyak dan Gas Bumi (SKK Migas) pada tahun 2020, produksi minyak dan kondensat nasional mencapai 708,5 ribu barrel minyak per hari (Mbopd), sedangkan tingkat kebutuhan bahan bakar di Indonesia saat ini telah mencapai 1,6 juta barrel per hari, sehingga 50% kebutuhan BBM dan minyak mentah harus diimpor. Oleh karena itu perlu upaya untuk mencari pengganti bahan bakar yang ramah lingkungan.

Solusi untuk mengatasi masalah kelangkaan BBM yang selama ini dilakukan oleh pemerintah adalah mengembangkan bahan bakar yang bisa diperbaharui sebagai bahan bakar alternatif, salah satunya adalah bioetanol. Bioetanol merupakan sumber bahan bakar alternatif yang potensial karena dapat diperbaharui, ramah lingkungan, menghasilkan emisi karbon yang rendah (Yusuf dan Inambao, 2019), mengurangi emisi gas-gas tercemar ke lingkungan, dan dapat langsung digunakan sebagai alkohol murni diindustri bertenaga bensin (Khan *et al.*, 2021). Namun terdapat beberapa hambatan yang perlu

dipertimbangkan untuk meningkatkan produksi bioetanol, salah satunya adalah dengan pencarian bahan baku yang tepat (Oh *et al.*, 2018).

Berbagai alternatif bahan baku produksi bioetanol telah dilaporkan antara lain gandum, jagung, kentang dan tebu (Alalwan *et al.*, 2019), Namun ketersediaan bahan baku terbatas karena fungsi utamanya sebagai bahan pangan (Donato *et al.*, 2019). Selain itu, bahan baku tersebut kurang efektif karena akan bersaing dengan tanaman lain untuk memperebutkan lahan (Nanda *et al.*, 2018). Oleh karena itu, perlu dicari alternatif lain sebagai bahan baku yang kaya sumber daya alam berbasis karbohidrat dengan ketersediaan yang melimpah seperti alga laut. Alga laut adalah bahan baku yang menjanjikan untuk produksi bioetanol karena pertumbuhannya yang cepat dan berkelanjutan (Sulfahri *et al.*, 2020), tidak adanya persaingan memperebutkan lahan (Ashokkumar *et al.*, 2019), dan tidak ada input sumber daya seperti pupuk dan pestisida (Offei *et al.*, 2018).

Indonesia merupakan salah satu produsen utama alga laut dunia dengan produksi alga laut pada tahun 2020 mencapai 9.923.259 juta ton (KKP, 2020). Produksi tersebut sebagian besar merupakan jenis *Kappaphycus alvarezii* (Rimmer *et al.*, 2021; Simatupang *et al.*, 2021). *K. alvarezii* banyak dibudidayakan di Indonesia bagian timur yaitu Pulau Maluku, Bali, Nusa Tenggara dan Pulau Sulawesi khususnya Sulawesi Selatan (Mulyati *et al.*, 2020). Sulawesi Selatan merupakan salah satu sentra penghasil alga laut khususnya alga laut merah *K. alvarezii*.

*K. alvarezii* berpotensi untuk dijadikan bahan baku produksi bioetanol karena mengandung karbohidrat. Kandungan karbohidrat jenis polisakarida dari *K. alvarezii* mencapai 60% yang terdiri dari kappa-karagenan dan selulosa. *K. alvarezii* merupakan alga yang memiliki kepentingan ekonomi global karena penggunaan utamanya untuk produksi karagenan. Pada proses pembuatan karagenan, limbah yang dihasilkan antara 65-70% dari berat alga laut, sedangkan kandungan selulosanya bisa mencapai 71,38% (Fauziyah *et al.*, 2021). Kandungan selulosa yang tinggi pada limbah pengolahan alga laut dapat dikonversi menjadi bioetanol. Hal ini merupakan upaya yang dapat dilakukan untuk mengurangi pencemaran lingkungan akibat limbah yang dihasilkan dari pengolahan alga laut tersebut dan juga dapat menambah nilai ekonomi. Karbohidrat ini dapat diubah menjadi etanol melalui proses hidrolisis dan fermentasi (Fadillah *et al.*, 2018).

Fermentasi bioetanol dalam skala besar dilakukan pada konsentrasi tinggi gula, tinggi etanol, dan suhu tinggi. Kondisi ini menyebabkan stres pada sel ragi (Abreu-Cavalheiro dan Monteiro, 2013). Oleh karena itu, diperlukan mikroorganisme yang memiliki sifat toleransi terhadap kondisi yang ekstrim. Salah satu mikrobia potensial dalam fermentasi etanol adalah yeast *Pichia kudriavzevii* karena mampu memproduksi etanol lebih tinggi, lebih cepat, dan tahan terhadap kondisi lingkungan yang ekstrim (Sulfahri *et al.*, 2019). *P. kudriavzevii* mampu hidup pada pH rendah, suhu lebih tinggi, dan lebih toleran terhadap kadar etanol tinggi dibandingkan dengan banyak mikroba fermentasi komersial seperti *saccharomyces cerevisiae* (Mukherjee *et al.*, 2017).

Proses fermentasi bioetanol dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain jenis substrat, mikroorganisme, pH, nutrisi dan lama fermentasi. Nutrisi merupakan faktor yang sangat penting bagi mikroba agen fermentasi. Menurut Kelbert *et al.* (2015), nutrisi merupakan faktor penting bagi pertumbuhan mikroba fermentasi untuk menghasilkan bioetanol. Selain membutuhkan sumber karbon, juga membutuhkan sumber nitrogen, fosfor, kalium dan unsur mineral seperti seng dan magnesium. Unsur-unsur tersebut dapat dipenuhi dengan penambahan nutrisi *yeast extract* dan Gandasil-D<sup>®</sup>. Nutrisi tersebut berfungsi untuk membantu proses sintesis protein dalam sel sehingga menyebabkan peningkatan aktivitas sel dalam memproduksi bioetanol (Putri *et al.*, 2016). Hasil penelitian Sheikh *et al.* (2016), menyebutkan penambahan *yeast extract* dapat mengoptimalkan produksi bioetanol dari kulit kentang dengan lama fermentasi 96 jam menghasilkan bioetanol sebesar 2,83%, sedangkan jika tanpa penambahan *yeast extract* hanya dihasilkan bioetanol sebesar 2,17%. Selain itu, hasil penelitian Sulfahri *et al.* (2016b), menunjukkan bahwa kadar etanol tertinggi dicapai dengan penambahan nutrisi Gandasil-D<sup>®</sup> pada alga *Spirogyra hyalina* selama 96 jam, kadar bioetanol yang dihasilkan mencapai 10,77%, sedangkan jika tanpa penambahan Gandasil-D<sup>®</sup> hanya dihasilkan bioetanol sebesar 8,00%.

Penggunaan variasi nutrisi fermentasi yang berbeda perlu dilakukan dalam penelitian ini untuk melihat pengaruh dari penambahan nutrisi yang berbeda terhadap produksi kadar etanol yang dihasilkan. Nutrisi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *yeast extract* dan Gandasil-D<sup>®</sup>. Berdasarkan dari uraian tersebut maka perlu dilakukan penelitian mengenai pemanfaatan limbah pengolahan alga laut *K. alvarezii* sebagai bahan baku produksi bioetanol dengan

menggunakan yeast *P. kudriavzevii* melalui penambahan variasi nutrisi fermentasi.

## 1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana pengaruh jenis nutrisi fermentasi yang optimal untuk produksi bioetanol dari limbah *K. alvarezii* dengan menggunakan *P. kudriavzevii*?
2. Bagaimana pengaruh jumlah konsentrasi nutrisi yang optimal untuk produksi bioetanol dari limbah *K. alvarezii* dengan menggunakan *P. kudriavzevii*?
3. Bagaimana pengaruh durasi fermentasi yang optimal untuk produksi bioetanol dari limbah *K. alvarezii* dengan menggunakan *P. kudriavzevii*?

## 1.3 Tujuan Penelitian

1. Menganalisis pengaruh jenis nutrisi fermentasi yang optimal untuk produksi bioetanol dari limbah *K. alvarezii* dengan menggunakan *P. kudriavzevii*
2. Menganalisis pengaruh jumlah konsentrasi nutrisi yang optimal untuk produksi bioetanol dari limbah *K. alvarezii* dengan menggunakan *P. kudriavzevii*
3. Menganalisis pengaruh durasi fermentasi yang optimal untuk produksi bioetanol dari limbah *K. alvarezii* dengan menggunakan *P. kudriavzevii*

## 1.4 Manfaat Penelitian

1. Memanfaatkan limbah alga *K. alvarezii* sebagai bahan dasar pembuatan bioetanol yang selama ini belum dimanfaatkan secara optimal
2. Memberikan informasi bahwa limbah hasil pengolahan alga memiliki potensi untuk dikembangkan menjadi bioetanol
3. Sebagai alternatif untuk mencegah terjadinya pencemaran lingkungan akibat limbah yang dihasilkan dari olahan alga
4. Membantu menyelesaikan masalah pemerintah dari ketergantungan bahan bakar dari minyak bumi yang ketersediannya dialam semakin berkurang
5. Sebagai acuan bagi peneliti selanjutnya terkait dengan pengembangan limbah hasil olahan alga



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Bioetanol

Bioetanol adalah senyawa organik dengan rumus kimia  $C_2H_5OH$  yang dihasilkan dari proses fermentasi pati, gula dan selulosa dengan bantuan mikroorganisme tertentu (Kannah *et al.*, 2020). Bioetanol memiliki sifat yang tidak berwarna, jernih, beraroma khas, berfase cair pada temperatur kamar, dan mudah terbakar dengan nyala berwarna biru. Selain itu, bioetanol berbobot molekul rendah yang larut dalam air (Sulfahri *et al.*, 2016a).

Bioetanol merupakan sumber energi terbarukan yang memberikan berbagai manfaat yaitu mudah terurai di lingkungan, menghasilkan jauh lebih sedikit polutan pada mesin pembakaran internal dibandingkan dengan bahan bakar minyak bumi, mengurangi pembentukan ozon, memiliki toksisitas yang rendah dan larut dalam air. Selain itu, bioetanol memiliki nilai oktan dan kandungan oksigen yang lebih tinggi dibandingkan kebanyakan bensin. Kandungan oksigen yang tinggi akan meningkatkan efisiensi pembakaran dan mengurangi terjadinya pencemaran akibat gas buang seperti emisi hidrokarbon, karbon monoksida, dan emisi partikulat, atau pun gas-gas rumah kaca (Sulfahri *et al.*, 2016a).

Bioetanol adalah satu-satunya bahan bakar transportasi yang mengurangi emisi gas rumah kaca. Peningkatan penggunaan bahan bakar terbarukan seperti bioetanol, akan membantu melawan polusi dan efek pemanasan global dari pembakaran bensin. Bioetanol dapat bercampur dengan bensin dalam proporsi berapa pun, tetapi paling sering ditemukan sebagai etanol 10% dan etanol 85%. Bahan bakar campuran etanol seperti E10 yang mengandung 10% etanol dan 90% bensin mengurangi gas rumah kaca hingga 3,9%. Penggunaan bahan bakar campuran etanol seperti E85 yang mengandung 85% etanol dan 15% bensin mengurangi emisi bersih gas rumah kaca hingga 37,1% dan selanjutnya dapat berkontribusi dengan mengurangi penggunaan energi fosil sebesar 42–48% (Bala *et al.*, 2023). Pemerintah Amerika Serikat mendukung produksi etanol dengan metode yang menggunakan energi lebih rendah dan menggunakan biomassa selulosa seperti alga yang membutuhkan lebih sedikit budidaya, pupuk, dan pestisida dibandingkan dengan jagung atau tebu (Bajpai, 2021).

## 2.2 Biomassa Produksi Bioetanol

Bioetanol merupakan alternatif yang menjanjikan untuk bahan bakar fosil karena kapasitasnya untuk produksi yang berkelanjutan dan ramah lingkungan (Tan *et al.*, 2019). Saat ini produksi bioetanol industri dibagi menjadi tiga generasi berdasarkan jenis bahan baku yang digunakan. Bioetanol generasi pertama diperoleh melalui fermentasi biomassa yang mengandung pati (misalnya, gandum, jagung) atau gula (misalnya, tebu, bit gula) (Nanda *et al.*, 2018). Produksi bioetanol dari generasi pertama secara komersial digunakan di banyak negara dengan bahan baku yang bervariasi, seperti di Amerika Serikat bahan baku yang paling umum digunakan untuk produksi bioetanol adalah jagung, di Kanada jagung dan gandum digunakan secara luas, di Brasil, tebu adalah bahan baku yang paling umum dan di Eropa, industri etanol paling sering menggunakan kentang, gandum, dan bit gula (Tse *et al.*, 2021). Namun produksi etanol generasi pertama dikritik oleh berbagai kalangan masyarakat karena menggunakan bahan baku yang dimanfaatkan sebagai bahan pangan.

Berbeda dengan bioetanol generasi pertama yang biomasanya berasal dari bahan pangan, bioetanol generasi kedua biasanya menggunakan bahan baku yang tidak dapat dimakan, seperti bahan lignoselulosa dan residu hutan pertanian (misalnya, kayu) (Nanda *et al.*, 2018). Meskipun penggunaan bahan baku ini untuk produksi etanol tidak secara langsung bersaing dengan produksi pangan. Namun, batasan utama dengan bahan baku generasi kedua adalah mengandung lignin dalam jumlah tinggi dan membutuhkan lahan pertanian yang luas untuk penanamannya (Mohr dan Raman, 2013). Selain itu, bahan baku generasi kedua memerlukan teknologi dan fasilitas yang lebih maju untuk memprosesnya sebelum fermentasi. Oleh karena itu, untuk mengatasi keterbatasan bahan baku tersebut, biomassa alga telah diidentifikasi sebagai sumber energi generasi ketiga.

Bioetanol generasi ketiga memanfaatkan biomassa alga untuk produksi etanol (Nanda *et al.*, 2018). Keuntungan menggunakan biomassa alga adalah pemanfaatan karbon dioksida (CO<sub>2</sub>) dalam budidaya, membutuhkan lebih sedikit lahan daripada tanaman terestrial, pertumbuhannya cepat, hasil tinggi, parameter yang mudah dikontrol dibandingkan dengan tanaman lain, dan tidak bersaing untuk mendapatkan lahan yang dapat digunakan untuk tanaman pangan (Maia *et al.*, 2020).

### 2.3 Biomassa Alga

Alga adalah organisme fotosintetik yang mengandung klorofil hijau. Namun, ditutupi oleh pigmen fotosintesis yang memberikan warna yang berbeda (Menetrez, 2012). Alga dapat uniseluler atau multiseluler, secara luas diketahui tumbuh di hampir setiap habitat di berbagai kondisi, seperti lingkungan air darat, air tawar, dan air asin. Terdapat tiga komposisi utama dari alga yaitu karbohidrat, protein dan lipid dimana kandungan masing-masing komposisi berbeda satu sama lain. Struktur dinding sel alga biasanya terdiri dari matriks, yang terdiri dari polimer galaktan bersulfat linier (Yanagisawa *et al.*, 2011).

Berdasarkan morfologi dan ukurannya, alga umumnya dibagi menjadi dua kategori utama yaitu, mikroalga dan makroalga. Mikroalga merupakan organisme yang tidak memiliki akar, batang, dan daun. Tiga kelas mikroalga yang paling penting dalam hal kelimpahan adalah diatom (Bacillariophyceae), ganggang hijau (Chlorophyceae), dan ganggang emas (Chrysophyceae) (Singh *et al.*, 2014). Makroalga merupakan organisme yang tersusun dalam struktur yang menyerupai akar, batang, dan daun tumbuhan tingkat tinggi. Makroalga biasanya ditemukan di daerah pesisir di habitat intertidal dan subtidal, terlihat melekat pada batuan atau struktur lainnya. Makroalga diklasifikasikan ke dalam tiga kelompok besar berdasarkan pigmentasinya yaitu, alga hijau (Chlorophyceae), alga coklat (Phaeophyceae), dan alga merah (Rhodophyceae) (Hebbale *et al.*, 2017). Dari jumlah tersebut, alga merah adalah yang paling banyak dibudidayakan secara komersial di dunia karena produktivitasnya yang tinggi dan pertumbuhan yang cepat (Greetham *et al.*, 2018).

Baru-baru ini, produksi bioetanol dari makroalga menjadi sangat penting karena kandungan karbohidrat yang tinggi dan kandungan lignin yang rendah, sifat yang ideal untuk konversi menjadi bioetanol. Kandungan karbohidrat dari alga hijau, alga coklat dan alga merah dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Kandungan Karbohidrat dari alga hijau, coklat dan merah

Komponen	Tipe Alga Laut		
	Chlorophyceae	Phaeophyceae	Rhodophyceae
Polisakarida	Selulosa	Laminarin	Selulosa
	Ulvan	Manitol	Agar
	Pati	Alginat	Karagenan
	Mannan	Fucoidan	Pati

Monosakarida Utama	Glukosa Manosa Xilosa	Glukosa Fukosa Manitol	Glukosa Galaktosa
-----------------------	-----------------------------	------------------------------	----------------------

(Sumber: Offei *et al.*, 2018)

## 2.4 Polisakarida Alga

Produksi bioetanol dari alga didasarkan pada fermentasi polisakarida alga yaitu pati, gula dan selulosa. Mikroalga memiliki lapisan dinding sel bagian dalam dan luar. Dinding sel luar mikroalga mengandung polisakarida tertentu seperti pektin, agar dan alginat. Namun komposisinya dapat bervariasi dari spesies ke spesies. Sebaliknya, dinding sel bagian dalam mikroalga sebagian besar terdiri dari selulosa, hemiselulosa dan bahan lainnya. Karena memiliki selulosa di dinding sel dan pati, mikroalga dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku untuk produksi bioetanol. Sebagian besar polisakarida dinding sel dan pati dapat difermentasi untuk produksi bioetanol (Özçimen dan Biernat, 2015).

Kandungan karbohidrat makroalga ditemukan 25-50% pada alga hijau, 30-50% pada alga coklat dan 30-60% pada alga merah. Kandungan karbohidrat dari beberapa spesies makroalga disajikan pada Tabel 2. Polisakarida di dinding sel makroalga terdiri dari selulosa dan hemiselulosa. Lignin hanya ada pada spesies *Ulva* dan merupakan 3% dari berat kering.

Tabel 2. Komposisi Karbohidrat dari Beberapa Spesies Makroalga

Makroalga	Spesies	Karbohidrat (%)	Referensi
<i>Chlorophyta</i>	<i>Ulva lactuca</i>	23,8	Kostas <i>et al.</i> (2016)
	<i>Enteromorpha intestinalis</i>	42,8	Kim <i>et al.</i> (2014)
	<i>Ulva fasciata</i>	43	Trivedi <i>et al.</i> (2013)
	<i>Ulva rigida</i>	53	Harchi <i>et al.</i> (2018)
<i>Phaeophyta</i>	<i>Sargassum latifolium</i>	20,1	Soliman <i>et al.</i> (2018)
	<i>Fucus serratus</i>	26,4	Kostas <i>et al.</i> (2016)
	<i>Sargassum sp.</i>	41,81	Borines <i>et al.</i> (2013)
	<i>Ascophyllum nodosum</i>	44,66	Yuan dan Macquarrie (2015)
	<i>Laminaria digitata</i>	46,6	Kostas <i>et al.</i> (2017)
	<i>Laminaria japonica</i>	54,5	Jang <i>et al.</i> (2012)
<i>Rhodophyta</i>	<i>Chondrus crispus</i>	21,8	Kostas <i>et al.</i> (2016)
	<i>Palmaria palmate</i>	39,4	Kostas <i>et al.</i> (2016)
	<i>Kappaphycus alvarezii</i>	50,8	Solorzano-Chavez <i>et al.</i> (2019)

## 2.5 Alga *Kappaphycus alvarezii*

*K. alvarezii* adalah alga laut yang paling banyak dibudidayakan secara komersial di dunia. Spesies ini mewakili 15% dari nilai pasar global rumput laut merah dan merupakan spesies yang paling banyak dibudidayakan di Indonesia (Mariño *et al.*, 2019). Indonesia dan Filipina merupakan negara penghasil utama *K. alvarezii*. Alga ini banyak dibudidayakan karena produktivitasnya yang tinggi dan pertumbuhannya yang cepat (Sulfahri *et al.*, 2020).

Dalam dunia perdagangan nasional dan internasional, *K. alvarezii* umumnya lebih dikenal dengan nama *Euchema cottonii*. Spesies ini menghasilkan karagenan tipe *kappa*. Oleh karena itu, secara taksonomi diubah namanya dari *E. cottonii* menjadi *K. alvarezii*. Adapun klasifikasinya menurut (Doty, 1973), adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisio	: Rhodophyta
Classis	: Rhodophyceae
Ordo	: Gigartinales
Familia	: Solieriaceae
Genus	: <i>Kappaphycus</i>
Species	: <i>Kappaphycus alvarezii</i>



Gambar 1. Alga laut *Kappaphycus alvarezii*  
(Sumber: Krishnamoorthy *et al.*, 2014)

*K. alvarezii* merupakan alga laut yang termasuk kedalam golongan *Rhodophyta* atau alga merah, dapat dibudidayakan di zona beriklim sedang, dan subtropis atau tropis. Berdasarkan morfologinya, alga ini memiliki ciri-ciri yaitu, mempunyai thallus yang berwarna coklat, hijau dan merah akibat dari komposisi pigmen yang berbeda menyebabkan panjang gelombang cahaya

yang diserap bervariasi, sehingga mempengaruhi karakteristik fotosintesis dan pertumbuhan (Hayashi *et al.*, 2011). Bentuk thallusnya sangat bervariasi mulai dari yang paling sederhana sampai bentuk yang kompleks dengan warna hijau, hijau kuning, abu-abu, atau merah, berbentuk silindris, permukaan licin, dan, cartilogeneus. Terdapat duri-duri tetapi tidak melingkari thallusnya. Cabang pertama dan kedua tumbuh membentuk rumpun yang rimbun. Ujungnya runcing atau tumpul berwarna coklat ungu atau hijau kuning. Bentuk *spine* tidak teratur menutupi thallus dan cabang-cabangnya (Gambar 1) (Nugroho dan Kusnandar, 2015).

Berdasarkan komposisi kimianya, secara umum *K. alvarezii* tersusun oleh karbohidrat, protein, lipid, abu, gugus sulfat dan aromatik yang tidak larut (Solorzano-Chavez *et al.*, 2019). Selain itu, mengandung asam amino esensial, khususnya fenilalanin, leusin dan treonin (Naseri *et al.*, 2019). Mengenai komposisi gula, *K. alvarezii* terdiri dari agar, karagenan dan selulosa (Sudhakar *et al.*, 2019).

Tabel 3. Komposisi Kimia *K. alvarezii*

Kandungan Kimia	Komposisi (%)
Karbohidrat	50,8
Protein	3,3
Lipid	3,3
Abu	15,6
Gugus sulfat	12,4
Gugus aromatic	3,0
Asam amino esensial	43

(Sumber: Solorzano-Chavez *et al.*, 2019; Naseri *et al.*, 2019)

## 2.6 Keunggulan Alga untuk Produksi Bioetanol

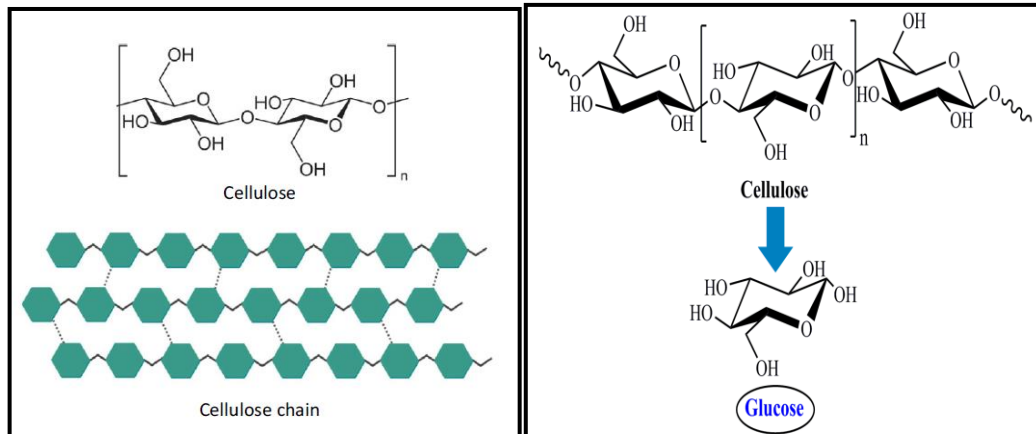
Teradapat beberapa keuntungan komersial dari produksi bioetanol alga yang menarik minat para peneliti dan pengusaha di seluruh dunia, yaitu (Jambo *et al.*, 2016):

1. Produksi bioetanol alga tidak perlu bersaing dengan produksi pangan, baik di darat maupun di air. Selain itu, tidak perlu bersaing dengan manusia untuk mendapatkan makanan
2. Kandungan karbohidrat dalam alga melimpah, karbohidrat seperti pati dan gula dapat difermentasi untuk menghasilkan bioetanol
3. Tidak memiliki lignin dan kadar hemiselulosa rendah, yang menghasilkan peningkatan efisiensi hidrolisis dan hasil fermentasi, sehingga dapat mengurangi biaya produksi bioetanol

4. Alga memiliki kemampuan untuk mengambil CO<sub>2</sub> dari atmosfer dan pembangkit listrik, bioetanol alga dapat menghasilkan pengurangan Gas Rumah Kaca (GRK) dibandingkan dengan bahan bakar fosil dan biobased lainnya
5. Alga tumbuh dengan cepat dan dapat dengan mudah tumbuh di berbagai lingkungan perairan seperti air tawar, air asin, atau air limbah kota
6. Memiliki efisiensi fotosintesis yang tinggi, efisiensi fotosintesis rata-rata biomassa air adalah 6-8%, yang jauh lebih tinggi daripada biomassa terestrial (1,8-2,2%)
7. Memiliki produktivitas dan siklus pemanenan yang sangat cepat (1-10 hari) dibandingkan dengan bahan baku lainnya dan dengan demikian menyediakan pasokan yang cukup untuk memenuhi kebutuhan produksi etanol

## **2.7 Limbah *Kappahycus alvarezii***

Pada proses pembuatan karagenan, limbah yang dihasilkan sekitar 65-70% dari berat alga laut, kandungan selulosanya bisa mencapai 71,38% (Fauziyah *et al.*, 2021). Selulosa merupakan salah satu komponen karbohidrat yang terdapat pada limbah produksi karagenan. Selulosa adalah polisakarida yang dibentuk oleh unit berulang glukosa. Selulosa dapat diubah menjadi gula yang dapat difermentasi menjadi etanol. Meinita *et al.* (2019), mempelajari kemungkinan memperoleh etanol dari residu atau limbah dari produksi karagenan. Lebih dari 3000 ton etanol dapat diperoleh per tahun, mengingat produksi limbah karagenan bisa mencapai 17.549 ton per tahun. Selulosa adalah biopolimer paling melimpah di alam. Selulosa dapat ditemukan pada dinding sel tanaman hijau dan alga. Selulosa merupakan komponen linier yang terdiri dari monomer glukosa rantai panjang  $\beta$ -D-glukopiranososa yang dihubungkan dengan ikatan  $\beta$ -(1,4)-glikosidik, dapat mencapai lebih dari seribu unit glukosa, dengan selobiosa sebagai unit berulangnya. Selobiosa adalah unit selulosa terkecil yang berulang dan dapat diubah menjadi residu glukosa. Rantai selulosa terdiri dari sekitar 1000 unit D-glukosa, yang tersusun dalam mikrofibril. Serat-serat tersebut membentuk matriks lignoselulosa dengan ikatan hidrogen, yang membuatnya sangat tahan, kuat, dan kompak dalam strukturnya (Zoghلامي dan Paës, 2019). Struktur selulosa dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Struktur Selulosa  
(Sumber: Zanchetta *et al.*, 2021)

## 2.8 *Pichia kudriavzevii*

*P. kudriavzevii* merupakan yeast yang bersifat uniseluler berbentuk bulat telur dan berukuran sangat kecil dengan diameter 4000 mm, terdiri atas dinding sel yang mengelilingi membran dan berfungsi melindungi sel dari faktor-faktor luar, biasanya bereproduksi setiap 2-3 jam, dan dapat hidup pada kondisi lingkungan yang terdapat oksigen dan tanpa oksigen (Herawati, 2015).

Klasifikasi *P. kudriavzevii* menurut (Herawati, 2015) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Fungi  
 Divisio : Ascomycota  
 Classis : Ascomycetes  
 Ordo : Saccharomycetales  
 Familia : Saccharomycetaceae  
 Genus : *Pichia*  
 Species : *Pichia kudriavzevii*

Yeast ini merupakan salah satu mikrobia potensial dalam fermentasi etanol karena mampu memproduksi etanol lebih tinggi, cepat, dan tahan terhadap kondisi lingkungan yang ekstrim (Sulfahri *et al.*, 2019). Produksi etanol dengan kondisi lingkungan yang ekstrim seperti fermentasi etanol suhu tinggi (*High temperature ethanol fermentation* atau HTEF) dapat mengurangi risiko kontaminasi oleh mikroorganisme mesofilik yang tidak diinginkan dan dapat meningkatkan konversi gula menjadi etanol (Nuanpeng *et al.*, 2016).



*P. kudriavzevii* sangat toleran terhadap kondisi ekstrim dibandingkan dengan mikroba lainnya yang banyak digunakan dalam fermentasi etanol seperti *Saccharomyces cerevisiae* (Mukherjee *et al.*, 2017). *Yeast* ini menunjukkan kemampuan termotoleransi yang lebih tinggi dari pada *S. cerevisiae*. Beberapa strain *P. kudriavzevii* telah dilaporkan tumbuh dan menghasilkan etanol secara efektif pada suhu tinggi (Chamnipa *et al.*, 2018), misalnya *P. kudriavzevii* MF-121 (Isono *et al.*, 2012) dan *P. kudriavzevii* DMKU 3-ET15 (Yuangsaard *et al.*, 2013). Selain itu, beberapa galur *P. kudriavzevii*, seperti galur MF-121, juga menunjukkan toleransi multi-stres, seperti asam, etanol, suhu tinggi, dan toleransi garam (Kitagawa *et al.*, 2010).

*P. kudriavzevii* mampu menghasilkan etanol antara 40°C dan 45°C, sedangkan *S. cerevisiae* tidak dapat digunakan secara efektif untuk produksi etanol pada suhu yang lebih tinggi, karena aktivitasnya akan terhambat pada suhu yang lebih tinggi (Chamnipa *et al.*, 2018; Nwuche *et al.*, 2018). Selain itu *yeast* jenis ini juga dapat digunakan sebagai kultur campuran dengan mikroba lainnya yang toleran terhadap etanol. Chamnipa *et al.* (2018), melaporkan bahwa *P. kudriavzevii* RZ8-1 adalah strain ragi termotoleran yang efektif untuk produksi etanol pada suhu tinggi. Strain ini menunjukkan pertumbuhan yang baik dan kemampuan produksi etanol pada suhu hingga 45°C.

## **2.9 Produksi Bioetanol**

Produksi bioetanol meliputi tiga proses yaitu: (1) pretreatment untuk memisahkan hemiselulosa dan lignin dari selulosa, (2) hidrolisis selulosa untuk mendapatkan gula dan, (3) fermentasi untuk konversi gula menjadi etanol (Rocha-Meneses *et al.*, 2017).

### **2.9.1 Hidrolisis**

Hidrolisis merupakan proses yang bertujuan untuk memecah karbohidrat kompleks menjadi gula sederhana, agar dapat dimanfaatkan oleh mikroba fermentasi menghasilkan etanol. Selama konversi, polisakarida akan dihidrolisis menjadi molekul monomer bebas yang dapat dengan mudah difermentasi menjadi bioetanol. Proses hidrolisis dapat dilakukan secara kimiawi dan enzimatik. Secara umum, hidrolisis kimiawi merupakan metode yang paling umum digunakan untuk menghidrolisis polisakarida, sedangkan hidrolisis enzimatik merupakan pendekatan terkini yang telah mendapatkan sorotan dari para peneliti di seluruh dunia (Abd-Rahim *et al.*, 2014).

## 1. Hidrolisis asam

Pelepasan gula sederhana dari komponen polisakarida dapat ditingkatkan secara signifikan dengan menggunakan bahan kimia seperti asam. Proses hidrolisis secara kimiawi yang paling banyak digunakan yaitu dengan menggunakan asam sulfat  $H_2SO_4$  (El-Tayeb *et al.*, 2012). Ditemukan bahwa polisakarida dari tiga kelas makroalga (hijau, coklat, dan merah) dapat dihidrolisis secara efektif menjadi monosakarida dengan perlakuan  $H_2SO_4$  encer pada suhu tinggi (Jang *et al.*, 2012). Peran asam dalam hidrolisis dapat dilihat pada kemampuannya untuk memutuskan ikatan yang menghubungkan rantai panjang polisakarida. Binod *et al.*, (2011), menjelaskan bahwa pada tahap awal, terjadi penghancuran ikatan hidrogen untuk memutus rantai polisakarida yang mengubahnya menjadi keadaan amorf sepenuhnya. Kemudian, asam akan berfungsi sebagai katalisator yang akan membelah polisakarida dengan menghidrolisis ikatan glikosidik. Pada akhir proses, setiap penambahan atau pengenceran dengan air pada suhu sedang akan menghasilkan hidrolisis hidrolisat yang lengkap dan cepat menjadi monosakarida.

## 2. Hidrolisis enzimatik

Konversi gula kompleks menjadi bentuk sederhana dengan menggunakan hidrolisis enzimatik adalah cara yang pasti untuk mengurangi dampak lingkungan (Hsu *et al.*, 2011). Kemampuan untuk mencapai lebih dari 80% tingkat konversi juga membuat pendekatan enzimatik tampaknya lebih menarik untuk aplikasi dalam produksi bioetanol (Balat, 2010). Dalam hidrolisis enzimatik, selulase adalah enzim yang sebagian besar digunakan untuk mendegradasi polisakarida. Enzim selulase memiliki kemampuan untuk mendegradasi selulosa yang ada pada dinding sel alga menjadi glukosa melalui hidrolisis enzimatik (Hirasawa *et al.*, 2019). Enzim ini dibagi menjadi tiga kelompok utama yaitu, endoglukanase (EGs), selobiohidrolase (CBHs) atau eksoglukanase, dan  $\beta$ -glukosidase (BGLs). EGs mengkatalisis pemutusan acak ikatan internal rantai selulosa, sementara CBHs memotong selulosa menjadi selobiosa dari ujung rantai bebas. BGLs dan melepaskan unit monomer glukosa dari selobiosa. Enzim yang sangat spesifik mendorong transformasi 100% selulosa menjadi glukosa tanpa

pembentukan produk yang tidak diinginkan (inhibitor), yang membuat proses ini sangat menarik dibandingkan dengan hidrolisis kimia (Demuez *et al.*, 2015).

Namun, kendala dalam hidrolisis enzimatis yaitu harga enzim yang mahal. Sehingga meningkatkan biaya produksi. Oleh karena itu, para peneliti memanfaatkan mikroorganisme seperti bakteri dan jamur untuk menghasilkan enzim. Enzim yang disekresikan oleh mikroorganisme seperti *Trichoderma reesei* dapat memproduksi enzim selulase untuk menghidrolisis selulosa menjadi gula sederhana. Sistem selulase *T. reesei* mengandung dua CBHs (CBHI dan CBHII) dan setidaknya lima EGs (EGI, EGII, EGIII, EGIV dan EGV), dan dua BGLs (BGLI dan BGLII (Saloheimo *et al.*, 2002). Aksi sinergis dari enzim-enzim tersebut dalam *T. reesei* memungkinkan hidrolisis yang efisien dari kristal selulosa.

Enzim akan memecah dinding sel alga untuk melepaskan lebih banyak monosakarida dari bahan baku. Dalam reaksi, pengikatan enzim ke bahan baku alga akan memecah ikatan polisakarida, akibatnya, konsentrasi enzim berkurang dan konversi berlangsung menjadi bioetanol pada langkah fermentasi. Tabel 4. menunjukkan perbandingan metode hidrolisis asam dan enzimatis.

Tabel 4. Perbandingan Hidrolisis Asam dan Enzimatis

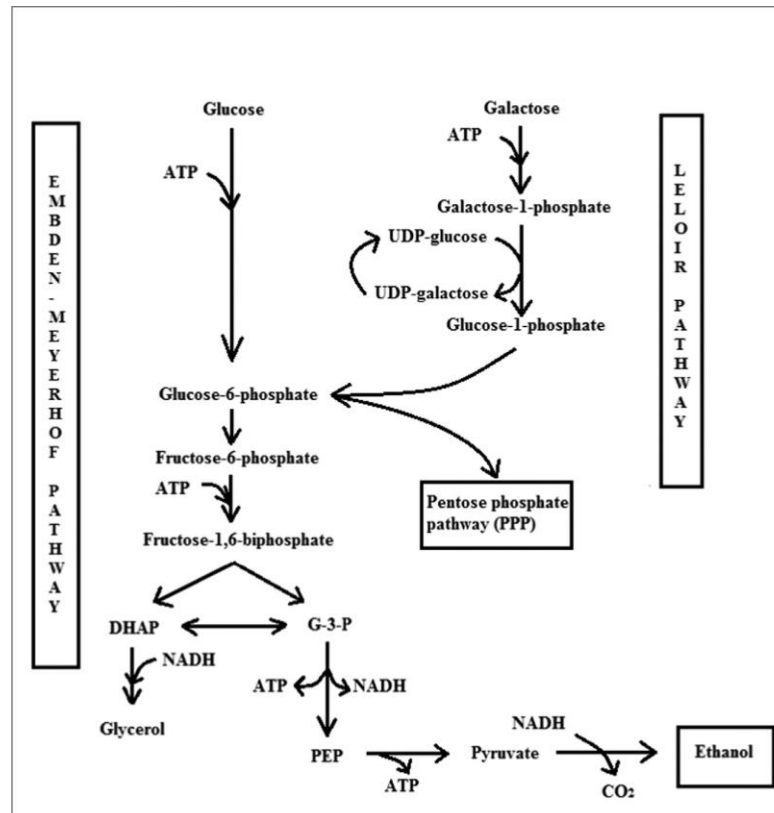
Parameter	Asam	Enzimatis
Waktu	Pendek	Panjang
Biaya	Rendah	Tinggi
Suhu	Tinggi	Sedang
Hasil gula	Rendah	Tinggi
Korosi peralatan	Ya	Tidak
Produk yang tidak diinginkan	Ya	Tidak

(Sumber: Taherzadeh dan Karimi, 2007)

### 2.9.2 Fermentasi

Gula sederhana yang dilepaskan pada langkah hidrolisis dapat dengan mudah diubah menjadi bioetanol dengan bantuan beberapa mikroorganisme. Bioetanol merupakan produk utama fermentasi bersama dengan beberapa produk sampingan seperti CO<sub>2</sub> dan air (Kiran *et al.*, 2014). Berbagai mikroorganisme, seperti bakteri dan jamur digunakan untuk fermentasi. Gambar 3, menunjukkan dua contoh gula yang dihasilkan setelah tahap hidrolisis dan

jalurnya menuju produksi etanol. Konversi glukosa dan galaktosa menjadi etanol masing-masing melibatkan jalur glikolisis Embden-Meyerhof dan jalur Leloir.



Gambar 3. Jalur Glikolisis Embden-Meyerhof dan Jalur Leloir untuk Sintesis Etanol dari Glukosa dan Galaktosa

Pada jalur Embden-Meyerhof, ada dua tahap utama yang dihadapi oleh glukosa, yang pertama adalah konversi gula menjadi glukosa-6 fosfat diikuti oleh tahap kedua, yaitu konversi zat antara menjadi piruvat. Produk akhir dari jalur ini bervariasi tergantung pada mikroorganisme yang digunakan. Ketika mikroorganisme fermentasi digunakan, mikroorganisme tersebut akan mereduksi piruvat menjadi alkohol (etanol) dan  $\text{CO}_2$  dengan proses dua langkah yang dikatalis oleh enzim, disebut sebagai fermentasi alkohol (Kannah *et al.*, 2020).

Dalam proses jalur Leloir, galaktosa-1-fosfat diubah menjadi glukosa-1-fosfat diikuti oleh konversinya menjadi glukosa-6-fosfat. Molekul yang dihasilkan kemudian dapat masuk ke jalur Embden-Meyerhof dan jalur pentosa fosfat (PPP) yang dilanjutkan untuk produksi etanol. Jalur leloir dalam metabolisme galaktosa lebih kompleks daripada glikolisis, yang menyebabkan konsumsi galaktosa lebih lambat jika dibandingkan dengan konsumsi glukosa selama fermentasi. Perbedaan metabolisme gula ini mempengaruhi hasil bioetanol terutama selama

fermentasi substrat gula campuran (Lee *et al.*, 2015). Proses fermentasi bioetanol dapat dilakukan dengan hidrolisis dan fermentasi terpisah (SHF) dan sakarifikasi dan fermentasi simultan (SSF)

### **1. *Separate Hydrolysis dan Fermentation (SHF)***

Mekanisme dasar SHF didasarkan pada pemisahan hidrolisis dan fermentasi menjadi dua proses yang berbeda. Seperti pada proses produksi bioetanol normal, hidrolisis akan dilakukan terlebih dahulu untuk mendegradasi bahan baku menjadi gula monomer dengan menggunakan enzim. Proses ini dilanjutkan dengan reaksi fermentasi yang akan memanfaatkan gula yang terbentuk pada tahap hidrolisis (Alfani *et al.*, 2000). Metode SHF untuk biomassa makroalga melibatkan pra-pemrosesan mekanis (seperti pengeringan, penggilingan dan homogenisasi) diikuti dengan pra-perlakuan fisiko-kimia dan enzimatik untuk mendapatkan gula monomer untuk fermentasi.

### **2. *Simultaneous Saccharification dan Fermentation (SSF)***

Pada SSF, proses hidrolisis dan fermentasi dilakukan secara bersamaan dalam satu tahap yang melibatkan satu reaktor. Selama reaksi, bahan baku, enzim dan ragi disatukan secara teratur sehingga gula yang dilepaskan dengan cepat diubah menjadi bioetanol. SSF dapat membatasi penghambatan produk akhir dengan menghilangkan sisa gula (Dahnum *et al.*, 2015). Hasil bioetanol yang lebih tinggi dapat diperoleh jika kondisinya sesuai selama reaksi SSF.

## **2.10 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Produksi Bioetanol**

Produksi bioetanol melalui fermentasi dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor. Faktor-faktor tersebut antara lain jenis substrat, mikroorganisme, pH, lama fermentasi dan nutrisi (Fakrudin *et al.*, 2012).

### **1. Jenis Substrat**

Substrat yang dapat digunakan dalam produksi bioetanol, diantaranya bahan-bahan yang mengandung glukosa, pati, lignoselulosa dan alga. Perbedaan substrat dapat mempengaruhi konsentrasi bioetanol yang dihasilkan oleh mikroorganisme yang sama (Azkar *et al.*, 2017). Hasil penelitian Bharti dan Mudhulika (2016), menunjukkan bahwa kadar bioetanol yang dihasilkan dengan menggunakan substrat singkong yaitu sebesar 9,9% sedangkan dengan menggunakan substrat kulit biji kopi menghasilkan

bioetanol sebesar 13,6% dengan menggunakan jenis mikroba yang sama yaitu *S. cerevisiae*.

## **2. Jenis Mikroorganisme**

Biotanol dapat diproduksi melalui fermentasi menggunakan berbagai jenis mikroorganisme. Beberapa mikroorganisme yang umum digunakan dalam produksi bioetanol, seperti khamir *S. cerevisiae* dan bakteri *Zymomonas mobilis*. Selain khamir dan bakteri, produksi bioetanol juga dapat menggunakan jamur, diantaranya *P. kudriavzevii*, *Candida gabrata* dan *Torulaspota globosa* (Sumerta dan Atit, 2017).

## **3. pH**

Nilai pH berpengaruh terhadap kadar bioetanol yang dihasilkan. Nilai pH yang terlalu basa atau asam dapat menghambat fermentasi bioetanol dan menurunkan jumlah produk yang dihasilkan. Pada pH yang terlalu tinggi, laju fermentasi akan menurun dikarenakan enzim-enzim yang dihasilkan oleh khamir untuk memproduksi bioetanol mengalami denaturasi. Sedangkan jika pH terlalu rendah dapat menyebabkan enzim-enzim yang dihasilkan oleh khamir untuk produksi bioetanol menjadi inaktif. pH optimum untuk fermentasi bioetanol yaitu 4,5-6,0 (Anggraini *et al.*, 2017).

## **4. Lama Fermentasi**

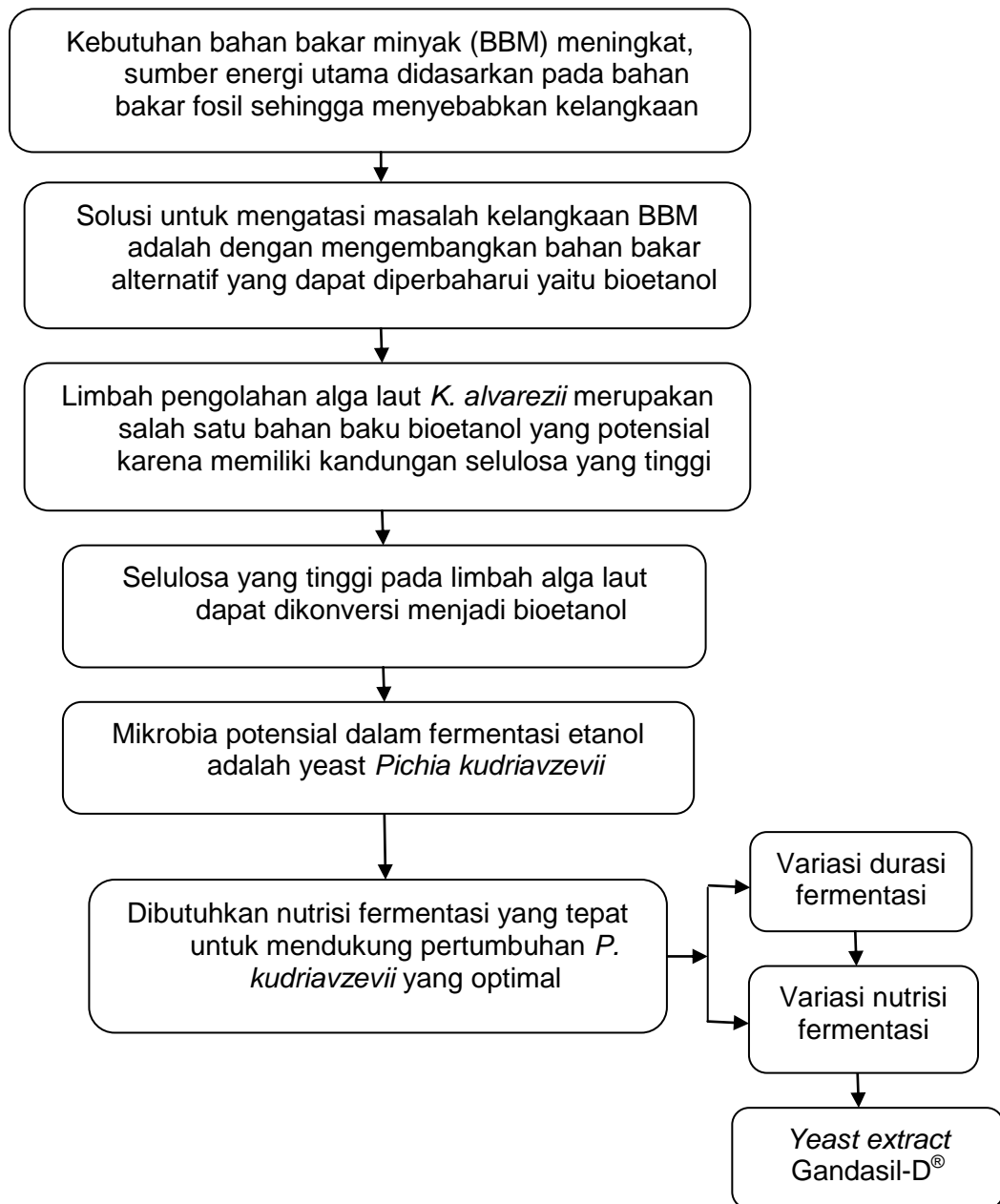
Lama fermentasi pada produksi bioetanol sangat mempengaruhi kadar bioetanol yang dihasilkan. Semakin lama waktu fermentasi maka semakin tinggi kadar bioetanol yang dihasilkan.

## **5. Nutrisi Fermentasi**

Nutrisi merupakan faktor yang sangat penting bagi mikroba agen fermentasi. Media fermentasi harus dipersiapkan dengan kandungan bahan-bahan yang memenuhi syarat, cukup untuk berkembang biak, dan cukup pula untuk diubah menjadi produk. Mikroorganisme membutuhkan unsur karbon dan nitrogen untuk berkembang biak. Unsur karbon merupakan sumber energi, sedangkan nitrogen digunakan mikroorganisme untuk mempercepat pertumbuhan selama masa fermentasi. Selain karbon dan nitrogen, proses ini juga membutuhkan unsur fosfor, kalium dan mineral (misalnya, seng atau magnesium). Komponen tersebut merupakan penyusun utama membran, protein, asam nukleat dan struktur seluler lainnya. Suplementasi nutrisi pada fermentasi bioetanol berfungsi untuk pertumbuhan mikroba yang lebih baik, peningkatan toleransi stres selama

fermentasi, dan untuk meningkatkan hasil bioetanol. Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa menambahkan suplemen nutrisi meningkatkan aktivitas fermentasi mikroba dan meningkatkan toleransi komunitas mikroba fermentasi terhadap etanol. Kekurangan nutrisi pada media ini merupakan penyebab melambat atau terhentinya fermentasi (Umam, 2018).

## 2.11 Kerangka Pikir



Gambar 4. Kerangka Pikir