

TESIS

**PRODUKSI BIOETANOL DARI SELULOSA ALGA MERAH DENGAN
SISTEM FERMENTASI DUA TAHAP MENGGUNAKAN
JAMUR *Trichoderma viride* DAN BAKTERI *Zymomonas mobilis***

**BIOETHANOL PRODUCTION FROM CELLULOSE IN RED ALGAE
BY SEPARATED HYDROLYSIS AND FERMENTATION SYSTEM
USING *Trichoderma viride* AND *Zymomonas mobilis***

IKA SEPTIANY

P1100209009



**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2013**

**PRODUKSI BIOETANOL DARI SELULOSA ALGA MERAH
DENGAN SISTEM FERMENTASI DUA TAHAP MENGGUNAKAN
JAMUR *Trichoderma viride* DAN BAKTERI *Zymomonas mobilis***

Tesis

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh Gelar Magister

**Program Studi
Kimia**

Disusun dan diajukan oleh

IKA SEPTIANY

Kepada

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2013**

TESIS

**PRODUKSI BIOETANOL DARI SELULOSA ALGA MERAH DENGAN
SISTEM FERMENTASI DUA TAHAP MENGGUNAKAN
JAMUR *Trichoderma viride* DAN BAKTERI *Zymomonas mobilis***

Disusun dan diajukan oleh

IKA SEPTIANY

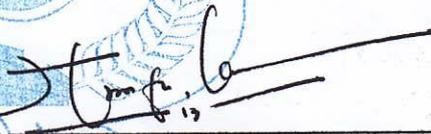
Nomor Pokok P1100209009

telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Tesis
pada tanggal 23 Mei 2013
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui
Komisi Penasehat



Prof. Ahyar Ahmad, Ph.D
Ketua



Prof. Dr. H. Hanapi Usman, MS.
Anggota

Ketua Program Studi
Kimia



Dr. Paulina Taba, M.Phill

Direktur Program Pascasarjana
Universitas Hasanuddin




Prof. Dr. Ir. Mursalim

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertandatangan dibawah ini:

Nama : Ika Septiany
No. Mahasiswa : P1100209009
Program studi : Kimia

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa tesis yang saya tulis ini benar-benar hasil karya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan sebagian atau keseluruhan tesis ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 23 Mei 2013

Yang menyatakan,

Ika Septiany

PRAKATA

Alhamdulillahirabiil 'alamiin, penulis panjatkan kehadiran Allah SWT yang telah memberikan kesempatan, petunjuk, kesehatan, dan kemudahan dalam menjalankan program studi pada pendidikan tingkat Magister mulai dari awal perkuliahan hingga akhir penulisan tesis ini.

Tesis ini disusun sebagai syarat akademis dalam memperoleh gelar Magister Sains pada Program Studi Kimia, Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin. Tesis ini merupakan laporan penelitian dengan judul **Produksi Bioetanol dari Selulosa Alga Merah dengan Sistem Fermentasi Dua Tahap menggunakan Jamur *Trichoderma viride* dan Bakteri *Zymomonas mobilis*.**

Dalam proses penyusunan tesis ini berbagai hambatan telah dihadapi penulis. Namun atas bantuan, bimbingan, dan kerjasama dari berbagai pihak sehingga penyusunan tesis ini dapat selesai. Pada kesempatan ini penulis dengan penuh kerendahan hati menyampaikan ucapan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada Bapak Prof. Ahyar Ahmad, Ph.D sebagai ketua komisi penasehat dan Bapak Prof. Dr. H. Hanapi Usman, MS sebagai anggota komisi penasehat yang telah banyak meluangkan waktunya dalam membimbing dan mengarahkan penulis sejak penulisan rencana penelitian sampai pada penyelesaian penulisan tesis ini.

Demikian pula ucapan terima kasih dan penghargaan yang sama disampaikan kepada:

1. Bapak Prof. Dr. dr. Idrus Paturusi, Sp.B, Sp.BO. sebagai Rektor Universitas Hasanuddin.
2. Bapak Prof. Dr. Ir. Mursalim sebagai Direktur PPS-UNHAS, Makassar.
3. Bapak Prof. Dr. H. Abd. Wahid Wahab, M.Sc sebagai Dekan FMIPA-UNHAS, Makassar.
4. Ibu Dr. Paulina Taba, M.Phil sebagai Ketua Program Studi Magister Kimia PPS-UNHAS, Makassar.
5. Bapak (Alm) Prof. Dr. H. M. Noor Jalaluddin, Bapak Prof. Dr. Tjodi Harlim dan Ibu Dr. Indah Raya, M.Si sebagai anggota tim penguji seminar usul, seminar hasil serta ujian tesis.
6. Bapak dan Ibu dosen Program Studi Kimia PPS-Unhas Makassar.
7. Bapak dr. H. Sukiman, M.Kes sebagai Kepala Balai Teknik Kesehatan Lingkungan dan Pengendalian Penyakit Kelas I Makassar dan Ibu Tabita Mintu, SKM, M.Kes sebagai Kepala Seksi Pengembangan Teknologi dan Laboratorium yang telah memberikan izin kepada penulis untuk melanjutkan studi ke Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin.
8. Seluruh rekan-rekan mahasiswa angkatan 2009 Program Magister Kimia yang telah berbagi suka dan duka selama mengikuti kuliah dan penelitian.

9. Seluruh rekan-rekan mahasiswa angkatan 2008, 2010, 2011, 2012 Program Magister Kimia yang telah membantu selama mengikuti kuliah dan penelitian.
10. Bapak Sakius Ruso, ST, M.Si; Ibu Mahyati, ST, M.Si; Kanda Anita Purnamasari, S.Si, M.Si, dan Adinda Evi Prima Kusuma yang telah banyak membantu dalam pelaksanaan penelitian beserta seluruh Staf dan Analis di Jurusan Teknik Kimia Politeknik Negeri Ujungpandang.
11. Seluruh rekan-rekan sejawat di Balai Teknik Kesehatan Lingkungan dan Pengendalian Penyakit Kelas I Makassar, terima kasih buat dukungan dan semangat dari kalian semua serta kepada mereka yang tidak sempat disebutkan tetapi telah banyak membantu penulis dalam penyelesaian tesis ini.

Secara khusus penghargaan dan terima kasih kepada saudaraku Indra Dwinata, SKM, M.PH dan Ismi Sriwahyuni yang telah memberikan bantuan kepada penulis. Tak pernah terlupakan selamanya, kepada kedua orang tua yang saya hormati dan cintai Ayahanda H. Halwatif, S.Sos, MM dan Ibu Hj. Ir. Kasmawati Kadir yang selalu mendidik, memberikan motivasi dan mendoakan penulis. Terkhusus suami tercinta Budi Darma Putra, SE, MM atas segala bantuan, dukungan, pengertian, dan doa yang diberikan selama ini. Semoga Allah SWT memberikan balasan pahala yang berlipat ganda.

Penulis menyadari bahwa tesis ini masih memiliki banyak kekurangan, namun harapan penulis sekurang apapun karya ini mudah-mudahan ada yang bermanfaat bagi dunia ilmu pengetahuan.

Akhir kata penulis mengharapkan saran dan kritik yang bermanfaat dari pembaca untuk menyempurnakan tesis ini. Semoga Allah SWT senantiasa memberikan rahmat dan hidayah-Nya kepada kita semua. Aamiin.

Makassar, Mei 2013

Penulis

Ika Septiany

ABSTRAK

IKA SEPTIANY. *Produksi Bioetanol dari Selulosa Alga Merah dengan Sistem Fermentasi Dua Tahap Menggunakan Jamur Trichoderma Viride dan Bakteri Zymomonas Mobilis* (dibimbing oleh Ahyar Ahmad dan Hanapi Usman).

Penelitian ini bertujuan mengetahui kadar produksi bioetanol dari selulosa alga merah dengan metode hidrolisis enzimatik dan fermentasi secara bertahap dan mengetahui nilai konversi selulosa dari alga merah.

Metode yang digunakan melibatkan proses hidrolisis selulosa secara enzimatik menggunakan jamur *trichoderma viride* dan proses fermentasi bioetanol dengan menggunakan bakteri *zymomonas mobilis*. Optimasi hidrolisis enzimatik dan fermentasi dilakukan dengan cara memvariasikan pH dan waktu hidrolisis dan fermentasi.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kondisi optimum hidrolisis selulosa secara enzimatik diperoleh pada pH 5,5 dengan waktu hidrolisis enam hari, sedangkan untuk kondisi optimum fermentasi bioetanol diperoleh pada pH 6,0 dengan waktu fermentasi tujuh hari. Pengukuran konsentrasi bioetanol menggunakan kromatografi gas. Nilai konversi selulosa alga merah adalah setiap satu kilogram selulosa alga merah *gracilaria verrucosa* menghasilkan 23,01% bioetanol dengan kadar 29,60% dan satu kilogram *eucheuma cottonii* menghasilkan 17,53% bioetanol dengan kadar 15,22%.

Kata kunci: *gracilariaa verrucosa*, *eucheuma cottonii*, selulosa, bioetanol, hidrolisis enzimatik, fermentasi, *trichoderma viride*, *zymomonas mobilis*, kromatografi gas



ABSTRACT

IKA SEPTIANY. *Bioethanol Production from Red Alga Cellulose by Two Step Fermentation System Using Trichoderma viride Fungus and Zymomonas mobilis Bacterium* (supervised by Ahyar Ahmad and Hanapi Usman).

The objective of the research was to produce the bioethanol from the red alga cellulose by the enzymatic hydrolytic and fermentation methods in succession and to find out the conversion values of the cellulose and red alga.

The method used involved the enzymatically hydrolytic cellulose process using the *Trichoderma viride* fungus and bioethanol fermentation process by using the *Zymomonas mobilis* bacterium. Enzymatic hydrolytic and fermentation optimization were carried out by varying pH, and hydrolytic and fermentation time.

The research result indicates that the optimum condition of the hydrolytic cellulose is enzymatically obtained on the pH of 5.5 with the hydrolytic time of six days, whereas the optimum condition of the bioethanol fermentation is obtained on pH of 6.0 with the fermentation time of 7 days. The bioethanol concentration measurement is carried out by using the Gas Chromatography. The value of the red alga cellulose conversion is that every one kilogram of the red alga cellulose, *Gracilaria verrucosa* produces 23.01% bioethanol with the content of 29.60% and one kilogram *E. cottonii* produces 17.53% bioethanol with the content of 15.22%.

Key-words: *Gracilaria verrucosa*, *Euचेuma cottonii*, cellulose, bioethanol, enzymatic hydrolytic, fermentation, *Zymomonas mobilis*, gas chromatography.



DAFTAR ISI

	Halaman
PRAKATA	v
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xix
DAFTAR SINGKATAN	xxi
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Rumusan Masalah	7
C. Tujuan Penelitian.....	7
D. Manfaat Penelitian	8
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	9
A. Tinjauan tentang Alga Laut.....	9
B. Tinjauan tentang Alga Merah.....	11
C. Morfologi Alga Merah	12
1. <i>Gracilaria verrucosa</i>	12
2. <i>Eucheuma cottonii</i>	14
D. Tinjauan tentang Enzim.....	16
1. Penggolongan enzim.....	18

2. Enzim selulase	18
E. Selulosa dan Lignin.....	21
1. Lignoselulosa	21
2. Selulosa.....	22
3. Lignin	25
F. Jamur <i>Trichoderma viride</i>	27
G. Bakteri <i>Zymomonas mobilis</i>	32
H. Produksi Bioetanol.....	36
1. Proses Hidrolisis.....	40
2. Proses Fermentasi.....	40
3. Destilasi.....	45
I. Kerangka Pikir.....	45
BAB III METODE PENELITIAN.....	48
A. Waktu dan Tempat Penelitian.....	48
B. Alat Penelitian.....	48
C. Bahan Penelitian.....	48
D. Prosedur Kerja	49
1. Tahap pretreatment.....	50
a. Persiapan bahan baku.....	50
b. Proses delignifikasi	50
c. Analisis kandungan glukosa metode Luff Schoorl	51
d. Analisis kandungan selulosa dan lignin.....	52

2. Proses hidrolisis secara enzimatik.....	53
a. Peremajaan jamur <i>Trichoderma viride</i> dengan media agar miring.....	53
b. Pembuatan Media Inokulum jamur <i>T. viride</i>	54
c. Pembuatan media hidrolisis enzimatik oleh jamur <i>T. viride</i>	55
d. Analisis kadar glukosa metode Nelson-Somogyi	56
3. Proses fermentasi	58
a. Peremajaan Bakteri <i>Zymomonas mobilis</i> dengan Media Agar Miring.....	58
b. Pembuatan Media Inokulum bakteri <i>Z. mobilis</i> ...	59
c. Pembuatan Media Fermentasi bakteri <i>Z. mobilis</i>	60
d. Penentuan Indeks Bias	61
4. Proses Produksi Bioetanol	62
a. Pembuatan Media Inokulum jamur <i>T. viride</i>	62
b. Pembuatan Media Produksi Glukosa dari jamur <i>T. viride</i>	63
c. Pembuatan Media Inokulum bakteri <i>Z. mobilis</i> ...	64
d. Pembuatan Media Produksi Bioetanol dari bakteri <i>Z. mobilis</i>	65
e. Proses Destilasi Dan Dehidrasi Bioetanol	65
f. Penentuan berat jenis sampel.....	66
g. Analisis Kadar Bioetanol dengan Kromatografi Gas	66
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	68
A. Penentuan kadar air, selulosa, dan lignin alga laut.....	69
B. Penentuan berat kering alga laut	70

C. Penentuan gula reduksi setelah proses delignifikasi...	71
D. Penentuan kondisi optimum hidrolisis selulosa berdasarkan pengaruh pH dan waktu hidrolisis oleh jamur <i>T. viride</i>	72
1. Produksi bioetanol dengan metode SHF.....	72
2. Penentuan Waktu Optimum Hidrolisis Enzimatik....	74
3. Penentuan pH optimum hidrolisis enzimatik.....	78
E. Penentuan kondisi optimum fermentasi bioetanol berdasarkan pengaruh pH dan waktu fermentasi oleh bakteri <i>Z. mobilis</i>	80
1. Penentuan waktu optimum fermentasi.....	81
2. Penentuan pH optimum fermentasi.....	85
F. Produksi Bioetanol.....	89
1. Konsentrasi substrat.....	89
2. Hidrolisis dan fermentasi	89
3. Penentuan kadar bioetanol	89
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	97
A. Kesimpulan	97
B. Saran	98
DAFTAR PUSTAKA.....	99
LAMPIRAN.....	105

DAFTAR TABEL

Nomor	Halaman
1. Kandungan selulosa beberapa jenis alga	24
2. Komponen enzim di dalam kompleks enzim selulase.....	30
3. Komposisi bahan untuk media agar miring jamur <i>T. viride</i>	53
4. Komposisi bahan untuk media inokulum jamur <i>T. viride</i>	54
5. Komposisi bahan untuk media hidrolisis oleh jamur <i>T. viride</i>	55
6. Komposisi bahan untuk media agar miring bakteri <i>Z. mobilis</i> .	58
7. Komposisi bahan untuk media inokulum bakteri <i>Z. mobilis</i> ...	59
8. Komposisi bahan untuk media fermentasi bakteri <i>Z. mobilis</i> .	60
9. Komposisi bahan untuk media produksi inokulum jamur <i>T. viride</i>	62
10. Komposisi bahan untuk media produksi hidrolisis enzimatik selulosa oleh jamur <i>T. viride</i>	63
11. Komposisi bahan untuk media produksi inokulum bakteri <i>Z. mobilis</i>	64
12. Komposisi bahan untuk media produksi bioetanol oleh bakteri <i>Z. mobilis</i>	65
13. Komposisi kandunga kimia serbuk alga merah sebelum dan setelah proses delignifikasi.....	68
14. Penentuan rendamen selulosa alga merah setelah proses delignifikasi.....	70
15. Penentuan gula reduksi metode Luff Schrool pada alga merah setelah proses delignifikasi.....	71
16. Pengaruh waktu hidrolisis enzimatik terhadap konsentrasi gula reduksi dari kedua jenis alga merah pada pH 5,0.....	74

17. Pengaruh pH hidrolisis enzimatik terhadap konsentrasi gula reduksi dari kedua jenis alga merah setelah 6 hari.....	78
18. Pengaruh waktu fermentasi bioetanol terhadap nilai indeks bias dari kedua jenis alga merah pada pH 5,0.....	82
19. Pengaruh pH fermentasi bioetanol terhadap nilai indeks bias dari kedua jenis alga merah selama 7 hari	86

DAFTAR GAMBAR

Nomor	Halaman
1. Morfologi alga laut.....	10
2. <i>Gracilaria verrucosa</i>	12
3. <i>Eucheuma cottonii</i>	15
4. Aktivitas enzim selulase.....	20
5. Struktur selulosa.....	23
6. Struktur Selulosa yang merupakan polimer dari glukosa.....	23
7. Unit monomer lignin	25
8. Proses delignifikasi pada lignoselulosa	27
9. Jamur <i>Trichoderma viride</i>	28
10. Tahapan-tahapan hidrolisis selulosa.....	31
11. Proses hidrolisis selulosa oleh enzim selulase.....	32
12. Tahap glikolisis melalui jalur Embden-Mayerhof-Parnas (EMP)	35
13. Proses pembentukan etanol dari piruvat.....	36
14. Kurva pertumbuhan bakteri.....	42
15. Skema kerangka pikir penelitian.....	47
16. Skema proses kerja pembuatan bioetanol melalui proses fermentasi dua tahap (SHF) dari alga merah oleh jamur dan bakteri.....	67
17. Reaksi delignifikasi kompleks lignin-karbohidrat.....	69
18. Grafik penentuan waktu optimum hidrolisis <i>G. verrucosa</i> pada pH 5.0.....	75
19. Grafik penentuan waktu optimum hidrolisis <i>E. cottonii</i> pada pH 5.0.....	76
20. Grafik penentuan pH optimum hidrolisis <i>G. verrucosa</i>	79

21. Grafik penentuan pH optimum hidrolisis <i>E. cottonii</i>	80
22. Grafik penentuan waktu optimum fermentasi bioetanol <i>G. verrucosa</i> pada pH 5.0.....	82
23. Grafik penentuan waktu optimum fermentasi bioetanol <i>E. cottonii</i> pada pH 5.0.....	83
24. Grafik penentuan pH optimum fermentasi bioetanol <i>G. verrucosa</i>	87
25. Grafik penentuan pH optimum fermentasi <i>E. cottonii</i>	87
26. Data analisis etanol murni pada GC	90
27. Analisis bioetanol hasil fermentasi sebelum pemurnian selulosa <i>G. verrucosa</i> menggunakan Kromatografi Gas.....	91
28. Analisis bioetanol hasil fermentasi sebelum pemurnian selulosa <i>E. cottonii</i> menggunakan Kromatografi Gas... ..	92
29. Analisis bioetanol hasil fermentasi setelah pemurnian selulosa dari <i>G. verrucosa</i> menggunakan Kromatografi Gas	94
30. Analisis bioetanol hasil fermentasi setelah pemurnian selulosa dari <i>E. cottonii</i> menggunakan Kromatografi Gas	95

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Halaman
1. Skema persiapan bahan baku.....	105
2. Skema kerja proses delignifikasi alga laut.....	105
3. Data penentuan kadar air alga merah sebelum proses delignifikasi	106
4. Data penentuan kadar air alga merah setelah proses delignifikasi	106
5. Skema kerja penentuan kandungan lignin dan selulosa.....	107
6. Data penentuan kadar selulosa dan lignin alga merah sebelum proses delignifikasi.....	108
7. Data penentuan kadar selulosa dan lignin alga merah setelah proses delignifikasi	108
8. Penentuan gula reduksi Metode Luff-Schoorl.....	109
9. Standarisasi larutan $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 N (larutan penitrasi gula reduksi).....	110
10. Hasil titrasi blanko metode Luff Schrool	110
11. Hasil titrasi gula reduksi pada sampel alga merah metode Luff Schrool.....	110
12. Daftar Penetapan Kadar Gula menurut Luff-Schoorl.....	111
13. Skema kerja peremajaan jamur <i>T. viride</i> pada media Potato Dextrose Agar (PDA).....	112
14. Skema kerja peremajaan bakteri <i>Z. mobilis</i> pada media Nutrien Agar (NA).....	113
15. Pembuatan Media inokulum <i>T. viride</i> / <i>Z. mobilis</i>	114
16. Skema penentuan waktu optimum hidrolisis <i>T. viride</i>	115
17. Skema penentuan pH optimum hidrolisis <i>T. viride</i>	115
18. Pembuatan larutan standar glukosa 100 mg/mL	117

19. Kurva kalibrasi standar glukosa	118
20. Penentuan kadar glukosa metode Nelson Somogyi pada kondisi optimum proses hidrolisis oleh jamur <i>T. viride</i>	119
21. Data hasil analisa kadar gula reduksi pada spektrofotometer UV VIS	120
22. Skema penentuan waktu optimum fermentasi <i>Z. mobilis</i>	122
23. Skema penentuan pH optimum fermentasi <i>Z. mobilis</i>	123
24. Pembuatan larutan standar etanol untuk penentuan indeks bias.....	124
25. Kurva kalibrasi standar etanol vs indeks bias.....	125
26. Data penentuan kondisi optimum fermentasi berdasarkan nilai indeks bias bioetanol hasil fermentasi pada variasi pH dan waktu fermentasi dari <i>Z. mobilis</i>	126
27. Skema produksi glukosa berdasarkan kondisi optimum hidrolisis.....	127
28. Skema produksi bioetanol berdasarkan kondisi optimum fermentasi	128
29. Penentuan berat jenis sampel bioetanol setelah dehidrasi....	129
30. Data penggunaan bahan baku serta jumlah rendamen hasil fermentasi <i>G. verrucosa</i> menjadi bioetanol	130
31. Data penggunaan bahan baku serta jumlah rendamen hasil fermentasi <i>E. cottonii</i> menjadi bioetanol.....	131
32. Perhitungan konversi volume bioetanol dari 1 kg berat kering <i>G. verrucosa</i>	132
33. Perhitungan konversi volume bioetanol dari 1 kg berat kering <i>E. cottonii</i>	132
34. Pembuatan Larutan Kerja	133
35. Dokumentasi.....	136

DAFTAR SINGKATAN

Lambang/Singkatan	Arti dan Keterangan
α	alfa
ADP	adenosine difosfat
ATP	adenosine trifosfat
β	beta
BBM	bahan bakar minyak
C	karbon
cm	centimeter
$^{\circ}\text{C}$	derajat celcius
dkk	dan kawan-kawan
E-10	gasoline plus etanol 10
GC	<i>gas chromatography</i>
H	hidrogen
kL	kilo Liter
mg/L	milligram per liter
mm	millimeter
μL	mikroliter
NA	nutrien agar
NADH	nikotinamida adenosin dinukleotida hydrogen
O	oksigen
PDA	potato dextrose agar
pH	derajat keasaman
rpm	kecepatan putar per menit
SHF	<i>separated hydrolysis and fermentation</i>
SSF	<i>simultaneous sacharification and fermentation</i>
%	persen
UV-VIS	ultra violet-visible
nm	nanometer
W_R	waktu retensi

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Telah berabad-abad lamanya, manusia telah menggantungkan kebutuhan energi pada bahan bakar fosil seperti minyak dan gas bumi. Dewasa ini, kedua sumber energi tersebut tengah menghadapi permasalahan yang cukup serius yaitu kelangkaan persediaan bahan bakar. Berangkat dari permasalahan tersebut ternyata telah menyadarkan manusia terhadap ancaman kelangkaan sumber energi di masa yang akan datang. Hal ini dibuktikan dengan meningkatnya kepedulian masyarakat terhadap sumber energi alternatif. Aktualisasi ini tercermin dengan semakin giatnya kegiatan penelitian yang bertujuan menghasilkan sumber-sumber energi yang telah terjamin ketersediannya juga lebih ramah lingkungan. Salah satu dari beberapa sumber energi yang saat ini tengah gencar diteliti adalah bio-bahan bakar (bahan bakar hayati) seperti bioetanol dan biodiesel.

Bioetanol dan biodiesel adalah energi alternatif yang banyak diproduksi di dunia sampai saat ini. Laporan menunjukkan bahwa produksi bioetanol mengungguli produksi biodiesel karena bioetanol lebih ramah lingkungan. Beberapa penelitian mengenai bioetanol tengah digalangkan untuk menopang kemandirian energi diantaranya yang berasal dari berbagai jenis tumbuhan tingkat tinggi seperti kelapa sawit (*Elaeis guineensis*) (Suwirta, 2009), jarak pagar (*Jatropha curcas* L.) (Syakir, 2010; Widaryanto, 2008), dan singkong (*Manihot Utilissima* Phol) (Buana,

2009). Akan tetapi pengembangan usaha bahan bakar hayati dengan tumbuhan tersebut menemui beberapa permasalahan, diantaranya tingginya ongkos produksi dalam proses pembuatannya dan jika diproduksi dalam skala besar memerlukan lahan yang luas (Nurcholis dan Sumarsih 2007).

Bioetanol merupakan cairan biokimia yang diperoleh dari proses fermentasi glukosa dari sumber karbohidrat dengan menggunakan bantuan mikroorganisme dilanjutkan dengan proses destilasi (Ruso, 2011). Bioetanol merupakan salah satu bahan bakar alternatif pengganti BBM. Bioetanol dengan kadar 99,9 % dapat digunakan sebagai bahan campuran premium sedangkan bioetanol dengan kadar 40% dipakai sebagai bahan substitusi minyak tanah. Pencampuran bioetanol absolut sebanyak 10% dengan premium 90% disebut Gasohol E—10 (Herawati, 2011). Gasohol merupakan singkatan dari gasoline (premium) plus etanol. Pencanangan target produksi bioetanol 1% dari kebutuhan premium bersubsidi di Indonesia pada tahun 2010, yaitu sebesar 214.541 kL/tahun (Riyanti, 2009), sulit dicapai karena kapasitas produksi semua produsen hanya sekitar 100.000 kL sehingga kebutuhan akan bioetanol sangat tinggi. Di Indonesia bioetanol diproduksi dari bahan berkarbohidrat seperti ubi kayu, jagung, tebu sehingga berkompetisi dalam pemanfaatannya untuk pangan, pakan, dan industri. Oleh karena itu, bahan baku dari sumber daya laut menjadi alternatif dalam memproduksi bioetanol.

Indonesia merupakan salah satu negara maritim terbesar di dunia, dengan luas perairan laut sekitar 5,8 juta km² (75% dari total wilayah

Indonesia) dan garis pantai mencapai 81.000 km (Franvius, 2009). Jika dilihat dari data tersebut Indonesia mempunyai potensi yang cukup besar dalam mengembangkan budidaya sumber daya lautnya dibandingkan sumber daya daratannya. Salah satu sumber daya laut yang dapat dibudidayakan dan memiliki nilai ekonomis yang tinggi yaitu alga merah dan Sulawesi Selatan merupakan salah satu penghasil alga merah terbesar di Indonesia. Alga merah yang potensial dan banyak dijumpai di propinsi Sulawesi Selatan adalah jenis *Gracilaria* dan *Eucheuma* (Kadi, 2004). Namun tidak semua hasil panen *Gracilaria verrucosa* dan *Eucheuma cottonii* dapat diekspor sebagai bahan baku kosmetik dan bahan makanan, karena ada saja bagian-bagian yang tidak masuk kedalam kriteria kelayakan sebagai bahan baku untuk diekspor. Sisa hasil panen ini ada yang terserang penyakit, pertumbuhannya terhambat karena kurangnya nutrisi yang sangat dibutuhkan dalam masa pertumbuhan, serangan gulma, serta adanya serangga predator luar seperti ikan yang merusak pertumbuhan alga merah. Sehingga alga yang tidak masuk kriteria ekspor tersebut, menjadi kurang termanfaatkan. Alangkah baiknya apabila hasil panen yang kurang termanfaatkan tersebut dapat dimanfaatkan kembali menjadi salah satu bahan baku pembuatan etanol pengganti bahan baku yang selama ini digunakan seperti jarak, singkong dan tebu.

Kandungan terbesar dalam alga merah adalah polisakarida. Dalam perkembangannya, bahan baku dalam produksi bioetanol yang paling banyak digunakan adalah tanaman yang banyak mengandung pati atau

selulosa (Ruso, 2011). Kandungan selulosa pada *Gracilaria verrucosa* sebesar 19,7 % dan *Eucheuma cottonii* sebesar 7,1 % (Triwarsari, dkk., 2009). Kandungan selulosa yang cukup dapat dimanfaatkan sebagai salah satu penghasil bioetanol (Sari, 2009). Oleh sebab itu, pada penelitian ini digunakan berbagai jenis alga merah sebagai bahan baku penghasil bioetanol.

Dalam memproduksi bioetanol dari bahan berselulosa dengan sistem SHF (*Separated Hydrolysis and Fermentation*) dikenal perlakuan pendahuluan (delignifikasi), proses hidrolisis dan proses fermentasi etanol.

Salah satu hal yang belum menarik banyak orang dalam bidang penelitian tentang pengolahan alga merah menjadi bioetanol adalah adanya senyawa lignin yang membungkus selulosa didalam matriks alga merah. Adanya lignin dalam bahan berselulosa ini akan menghambat aktivitas enzim yang terdapat didalam mikroba dalam proses pengkonversian gula sederhana menjadi etanol, sehingga untuk meningkatkan proses hidrolisis maka perlu dilakukan proses delignifikasi untuk mendegradasi lignin dari struktur selulosa dengan menggunakan bantuan senyawa katalis. Salah satu caranya adalah dengan menggunakan katalis kimia berupa senyawa NaOH. Dari hasil penelitian Samsul Rizal (2005), penambahan konsentrasi katalis NaOH hingga 4% ternyata mampu meningkatkan kandungan selulosa dalam produksi pulp dari jerami, sehingga diperoleh hasil produksi optimum selulosa sekitar 91,4% dengan sisa lignin dalam pulp yang hanya mencapai sekitar 1,2% saja.

Proses hidrolisis merupakan proses mengubah selulosa menjadi glukosa. Proses hidrolisis biasanya dilakukan dengan metode konvensional yaitu dengan menggunakan asam. Penelitian hidrolisis selulosa dengan asam telah berkembang cukup lama. Permasalahannya adalah hidrolisis ini menggunakan bahan baku yang sangat korosif dan produknya pun dapat menghasilkan limbah yang berbahaya dan dapat menjadi inhibitor pada proses fermentasi enzimatik selanjutnya. Hidrolisis menggunakan metode enzimatik lebih efisien, prosesnya lebih ramah lingkungan dan sedikit menghasilkan limbah berbahaya (Sukumaran, 2008). Proses hidrolisis secara enzimatik pada penelitian ini digunakan jamur *Trichoderma viride* yang merupakan salah satu jamur penghasil enzim selulase yang mampu mengubah bahan berselulosa menjadi glukosa.

Proses selanjutnya setelah proses hidrolisis yaitu proses fermentasi etanol dimana glukosa yang dihasilkan pada proses hidrolisis difermentasikan menjadi bioetanol. Fermentasi etanol pada umumnya menggunakan jasa mikroba yaitu bakteri atau khamir. Berbagai jenis mikroba telah banyak digunakan dalam fermentasi untuk menghasilkan etanol. Pembuatan etanol selama ini banyak menggunakan mikroba ragi (*Saccharomyces cerevisiae*), tetapi penggunaan mikroba ini tidak tahan pada konsentrasi etanol yang tinggi (Gunasekaran dan Raj, 1999).

Penelitian terkini difokuskan pada bakteri Gram negatif *Zymomonas mobilis* yang sangat prospektif untuk memproduksi etanol skala industri karena etanol yang dihasilkan lebih banyak dan cepat dan penggunaan

biomassa lebih sedikit (Davis, dkk., 2006). *Z. mobilis* juga memiliki kelebihan dibandingkan dengan *Saccharomyces cerevisiae*, diantaranya konversi yang lebih cepat, toleran terhadap suhu dan pH rendah, serta tahan terhadap etanol konsentrasi tinggi sampai 16% (Triphetchul, dkk., 1999). Beberapa penelitian fermentasi etanol dari berbagai substrat dengan menggunakan bakteri *Z. mobilis* telah dilakukan, diantaranya dengan menggunakan substrat sukrosa oleh Hany (2009), limbah karet alam oleh Triphetchul dkk. (1999), sari buah pisang dengan *Z. Mobilis* FNCC 0056 oleh Imamah (2006), buah dan limbah nanas dengan *Z. Mobilis* ATCC 10988 (Tanaka, dkk., 1999), dan glukosa dengan *Z. mobilis* A3 (Alfena, 2008).

Pada penelitian ini melibatkan biakan jamur *Trichoderma viride* untuk mengubah selulosa alga merah menjadi glukosa (tahap hidrolisis) selanjutnya hasil hidrolisis akan difermentasi oleh bakteri *Zymomonas mobilis* dengan mengubah glukosa menjadi bioetanol. Untuk mendapatkan hasil bioetanol yang optimum, maka perlu dilakukan variasi berupa waktu dan pH untuk mendapatkan kondisi optimum pada tahap hidrolisis selulosa dan fermentasi etanol.

B. Rumusan Masalah

Dari uraian di atas, maka masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Bagaimanakah kondisi optimum hidrolisis selulosa alga merah dari jamur *Trichoderma viride* mempengaruhi produksi glukosa dan kondisi optimum fermentasi bioetanol dari bakteri *Zymomonas mobilis*?
2. Apakah bioetanol dapat diproduksi dari alga merah dengan menggunakan fermentasi dua tahap berdasarkan pada kondisi optimum fermentasi?
3. Alga merah jenis manakah yang dapat menghasilkan bioetanol yang maksimum?

C. Tujuan Penelitian

1. Menentukan kondisi optimum fermentasi dua tahap menggunakan jamur *Trichoderma viride* dan bakteri *Zymomonas mobilis* untuk produksi bioetanol.
2. Memproduksi bioetanol dengan menggunakan fermentasi dua tahap dari selulosa alga merah berdasarkan kondisi optimum fermentasi.
3. Menentukan jenis alga merah yang dapat menghasilkan bioetanol maksimum.

D. Manfaat Penelitian

1. Menggali potensi alga merah khususnya jenis *Gracilaria verrucosa* dan *Euclima cottonii* sebagai salah satu sumber bahan baku alternatif dalam pembuatan bioetanol.
2. Sebagai pengembangan ilmu pengetahuan bagi peneliti, khususnya dalam pemanfaatan alga merah sebagai bahan baku pembuatan bioetanol.
3. Memberikan salah satu solusi alternatif dalam usaha mengatasi permasalahan sumber energi terbarukan di Indonesia khususnya dan dunia pada umumnya.
4. Diperoleh data-data signifikan yang dapat dijadikan acuan awal dalam hal pemanfaatan alga merah *Gracilaria verrucosa* dan *Euclima cottonii* sebagai salah satu sumber bahan baku pembuatan bioetanol sehingga untuk kedepannya dapat dijadikan sebagai salah satu sumber energi alternatif pengganti bahan bakar fosil yang digunakan selama ini.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

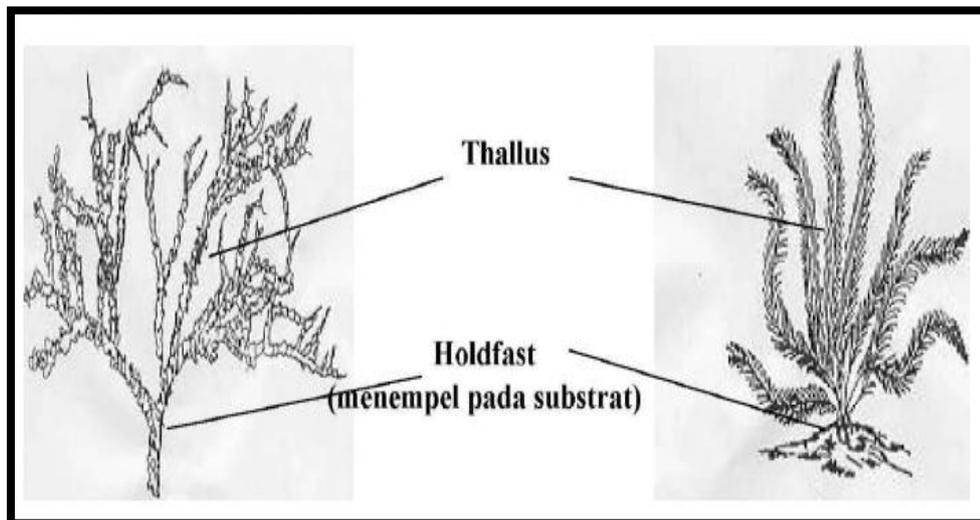
Indonesia dikenal sebagai negara kepulauan yang dua per tiga wilayahnya adalah lautan dan mempunyai garis pantai terpanjang di dunia yaitu kurang lebih 80.791,42 Km. Di lautan terdapat bermacam-macam mahluk hidup baik berupa tumbuhan maupun hewan air. Salah satu mahluk hidup yang tumbuh dan berkembang di laut adalah alga (Evan, 2006). Alga dapat hidup di air yang tenang, relatif dangkal, bersuhu panas, dan bercurah hujan yang rendah, dalam hal ini kawasan timur Indonesia merupakan daerah yang memiliki potensi alga yang terbesar (Darmajana, dkk., 2007). Alga mempunyai peranan yang sangat besar di lingkungan laut, karena merupakan kontributor penting pada rantai makanan dan sebagai penghasil oksigen utama yang dibutuhkan oleh semua penghuni laut (Gumay, dkk., 2002).

A. Tinjauan tentang Alga Laut

Alga laut diklasifikasikan menjadi makroalga dan mikroalga. Makroalga terdiri dari banyak sel dan berbentuk koloni (Castro dan Huber 2003). Alga laut termasuk alga merah (Rhodophyta), alga hijau (Chlorophyta), dan alga pirang (Phaeophyta) dan umumnya disebut sebagai rumput laut. Alga adalah biota laut yang umumnya tumbuh melekat pada substrat tertentu, tidak mempunyai akar, batang maupun daun sejati tetapi hanya menyerupai batang yang disebut *thallus*. Dalam pertumbuhannya, zat hara diserap dari media air melalui seluruh kerangka

tubuhnya yang biasa disebut “thallus”. Pertumbuhan dan percabangan thallus antara jenis yang satu dengan yang lainnya berbeda-beda. Bentuk *thallus* alga laut juga bervariasi, antara lain bulat seperti tabung, pipih, gepeng, bulat seperti kantong, lembaran dan juga ada yang berbentuk seperti helai rambut.

Alga tumbuh dengan mendekatkan dirinya pada karang, lumpur, pasir, batu, dan tumbuhan lain secara spesifik (Anggadiredja, 2006). Struktur alga laut lebih kompleks daripada alga uniselular. Perkembangbiakan alga laut melalui dua cara yaitu generatif dan vegetatif. Gambar bagian-bagian dari holdfast dan *thallus* dari alga laut dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Morfologi Alga Laut
(Sumber : Afrianto dan Liviawati, 1993)

Pada umumnya klasifikasi alga ditentukan dari pigmennya. Selain mengandung klorofil, alga laut juga mengandung zat warna lainnya seperti hijau biru, pirang, hijau dan merah. Alga laut dikatakan bersifat *autotrop*,

yaitu dapat hidup sendiri tanpa harus tergantung pada makhluk lainnya. Para ahli menggolongkan alga dalam 5 kelas berdasarkan pigmentasinya, yaitu :

1. Cyanophyceae (alga hijau biru)
2. Chlorophyceae (alga hijau)
3. Charophyceae (alga hijau)
4. Phaeophyceae (alga coklat)
5. Rhodophyceae (alga merah)

Menurut Harvey (2009), secara kimia alga laut terdiri dari air (27,8%), protein (5,4%), karbohidrat (33,3%), lemak (8,60%), serta serat kasar (3,0%), dan abu (22,25%).

B. Tinjauan tentang Alga Merah (Rhodophyceae)

Salah satu jenis alga laut adalah alga merah (Rhodophyceae) yang telah banyak dimanfaatkan berasal dari marga *Eucheuma*, *Gelidium*, *Gracilaria*, *Hypnea*, dan *Sargassum*, sedangkan jenis lainnya seperti *Caulerpa* dan *Dictosphaeria* masih dimanfaatkan dalam skala kecil untuk konsumsi lokal (Atmadja dkk., 1996). Alga merah mempunyai nilai ekonomis yang tinggi. Karena itu, hampir semua masyarakat di pesisir pantai di Sulawesi Selatan membudidayakannya. Jenis-jenis alga merah yang telah dibudidayakan adalah genus *Eucheuma* dan *Gracilaria*. Alga merah ini banyak tersebar di daerah Takalar, Jeneponto, Bantaeng, Sinjai, dan Pangkajene Kepulauan (Anggadiredja, 2008).

Alga merah memiliki pigmen fikoeiretrin (pigmen yang berwarna merah cerah dan memancarkan warna oranye) dan fikosianin (berwarna biru yang memancarkan warna merah tua). Alga merah mempunyai sifat

adaptik kromatik, yaitu mempunyai penyesuaian antara pigmen dengan berbagai kualitas pencahayaan sehingga pada kenyataan di alam, alga merah mempunyai variasi warna lain seperti pirang, violet, merah tua, merah muda, coklat, kuning dan hijau (Atmadja, 2007). Pada penelitian alga merah yang digunakan sebagai sampel adalah spesies *G. verrucosa* dan *E. cottonii*.

C. Morfologi Alga Merah (Sampel)

1. *Gracilaria verrucosa*

Alga merah *Gracilaria verrucosa* adalah salah satu komoditas unggulan perikanan Provinsi Sulawesi Selatan yang mempunyai nilai ekonomis penting dan dibudidayakan di tambak dan perairan pantai (Akmal, dkk., 2007).

Ciri morfologisnya adalah *thallus* yang menyerupai silinder, licin, berwarna coklat atau kuning hijau, percabangan tidak beraturan memusat di bagian pangkal dan bercabang lateral memanjang menyerupai rambut dengan ukuran panjang berkisar 15-30 cm (Aslan, 1998).



Gambar 2. *Gracilaria verrucosa*

Habitatnya tumbuh melekat pada karang di terumbu karang berarus sedang, dan dapat tumbuh di sekitar muara sungai. Di alam *G. verrucosa* hidup dengan cara menempel pada substrat dasar perairan atau benda lainnya pada daerah pasang surut. Bahkan di daerah Sulawesi pada musim-musim tertentu alga jenis ini banyak terdampar di pantai karena hempasan gelombang dalam jumlah yang sangat besar. *G. verrucosa* tersebar luas disepanjang pantai daerah tropis (Anggadiredja, 2006).

Alga merah ini dikenal oleh masyarakat dengan nama yang berbeda-beda tergantung pada daerah tumbuhnya, seperti bulung rambut (Bali) dan sango-sango (Sulawesi) (Anggadiredja, 2008).

Sinulingga dan Darmanti, 2006 mengklasifikasikan *Gracilaria verrucosa* dalam taksonomi sebagai berikut:

Kingdom : Plantae
Superdivisi : Spermatophyta
Divisio : Rhodophyta
Kelas : Rhodophyceae
Bangsa : Gigartinales
Suku : Gracilariaceae
Marga : *Gracilaria*
Jenis : *Gracilaria verrucosa*

Tumbuh tersebar hampir diseluruh perairan Indonesia. Di Indonesia umumnya yang dibudidayakan di tambak adalah jenis *G. verrucosa* dan *G. gigas*. Jenis ini berkembang di perairan Sulawesi Selatan (Jeneponto,

Takalar, Sinjai, Bulukumba, Wajo, Palopo, Bone, Maros) (Kadi dan Atmaja, 1988).

Alga merah *G. verrucosa* merupakan salah satu sumberdaya hayati laut yang bernilai ekonomis penting dan disebut “agarofit” karena menghasilkan agar-agar. Agar-agar digunakan dalam industri makanan, farmasi dan industri kosmetika (Akmal, 2008).

2. *Eucheuma cottoni*

Eucheuma merupakan salah satu kelas Rhodophyceae yang banyak dibudidayakan di daerah Takalar seperti *Eucheuma cottoni*. Alga merah jenis ini memiliki thallus yang licin dan silindris, berwarna hijau, hijau kuning, abu-abu, dan merah. Tumbuh melekat pada karang dengan alat perekat seperti cakram (Atmadja, dkk., 1996). Alga jenis ini dikenal sebagai penghasil karagenan, sehingga masuk ke dalam kelompok *carrageenophytes*. Karagenan yang dihasilkan merupakan senyawa polisakarida yang dapat diekstrak dengan air panas yang memiliki kemampuan untuk membentuk gel.

Dawes, 1981 menjelaskan sistematika klasifikasi *Eucheuma cottoni* adalah sebagai berikut:

Kingdom : Plantae
Superdivisi : Spermatophyta
Divisio : Rhodophyta
Kelas : Rhodophyceae
Bangsa : Gigartinales
Suku : Solieriscaeae

Marga : *Eucheuma*

Jenis : *Eucheuma cottoni* (*Kappaphycus alvarezii*)



Gambar 3. *Eucheuma cottoni*
(Sumber: Anggadiredja, 2008)

Alga merah ini dikenal oleh masyarakat dengan nama *E. cottonii*. Ciri morfologisnya adalah memiliki memiliki *thailli* yang berbetuk gepeng dengan cabang berselang tidak teratur (Aslan, 1998). Percabangan *thailli* berujung runcing atau tumpul, ditumbuhi nodulus (tonjolan-tonjolan), dan duri lunak/tumpul untuk melindungi gametangianya. Habitatnya memerlukan sinar matahari untuk proses fotosintesis. Oleh karena itu, alga merah jenis ini hanya mungkin hidup pada lapisan fotik, yaitu kedalaman sejauh sinar matahari masih mampu mencapainya. Faktor yang sangat berpengaruh pada pertumbuhan jenis ini yaitu cukup arus dengan salinitas (kadar garam) yang stabil, yaitu berkisar 28-34 per mil. Oleh karenanya, alga merah ini akan hidup baik bila jauh dari muara sungai (Anggadiredja, 2008).

E. cottoni menghasilkan metabolit primer berupa senyawa hidrokoloid yang disebut karaginan. Karaginan adalah senyawa polisakarida yang tersusun dari sejumlah unit galaktosa dengan ikatan α -(1,3)-D-galaktosa dan β -(1,4)-3,6 anhidrogalaktosa secara bergantian. Karaginan larut dalam air panas (70 °C), air dingin, susu, dan larutan gula sehingga digunakan sebagai pengental atau penstabil dalam berbagai produk minuman dan makanan. Di bidang industri, karaginan dimanfaatkan untuk kosmetik, tekstil, cat, obat, dan pakan ternak (Poncomulyo, 2006). *E. cottoni* juga mengandung senyawa kalsium (1,13%), fosfor (1,12%), asam amino, vitamin A (59,393 IU/kg), vitamin E (219,96 IU/kg), dan vitamin D (1,9 mg/100 g) (Sunarto, 2003).

D. Tinjauan tentang Enzim

Enzim adalah protein yang tersusun oleh untaian asam amino yang panjang, dimana antara yang satu dengan yang lainnya dihubungkan dengan ikatan peptida (Wirahadikusuma dan Madayanti, 1990). Enzim dapat diproduksi oleh mikroba atau bahan lainnya seperti hewan dan tumbuhan. Enzim juga dapat diisolasi dalam bentuk murni (Winarno, 1986).

Enzim merupakan protein yang merupakan biokatalisator yang akan meningkatkan kecepatan reaksi kimia secara spesifik dimana reaksi tanpa enzim akan berlangsung lambat (Lehninger, 1995). Percepatan reaksi terjadi karena enzim menurunkan energi pengaktifan yang dengan sendirinya akan mempermudah terjadinya reaksi. Enzim mengikat molekul

substrat membentuk kompleks enzim substrat yang bersifat sementara dan lalu terurai membentuk enzim bebas dan produknya (Lehninger, 1995).



E = enzim S = substrat P = Produk

Enzim memiliki keunggulan sifat, antara lain mempunyai aktivitas yang tinggi, efektif, spesifik dan ramah lingkungan (Lidya dan Djenar, 2000), sedangkan menurut (Saktiwansyah, 2001), enzim memiliki sifat yang khas, yaitu sangat aktif walaupun konsentrasinya amat rendah, sangat selektif dan bekerja pada kondisi yang ramah (*mild*). Hal inilah yang menyebabkan reaksi yang dikatalisis secara enzimatik menjadi lebih efisien dibandingkan dengan reaksi yang dikatalisis oleh katalis kimia (August, 2000).

Keunggulan sifat enzim yang lain yaitu memiliki sifat yang spesifik yang didefinisikan sebagai kemampuan suatu enzim untuk mendiskriminasikan substratnya berdasarkan perbedaan afinitas substrat-substrat untuk mencapai sisi aktif enzim (August, 2000). Sifat spesifik ini dapat dimanfaatkan untuk tujuan reaksi atau jenis produk yang diharapkan. Sifat ini sangat menguntungkan karena tidak akan dijumpai reaksi-reaksi samping, sehingga lebih ramah lingkungan.

1. Penggolongan Enzim

Pada tahun 1956, *The International Union of Biochemistry* membagi enzim dalam enam golongan utama berdasarkan tipe reaksi yang dikatalisis oleh enzim yang bersangkutan yaitu (Wirahadikusumah dan Madayanti, 1990):

- a. Oksido reduktase, yaitu enzim yang bertindak sebagai katalis dalam reaksi oksidasi atau reduksi suatu bahan.
- b. Transferase, yaitu enzim yang ikut serta dalam reaksi pemindahan suatu radikal atau gugus.
- c. Hidrolase, yaitu enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis suatu substrat atau pemecahan substrat dengan batuan molekul air.
- d. Liase, yaitu enzim yang aktif dalam pemecahan ikatan C-C dan ikatan C-O tanpa menggunakan molekul air.
- e. Isomerase, yaitu enzim yang mengkatalisis reaksi perubahan konfigurasi molekul dengan cara pengaturan kembali atom-atom dalam molekul substrat sehingga dihasilkan molekul baru yang merupakan isomer dari substrat yang bersangkutan.
- f. Ligase, yaitu enzim yang mengkatalisis penggabungan dua molekul disertai dengan hidrolisis ikatan berenergi tinggi.

2. Enzim Selulase

Selulase adalah suatu enzim yang termasuk dalam kelompok hidrolase yang mengkatalisis reaksi pemutusan ikatan β -1,4-glukopiranosil dari senyawa selulosa, selobiosa dan turunan selulosa lainnya. Selulase tidak dimiliki oleh manusia, karena itu manusia tidak dapat menguraikan selulosa. Selulase merupakan nama umum atau trivial bagi enzim selulase

sedang nama sistematiknya adalah β -1,4-glukan-4-glukahidrolase (EC.3.2.1.4) (Wirahadikusumah dan Madayanti, 1990).

Selulase sesungguhnya merupakan suatu kompleks enzim yang terdiri atas beberapa enzim yang bekerja, bertahap atau bersama-sama menguraikan selulosa menjadi glukosa. Ada empat kelompok enzim utama yang menyusun enzim selulase berdasarkan spesifitas substrat masing-masing yaitu (Fengel dan Wegener, 1995):

a. Endoglukanase (β -1,4-D-glukan-4-glukanohidrolase) (EC.3.2.1.4)

Enzim ini menghidrolisis ikatan glikosidik secara acak. Enzim ini tidak menyerang selobiosa tapi menghidrolisis selodekstrin, suatu selulosa yang sudah dilunakkan dengan asam fosfat dan selulosa yang sudah disubstitusi seperti CMC.

b. β -1,4-D-glukan selobiohidrolase (EC.3.2.1.91)

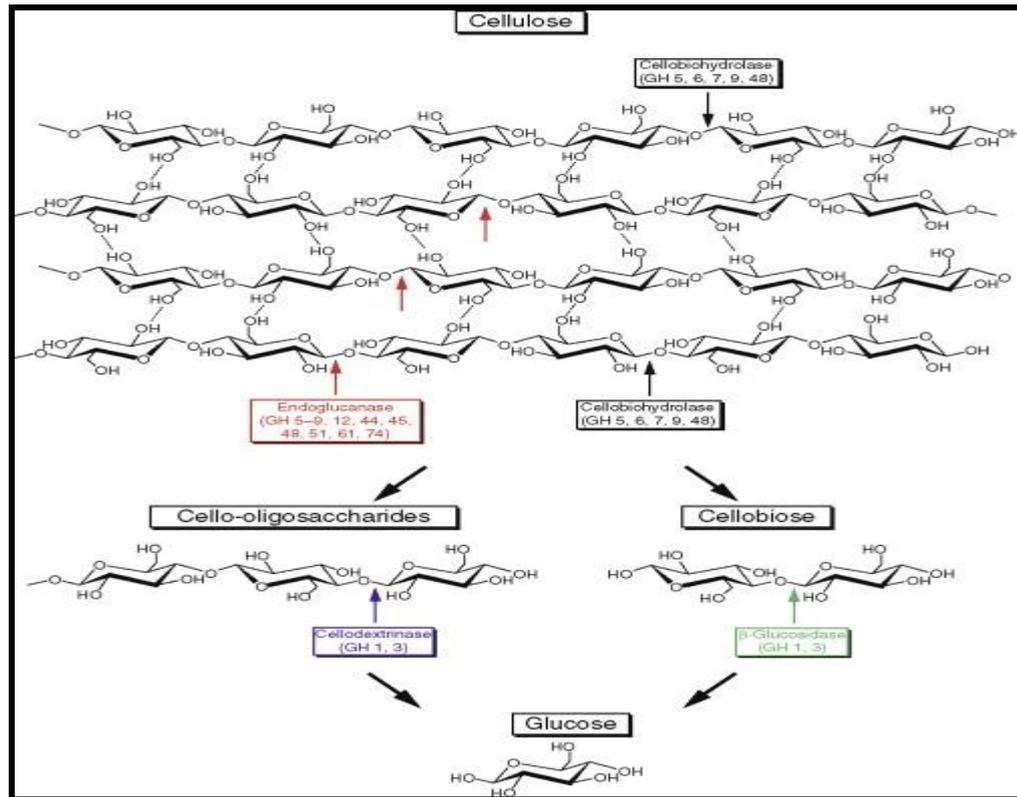
Enzim yang menyerang ujung rantai selulosa non pereduksi dan menghasilkan selobiosa. Enzim ini dapat menyerang selodekstrin tapi tidak dapat menghidrolisis selobiosa.

c. β -1,4-glukan glukohidrolase (EC.3.2.1.74)

Enzim ini menyerang ujung rantai selulosa non pereduksi dan menghasilkan glukosa. Enzim ini menyerang selulosa yang telah dilunakkan oleh asam fosfat, selo-oligosakarida dan CMC.

d. β -1,4-D-glukosidase (EC.3.2.1.21)

Enzim ini menghidrolisis selobiosa dan rantai pendek selooligosakarida dan menghasilkan glukosa. Enzim ini tidak menyerang selulosa atau selodekstrin.



Gambar 4. Aktivitas enzim selulase
(Sumber: Yeoman, dkk., 2010)

Pada Gambar 4 menjelaskan tentang aktivitas enzimatis dari selulosa. Enzim endoglukanase (ditandai dengan panah merah) secara acak membelah ikatan β -1,4 glikosidik pada struktur selulosa. Enzim selobiohidrolase (juga dikenal sebagai eksoglukanase) menyerang ujung rantai selulosa pereduksi dan non pereduksi menghasilkan selobiosa. Selooligosakarida sebagai hasil dari kegiatan ini diubah menjadi glukosa oleh enzim selodekstrin, sedangkan selobiosa merupakan hasil dari aksi selobiohidrolase diubah menjadi glukosa oleh enzim β -glukosidase (Yeoman, dkk., 2010).

Mikroorganisme yang digunakan untuk mendapat enzim selulase adalah *Myrothecium verrucaria*, *Penicillium pusillum*, dan *Trichoderma*

viride. Penggunaan enzim selulase dalam industri pangan masih sangat terbatas (Winarno, 1983).

Sistem selulosa dari tingkat genus jamur *Trichoderma* telah secara ekstensif dipelajari dan menunjukkan sejumlah produksi endo- β -glukanase dan ekso- β -glukanase tetapi jumlah yang rendah dalam β -glukosidase. Berlawanan dengan *Aspergillus* yang menghasilkan sejumlah besar endo- β - glukanase dan β - glukosidase tetapi sedikit pada ekso- β - glukanase (Paul, 2010).

E. Selulosa dan Lignin

1. Lignoselulosa

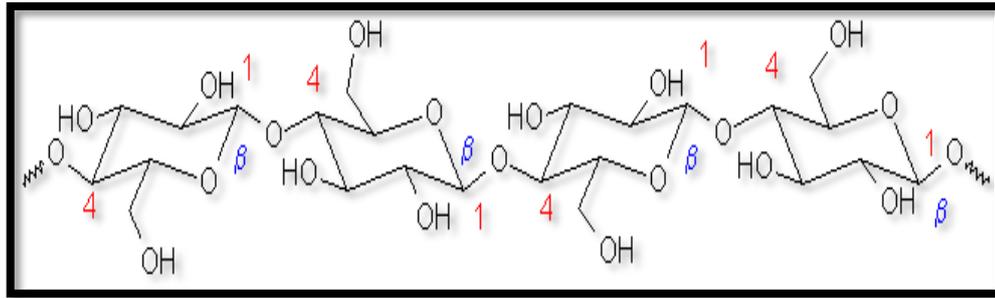
Bahan lignoselulosa merupakan biomassa yang berasal dari tanaman dengan komponen utama lignin, selulosa, dan hemiselulosa (Fujita dan Harada, 1991). Ketersediaannya yang cukup melimpah, terutama sebagai limbah pertanian, perkebunan, dan kehutanan, menjadikan bahan ini berpotensi sebagai salah satu sumber energi melalui proses konversi, baik proses fisika, kimia, maupun biologis. Lignoselulosa mengandung tiga komponen penyusun utama, yaitu selulosa (30-50%-berat), hemiselulosa (15-35%-berat), dan lignin (13-30%-berat).

Selulosa adalah senyawa kerangka yang menyusun 40% - 50% bagian kayu dalam bentuk selulosa mikrofibril, di mana hemiselulosa adalah senyawa matriks yang berada di antara mikrofibril-mikrofibril selulosa. Saat ini biomassa lignoselulosa sedang dilirik untuk bahan baku pembuatan bahan bakar masa depan yaitu bioetanol.

2. Selulosa

Selulosa merupakan struktur dasar sel-sel tanaman, oleh karena itu merupakan bahan alam yang paling penting yang dibuat oleh organisme hidup. Di dalam biosfer 27×10^{10} ton karbon terikat dalam organisme hidup, lebih 99% adalah tanaman. Dapat diperkirakan bahwa sekitar 90% karbon tanaman terikat dalam selulosa, yang berarti bahwa selulosa total di dunia nabati berjumlah sekitar $26,5 \times 10^{10}$ ton (Fengel dan Wegener, 1995). Selulosa adalah polimer linear yang terdiri dari 300 sampai 150000 unit D-glukosa saling berhubungan melalui ikatan glikosidik β -1,4 dan berat molekul diperkirakan mencapai 500.000 (Harjo, dkk, 1989; Kennedy and Philips, 1985).

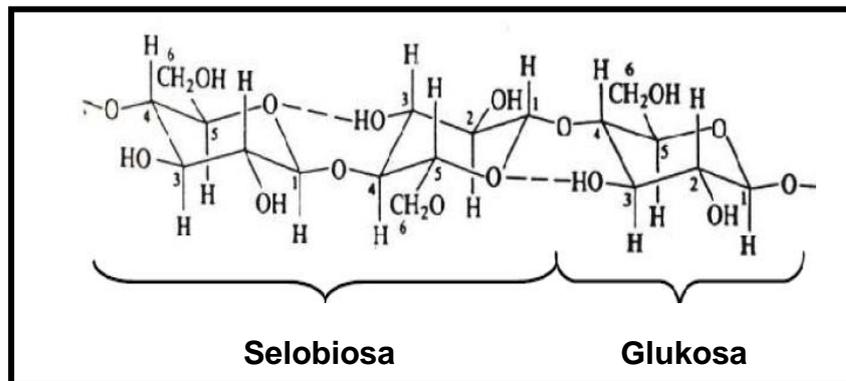
Selulosa hampir tidak pernah ditemui dalam keadaan murni di alam, melainkan selalu berikatan dengan bahan lain yaitu lignin dan hemiselulosa. Serat selulosa alami terdapat di dalam dinding sel tanaman dan material vegetatif lainnya. Selulosa murni mengandung 44,4% C; 6,2% H dan 49,3% O. Berat molekul selulosa rata-rata sekitar 400.000 mikrofibril selulosaterdiri atas bagian amorf (15%) dan bagian berkrystal (85%). Rumus molekul selulosa adalah $(C_6H_{10}O_5)_n$. Selulosa terdapat dalam tumbuhan sebagai bahan pembentuk dinding sel dan serat tumbuhan. Molekul selulosa merupakan mikrofibril dari glukosa yang terikat satu dengan lainnya membentuk rantai polimer yang sangat panjang.



Gambar 5. Struktur Selulosa
(Sumber: Cole dan Fort, 2007)

Secara alamiah molekul selulosa tersusun dalam bentuk “fibril” yang terdiri atas beberapa molekul selulosa paralel yang dihubungkan oleh ikatan hidrogen, fibril-fibril tersebut membentuk struktur kristalin pada kayu. Struktur kristalin tersebut dibungkus oleh lignin yang berperan sebagai pelindung selulosa terhadap serangan enzim pemecah selulosa (Fengel dan Wegener, 1995).

Struktur berkristal dan adanya lignin serta hemiselulosa disekeliling selulosa merupakan hambatan utama untuk menghidrolisis selulosa (Sjostrom, 1995 dalam Soeprijanto, 2007). Pada proses hidrolisis yang sempurna akan menghasilkan glukosa sedangkan proses hidrolisis sebagian akan menghasilkan disakarida selobiosa.



Gambar 6. Struktur Selulosa Yang Merupakan Polimer Dari Glukosa

Dalam tubuh manusia, selulosa tidak dapat dicernakan karena manusia tidak mempunyai enzim selulase yang dapat menguraikan selulosa (Poedjiadi, 1994).

Bahan berselulosa yang digunakan pada penelitian ini adalah kelas alga merah (Rhodophyceae) jenis *G. verrucosa* dan *E. cotonii*.

Tabel 1. Kandungan selulosa beberapa jenis alga

Jenis Alga	Selulosa (%)	Galaktan (%)	Karbohidrat (%)	Protein (%)	Lipid (%)
<i>Gelidium amansii</i>	16,8	55,2	72,0	21,1	6,9
<i>Gracilaria</i>	19,7	44,4	74,1	11	14,9
<i>E. cotonii</i>	7,1	43,3	50,5	4,9	44,6
<i>Codium fragile</i>	10,9	47,8	58,7	34,7	6,6
<i>Undaria Pinattinda</i>	2,4	38,7	41,1	24,2	34,7
<i>Laminaria japonica</i>	6,7	40,0	46,7	12,2	38,1

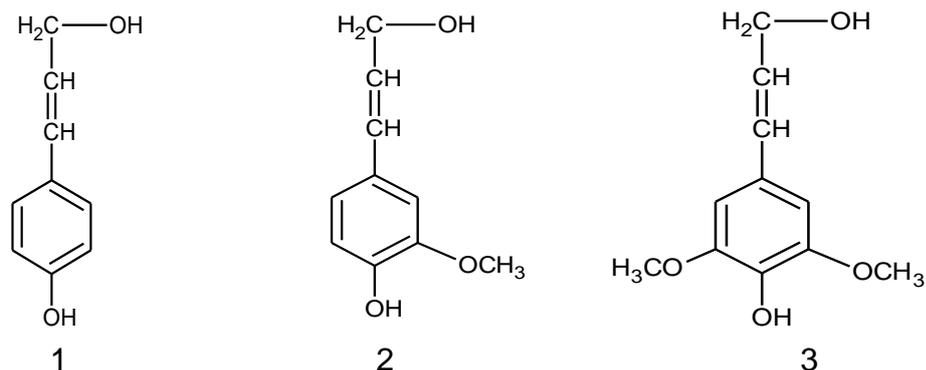
Sumber: Kim, dkk., 2008

Pada Tabel 1 diatas dapat diketahui besarnya kandungan selulosa dalam *G. verrucosa* sebesar 19,7 % sedangkan kandungan selulosa *E. cotonii* sebesar 7,1 %. Ikatan glikosidik β -1,4 pada serat selulosa dapat dihidrolisis menjadi monomer glukosa. Selulosa dapat dikonversi menjadi produk-produk bernilai ekonomi yang lebih tinggi seperti glukosa, etanol, dan pakan ternak dengan cara menghidrolisis selulosa dengan bantuan enzim selulase sebagai biokatalisator atau dengan cara hidrolisis secara asam atau basa (Kim, dkk., 2007).

3. Lignin

Lignin atau zat kayu adalah salah satu zat komponen penyusun tumbuhan. Komposisi bahan penyusun ini berbeda-beda bergantung jenisnya. Lignin merupakan zat organik polimer yang banyak dan yang penting dalam dunia tumbuhan. Lignin tersusun atas jaringan polimer fenolik yang berfungsi merekatkan serat selulosa dan hemiselulosa sehingga menjadi sangat kuat (Sun dan Cheng, 2002).

Lignin mempunyai struktur molekul yang sangat berbeda dengan polisakarida karena terdiri atas sistem aromatik yang tersusun atas unit-unit fenil propana (Fengel dan Wegener, 1984) yaitu p-kumaril alkohol, koniferil alkohol, dan sinapil alkohol yang merupakan senyawa induk dari lignin (Gambar 7) (Davin dan Lewis, 2005). Gugus aromatik ditemukan pada lignin, yang saling dihubungkan dengan rantai alifatik, yang terdiri dari 2-3 karbon. Proses pirolisis lignin menghasilkan senyawa kimia aromatis berupa fenol, terutama kresol.



Gambar 7. Unit monomer lignin
(Sumber: Davin dan Lewis, 2005)

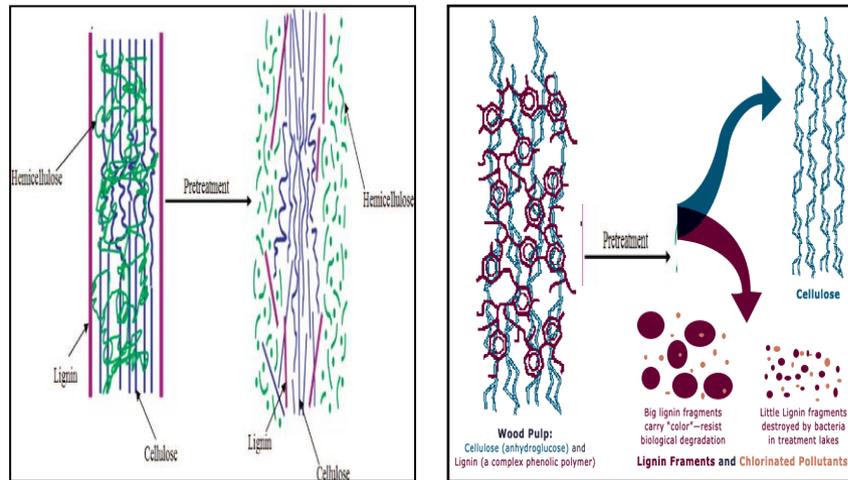
(1) p-kumaril alkohol (unit p-hidroksifenil), (2) koniferil alkohol (unit guaiasil), (3) sinapil alkohol (unit sirigil)

Selain itu lignin merupakan tandon karbon utama di dalam biosfer, kalau dihitung kira-kira 30% dari 1.4×10^{12} kg karbon disimpan di dalam lignin tanaman setiap tahunnya. Karena lignin merupakan salah satu komponen utama sel tanaman, karena itu lignin juga memiliki dampak langsung terhadap karakteristik tanaman. Misalnya saja, lignin sangat berpengaruh pada proses pembuatan pulp dan kertas. Struktur kimia lignin mengalami perubahan di bawah kondisi suhu yang tinggi dan suasana asam/basa. Pada reaksi dengan temperatur tinggi mengakibatkan lignin terpecah menjadi partikel yang lebih kecil dan terlepas dari selulosa (Tahezadeh dan Karimi, 2008).

Kandungan lignin dalam bahan berlignoselulosa merupakan salah satu penghambat utama biokonversi lignoselulosa menjadi etanol. Lignin dalam hal ini melindungi selulosa, sehingga selulosa sulit untuk dihidrolisis menjadi glukosa. Proses *pretreatment* (delignifikasi) saat ini banyak dilakukan untuk memecah pelindung ini sehingga selulosa menjadi mudah dihidrolisis tanpa banyak kehilangan polisakaridanya. Dari hasil penelitian Samsul Rizal (2005), penambahan konsentrasi katalis NaOH hingga 4% ternyata mampu meningkatkan kandungan selulosa dalam produksi pulp dari jerami, sehingga diperoleh hasil produksi optimum selulosa sekitar 91,4% dengan sisa lignin dalam pulp yang hanya mencapai sekitar 1,2% saja.

Alga merah merupakan sumber selulosa yang dapat diolah menjadi bahan baku bioetanol. Namun keberadaan lignin dalam biomassa menyebabkan enzim sukar berinteraksi dengan selulosa pada proses

hidrolisis. Agar proses hidrolisis berlangsung baik maka perlu dilakukan proses delignifikasi. Delignifikasi dilakukan dengan menggunakan NaOH 2-8% (Jalaluddin dan Risal, 2003).



Gambar 8. Proses Delignifikasi pada Lignoselulosa
(Sumber : Kumar dkk., 2009)

F. Jamur *Trichoderma viride*

Trichoderma viride merupakan salah satu jamur yang mampu mendegradasi serat dan merupakan jamur yang potensial memproduksi enzim selulase dalam jumlah relatif besar guna mendegradasi selulosa secara luas (Mandels, 1982).

Klasifikasi jamur *T. viride* menurut Alexopoulos dan Mims (1979) adalah sebagai berikut ini :

- Kingdom : Fungi
- Divisio : Amastigomycota
- Subdivisio : Deuteromycotina
- Classis : Deuteromycetes
- Ordo : Moniliales

Family : Moniliaceae

Genus : *Trichoderma*

Species : *Trichoderma viride*

Kultur jamur *T. viride* pada skala laboratorium berwarna hijau, hal ini disebabkan oleh adanya kumpulan konidia pada ujung hifa jamur tersebut. Susunan sel jamur *T. viride* bersel banyak berderet membentuk benang halus yang disebut dengan hifa. Hifa pada jamur ini berbentuk pipih, bersekat, dan bercabang-cabang membentuk anyaman yang disebut miselium. Miseliumnya dapat tumbuh dengan cepat dan dapat memproduksi berjuta-juta spora, karena sifatnya inilah *T. viride* dikatakan memiliki daya kompetitif yang tinggi (Alexopoulos dan Mims, 1979). Dalam pertumbuhannya, bagian permukaan akan terlihat putih bersih, dan bermiselium kusam. Setelah dewasa, miselium memiliki warna hijau kekuningan (Larry, 1977). Konidianya berwarna hijau cerah bergerombol membentuk menjadi seperti bola dan berkas-berkas hifa terlihat menonjol jelas diantara konidia spora (Frazier dan Weathoff, 1981).



Gambar 9. Jamur *Trichoderma viridee*

T. viride berkembang biak secara aseksual dengan membentuk spora diujung *fialida* (cabang dari hifa). Reproduksi *T. viride* adalah dengan menggunakan cara mitosis. Pertumbuhan miselia dan pigmen juga dapat dilihat pada media *Potato Dextrose Agar* (Widyastuti, 2007). Pada spesies saprofit, jamur tumbuh pada kisaran suhu optimal 22-30°C. Sedangkan menurut Enari (1983), suhu optimal untuk pertumbuhan jamur ini adalah 32-35°C dan pH optimal sekitar 5.0.

Menurut Judoamidjojo, dkk. (1989), banyak jamur yang bersifat selulolitik tetapi tidak banyak yang menghasilkan enzim selulase yang cukup banyak untuk dapat dipakai secara langsung dalam skala besar. Jamur selulolitik yang cukup baik memproduksi enzim selulolitik adalah *T. viride* (Pelczar dan Chan, 1986).

T. viride merupakan salah satu jenis jamur yang bersifat selulolitik karena dapat menghancurkan selulosa tingkat tinggi dan memiliki kemampuan mensintesis beberapa faktor esensial untuk melarutkan bagian selulosa yang terikat kuat dengan ikatan hidrogen (Wood, 1985). Selulosa yang terikat tersebut diuraikan menjadi glukosa dan gula sederhana dengan menggunakan enzim selulase yang dihasilkan oleh jamur tersebut (Mandels, 1982). Keuntungan jamur tersebut sebagai sumber selulase adalah menghasilkan selulase lengkap dengan semua komponen-komponen yang dibutuhkan untuk hidrolisis total selulosa kristal dan protein selulosa yang dihasilkan cukup tinggi (Volk, 2004).

Tabel 2. Komponen enzim di dalam kompleks enzim selulase

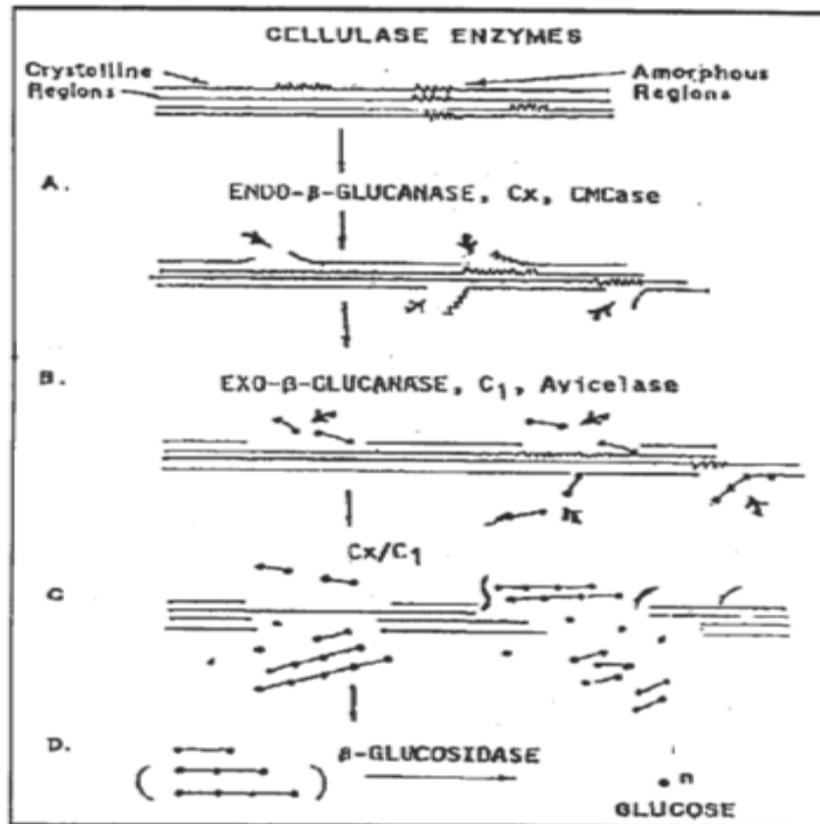
Nama	Sinonim	Reaksi
Endo- β -glukanase	Faktor C _x ; CMCase; 1,4- β - D-glukan glukanohidrolase	Endohidrolisis ikatan 1,4- β -D-glukosidik, membentuk glukosa dan selo-oligosakarida.
Ekso- β -glukanase	Faktor C ₁ ; avicelase; 1,4- β - D-glukan selobiohidrolase	Eksohidrolisis ikatan 1,4- β - D-glukosidik membentuk selobiosa dari selulosa atau 1,4- β - glukooligosakarida.
β -glukosidase	Selobiase; amygdalase	Hidrolisis residu β -D- glukosa terminal dalam β - glukan.

Sumber: Belitz dkk, 2008

T. viride menghasilkan tiga macam enzim selulase, yaitu selobiohidrolase (C₁) yang akan menyerang bagian kristal dari selulosa, endoglukanase (C_x) yang menyerang bagian amorf dari struktur selulosa, dan β -glukosidase yang menguraikan selobiosa menjadi glukosa (Judoamidjojo dkk., 1989). Gula hasil hidrolisis oleh jamur *T. viride*, selanjutnya diolah lebih lanjut untuk menghasilkan etanol (Yulneriwarni, 2008).

Tahapan-tahapan hidrolisis selulosa oleh enzim selulase dapat dilihat pada Gambar 10. Faktor C₁ sangat diinhibisi oleh produknya, sehingga selobiase diperlukan agar hidrolisis selulosa dapat berlangsung. Selobiase juga diinhibisi oleh produknya, glukosa, sehingga hidrolisis

sempurna selulosa hanya dapat dilakukan jika tersedia selobiase dalam jumlah besar atau glukosa yang terbentuk segera dipisahkan.



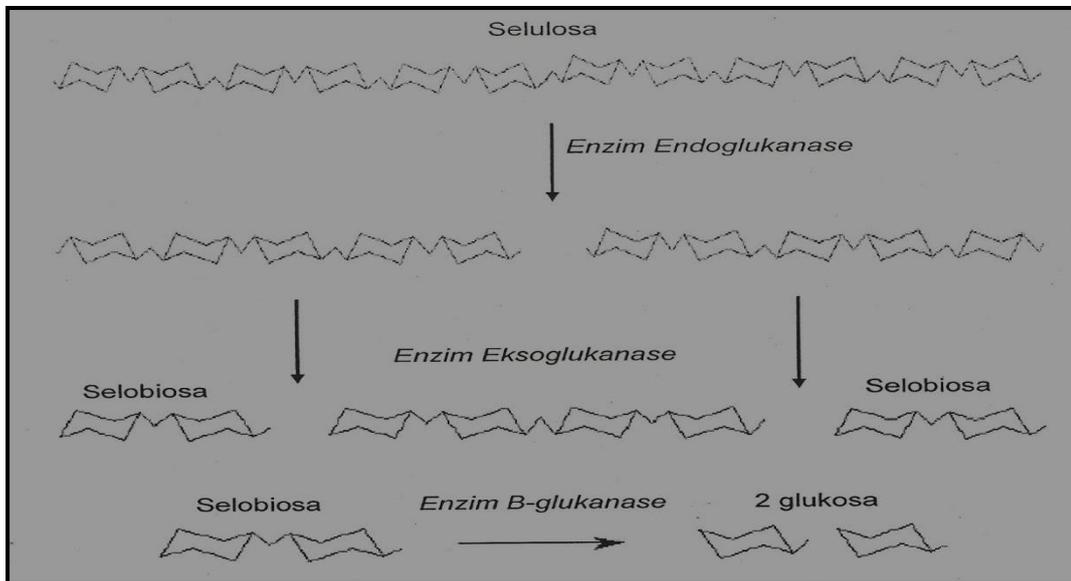
Gambar 10. Tahapan-tahapan hidrolisis selulosa
(Sumber: Ghori, 2001)

T. viride banyak digunakan dalam penelitian karena memiliki beberapa keuntungan, diantaranya adalah (Kotaric, dkk., 1980) :

1. Selulase yang diperoleh mengandung semua komponen-komponen enzim yang diperlukan untuk proses hidrolisis seluruh kristal selulosa.
2. Protein selulase dihasilkan dalam kualitas sangat tinggi.

Pada penelitian ini digunakan jamur jenis *T. viride* yang dikenal sebagai jamur selulolitik yang nantinya dapat menggunakan selulosa dari alga merah sebagai substratnya. Glukosa yang diperoleh merupakan hasil hidrolisis secara enzimatik selulosa dengan menggunakan jamur *T. viride*.

Adapun mekanisme pembentukan selulosa menjadi glukosa melalui proses hidrolisis secara enzimatik dapat dilihat pada Gambar 11 berikut.



Gambar 11. Proses hidrolisis selulosa oleh enzim selulase
(Sumber: Shaw, 2006)

G. Bakteri *Zymomonas mobilis*

Bakteri *Zymomonas mobilis* tumbuh secara anaerob dan mempunyai toleransi terhadap suhu tinggi, kemampuan untuk mencapai konversi yang lebih tinggi, tahan terhadap kadar etanol yang tinggi jika dibandingkan dengan *Saccharomyces cerevisiae* (Gunasekaran, 1999). pH efektif untuk pertumbuhan *Z. mobilis* adalah 4-6,5 dan *Z. mobilis* dapat menguraikan glukosa, fruktosa untuk memproduksi etanol (Mushlihah, dkk., 2011). Keunggulan bakteri tersebut adalah mempunyai morfologi yang lebih besar dengan gerakan yang lebih pelan dan lebih tahan terhadap kondisi asam dibanding kondisi awal.

Adapun klasifikasi dari bakteri ini yaitu :

Kerajaan : Bakteri

Filum : *Proteobacteria*

Kelas : *Alpha Proteobacteria*

Urutan : *Sphingomonadales*

Keluarga : *Sphingomonadaceae*

Genus : *Zymomonas*

Spesies : *Zymomonas mobilis*

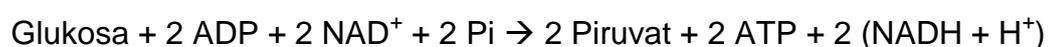
Mekanisme pembentukan bioetanol dari bakteri *Z. mobilis* melalui jalur Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) atau lebih dikenal dengan jalur glikolisis. Hasil dari tahap glikolisis adalah memecah glukosa menjadi dua molekul asam piruvat. Proses yang terjadi dalam jalur glikolisis dapat dilihat pada Gambar 12 (Didu, 2010).

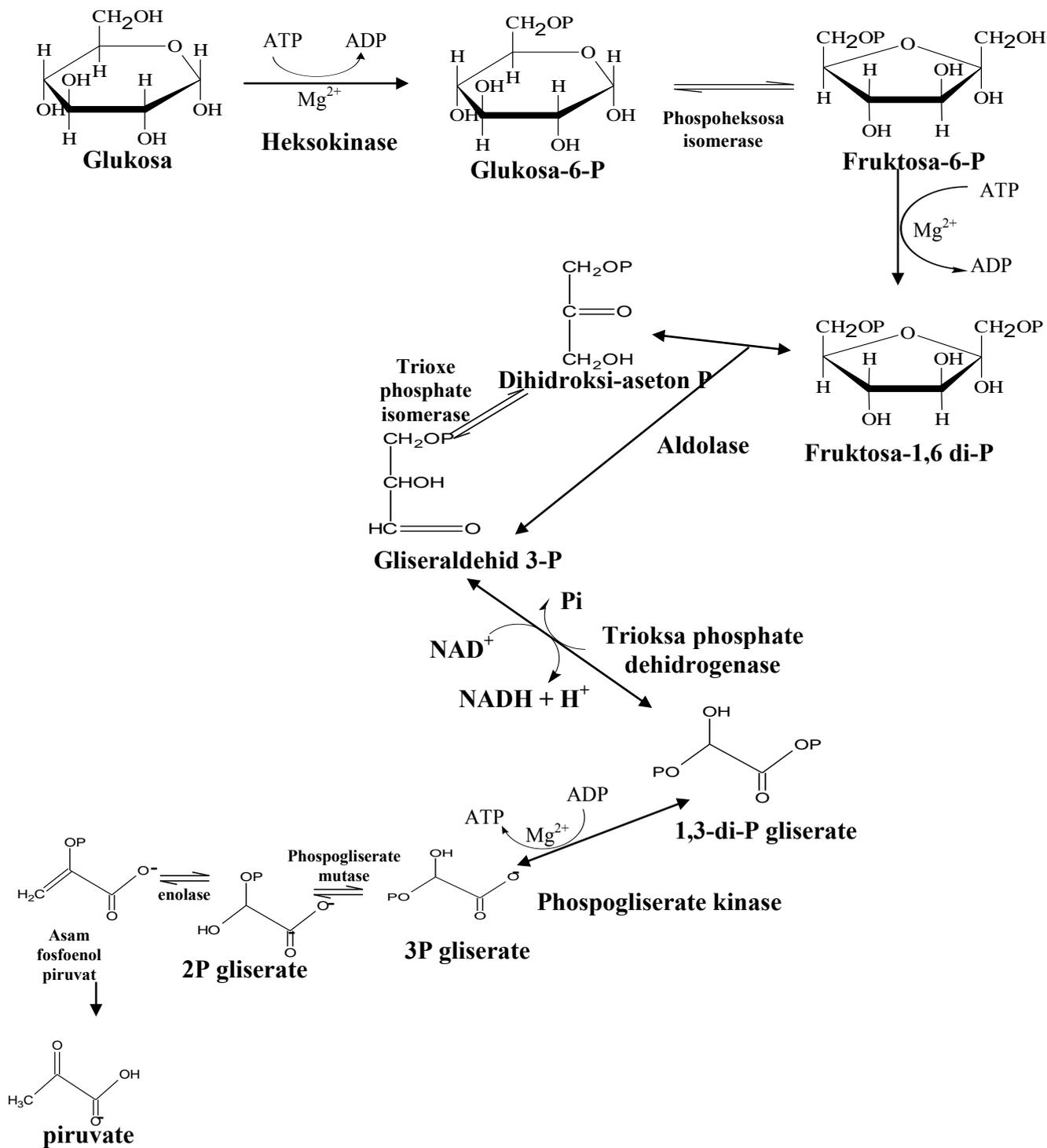
1. Glikolisis diawali dengan reaksi pembentukan senyawa glukosa-6-fosfat dari glukosa. Reaksi tersebut merupakan reaksi yang membutuhkan energi pemutusan ikatan fosfat dari ATP. Reaksi ini dikatalisis oleh enzim heksokinase atau glukokinase. Pada tahap ini, menggunakan satu mol ATP dan menghasilkan satu mol ADP.
2. Reaksi kedua adalah pembentukan isomer fruktosa-6-fosfat dari glukosa-6-fosfat. Reaksi ini dikatalisis oleh enzim fosfoheksosa isomerase.
3. Fruktosa-6-fosfat selanjutnya dikonversi menjadi fruktosa-1,6-difosfat oleh enzim fruktosafosfokinase. Reaksi ini berjalan spontan dan

merupakan rate limiting step pada proses glikolisis. Pada tahap inipun satu molekul ATP digunakan dan satu molekul ADP dihasilkan.

4. Tahap selanjutnya adalah reaksi pemecahan fruktosa-1,6-difosfat oleh enzim aldolase menjadi dihidroksiasetonfosfat (DHAP) dan gliseraldehid-3-fosfat (GA-3P) oleh enzim triosefosfat isomerase.
5. Gliseraldehid-3-fosfat (GA-3P) dioksidasi dengan penambahan fosfat inorganis (Pi) menjadi 1,3-difosfogliserat (1,3-dP-GA) oleh enzim gliseraldehid-3-fosfat-dehidrogenase.
6. 1,3-difosfogliserat melepaskan satu grup fosfat untuk membentuk ATP dan ADP kemudian dikonversi menjadi 3-fosfogliserat (3P-GA) oleh enzim phosphogliserate kinase kemudian dikonversi menjadi 2-fosfogliserat (2P-GA) oleh enzim fosfogliserat mutase.
7. 2-fosfogliserat (2P-GA) selanjutnya didehidrasi menjadi fosfoenol piruvat oleh enzim enolase.
8. Tahap terakhir dari jalur glikolisis oleh defosforelasi fosfoenol piruvat (PEP) menjadi piruvat oleh enzim piruvat kinase; pada tahap ini dibentuk sebuah molekul ATP.

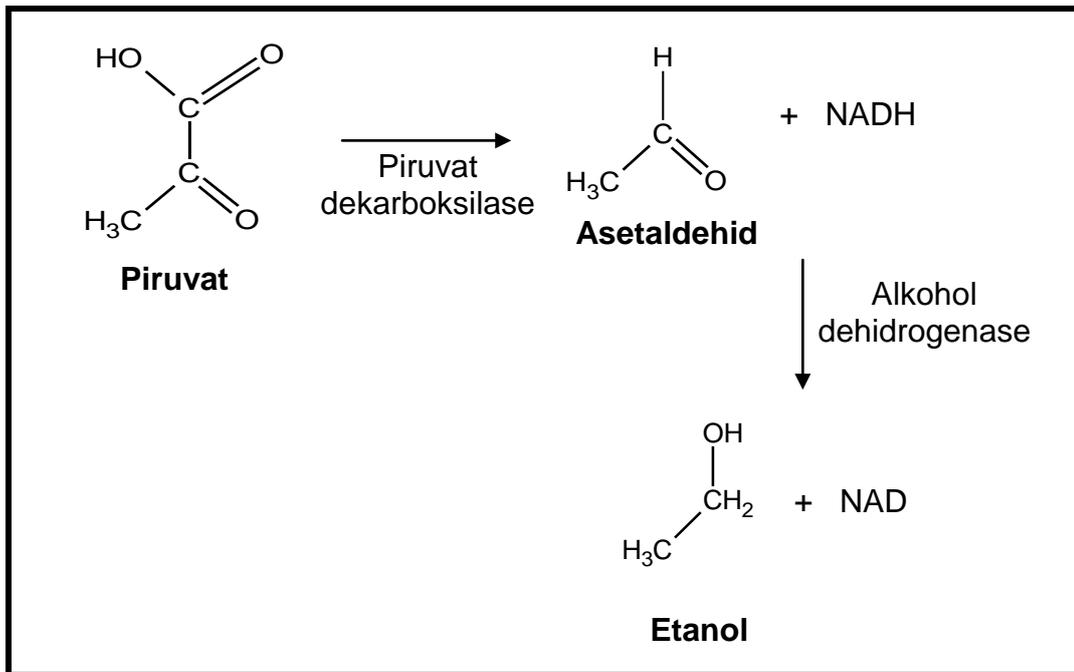
Setelah penambahan DHAP dan GA-3P selama proses glikolisis berlangsung sebanyak dua kali. Piruvat yang merupakan produk akhir dari tahap glikolisis ini merupakan kunci pada proses metabolisme. Secara keseluruhan reaksi yang terjadi pada proses glikolisis adalah sebagai berikut (Didu, 2010):





Gambar 12. Tahap glikolisis melalui jalur Embden-Mayerhof-Parnas (EMP)

Setelah melalui tahapan glikolisis, piruvat yang terbentuk kemudian diubah menjadi asetaldehid dan CO₂ oleh enzim piruvat dekarboksilase, setelah itu enzim alkohol dehidrogenase mengubah asetaldehid menjadi etanol (Didu, 2010).



Gambar 13. Proses pembentukan etanol dari piruvat
(Sumber: Didu, 2010)

H. Produksi Bioetanol

Etanol (disebut juga etil-alkohol atau alkohol saja), adalah yang paling sering digunakan dalam kehidupan sehari-hari. Karena sifatnya yang tidak beracun banyak dipakai sebagai pelarut dalam dunia dan industri makanan dan minuman. Etanol tidak berwarna dan tidak berasa tapi memiliki bau yang khas. Bahan ini dapat memabukkan jika diminum. Rumus molekul etanol adalah C₂H₅OH atau rumus empiris C₂H₆O.

Etanol murni (absolut) dihasilkan pertama kali pada tahun 1796 oleh Johan Tobias Lowitz yaitu dengan cara menyaring alkohol hasil distilasi melalui arang. Lavoisier menggambarkan bahwa etanol adalah senyawa yang terbentuk dari karbon, hidrogen dan oksigen. Pada tahun 1808 Saussure dapat menentukan rumus kimia etanol. Limapuluh tahun kemudian (1858), Couper menerbitkan rumus bangun etanol. Dengan demikian etanol adalah salah satu senyawa kimia yang pertama kali ditemukan rumus bangunnya. Pada tahun 1815, Gay-Lussac memformulasikan konversi glukosa menjadi etanol dan karbondioksida.

Bioetanol merupakan produk fermentasi yang dapat dibuat dari substrat yang mengandung karbohidrat (gula, pati atau selulosa). Rumus molekul $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ atau $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$; bobot molekul 46,07 g/mol. Bioetanol dapat dibuat dengan fermentasi dari bahan yang mengandung gula seperti minyak nira, legen, tetes (molase). Alkohol dapat juga didapat dari tumbuhan yang mengandung pati (karbohidrat) seperti jagung, sorghum, kentang, dan singkong. Etanol yang berbahan dasar tumbuhan biasa disebut bioetanol.

Dalam perkembangannya produksi bioetanol yang paling banyak digunakan adalah metode fermentasi yang dilanjutkan dengan destilasi. Mikroorganisme yang digunakan untuk fermentasi alkohol bisa dari bakteri seperti *Clostridium thermocellum*, *Clostridium acetobutylicum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Leuconoctoc mesenteroides*, *Sarcina ventriculi*, *Zymomonas mobilis*, dll. atau jamur (fungi) seperti *Aspergillus oryzae*, *Endomyces lactis*, *Kloeckera sp.*, *Kluyreromyces fragilis*, *Mucor sp.*, *Neurospora*

crassa, *Rhizopus sp.*, *Saccharomyces beticus*, *S. cerevisiae*, *S. ellipsoideus*, *S. oviformis*, *S. saki*, *Torula sp.*, dll.

Penggunaan Bioetanol

- a. Untuk sintesis eter, iodoform, kloroform, kloral dan sebagainya.
- b. Larutan 70 % dipakai sebagai antiseptik karena mengkoagulasikan albumina dan menghentikan pertumbuhan dari organisme-organisme yang mengakibatkan pembusukan. Konsentrasi lebih tinggi tidak efektif karena tidak mematikan spora.
- c. Dipakai sebagai pengawet contoh-contoh biologik
- d. Sebagai sumber energi untuk bahan bakar motor.

Pengembangan bioetanol dari biomassa yang banyak mengandung lignoselulosa merupakan salah satu energi alternatif yang cukup berpotensi untuk diterapkan di Indonesia. Bioetanol dapat dimanfaatkan sebagai bahan bakar substitusi bensin dan sebagai bahan campuran premium. Etanol dapat dicampur secara langsung ke dalam bensin dengan campuran 10% etanol dan 90 % bensin yang biasa disebut gasohol. Sebagai bahan bakar, bioetanol memiliki beberapa kelebihan, seperti ramah lingkungan karena bersih dari emisi bahan pencemar dan dapat diperbaharui (Sardjoko 1991).

Pada penelitian ini produksi bioetanol menggunakan fermentasi dua tahap (*Separation Hydrolysis and Fermentation*) dimana tahap hidrolisis dan fermentasi dilakukan secara bertahap yaitu melibatkan proses hidrolisis secara enzimatis oleh jamur *T. viride* dan proses fermentasi dengan bantuan bakteri *Z. mobilis*. Setelah melalui dua tahap

tersebut selanjutnya didestilasi pada suhu 70 °C untuk mendapatkan etanol hasil dari fermentasi.

1. Proses Hidrolisis (Sakarifikasi)

Pada tahap sakarifikasi, selulosa diubah menjadi selobiosa dan selanjutnya menjadi gula-gula sederhana seperti glukosa. Hidrolisis selulosa dapat dilakukan menggunakan larutan asam atau secara enzimatik, masing-masing dengan kelebihan dan kekurangannya. Proses hidrolisis secara enzimatik biasanya berlangsung pada kondisi yang ringan (pH sekitar 4,80 dan suhu 45-50 °C) dan tidak menimbulkan masalah korosi. Kelemahannya adalah harga enzim cukup mahal. Komponen biaya enzim dapat mencapai 53-65% dari biaya bahan kimia, dan biaya bahan kimia sekitar 30% dari biaya total.

2. Proses Fermentasi

Fermentasi adalah perubahan struktur kimia dari bahan-bahan organik dengan memanfaatkan agen-agen biologis terutama enzim sebagai biokatalis. Untuk menghasilkan produk fermentasi dibutuhkan kondisi fermentasi yang berbeda-beda dan jenis mikroba yang bervariasi juga karakteristiknya. Oleh karena itu, diperlukan keadaan lingkungan, substrat (media), serta perlakuan (*treatment*) yang sesuai sehingga produk yang dihasilkan optimal.

Proses fermentasi pembentukan bioetanol membutuhkan bantuan mikroba. Untuk bahan yang mengandung gula dalam bentuk polisakarida atau oligosakarida, terlebih dahulu harus diubah dulu dalam

bentuk yang lebih sederhana yaitu monosakarida (fruktosa atau glukosa). Mikroba tersebut akan menghasilkan enzim yang akan merubah gula-gula sederhana ($C_6H_{12}O_6$) kemudian menjadi bioetanol (C_2H_5OH) dan karbondioksida (CO_2).

Mikroba-mikroba dalam fermentasi meliputi ragi, jamur, dan bakteri. Karena organisme tersebut tidak memiliki klorofil sendiri, mereka tidak dapat melakukan fotosintesis, sehingga mereka harus mendapatkan makanannya dari bahan-bahan organik. Tiap jenis mikroba memiliki ciri morfologi, bentuk dan ukuran, serta perkembangbiakan yang berbeda, namun mereka memiliki persamaan, yaitu dapat menghasilkan enzim. Menurut produk yang paling banyak dihasilkan, dikenal beberapa macam fermentasi, yaitu fermentasi etanol, fermentasi asam sitrat, fermentasi asam propinoat, fermentasi asam butirat, dan fermentasi asam asetat.

Selama fermentasi berlangsung, gula dalam bentuk glukosa dirombak menjadi etanol dan berbagai substansi lainnya seperti gliserol dan asam laktat yang disebut sebagai produk fermentasi. Perombakan tersebut berlangsung bersamaan dengan pembentukan asam, khususnya asam asetat yang semakin meningkat jumlahnya dari asam-asam volatile lainnya (Winton, 1958).

Secara umum proses fermentasi alkohol terjadi dari pemecahan karbohidrat melalui suatu degradasi dari monosakarida yaitu glukosa menjadi asam piruvat. Asam piruvat ini selanjutnya akan dirombak menjadi etanol dan juga CO_2 yang biasanya berlangsung melalui proses

oksidasi reduksi dengan menggunakan DNPH + H⁺ sebagai donor elektron (Winarno dan Fardiaz, 1990).

Proses fermentasi akan berlangsung dengan baik apabila mengikuti kaidah-kaidah seperti dibawah ini:

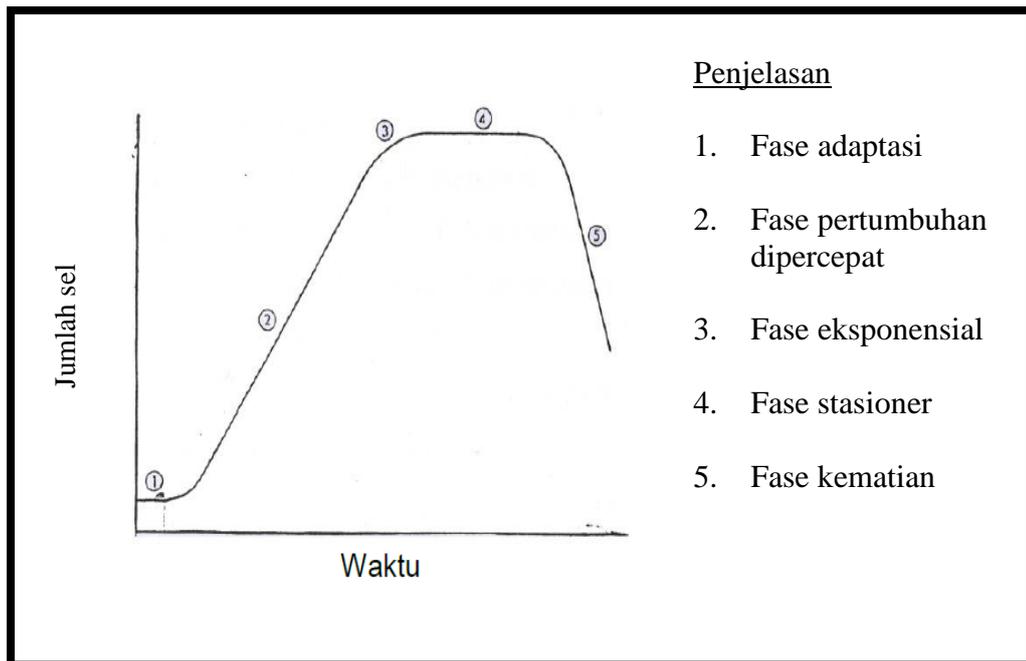
1. Mikroorganisme dapat membentuk produk yang diinginkan.
2. Organisme ini harus berpropagasi secara cepat dan dapat mempertahankan keseragaman biologis, sehingga memberikan yield yang dapat diprediksi.
3. Fermentasi dapat berlangsung dengan cepat.
4. Produk mudah diambil dan dimurnikan.

Faktor utama yang mempengaruhi pertumbuhan dan perilaku mikroba dapat digolongkan dalam faktor intraseluler dan ekstraseluler. Faktor intraseluler meliputi struktur, mekanisme, metabolisme, dan genetika. Sedangkan faktor ekstraseluler meliputi kondisi lingkungan seperti pH, suhu, dan tekanan. Proses pertumbuhan mikroba merupakan proses yang memiliki batas tertentu.

Faktor-faktor yang dapat menyebabkan berhentinya mikroba antara lain:

1. Penyusutan konsentrasi nutrisi yang dibutuhkan dalam pertumbuhan mikroba.
2. Produk akhir metabolisme yang menghambat pertumbuhan mikroba.

Pertumbuhan kultur mikroba umumnya dapat digambarkan dalam suatu kurva pertumbuhan pada Gambar 14.



Gambar 14. Kurva pertumbuhan bakteri

Pertumbuhan mikroba dapat terbagi dalam beberapa tahap yaitu:

1. Fase adaptasi

Jika mikroba dipindahkan ke dalam suatu medium, mula-mula akan mengalami fase adaptasi untuk menyesuaikan dengan kondisi lingkungan disekitarnya. Lamanya fase adaptasi ini dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya:

a. Medium dan lingkungan pertumbuhan

Jika medium dan lingkungan pertumbuhan sama seperti medium dan lingkungan sebelumnya, mungkin tidak diperlukan waktu adaptasi. Tetapi jika nutrisi yang tersedia dan kondisi lingkungan yang baru berbeda dengan sebelumnya, diperlukan waktu penyesuaian untuk mensintesis enzim-enzim.

b. Jumlah inokulum

Jumlah awal sel yang semakin tinggi akan mempercepat fase adaptasi. Fase adaptasi mungkin akan berjalan lambat karena beberapa sebab:

- Kultur dipindahkan dari medium yang kaya nutrisi ke medium yang kandungan nutrisinya terbatas,
- Mutan yang baru dipindahkan dari fase statis ke medium baru dengan komposisi sama seperti sebelumnya.

2. Fase pertumbuhan dipercepat

Fase pertumbuhan dipercepat adalah fase dimana mikroba sudah dapat menggunakan nutrisi dalam medium fermentasinya. Pada fase ini mikroba banyak tumbuh dan membelah diri sehingga jumlahnya meningkat dengan cepat. Pada fase ini kecepatan pertumbuhan sangat dipengaruhi oleh medium tempat tumbuhnya seperti pH dan kandungan nutrisi, juga kondisi lingkungan termasuk suhu dan kelembaban udara. Pada fase ini mikroba membutuhkan energi lebih banyak daripada fase lainnya.

3. Fase eksponensial

Fase eksponensial adalah akhir fase pertumbuhan dipercepat. Pada fase ini laju pertumbuhan tetap pada laju pertumbuhan maksimum (μ_{maks}). Nilai μ_{maks} untuk setiap mikroba juga tertentu pada masing-masing substrat.

4. Fase stasioner

Pada fase ini jumlah populasi sel tetap karena karena jumlah sel yang tumbuh sama dengan jumlah sel yang mati dikarenakan:

- Nutrient di dalam medium sudah berkurang
- Adanya hasil metabolisme yang mungkin beracun atau menghambat pertumbuhan mikroba.

Ukuran sel pada fase ini menjadi lebih kecil karena sel tetap membelah meskipun zat-zat nutrisi sudah habis. Karena kekurangan zat nutrisi, sel kemungkinan mempunyai komposisi yang berbeda dengan sel yang tumbuh pada fase eksponensial. Pada fase ini sel-sel lebih tahan terhadap keadaan ekstrim seperti panas, dingin, radiasi, dan bahan-bahan kimia.

5. Fase kematian

Pada fase ini sebagian populasi mikroba mulai mengalami kematian karena beberapa sebab yaitu:

1. Nutrien di dalam medium sudah habis
2. Energi cadangan di dalam sel habis

Jadi nutrisi sudah benar-benar tidak dapat lagi mencukupi kebutuhan mikroorganisme. Keadaan ini diperparah oleh akumulasi produk metabolit primer dan sekunder yang tidak dipanen sehingga terus menghambat pertumbuhan sel mikroorganisme. Selain itu umur sel juga sudah tua, sehingga pertahanan sel terhadap lingkungan yang berbeda dari kondisi biasanya juga berkurang.

3. Proses Destilasi

Destilasi atau penyulingan adalah suatu metode pemisahan bahan kimia berdasarkan perbedaan kecepatan atau kemudahan menguap (volatilitas) bahan. Dalam penyulingan, campuran zat dididihkan sehingga menguap, dan uap ini kemudian didinginkan kembali ke dalam bentuk cairan. Zat yang memiliki titik didih lebih rendah akan menguap lebih dulu. Metode ini merupakan termasuk unit operasi kimia jenis perpindahan massa. Penerapan proses ini didasarkan pada teori bahwa pada suatu larutan, masing-masing komponen akan menguap pada titik didihnya.

I. Kerangka Pikir

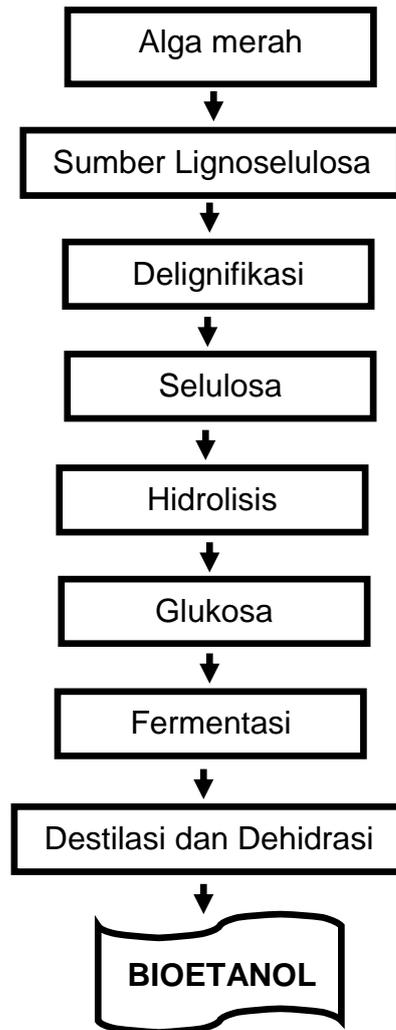
Biomassa berselulosa merupakan sumber daya alam yang melimpah dan murah yang memiliki potensi mendukung produksi komersial industri bahan bakar seperti bioetanol (Wyman, 1999). Indonesia merupakan salah satu negara maritim terbesar di dunia dengan garis pantai mencapai 81.000 km yang berpotensi dalam mengembangkan alga merah, salah satu biomassa berselulosa yang memiliki nilai ekonomis yang tinggi. Sulawesi Selatan merupakan salah satu penghasil alga merah terbesar di Indonesia. Alga merah yang potensial dan banyak dijumpai di provinsi Sulawesi Selatan adalah jenis *Gracilaria* dan *Eucheuma*. Kandungan selulosa pada *G. verrucosa* sebesar 19,7 % dan *E. cottonii* sebesar 7,1 %. Kandungan selulosa yang cukup dapat dimanfaatkan sebagai salah satu penghasil bioetanol (Sari, 2009). Selulosa dapat dihidrolisis menjadi glukosa dengan menggunakan asam atau enzim. Selanjutnya glukosa yang dihasilkan dapat difermentasi

menjadi bioetanol. Untuk itulah pada penelitian ini digunakan berbagai jenis alga merah sebagai sumber selulosa untuk menghasilkan bioetanol.

Pembuatan bioetanol dari biomassa lignoselulosa lebih sulit daripada biomassa yang berpati. Proses yang harus dilewati juga lebih panjang. Salah satu tantangannya adalah bahwa secara alami lignoselulosa sulit untuk dihidrolisis. Selulosa secara alami diikat oleh hemiselulosa dan dilindungi oleh lignin, ini yang menyebabkan selulosa sulit untuk dihidrolisis. Menghilangkan atau merusak pelindung lignin ini tidak mudah dan menjadi tantangan dalam pengembangan produksi bioetanol dari biomassa berlignoselulosa. Untuk itu, diperlukan cara atau perlakuan pendahuluan untuk menghilangkan lignin yang disebut dengan proses delignifikasi dengan menggunakan natrium hidroksida (NaOH).

Kemudian cara selanjutnya adalah menghidrolisis selulosa yang terdiri dari rantai panjang glukosa yang membentuk rantai dengan pola ikatan tertentu. Untuk memotong ikatan ini bukanlah hal yang mudah. Banyak cara yang telah dikembangkan untuk melakukan hidrolisis yaitu dengan hidrolisis asam dan hidrolisis secara enzimatik. Hidrolisis selulosa dengan asam sudah berkembang cukup lama. Permasalahannya adalah hidrolisis ini menggunakan bahan baku yang sangat korosif dan produknya pun dapat menghasilkan limbah yang berbahaya dan dapat menjadi inhibitor pada proses fermentasi enzimatik selanjutnya. Hidrolisis menggunakan metode enzimatik lebih efisien, prosesnya lebih ramah lingkungan dan sedikit menghasilkan limbah berbahaya. Selanjutnya proses fermentasi etanol dengan menggunakan bakteri *Z. mobilis* yang

dapat mengubah glukosa hasil proses hidrolisis menjadi etanol. Pembuatan bioetanol dengan metode SHF (*Separated Hydrolysis and Fermentation*) ini lebih mudah dikontrol setiap tahapannya sehingga menghasilkan bioetanol yang maksimal.



Gambar 15. Skema Kerangka Pikir Penelitian