

TESIS

**PRODUKSI BIOSUGAR DARI RUMPUT LAUT *Kappaphycus
alvarezii* MELALUI METODE HIDROLISIS MENGGUNAKAN
Trichoderma harzianum DAN FERMENTASI
MENGGUNAKAN *Saccharomyopsis fibuligera***



ST ZAENAB

L012181008

**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU PERIKANAN
FAKULTAS ILMU KELAUTAN DAN PERIKANAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2020**

**PRODUKSI BIOSUGAR DARI RUMPUT LAUT *Kappaphycusalvarezii*
MELALUI METODE HIDROLISIS MENGGUNAKAN
Trichoderma harzianum DAN FERMENTASI MENGGUNAKAN
*Saccharomycopsis fibuligera***

TESIS

Sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar Master

Program Studi
Ilmu Perikanan

Disusun dan diajukan oleh:

**ST. ZAENAB
L012181008**

Kepada

**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU PERIKANAN
FAKULTAS ILMU KELAUTAN DAN PERIKANAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2020**

TESIS

PRODUKSI BIOSUGAR DARI RUMPUT LAUT *Kappaphycus alvarezii*
MELALUI METODE HIDROLISIS MENGGUNAKAN *Trichoderma harzianum*
DAN FERMENTASI MENGGUNAKAN *Saccharomycopsis fibuligera*

Disusun dan diajukan oleh:

ST. ZAENAB

Nomor Pokok L012181008

Telah dipertahankan di depan panitia ujian Tesis
Pada tanggal, 29 Juli 2020
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui

Komisi Penasihat,



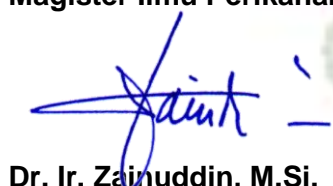
Kasmiami, S.TP. MP., Ph.D.
Ketua



Dr. Sulfahri, S.Si., M.Si
Anggota

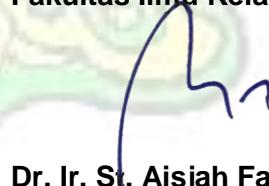
Mengetahui,

Ketua Program Studi
Magister Ilmu Perikanan



Dr. Ir. Zainuddin, M.Si.
NIP. 19640721 199103 1 001

Dekan
Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan



Dr. Ir. St. Aisjah Farhum, M.Si.
NIP. 19690605 199303 2 002

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : St. Zaenab

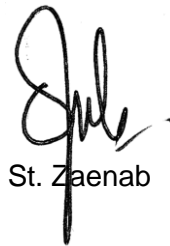
Nomor Pokok : L012181008

Program Studi : Ilmu Perikanan

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

Makassar, 29 Juli 2020

Yang menyatakan



St. Zaenab

KATA PENGANTAR

Assalamualaikum Warahmatullahi Wabarakatuh.

Alhamdulillahirabbil Alamin. Segala puji dan syukur kepada Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, berkah dan karunia Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis dengan judul **Produksi Biosugar Dari Rumput Laut *Kappaphycus alvarezii* Melalui Metode Hidrolisis Menggunakan *Trichoderma harzianum* Dan Fermentasi Menggunakan *Saccharomycopsis fibuligera*** sebagai syarat untuk memperoleh gelar magister pada program studi Ilmu Perikanan, Pascasarjana Unhas.

Awal hingga akhir menjalani kegiatan penelitian hingga penyusunan tesis tentu tak luput dari peranan berbagai pihak yang telah memberikan banyak bantuan, masukan, arahan maupun bimbingan yang sangat berharga sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini. Oleh karena itu, penulis ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar- besarnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada:

1. Kasmiasi, S.TP, MP., PhD selaku Ketua Komisi Penasihat dan Dr. Sulfahri, S.Si., M.Si selaku anggota komisi penasihat atas bantuan dan bimbingan yang telah diberikan, mulai dari penyusunan proposal hingga selesainya penulisan tesis ini.
2. Tim penilai/ penguji Dr. Nursinah Amir, S.Pi, M.P, Dr. Syahrul, S.Pi, M.Si, dan Dr. Ir. Sriwulan, MP yang telah banyak memberikan masukan dan saran untuk penyusunan tesis ini.
3. Dr. Ir. Zainuddin, M.Si. selaku ketua program studi Magister Ilmu Perikanan yang telah memberikan arahan.

4. Kedua orang tua penulis Ayahanda Muh. Muzakkir dan Ibunda Indo Lala dan kedua adik penulis Abdul Karim, ST dan Muh. Ridha Azhari M atas segala dukungan moril maupun materil selama ini kepada penulis.
5. Teman-teman Program Studi Ilmu Perikanan angkatan 201801, dan seluruh pihak lain yang telah banyak membantu penulis.
6. Huyyirnah, S.P, M.P sebagai laboran yang banyak membantu penulis selama penelitian di laboratorium.
7. Lembaga Pengelola Dana Pendidikan (LPDP) yang telah menanggung segala pembiayaan studi penulis selama menempuh pendidikan magister.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa tesis ini masih jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, penulis memohon maaf bila ada kesalahan dalam penulisan tesis ini. Kritik dan saran penulis hargai demi perbaikan penulisan dimasa yang akan datang. Besar harapan penulis, semoga tulisan ini dapat bermanfaat dan bernilai positif bagi semua pihak yang membutuhkan. Terima Kasih.

Penulis,

St. Zaenab

ABSTRAK

St. Zaenab. L012181008. "Produksi Biosugar Dari Rumput Laut *Kappaphycus alvarezii* Melalui Metode Hidrolisis Menggunakan *Trichoderma harzianum* Dan Fermentasi Menggunakan *Saccharomycopsis fibuligera*" dibimbing oleh **Kasmiati** sebagai Pembimbing Utama dan **Sulfahri** sebagai Pembimbing Anggota.

Kappaphycus alvarezii adalah salah satu sumber daya alam yang mengandung karbohidrat tinggi, dan berpotensi sebagai bahan baku alternatif untuk industri gula. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menganalisis kondisi optimal kombinasi kapang *Trichoderma harzianum* dan khamir *Saccharomycopsis fibuligera* dalam mendegradasi polisakarida dari *K. alvarezii* menjadi gula. Rumput laut diperoleh dari BPBAP Takalar, Sulawesi Selatan, Indonesia. *T. harzianum* dan *S. fibuligera* diaktivasi sebanyak tiga kali pada suhu 30°C dalam substrat rumput laut 2%. Metode yang digunakan adalah kombinasi hidrolisis dan fermentasi untuk menghasilkan biosugar dievaluasi dalam berbagai konsentrasi inokulum (5%, 10%, 15% dan 20%) dan waktu (0 jam, 24 jam, 48 jam, dan 72 jam). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa *K. alvarezii* mengandung 55,58% karbohidrat yang didominasi oleh pati 35,83% dan selulosa 12,21%. Berdasarkan hasil, hidrolisis dengan konsentrasi inokulum 20% selama 24 jam menunjukkan total produksi gula tertinggi. Dilanjutkan dengan fermentasi dengan *S. fibuligera* yang menghasilkan glukosa dan galaktosa masing-masing 1,74 g/L dan 9,93 g/L. Sebagai kesimpulan, penelitian ini menunjukkan kemampuan *T. harzianum* dan *S. fibuligera* untuk mengkonversi karbohidrat dari *K.alvarezii* untuk menghasilkan biosugar melalui metode kombinasi hidrolisis dan fermentasi. Hasil dari penelitian ini menunjukkan potensi rumput laut *K. alvarezii* sebagai bahan baku alternatif untuk produksi gula dengan persentase 20% gula total, 8,7% glukosa dan 49,65% galaktosa. Dengan demikian, *K. alvarezii* berpotensi sebagai gula alternatif yang rendah kalori.

Kata kunci : biosugar, *Kappaphycus alvarezii*, *Trichoderma harzianum*, hidrolisis, *Saccharomycopsis fibuligera*, fermentasi

ABSTRACT

St. Zaenab. L012181008. "Biosugar Production From Seaweed *Kappaphycus alvarezii* by Hydrolysis Method Using *Trichoderma harzianum* and Fermentation Using *Saccharomycopsis fibuligera*" supervised by **Kasmianti** as the Principle supervisor and **Sulfahri** as the co-supervisor.

Kappaphycus alvarezii is one of the natural resources that contains high carbohydrates, and has the potential as an alternative raw material for the sugar production. This study aims to determine the optimal conditions of the combination of *Trichoderma harzianum* and *Saccharomycopsis fibuligera* in degrading polysaccharides from *K. alvarezii* to sugar. Seaweed was collected from the Takalar Sea in South Sulawesi, Indonesia. *T. harzianum* and *S. fibuligera* were activated at 30°C three times in 2% seaweed substrate. The efficiency of hydrolysis and fermentation to produce biosugar was evaluated in various concentrations of inoculum (5%, 10%, 15% and 20%) and hydrolysis time (0 hours, 24 hours, 48 hours, and 72 hours). The results was showed that *K. alvarezii* contains 55.58% carbohydrates dominated by starch 35.83% and cellulose 12.21%. Hydrolysis with an inoculum concentration of 20% for 24 hours showed the highest total sugar production. Followed by fermentation with *S. fibuligera* which produce glucose and galactose each 1.74 g/L and 9.93 g/L. In conclusion, this study demonstrates the ability of *T. harzianum* and *S. fibuligera* to convert carbohydrates from *K. alvarezii* to produce biosugar through a combination of hydrolysis and fermentation methods. The results of this study indicate the potential of seaweed *K. alvarezii* as an alternative raw material for sugar production with a percentage of 20% total sugar, 8.7% glucose and 49.65% galactose. Thus, *K. alvarezii* has the potential as a low-calorie alternative sugar.

Kata kunci : biosugar, *Kappaphycus alvarezii*, *Trichoderma harzianum*, hydrolysis, *Saccharomycopsis fibuligera*, fermentation

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	i
ABSTRAK.....	v
ABSTRACT	vi
DAFTAR ISI.....	iv
DAFTAR TABEL.....	vi
DAFTAR GAMBAR.....	vii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Rumusan Masalah	3
C. Tujuan Penelitian	4
D. Kegunaan Penelitian.....	4
E. Hipotesis	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
A. Rumput laut <i>Kappaphycus alvarezii</i>	5
B. Produksi Biosugar	7
C. Hidrolisis	10
D. <i>Trichoderma harzianum</i>	12
E. Fermentasi.....	14
F. <i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	15
G. Kerangka Fikir.....	19
BAB III METODE PENELITIAN.....	20
A. Waktu dan tempat.....	20
B. Alat dan Bahan	20
1. Alat.....	20
2. Bahan.....	21
C. Prosedur Kerja	21
1. Sterilisasi Alat.....	21
2. Pretreatment <i>K. alvarezii</i>	21
3. Pembuatan Kultur <i>Trichoderma Harzianum</i> dan <i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	21
4. Proses Aktivasi <i>Trichoderma harzianum</i>	22
5. Proses Hidrolisis dengan Kapang <i>Trichoderma harzianum</i>	22
6. Proses Aktivasi Isolat <i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	23
7. Proses Fermentasi dengan Khamir <i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	23

D.	Pengukuran Total Gula, Galaktosa dan Glukosa.....	24
E.	Rancangan Penelitian Hidrolisis.....	24
F.	Rancangan Penelitian Fermentasi	25
G.	Analisis Data Penelitian Hidrolisis	25
H.	Analisis Data Penelitian Fermentasi.....	26
BAB IV HASIL.....		27
A.	Kandungan Karbohidrat Rumput Laut <i>K. alvarezii</i>	27
B.	Hidrolisis <i>K. alvarezii</i> menggunakan Kapang <i>Trichoderma harzianum</i> .	27
C.	Fermentasi <i>K. alvarezii</i> menggunakan Khamir <i>S. fibuligera</i>	29
BAB V PEMBAHASAN		31
A.	Analisis karbohidrat rumput laut <i>K. alvarezii</i>	31
B.	Analisis hubungan konsentrasi inokulum dan waktu hidrolisis.....	32
C.	Analisis hubungan konsentrasi khamir dan waktu fermentasi.....	36
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN.....		39
A.	Kesimpulan	39
B.	Saran	39
DAFTAR PUSTAKA.....		40
LAMPIRAN		47
	Lampiran 1. Uji Tukey Hidrolisis	47
	Lampiran 2. Uji Tukey Glukosa	48
	Lampiran 3. Uji Tukey Galaktosa.....	49
	Lampiran 4. Gambar Penelitian.....	50

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Komposisi kimia rumput laut <i>K. alvarezii</i>	7
Tabel 2. Perbandingan kadar gula pada berbagai metode hidrolisis	18
Tabel 3. Spesifikasi dan kegunaan alat.....	20
Tabel 4. Rancangan Penelitian Hidrolisis.....	25
Tabel 5. Rancangan Penelitian Fermentasi	25
Tabel 6. Kandungan polisakarida <i>K. alvarezii</i>	27

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Struktur Kappa Karaginan	7
Gambar 2. <i>Trichoderma harzianum</i> (Sumber : Dok. Pribadi)	13
Gambar 3. <i>Saccharomycopsis fibuligera</i> (Sumber : Dok. Pribadi)	16
Gambar 4. Kerangka fikir penelitian	19
Gambar 5. Grafik hubungan konsentrasi dan waktu hidrolisis terhadap kandungan total gula	28
Gambar 6. Grafik hubungan konsentrasi dan lama fermentasi terhadap kandungan glukosa (a) dan galaktosa (b)	29

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Gula merupakan salah satu kebutuhan pokok manusia yang penting karena dikonsumsi oleh seluruh lapisan masyarakat baik untuk kebutuhan rumah tangga maupun industri. Data Kementerian Pertanian tahun 2018 menunjukkan bahwa kebutuhan gula nasional mencapai 6,6 juta ton termasuk 3,6 juta ton untuk gula industri dan 3 juta ton gula rumah tangga. Produksi gula dalam negeri tahun 2018 sebesar 2,25 juta ton atau hanya memenuhi 34,6% kebutuhan gula nasional (Kementerian Pertanian, 2018). Hal ini menyebabkan volume gula impor mengalami peningkatan yang signifikan. Berdasarkan data Badan Pusat Statistik (BPS) 2018, Indonesia menempati posisi pertama negara pengimpor gula terbesar di dunia yang mencapai 4,45 juta ton.

Produksi tebu sebagai bahan baku utama industri gula terus mengalami penurunan karena ketersediaan lahan budidaya yang semakin terbatas akibat konversi lahan (Kementerian Pertanian, 2018). Berbagai alternatif bahan baku industri gula telah dilaporkan diantaranya singkong dan jagung yang banyak mengandung karbohidrat (Rahmawati, *et al.*, 2017; Mahyati *et al.*, 2017). Namun, ketersediaan bahan baku tersebut terbatas karena fungsi utamanya sebagai bahan makanan pokok. Oleh karena itu perlu upaya untuk mencari alternatif bahan baku kaya karbohidrat berbasis sumberdaya alam yang ketersediaannya berlimpah, misalnya rumput laut.

Indonesia merupakan negara terbesar pertama penghasil rumput laut basah dengan total produksi 9,9 juta ton pada tahun 2019 (kkp.go.id). Indonesia merupakan produsen terbesar di dunia khususnya untuk jenis *eucheuma cottoni* dan menguasai lebih dari 80% *supply share*, utamanya untuk tujuan ekspor ke

China (FAO, 2019). Pada umumnya, polisakarida rumput laut dimanfaatkan secara luas dalam industri makanan, bioteknologi, dan obat-obatan (Parenrengi *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2015). Sulawesi Selatan merupakan salah satu sentra budidaya rumput laut jenis *Kappaphycus alvarezii* dan *Gracilaria* sp dengan total produksi yang terus meningkat 3,28 juta ton pada tahun 2018 (statistik.kkp.go.id). Ketersediaan *K. alvarezii* yang berlimpah (65,9% dari total produksi) merupakan potensi yang menjanjikan sebagai bahan baku alternatif industri gula. Polisakarida penyusun dinding sel rumput laut seperti agar, karagenan, selulosa, manan, dan xilen dapat dikonversi menjadi monosakarida melalui berbagai metode seperti proses hidrolisis asam, hidrolisis enzim, hydrothermal dan kombinasi dengan fermentasi (Perez, 2002; Parenrengi *et al.*, 2010; Meinita, 2013; Wulandari, 2018).

Berberapa metode hidrolisis karbohidrat rumput laut menjadi gula sederhana telah dilaporkan. Hidrolisis karbohidrat menggunakan asam sulfat terbukti menghasilkan rendemen gula yang tinggi akan tetapi bersifat non spesifik karena menimbulkan senyawa yang bersifat toksik (Carvalho *et al.*, 2013). Penguraian karbohidrat dengan metode hidrotermal menunjukkan hasil yang kurang optimal akibat peningkatan suhu (Kim *et al.*, 2014). Metode hidrolisis enzim memproduksi oligosakarida yang tinggi, ramah lingkungan, efek samping senyawa toksik yang sangat rendah akan tetapi membutuhkan waktu yang relatif lama dengan biaya yang besar (Vanegas, 2015). Kelemahan metode tunggal dapat disempurnakan dengan menerapkan metode kombinasi, sebagaimana dilaporkan oleh Kim *et al.* (2015) bahwa kombinasi hidrolisis asam dan enzimatis dapat mengkonversi 57% karbohidrat dari *Gracilaria verrucosa* menjadi gula dengan minimum *by-products*. Selanjutnya penelitian Taufan (2018) menunjukkan kombinasi hidrolisis enzim dan fermentasi menghasilkan kadar gula dan biomassa sel yang tinggi. Berdasarkan uraian tersebut maka penulis

bermaksud melakukan konversi polisakarida dari *K. alvarezii* menjadi monosugar dengan kombinasi hidrolisis dengan kapang dan fermentasi menggunakan khamir.

Hidrolisis menggunakan mikroba merupakan metode alternatif yang potensial dalam memproduksi gula karena memiliki aktivitas enzimatik. Mikroba potensial yang dapat digunakan dalam degradasi karbohidrat melalui metode hidrolisis adalah *Trichoderma harzianum* karena dapat menghasilkan enzim selulase (Lee *et al.*, 2015) yang efektif dalam menghidrolisis selulosa menjadi gula (Jamil *et al.*, 2009). Penelitian Dezousa, 2018 menunjukkan enzim yang dihasilkan oleh *T. harzianum* 25% lebih efisien dibandingkan *Trichoderma reesei*.

Proses selanjutnya dalam mendegradasi karbohidrat dari rumput laut yaitu metode fermentasi. *Saccharomycopsis fibuligera* merupakan salah satu jenis mikroba yang dapat mengakumulasi theralose dari pati (Chi *et al.*, 2009) dan mengkonversinya menjadi gula (Giannone *et al.*, 2016). *S. fibuligera* juga dapat menghasilkan enzim amylase, protease and β -glucosidase yang sangat berpotensi digunakan dalam industri fermentasi (Chi *et al.*, 2009). González *et al.* (2008) menyatakan aktivitas tingkat tinggi α -1,6-debranching dari *S. fibuligera* secara ekstensif menghasilkan enzim amylase yang digunakan untuk menghidrolisis pati singkong. Berdasarkan uraian tersebut maka perlu dilakukan penelitian mengenai produksi biosugar dari rumput laut *K. alvarezii* melalui metode hidrolisis menggunakan kapang *Trichoderma harzianum* dan fermentasi menggunakan khamir *Saccharomycopsis fibuligera*.

B. Rumusan Masalah

1. Bagaimana pengaruh konsentrasi inokulum *T. harzianum* dan waktu hidrolisis terhadap kadar gula yang dihasilkan dari rumput laut *K. alvarezii* ?
2. Bagaimana pengaruh konsentrasi inokulum *S. fibuligera* dan waktu fermentasi terhadap kadar gula yang dihasilkan dari rumput laut *K. alvarezii* ?

3. Apa jenis monosakarida yang terbentuk hasil dari kombinasi hidrolisis dan fermentasi dari rumput laut *K. alvarezii* ?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk :

1. Menentukan konsentrasi inokulum *T. harzianum* dan waktu hidrolisis yang tepat dalam menghasilkan gula
2. Menentukan konsentrasi inokulum *S. fibuligera* dan waktu fermentasi terhadap kadar gula yang dihasilkan dari rumput laut *K. alvarezii*
3. Menganalisis monosakarida yang dihasilkan dari kombinasi hidrolisis dan fermentasi dari rumput laut *K. alvarezii*

D. Kegunaan Penelitian

Penelitian ini berguna untuk memberikan informasi mengenai manfaat rumput laut sebagai bahan baku untuk menghasilkan biosugar melalui metode kombinasi hidrolisis dan fermentasi.

E. Hipotesis

1. Ada pengaruh konsentrasi inokulum dan waktu hidrolisis terhadap kadar gula yang dihasilkan
2. Ada pengaruh konsentrasi inokulum dan waktu fermentasi terhadap kadar gula yang dihasilkan
3. Kombinasi metode hidrolisis dan fermentasi rumput laut *K. alvarezii* menghasilkan monosakarida

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Rumput laut *Kappaphycus alvarezii*

Rumput laut merupakan tumbuhan laut jenis alga yang termasuk dalam golongan divisi *Thallophyta*. Berbeda dengan tanaman sempurna pada umumnya, rumput laut tidak memiliki akar, batang dan daun. Jenis rumput laut sangat beragam mulai dari yang berbentuk bulat, pipih, tabung, atau seperti ranting dahan bercabang-cabang (Suparman, 2012). Rumput laut tumbuh di alam dengan melekatkan dirinya pada karang, lumpur, pasir, batu, dan benda keras lainnya. Jenis rumput laut yang biasa digunakan sebagai bahan olahan pembuatan karaginan adalah rumput laut jenis *Rhodophyceae* yaitu *Euचेuma cottonii*. Ciri fisik *Euचेuma cottonii* adalah mempunyai thallus silindris, permukaan licin, cartilagenous (Prasetyowati, 2008).

Beberapa jenis alga laut diantaranya adalah *Euचेuma cottonii* dan *Gracillaria* sp. dengan rasio sekitar 70:30 (Puspawati *et al.*, 2015). Alga laut *E. cottonii* merupakan makroalga yang pada umumnya hidup di dasar perairan dan menempel pada substrat maupun terapung di permukaan air laut. *E. cottonii* dapat tumbuh dengan baik pada kedalaman 30 cm. Hal ini dipengaruhi oleh faktor-faktor oseanografi (fisika, kimia, dan pergerakan atau dinamika air laut), alga laut mengambil nutrisi dari sekitarnya secara difusi dan osmosis melalui dinding thallus (Surni, 2014).

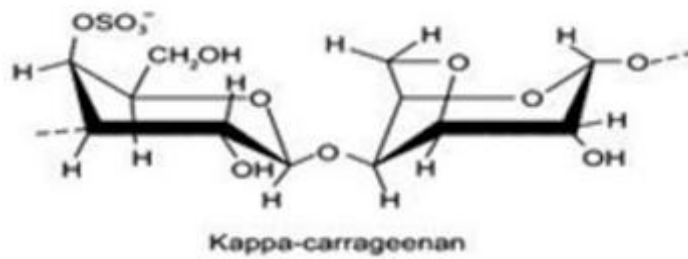
Saat ini rumput laut *E. cottonii* berubah nama menjadi *K. alvarezii* karena spesies ini menghasilkan karaginan tipe *kappa*. Oleh karena itu, secara taksonomi diubah namanya dari *E. cottoni* menjadi *K. alvarezii*. Umumnya *K. alvarezii* tumbuh dengan baik di daerah pantai terumbu (*reef*). Habitat khasnya adalah daerah yang memperoleh aliran air laut. Kondisi perairan yang sesuai untuk budidaya alga laut *K. alvarezii* yaitu perairan terlindung dari terpaan angin

dan gelombang yang besar, kedalaman perairan 7,65-9,72 m, salinitas 33-35 ppt, suhu air laut 28-30°C, kecerahan 2,5-5,25 m, pH 6,5-7, dan kecepatan arus 22-48 cm/detik (Wiratmaja *et al.*, 2011).

Rumput laut *Kappaphycus alvarezii* dapat diklasifikasikan menurut Doty (1985) adalah sebagai berikut :

Kingdom : Plantae
Divisi : Rhodophyta
Kelas : Rhodophyceae
Ordo : Gigartinales
Famili : Solieracea
Genus : *Kappaphycus*
Species : *Kappaphycus alvarezii*

Kappaphycus alvarezii adalah salah satu jenis rumput laut merah (Rhodophyceae) penghasil karaginan. Karaginan pada umumnya di peroleh dari hasil ekstraksi rumput laut merah dengan menggunakan air panas atau larutan alkali. Karaginan merupakan polisakarida yang tersusun atas unit-unit galaktosa dan 3,6-anhidrogalaktosa. *K. alvarezii* menghasilkan metabolit primer berupa senyawa hidrokoloid yang digunakan sebagai aditif makanan, bertindak sebagai gel, pengemulsi, pengental dan menstabilkan agen di bidang farmasi (Chang *et al.*, 2017). Komponen utama dari karagenan adalah D-galaktosa-4-sulfat dan 3,6-anhydro-D-galaktosa-2-sulfat, yang berpotensi untuk difermentasikan (Meinita *et al.*, 2012). Karagenan yang terkandung dalam *K. alvarezii* mudah dikonversi oleh hidrotermal, asam, enzim atau proses fermentasi menjadi produk monosugar (Lee *et al.*, 2016). Kappa karagenan memiliki struktur D-dalaktose dan beberapa gugus 2-sulfate ester pada 3,6 anhydro-D-galaktose yang ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Struktur Kappa Karaginan

Komposisi kimia rumput laut bervariasi antar individu, spesies, habitat, kematangan dan kondisi lingkungannya. Komposisi kimia *K. alvarezii* pada beberapa penelitian dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi kimia rumput laut *K. alvarezii*

Komposisi kimia (%)	Ega <i>et al.</i> , (2016)	Rahim <i>et al.</i> , (2014)	Abirami & Kowsalya (2011)
Total karbohidrat	51,81	59,58	57,3
Lipid	0,37	0,75	0,89
Abu	33,68	19,70	28,9
Protein	0,80	5,74	4,5

B. Produksi Biosugar

Karbohidrat merupakan senyawa yang terbentuk dari molekul karbon, hidrogen dan oksigen. Sebagai salah satu jenis zat gizi, fungsi utama karbohidrat adalah penghasil energi di dalam tubuh. Tiap 1 gram karbohidrat yang dikonsumsi menghasilkan energi sebesar 4 kkal. Energi hasil proses oksidasi (pembakaran) karbohidrat ini kemudian digunakan oleh tubuh untuk menjalankan berbagai fungsi-fungsinya seperti bernafas, kontraksi jantung dan otot serta juga untuk menjalankan berbagai aktivitas fisik seperti berolahraga atau bekerja (Irawan, 2007).

Gula adalah suatu karbohidrat sederhana karena dapat larut dalam air dan langsung diserap tubuh untuk diubah menjadi energi. Secara umum gula di bedakan menjadi dua, yaitu :

a) Monosakarida

Monosakarida merupakan jenis karbohidrat yang paling sederhana. Contoh dari monosakarida yang banyak terdapat di dalam sel tubuh manusia adalah glukosa, fruktosa dan galaktosa. Glukosa di dalam industri pangan lebih dikenal sebagai dekstrosa atau juga gula anggur. Di alam, glukosa banyak terkandung di dalam buah-buahan, sayuran dan juga sirup jagung. Fruktosa dikenal juga sebagai gula buah dan merupakan gula dengan rasa yang paling manis. Di alam fruktosa banyak terkandung di dalam madu (bersama dengan glukosa), dan juga terkandung di berbagai macam buah-buahan. Sedangkan galaktosa merupakan karbohidrat hasil proses pencernaan laktosa sehingga tidak terdapat di alam secara bebas. Selain sebagai molekul tunggal, monosakarida juga berfungsi sebagai molekul dasar bagi pembentukan senyawa karbohidrat kompleks pati (*starch*) atau selulosa.

b) Disakarida

Disakarida merupakan jenis karbohidrat yang banyak dikonsumsi oleh manusia di dalam kehidupan sehari-hari. Setiap molekul disakarida terbentuk dari gabungan 2 molekul monosakarida. Contoh disakarida adalah sukrosa (gabungan glukosa dan fruktosa), laktosa (gabungan dari glukosa dan galaktosa) dan maltosa (gabungan dari dua glukosa). Di dalam produk pangan, sukrosa merupakan pembentuk hampir 99% dari gula pasir atau gula meja (*table sugar*) yang biasa digunakan dalam konsumsi sehari-hari sedangkan laktosa merupakan karbohidrat yang banyak terdapat dalam susu sapi dengan konsentrasi 6.8 g/100 ml. Karbohidrat kompleks merupakan polisakarida yang terbentuk oleh hampir lebih dari 20.000 unit molekul

monosakarisa terutama glukosa. Jenis karbohidrat kompleks yang menjadi sumber utama bahan makanan yang umum dikonsumsi oleh manusia adalah pati (*starch*). Polisakarida merupakan polimer monosakarida, mengandung banyak satuan monosakarida yang dihubungkan oleh ikatan glikosida. Hidrolisis lengkap dari polisakarida akan menghasilkan monosakarida.

Biosugar adalah salah satu produk antara yang penting yang dapat dihasilkan dari bahan baku yang mengandung karbohidrat tinggi. Penelitian Ayoola *et al.* (2012) memproduksi biosugar dari limbah tapioka atau singkong. Salah satu limbah utama yang dihasilkan oleh industri pengolahan tapioka adalah kulit singkong. Karena kandungan yang tinggi, bahan baku ini bisa digunakan dengan baik untuk menghasilkan biosugar (Yoonan & Kongkiattikajorn, 2004; Olanbiwoninu & Odunfa, 2012).

Berdasarkan hasil penelitian, pemanfaatan bahan organik untuk energi terbarukan saat ini banyak dilakukan. Salah satu produk energi terbarukan adalah bioetanol yang dihasilkan dari gula difermentasikan. Oleh karena itu, kebutuhan untuk menghasilkan biosugar murah saat ini meningkat dan salah satu sumber potensi untuk menghasilkan biosugar adalah dari pengolahan limbah singkong karena mengandung pati, selulosa dan hemiselulosa (Edama *et al.*, 2014).

Bahan baku limbah lain yang dapat digunakan dalam produksi biosugar adalah ampas tebu. Menurut Woiciechowski *et al.* (2002), ampas tebu dapat diubah menjadi gula-gula pereduksi karena kaya akan bahan organik terutama pati. Proses hidrolisis secara asam atau enzim mampu menghasilkan gula reduksi. Woiciechowski *et al.* (2002) mengatakan bahwa hasil gula reduksi dari singkong dan ampas tebu dengan menggunakan hidrolisis enzimatis yaitu 97%. Hasil tersebut hanya sedikit lebih tinggi dari hasil hidrolisis asam yaitu 95%.

C. Hidrolisis

Hidrolisis adalah proses dekomposisi kimia dengan menggunakan air untuk memisahkan ikatan kimia dari substansinya (Rahmayanti, 2010). Konversi polimer karbohidrat dalam bahan baku lignoselulosa dapat difermentasi menjadi gula (Zhu *et al.*, 2015). Proses hidrolisis bisa dilakukan secara fisika, kimia maupun biologi. Proses hidrolisis secara fisika yaitu dengan cara pemanasan atau perebusan. Proses hidrolisis secara kimia yaitu dengan penambahan larutan asam atau basa. Sedangkan proses hidrolisis secara biologi yaitu dengan menggunakan mikroorganisme yang memiliki aktivitas enzimatik. Kombinasi ketiga jenis metode hidrolisis juga biasa dilakukan dalam industri fermentasi (Sulfahri *et al.*, 2016).

Proses hidrolisis pati yaitu pengubahan molekul pati menjadi monomernya atau unit-unit penyusunnya seperti gula. Hidrolisis pati dapat dilakukan dengan bantuan asam atau enzim dengan suhu, pH dan waktu reaksi tertentu (Ayoola *et al.*, 2013; Ramachandran *et al.*, 2013). Polisakarida dalam *Gracilaria* sp. dapat dihidrolisis menggunakan asam dengan memecah struktur polisakarida menjadi molekul gula. Proses hidrolisis dengan katalis asam adalah cara yang umum dan sering dipergunakan. Hidrolisis secara asam ini memiliki kelebihan karena murah dan mudah digunakan (Abd. Rahim *et al.*, 2014). Asam yang sering dipergunakan adalah asam sulfat, asam klorida dan asam fosfat. Namun, hidrolisis asam juga memiliki kekurangan. Menurut Riyanti (2008) efisiensi proses hidrolisis dengan menggunakan asam masih rendah serta penanganan limbah asam yang tidak mudah. Kelemahan lainnya adalah menghasilkan senyawa toksik yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme pada proses fermentasi nantinya. Sehingga banyak yang beralih menggunakan hidrolisis enzimatik dimana selain produk yang dihasilkan aman, senyawa penghambat pertumbuhan mikroba tidak terbentuk.

Hidrolisis menggunakan enzim bertujuan untuk membantu proses konversi pati menjadi gula sederhana (Sandi *et al.*, 2016). Enzim bersifat katalisator, enzim tidak diubah oleh reaksi yang dikatalisnya, dan enzim tidak mengubah kedudukan normal dari keseimbangan kimia. Dengan kata lain enzim dapat membantu mempercepat pembentukan produk, tetapi akhirnya jumlah produk tetap sama dengan produk yang diperoleh tanpa enzim. Kondisi yang mempengaruhi aktifitas enzim diantaranya konsentrasi enzim, konsentrasi substrat, pH, dan suhu. Hidrolisis enzimatik memiliki beberapa keuntungan jika dibandingkan dengan hidrolisis asam, antara lain tidak terjadi degradasi gula hasil hidrolisis, kondisi proses yang lebih lunak (suhu rendah, pH netral), memberikan hasil yang tinggi, dan biaya pemeliharaan peralatan yang relatif lebih rendah karena tidak ada bahan yang korosif (Taherzadeh & Karimi, 2007).

Hidrolisis menggunakan enzim menghasilkan konversi yang lebih besar jika dibandingkan dengan hidrolisis asam. Hidrolisis enzim juga dapat mencegah adanya reaksi efek samping karena sifat katalis enzim sangat spesifik, sehingga dapat mempertahankan flavor dan aroma bahan dasar (Risnoyatiningsih, 2011). Hidrolisis secara enzimatis memiliki perbedaan mendasar dengan hidrolisis secara asam. Ada beberapa faktor yang mempengaruhi reaksi hidrolisis diantaranya adalah suhu, katalisator, waktu, pH, kadar suspensi pati dan jumlah penambahan enzim (Risnoyatiningsih, 2011).

Proses hidrolisis enzimatik memerlukan enzim selulase. Penggunaan enzim selulase yang siap pakai pada proses hidrolisis harganya mahal sehingga Wyman (2005) menyarankan mengurangi penggunaan enzim. Ada tiga kelompok enzim yang dalam proses hidrolisis selulosa yaitu endoglukonase yang bekerja pada serat selulosa untuk memecah selulosa secara acak, eksoglukonase yang mendegradasi lebih lanjut serat tersebut, dan β -

glukosidase yang menghidrolisis selobiosa menjadi glukosa. Enzim tersebut dapat diproduksi oleh mikroorganisme seperti jamur dan bakteri.

D. *Trichoderma harzianum*

Trichoderma sp. merupakan mikroorganisme tanah yang bersifat saprofit yang secara alami menyerang cendawa patogen. *Trichoderma* sp. memiliki aktivitas antifungal. Di alam, *Trichoderma* banyak ditemukan di tanah hutan maupun tanah pertanian atau pada substrat berkayu (Samuel, 2010). *Trichoderma harzianum* merupakan salah satu spesies *Trichoderma* yang paling banyak dipelajari karena memiliki aktivitas antifungi yang tinggi (Laskin *et al.*, 2010). *T. harzianum* dapat memproduksi enzim selolitik dan senyawa antifungi.

Klasifikasi *Trichoderma harzianum* (Rifai, 1969) adalah sebagai berikut :

Kingdom : Kapang
Divisi : Ascomycota
Kelas : Sordariomycetes
Ordo : Hypocreales
Famili : Hypocreaceae
Genus : *Trichoderma*
Species : *Trichoderma harzianum*

Trichoderma harzianum memproduksi metabolit seperti asam sitrat, etanol, dan berbagai enzim seperti urease, selulase, glukonase, dan kitinase. Hasil metabolit ini dipengaruhi kandungan nutrisi yang terdapat dalam media. *T. harzianum* dapat memproduksi beberapa pigmen yang bervariasi pada media tertentu seperti pigmen ungu yang dihasilkan pada media yang mengandung amonium oksalat, dan pigmen jingga yang dihasilkan pada media yang mengandung gelatin atau glukosa, serta pigmen merah pada medium cair yang mengandung glisin dan urea. Saat berada pada kondisi yang kaya akan kitin,

T. harzianum memproduksi protein kitinolitik dan enzim kitinase. Enzim ini berguna untuk meningkatkan efisiensi aktivitas biokontrol terhadap patogen yang mengandung kitin (Danielson, 2002). Jamur jenis *T. harzianum* membentuk hifa atau serabut-serabut seperti pada Gambar 2.



Gambar 2. *Trichoderma harzianum* (Sumber : Dok. Pribadi)

Jamur dari genus *Trichoderma* ini banyak tersebar luas di alam. Genus ini dikenal sebagai penghasil enzim hidrolitik, selulase, pektinase, dan xilanase yang mampu mendegradasi polisakarida kompleks seperti selulosa, pektin, hemiselulosa, dan xilan. Sudah banyak dari jamur genus ini digunakan untuk kepentingan industri dan pertanian, diantaranya adalah jamur *T. harzianum* yang merupakan jamur selulolitik yang mampu mensekresi selulase dan hemiselulase yang cukup besar. Penggunaan jamur *T. harzianum* sebagai penghasil enzim selulase sangat menguntungkan karena selain mudah dibiakkan jamur ini mempunyai kecepatan tumbuh yang tinggi dan mudah dikontrol pertumbuhannya.

Jamur *T. harzianum* berperan sebagai dekomposer dalam proses pengomposan untuk mengurai bahan organik seperti selulosa menjadi senyawa glukosa. Keunggulan dalam penggunaan jamur *T. harzianum* adalah selain

jamur ini bisa menghasilkan enzim yang dapat memecah selulosa menjadi glukosa, jamur ini juga dapat digunakan sebagai biofungisida yang ramah lingkungan karena tidak menimbulkan pencemaran atau berdampak negatif pada lingkungan melainkan dapat mengembalikan keseimbangan alamiah dan kesuburan tanah (Soesanto, 2004).

Suhu optimum untuk tumbuhnya *Trichoderma* berbeda-beda setiap spesiesnya. Ada beberapa spesies yang dapat tumbuh pada temperatur rendah ada pula yang tumbuh pada temperatur cukup tinggi, kisarannya sekitar 7°C-41°C. *Trichoderma* yang dikultur dapat bertumbuh cepat pada suhu 25-30°C, namun pada suhu 35°C cendawan ini tidak dapat tumbuh. Perbedaan suhu memengaruhi produksi beberapa enzim seperti karboksimetilselulase dan xilanase. Kemampuan merespon kondisi pH dan kandungan CO₂ juga bervariasi. Namun secara umum apabila kandungan CO₂ meningkat maka kondisi pH untuk pertumbuhan akan bergeser menjadi semakin basa. Di udara, pH optimum bagi *Trichoderma* berkisar antara 3-7. Faktor lain yang memengaruhi pertumbuhan *Trichoderma* adalah kelembaban, sedangkan kandungan garam tidak terlalu memengaruhi *Trichoderma*. Penambahan HCO₃⁻ dapat menghambat mekanisme kerja *Trichoderma*.

E. Fermentasi

Kata fermentasi berasal dari bahasa latin yaitu *fervere*, yang berarti dalam keadaan mendidih atau bergelembung, akibat terjadinya gelembung CO₂ dari katabolisme senyawa organik, pada mulanya dikenal sebagai aktivitas khamir pada ekstrak buah atau nira (Sulfahri *et al.*, 2016). Proses fermentasi digunakan secara ekstensif dalam bioteknologi, farmasi, makanan dan industri minuman. Biasanya, fermentasi memanfaatkan mikroorganisme (bakteri, ragi) untuk menghasilkan produk yang diinginkan dari substrat. Butyl alkohol,

aseton, asam sitrat, hidrogen, glikol, alkohol bahan bakar, dan bir adalah contoh dari ratusan biokimia yang dihasilkan oleh fermentasi.

Dalam fermentasi, tidak terdapat akseptor elektron luar yang berperan. Senyawa organik yang diuraikan berfungsi sebagai donor, sekaligus akseptor elektron. Senyawa organik yang biasa digunakan adalah gula. Contoh reaksinya yaitu (Madigan *et al.*, 2012) :



Proses fermentasi berlangsung dengan fosforilasi tingkat substrat. Pelakunya adalah mikroorganisme anaerob fakultatif atau anaerob obligat. Hasil akhirnya selalu didapatkan senyawa-senyawa organik sederhana hasil penguraian substrat, maka sering kali dikatakan bahwa proses oksidasinya berjalan tidak sempurna. Pada fermentasi karbohidrat, asam piruvat adalah senyawa antara kunci. Senyawa-senyawa beratom C 4-6 diubah terlebih dahulu menjadi asam piruvat. Kemudian asam piruvat diubah lebih lanjut menjadi produk (Madigan *et al.*, 2012).

F. *Saccharomyces fibuligera*

Saccharomyces fibuligera merupakan salah satu khamir yang masuk dalam spesies ascomycoteus teleomorph. Nama lain dari *S. fibuligera* yaitu *Endomyces fibuliger* dan *Saccharomyces fibuligera*. *S. fibuligera* berkembangbiak dengan membentuk *budding* atau koloni seperti pada bakteri yang dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. *Saccharomyopsis fibuligera* (Sumber : Dok. Pribadi)

Saccharomyopsis fibuligera memiliki kemampuan menguraikan pati yang tinggi. *S. fibuligera* memproduksi askospora berbentuk *hat-shaped* yang dibentuk di spheroidal asci yang biasanya terdapat pada cabang lateral hifa utama. *S. fibuligera* dapat membentuk enzim pemecah pati dan dapat menyebabkan kerusakan pada produk-produk sereal dan gandum. Jika tumbuh dalam agar yang solid, strain *S. fibuligera* akan berkembang dalam morfologi yang berbeda. Dan jika strain *S. fibuligera* ditumbuhkan pada medium khamir extract peptone soluble starch (YPSS) akan memberi sporulasi berwarna putih. Jika budidaya tersebut diperpanjang maka koloni akan memproduksi *sector mitotic*. *S. fibuligera* dapat mengasimilasi sukrosa, maltose, selobiosa, dan juga pati larut air.

Spesies *S. fibuligera* merupakan protein secretor, serta memproduksi dan mensekresi glukoamilase dan α -amilase yang dapat mempercepat penguraian pati menjadi glukosa dan maltose. *S. fibuligera* juga dapat menghidrolisa selobiosa menggunakan β -glukosidase ekstraseluler. Optimal temperatur untuk glukoamilase dan α amylase yang dihasilkan *S. fibuligera* adalah 40-50°C. Optimal pH untuk glukoamilase dan α amylase yang dihasilkan *S. fibuligera*

adalah 5-6,2. α -Amilase *S. fibuligera* merupakan salah satu enzim ekstraseluler yang mampu memecah pati mentah sehingga dapat menghemat energi dalam pemrosesan pati, dengan demikian memiliki potensi untuk dapat dikembangkan dan diaplikasikan dalam industri (Hostinova, 2002; Hasan *et al.*, 2008). Walaupun α -amilase yang dihasilkan oleh ragi belum diaplikasikan secara luas dibandingkan dengan yang diproduksi oleh bakteri dan jamur, enzim α -amilase dari *S. fibuligera* telah lama dimanfaatkan untuk proses sakarifikasi pada fermentasi makanan. Kemampuan amilase (α -amilase dan glukoamilase) yang dihasilkan oleh *S. fibuligera* dalam memecah pati mentah merupakan sifat yang menarik, enzim semacam ini dapat digunakan dalam pemrosesan pati yang hemat energi (Hostinova, 2002).

Strain *S. fibuligera* di Jepang telah digunakan sebagai mikrobial penghasil glukosa dari pati (Zhang *et al.*, 2010). Beberapa penelitian juga menunjukkan bahwa ragi jenis ini mampu menghasilkan kadar amilase yang cukup tinggi sehingga baik dalam menghidrolisis pati (Gen *et al.*, 2014). *S. fibuligera* diketahui dapat mengeluarkan sejumlah besar amilase, protease, dan β -glukosidase yang sangat potensial dalam aplikasi industri fermentasi (Chi *et al.*, 2009). *Khamir* ini dapat efektif pada lingkungan dengan pH 5.0-6.0 yang setara dengan lingkungan pati (Hostinova *et al.*, 2010).

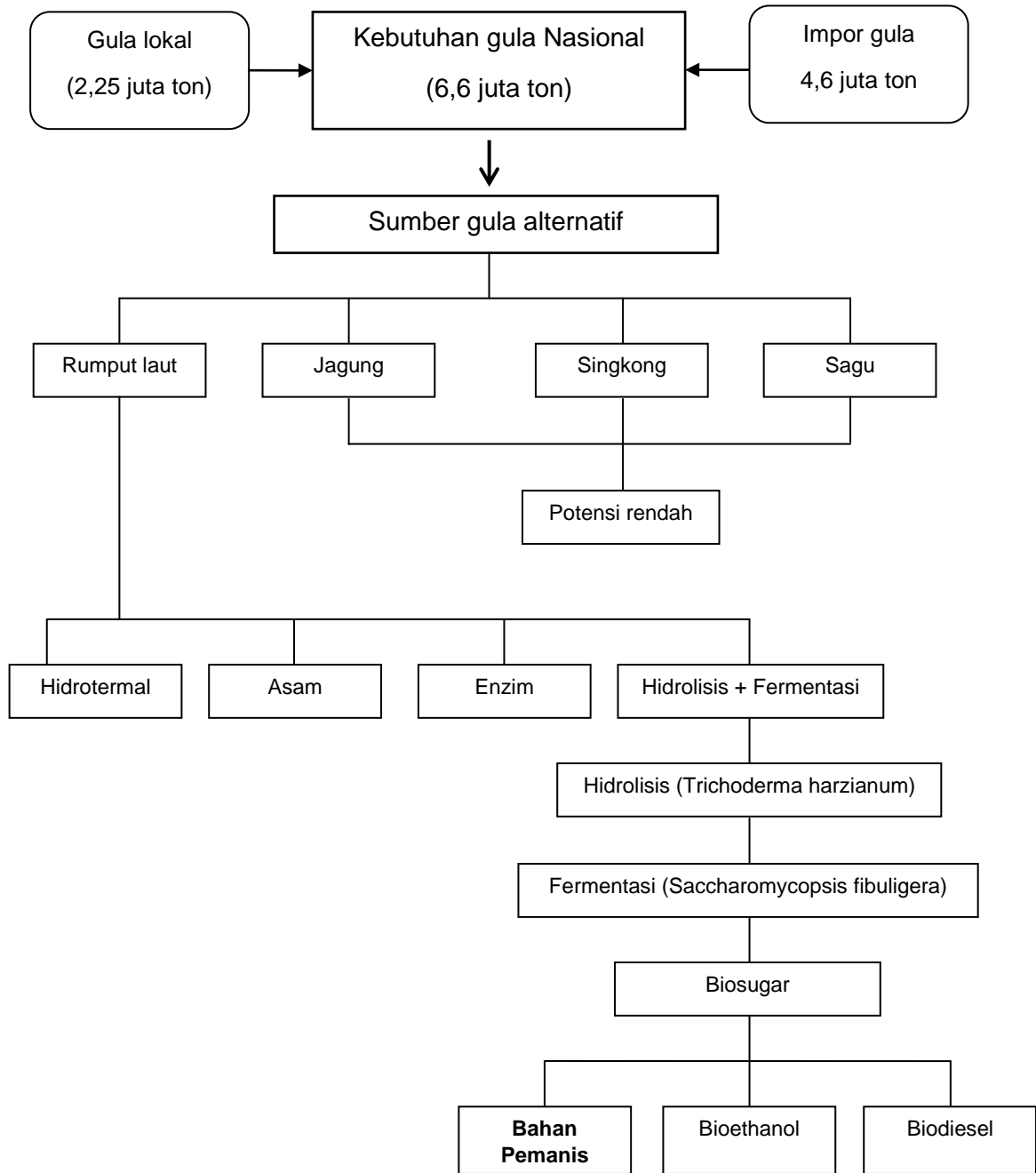
Penelitian untuk menghasilkan biosugar menggunakan bahan baku rumput laut telah banyak dilakukan. Berbagai jenis rumput laut juga sangat mempengaruhi total gula yang dihasilkan. Metode hidrolisis adalah metode yang paling banyak dilakukan. Beberapa penelitian terakhir menunjukkan produksi biosugar dengan metode kombinasi hidrolisis, hydrothermal maupun fermentasi yang ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Perbandingan kadar gula pada berbagai metode hidrolisis

Jenis Rumput Laut	Perlakuan	Kadar Gula (g/L)	Referensi
<i>Kappaphycus alvarezii</i>	110°C, 90 min, 0.2 M H ₂ SO ₄ pH 5.5, 50°C, Celluclast (8%; 80 g/L)	49,8 (RS)	Abd-Rahim <i>et al.</i> (2014)
<i>Gracilaria verrucosa</i>	121°C, 15 min, 0.1 N H ₂ SO ₄ , pH 5.0, 50°C, 48 h, Cellic CTec2 (2%; 0.6 g/30 mL)	8,53 (RS)	Kim <i>et al</i> (2015)
<i>Gracilaria verrucosa</i>	0,1 N H ₂ SO ₄ , 15 menit (2%; 0,6g/30mL)	7,47 (RS)	Kim <i>et al</i> (2015)
<i>Gracilaria</i> sp.	0,1 N H ₂ SO ₄ , 60 menit (2%)	0.64 (glu) 5.12 (gal)	Wu <i>et al</i> (2014)
<i>Kappaphycus alvarezii</i>	5% ; 0.9 N H ₂ SO ₄ , 100°C, 60 menit	13,1 (RS)	Khambaty <i>et al</i> (2012)
<i>Gelidium amansii</i>	121°C, 94 nM H ₂ SO ₄ , 60 menit, 48°C, 48 jam celluclast (10%; 10 g/100 mL)	13,5 (glu)	Ra <i>et al</i> (2013)
<i>Sargassum</i> spp.	10% ; 4% H ₂ SO ₄ , 115°C, 90 menit	12 (RS)	Borines <i>et al.</i> (2013)

Tabel 2. Menunjukkan beberapa hasil penelitian yang telah dilakukan dalam memproduksi biosugar. Hasil penelitian Abd.Rahim *et al.* (2014) menunjukkan nilai total gula tertinggi yaitu 49,8 g/L menggunakan metode kombinasi asam dan enzim dengan konsentrasi rumput laut 8%. Selanjutnya penelitian Kim *et al* (2015), menunjukkan nilai gula reduksi dengan metode hidrolisis menggunakan asam H₂SO₄ yaitu 7,47 g/L dan metode kombinasi asam dan enzim yaitu 8,53 g/L .

G. Kerangka Fikir



Gambar 4. Kerangka fikir penelitian

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Waktu dan tempat

Penelitian ini dilakukan pada bulan Oktober – Desember 2019. Pengambilan sampel rumput laut *Kappaphycus alvarezii* dilakukan di Balai Perikanan Budidaya Air Payau (BPBAP) Kabupaten Takalar. Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan, Universitas Hasanuddin. Analisis kadar gula dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Konsultasi Industri Surabaya.

B. Alat dan Bahan

1. Alat

Spesifikasi dan kegunaan peralatan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Spesifikasi dan kegunaan alat

Alat	Spesifikasi	Kegunaan
<i>Hummer mill</i>	-	Untuk menggiling sampel
Inkubator	Imperial III	Untuk menumbuhkan media pada suhu terkontrol
Magnetic stirrer	Faithful model SH-3	Untuk menghomogenkan dan memanaskan larutan
Water bath	Labsco	Untuk menguapkan zat pada suhu tertentu
Shaker rotator	Health H-SR-200	Untuk mengaduk larutan dengan gerakan satu arah
Oven	JumoLAN	Untuk sterilisasi alat-alat laboratorium
Sentifuge	-	Untuk memisahkan larutan dengan kepadatan berbeda
Autoklaf	-	Untuk sterilisasi alat dan bahan
Kulkas	Ikeda Model ISC-180	Untuk menyimpan bahan dalam waktu lama
<i>Laminar Air Flow (LAF)</i>	-	Sebagai ruangan pengerjaan sampel secara aseptis

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah rumput laut *Kappaphycus alvarezii* yang dipanen pada umur 45 hari. Kapang *Trichoderma Harzianum* InaCC F115 dan khamir *Saccharomyopsis fibuligera* InaaCC F595 yang diperoleh dari Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), medium *Potato Dextrosa Agar* (PDA), aquades, kertas label dan aluminium foil.

C. Prosedur Kerja

1. Sterilisasi Alat

Sterilisasi alat seperti cawan petri, erlenmeyer, gelas ukur dan botol fermentor dilakukan dengan cara sterilisasi kering. Alat dicuci hingga bersih lalu dikeringkan dan dibungkus dengan aluminium foil kemudian disterilisasi menggunakan oven dengan suhu 180°C selama satu jam.

2. Pretreatment *K. alvarezii*

Rumput laut *K. alvarezii* basah terlebih dahulu dicuci dengan air tawar untuk menghilangkan sisa lumpur dan garam yang masih menempel pada *thallus*. Selanjutnya rumput laut dijemur di bawah sinar matahari selama dua sampai tiga hari hingga rumput laut kering kemudian digiling menggunakan *hammer mill* dan disaring dengan ayakan ukuran 40 mesh untuk memperoleh tepung rumput laut. Tepung rumput laut dikemas dalam plastik sampel dan disimpan pada suhu ruang sebelum digunakan pada tahap selanjutnya.

3. Pembuatan Kultur *Trichoderma harzianum* dan *Saccharomyopsis fibuligera*

Isolat *T. harzianum* dan *S. fibuligera* disubkultur di cawan petri yang berisi medium *Potato Dextrose Agar* (PDA). Subkultur dilakukan dengan

mengambil satu ose isolat kemudian diinokulasikan ke medium PDA dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 48 jam.

4. Proses Aktivasi *Trichoderma harzianum*

Aktivasi *T. harzianum* dilakukan dalam tiga tahap sebagai berikut :

Aktivasi I, dengan cara mengambil 1 ose kultur *T. harzianum* dari media PDA lalu diinokulasikan ke dalam erlenmeyer 50 ml yang berisi 5 ml substrat *K. alvarezii* kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam.

Aktivasi II, sebanyak 1 ml kultur dari aktivasi I diambil menggunakan pipet dan diinokulasikan ke dalam erlenmeyer 50 ml yang berisi 9 ml substrat *K. alvarezii* kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam.

Aktivasi III, sebanyak 5 ml kultur dari aktivasi II diambil menggunakan pipet ukur dan diinokulasi kembali ke dalam erlenmeyer 100 ml yang berisi 45 ml substrat *K. alvarezii* dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 12 jam.

5. Proses Hidrolisis dengan Kapang *Trichoderma harzianum*

Proses hidrolisis menggunakan rumput laut yang telah melalui proses pretreatment. Sebanyak 2% tepung rumput laut dilarutkan ke dalam aquades dan dipanaskan di atas *hot plate* sambil diaduk-aduk sehingga homogen menjadi bubur rumput laut. Proses pemanasan berlangsung selama 120 menit pada suhu $\pm 100^{\circ}\text{C}$ kemudian didinginkan hingga mencapai $\pm 40^{\circ}\text{C}$. Selanjutnya bubur rumput laut disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama ± 15 menit. Bubur rumput laut *K. alvarezii* dihidrolisis menggunakan inokulum *T. harzianum* yang diperoleh dari aktivasi III dengan variasi konsentrasi 5%, 10%, 15% dan 20% dan variasi waktu hidrolisis 0, 24, 48, dan 72 jam. Setelah proses hidrolisis, sampel dari masing-masing kombinasi perlakuan disentrifugasi pada kecepatan 9.000 rpm selama 10 menit untuk memisahkan supernatan dari presipitat. Kadar gula supernatan tiap perlakuan ditera dengan metode asam

fenol sulfat. Kombinasi 20% konsentrasi *K. alvarezii* dengan lama waktu hidrolisis 24 jam merupakan kondisi hidrolisis yang optimum yang ditandai dengan kadar gula tertinggi. Kombinasi perlakuan tersebut dilanjutkan pada tahap fermentasi.

6. Proses Aktivasi Isolat *Saccharomycopsis fibuligera*

Sebagaimana halnya dengan aktivasi kapang, khamir *Saccharomycopsis fibuligera* juga diaktivasi dalam tiga tahap yaitu :

Aktivasi I, diambil sebanyak 1 ose kultur *S. fibuligera* dari medium PDA dan diinokulasikan ke dalam erlenmeyer 50 ml yang berisi 5 ml substrat *K. alvarezii*. Kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam.

Aktivasi II, sebanyak 1 ml kultur dari aktivasi I diambil menggunakan pipet ukur dan diinokulasi ke dalam erlenmeyer 50 ml yang berisi 9 ml substrat *K. alvarezii*, diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam.

Aktivasi III, sebanyak 5 ml dari aktivasi II diambil menggunakan pipet dan diinokulasi ke dalam erlenmeyer 100 ml yang berisi 45 ml substrat *K. alvarezii*, diinkubasi pada suhu 30°C selama 12 jam.

7. Proses Fermentasi dengan Khamir *Saccharomycopsis fibuligera*

Proses fermentasi dilakukan dengan menginokulasikan *S. fibuligera* yang telah diaktivasi pada sampel *K. alvarezii* yang sebelumnya telah dihidrolisis dengan *T. harzianum* pada kondisi optimum yaitu konsentrasi 20% selama 24 jam. Kultur *S. fibuligera* dengan variasi konsentrasi 5%, 10%, 15% dan 20% diinokulasikan pada sampel dan difermentasi dengan variasi waktu 0 jam, 24 jam, 48 jam dan 72 jam. Kadar monosakarida glukosa dan galaktosa setiap kombinasi perlakuan ditera dengan metode kromatografi.

D. Pengukuran Total Gula, Galaktosa dan Glukosa

Metode yang digunakan untuk menentukan total gula adalah metode asam fenol sulfat (Dubois *et al.*, 1956). Terlebih dahulu dilakukan pembuatan larutan standar glukosa dengan konsentrasi 10, 20, 40, 60, 80, 120, dan 200 ppm. Sampel hasil hidrolisis diambil 0,5 mL dimasukkan kedalam tabung reaksi setelah itu ditambahkan fenol 5% sebanyak 0,5 mL dan 2,5 mL larutan H₂SO₄ lalu dikocok dengan vortex. Setelah itu didiamkan selama 10 menit dan diletakkan di dalam waterbath dengan suhu 40°C selama 20 menit. Kemudian dilakukan pengujian absorbansi total gula dengan menggunakan spektrofotometer UV-Visibel pada panjang gelombang 490 nm.

Biosugar (glukosa dan galaktosa) ditentukan menggunakan HPLC (High Performance Liquid Chromatography) Agilent HPLC 1100, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA. HPLC dilengkapi dengan detektor indeks refraktif dan kolom bio-rad Aminex HPX-87H (300x7,8 mm). Kolom dipertahankan pada suhu 65°C dengan *flow rate* 0,6 mL/menit, dengan 5 mM H₂SO₄ sebagai *mobile phase*.

E. Rancangan Penelitian Hidrolisis

Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak lengkap dengan pola faktorial seperti yang tersaji pada Tabel 4. Faktor pertama konsentrasi *T. harzianum* dan faktor kedua lama waktu hidrolisis masing-masing 4 tarap. Penelitian dilakukan dengan tiga kali ulangan sehingga diperoleh 48 kombinasi perlakuan. Analisa kadar gula total dilakukan untuk setiap kombinasi perlakuan.

Tabel 4. Rancangan Penelitian Hidrolisis

Konsentrasi inokulum <i>T. harzianum</i> (%)	Produksi Gula											
	0 Jam (B1)			24 Jam (B2)			48 Jam (B3)			72 Jam (B4)		
5 (A1)	A1B1 ₁	A1B1 ₂	A1B1 ₃	A1B2 ₁	A1B2 ₂	A1B2 ₃	A1B3 ₁	A1B3 ₂	A1B3 ₃	A1B4 ₁	A1B4 ₂	A1B4 ₃
10 (A2)	A2B1 ₁	A2B1 ₂	A2B1 ₃	A2B2 ₁	A2B2 ₂	A2B2 ₃	A2B3 ₁	A2B3 ₂	A2B3 ₃	A2B4 ₁	A2B4 ₂	A2B4 ₃
15 (A3)	A3B1 ₁	A3B1 ₂	A3B1 ₃	A3B2 ₁	A3B2 ₂	A3B2 ₃	A3B3 ₁	A3B3 ₂	A3B3 ₃	A3B4 ₁	A3B4 ₂	A3B4 ₃
20 (A4)	A4B1 ₁	A4B1 ₂	A4B1 ₃	A4B2 ₁	A4B2 ₂	A4B2 ₃	A4B3 ₁	A4B3 ₂	A4B3 ₃	A4B4 ₁	A4B4 ₂	A4B4 ₃

F. Rancangan Penelitian Fermentasi

Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak lengkap dengan pola faktorial dengan konsentrasi inokulum *S. fibuligera* dan lama waktu fermentasi sebagai faktor pertama dan kedua dengan taraf masing-masing empat. Setiap kombinasi perlakuan dilakukan dengan tiga kali ulangan sehingga diperoleh 48 satuan percobaan sebagaimana yang tercantum pada Tabel 5. Parameter yang diamati adalah kadar gula sederhana glukosa dan galaktosa.

Tabel 5. Rancangan Penelitian Fermentasi

Konsentrasi inokulum <i>S. fibuligera</i> (%)	Produksi Gula											
	0 Jam (T1)			24 Jam (T2)			48 Jam (T3)			72 Jam (T4)		
5 (S1)	S1T1 ₁	S1T1 ₂	S1T1 ₃	S1T2 ₁	S1T2 ₂	S1T2 ₃	S1T3 ₁	S1T3 ₂	S1T3 ₃	S1T4 ₁	S1T4 ₂	S1T4 ₃
10 (S2)	S2T1 ₁	S2T1 ₂	S2T1 ₃	S2T2 ₁	S2T2 ₂	S2T2 ₃	S2T3 ₁	S2T3 ₂	S2T3 ₃	S2T4 ₁	S2T4 ₂	S2T4 ₃
15 (S3)	S3T1 ₁	S3T1 ₂	S3T1 ₃	S3T2 ₁	S3T2 ₂	S3T2 ₃	S3T3 ₁	S3T3 ₂	S3T3 ₃	S3T4 ₁	S3T4 ₂	S3T4 ₃
20 (S4)	S4T1 ₁	S4T1 ₂	S4T1 ₃	S4T2 ₁	S4T2 ₂	S4T2 ₃	S4T3 ₁	S4T3 ₂	S4T3 ₃	S4T4 ₁	S4T4 ₂	S4T4 ₃

G. Analisis Data Penelitian Hidrolisis

Data kadar gula dianalisis dengan menggunakan Two way ANOVA untuk mengetahui pengaruh konsentrasi inokulum waktu inkubasi terhadap kadar gula hasil hidrolisis rumput laut *K. alvarezii*. Kemudian dilanjutkan dengan uji Tukey

pada taraf kepercayaan 95% ($\alpha=0.05$) untuk melihat pengaruh pada masing-masing perlakuan.

H. Analisis Data Penelitian Fermentasi

Data kadar gula dianalisis dengan menggunakan Two way ANOVA untuk mengetahui pengaruh kombinasi perlakuan konsentrasi dan waktu fermentasi terhadap kadar gula yang dihasilkan. Kemudian dilanjutkan dengan uji Tukey pada taraf kepercayaan 95% ($\alpha=0.05$) untuk melihat adanya pengaruh pada masing-masing perlakuan.

BAB IV

HASIL

A. Kandungan Karbohidrat Rumput Laut *K. alvarezii*

Tepung rumput laut *K. alvarezii* yang telah mengalami perlakuan pendahuluan dianalisis untuk mengetahui kandungan pati dan selulosa sebagai penyusun utama karbohidrat seperti yang tersaji pada Tabel 6.

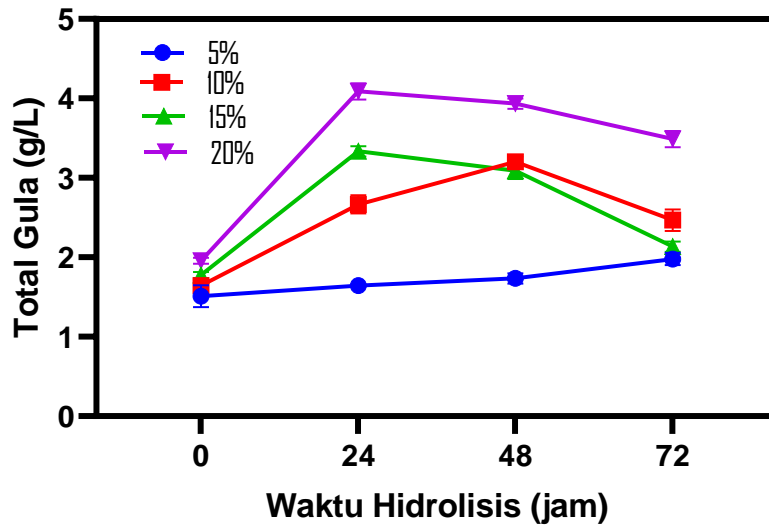
Tabel 6. Kandungan polisakarida *K. alvarezii*

No	Sampel	Komposisi (%)		
		Pati	Selulosa	Karbohidrat
1	<i>K. alvarezii</i>	35,83	12,21	55,58

Hasil analisis menunjukkan kandungan karbohidrat total rumput laut *K. alvarezii* adalah 55,58% dengan penyusun utamanya adalah pati sebesar 35,83% dan selulosa 12,21%.

B. Hidrolisis *K. alvarezii* menggunakan Kapang *T. harzianum*

Rumput laut yang telah melalui proses pretreatment kemudian dihidrolisis dengan inokulum *T. harzianum* dengan konsentrasi yang berbeda yaitu 5%, 10%, 15% dan 20% dan lama hidrolisis 0 jam, 24 jam, 48 jam dan 72 jam. Sampel dianalisis untuk mengetahui total gula yang dihasilkan dari proses hidrolisis sebagaimana yang tersaji pada Gambar 5.

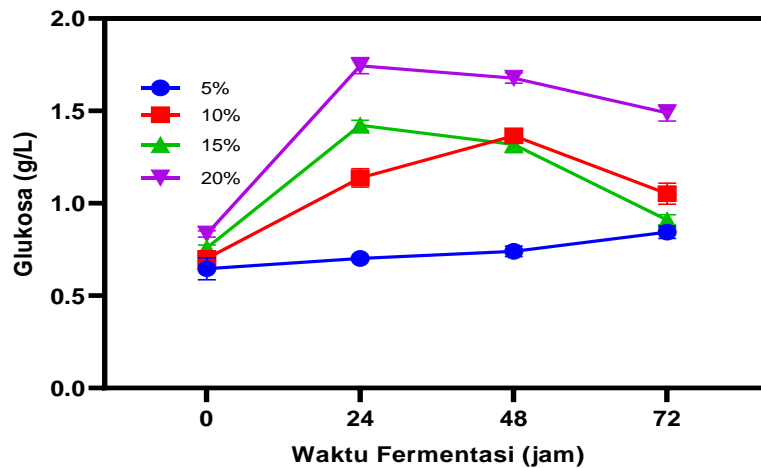


Gambar 5. Grafik hubungan konsentrasi dan waktu hidrolisis terhadap kandungan total gula

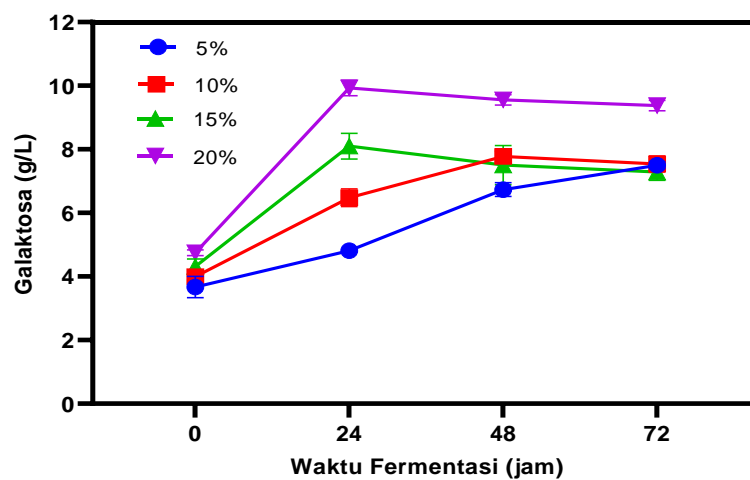
Gambar 5. menunjukkan hasil analisis total gula yang dihasilkan dari proses hidrolisis. Semua perlakuan menunjukkan hubungan linear dengan lama waktu hidrolisis kecuali perlakuan 5% konsentrasi substrat. Perlakuan 15% dan 20% menghasilkan gula optimum selama 24 jam hidrolisis yaitu masing-masing 3,33g/L dan 4,09g/L. Namun selanjutnya produksi gula menurun dengan meningkatnya lama waktu hidrolisis hingga 72 jam. Khusus untuk perlakuan pada konsentrasi substrat 10%, produksi gula mencapai titik maksimum pada hidrolisis selama 48 jam. Perlakuan 5% menunjukkan nilai yang paling rendah dengan peningkatan nilai yang tidak signifikan seiring lama waktu hidrolisis. Berdasarkan hasil analisis Two Way ANOVA dan uji lanjut Tukey menunjukkan perbedaan yang signifikan antar perlakuan. Perlakuan yang menunjukkan perbedaan yang nyata adalah perlakuan 5% dengan 10%, 5% dengan 15%, 5% dengan 20% dan 10% dengan 20%. Hasil total gula tertinggi ditunjukkan oleh perlakuan pada waktu hidrolisis 24 jam, yang menunjukkan perbedaan nyata antara perlakuan 15% dengan 20% seperti yang ditunjukkan pada Lampiran 1.

C. Fermentasi *K. alvarezii* menggunakan Khamir *S. fibuligera*

Kandungan gula tertinggi yang dihasilkan dari proses hidrolisis menggunakan *T. harzianum* yaitu perlakuan dengan konsentrasi inokulum 20% selama 24 jam. Tahap selanjutnya adalah proses fermentasi menggunakan khamir *S. fibuligera*. Perlakuan dalam tahap ini menggunakan variasi konsentrasi khamir 5%, 10%, 15% dan 20% dan waktu fermentasi dengan variasi 0 jam, 24 jam, 48 jam dan 72 jam. Hasil analisis menunjukkan monosakarida yang terbentuk dari proses fermentasi adalah glukosa dan galaktosa yang ditunjukkan pada Gambar 6.



(a)



(b)

Gambar 6. Grafik hubungan konsentrasi dan lama fermentasi terhadap kandungan glukosa (a) dan galaktosa (b)

Gambar 6 menunjukkan hasil fermentasi rumput laut yang menghasilkan monosakarida yaitu glukosa dan galaktosa. Sampel yang telah difermentasi menunjukkan kandungan glukosa yang meningkat dengan bertambahnya konsentrasi inokulum *S. fibuligera*. Perlakuan 15% dan 20% menunjukkan kandungan glukosa tertinggi dengan lama fermentasi 24 jam yaitu 1,74g/L dan 1,42g/L. Namun kandungan glukosa menurun seiring bertambahnya waktu fermentasi hingga 72 jam. Perlakuan 10% menunjukkan peningkatan kandungan glukosa hingga 48 jam dan menurun pada jam berikutnya. Untuk perlakuan dengan konsentrasi inokulum 5%, kandungan glukosa terus meningkat hingga lama fermentasi 72 jam. Hasil uji lanjut Tukey menunjukkan perbedaan yang nyata antar perlakuan. Untuk perlakuan dengan kandungan glukosa tertinggi ditunjukkan pada konsentrasi inokulum 20% yang berbeda nyata dengan konsentrasi 15% (Lampiran 2).

Hasil analisis kandungan galaktosa pada proses fermentasi menunjukkan kandungan tertinggi diperoleh pada perlakuan dengan konsentrasi inokulum 15% dan 20% selama 24 jam kemudian menurun hingga 72 jam. Untuk perlakuan dengan konsentrasi 5% menunjukkan peningkatan kandungan galaktosa yang terus meningkat hingga 72 jam. Berdasarkan hasil analisis Two way ANOVA dan uji lanjut Tukey hubungan waktu fermentasi dan konsentrasi inokulum terhadap kandungan glukosa dan galaktosa menunjukkan pengaruh yang nyata antar perlakuan ($P < 0.5$). Kandungan galaktosa tertinggi ditunjukkan pada perlakuan dengan konsentrasi inokulum 20% yang berbeda nyata dengan konsentrasi inokulum yang lainnya (Lampiran 3).

BAB V

PEMBAHASAN

A. Analisis karbohidrat rumput laut *K. alvarezii*

Komponen terbesar yang terkandung dalam rumput laut adalah karbohidrat. Karbohidrat tersusun atas molekul karbon, hidrogen dan oksigen yang berfungsi untuk menghasilkan energi di dalam tubuh. Polisakarida merupakan karbohidrat yang terbentuk dari banyak sakarida sebagai monomernya. Berdasarkan hasil analisis, kandungan karbohidrat adalah sebesar 55,58%. Karbohidrat disebut juga polisakarida merupakan gabungan dari monosakarida yang dihubungkan oleh ikatan glikosida. Contoh polisakarida adalah selulosa, hemiselulosa, glikogen, lignin, dan pati.

Pati merupakan bahan utama yang dihasilkan oleh tumbuhan untuk menyimpan kelebihan glukosa sebagai produk fotosintesis dalam jangka panjang. Kandungan pati tersusun dari dua macam karbohidrat, amilosa dan amilopektin, dalam komposisi yang berbeda-beda. Hasil analisis kandungan pati pada rumput laut *K.alvarezii* sangat tinggi yaitu sebesar 35,83%. Kandungan karbohidrat ini lebih tinggi dibandingkan dengan rumput laut jenis lain. Penelitian Tapotubun (2018) menunjukkan kandungan karbohidrat pada rumput laut jenis *Caulerpa lentillifera* sebesar 29,82%. Kandungan pati untuk jenis rumput laut *Ulva ohnoi* yaitu 21,4% dari total berat kering (Prabhu, 2019).

Selain pati, kandungan polisakarida yang tinggi dalam rumput laut adalah selulosa. Selulosa adalah salah satu biopolimer paling melimpah di alam dan merupakan komponen utama penyusun dinding sel tanaman (Borjesson & Westman, 2015) dan berasosiasi dengan polisakarida lain seperti hemiselulosa atau lignin (Holtzapple *et al.*, 2003). Rumput laut yang seluruh tubuhnya disebut

thallus juga memiliki dinding sel yang tersusun atas selulosa (Linder and Teeri, 1997). Hasil analisis kandungan selulosa pada rumput laut *K. alvarezii* adalah sebesar 12.21% lebih tinggi dari selulosa *Euchema cottonii* sebesar 7.11% yang dilaporkan oleh Kim *et al.* (2010), serta selulosa *Laminaria japonica* dan *Codium fragile* sebesar 6,7 % dan 10.9% oleh Kim *et al.* (2008). Milala *et al.* (2005) menyatakan bahwa kandungan selulosa dalam tumbuhan mencapai 40-50% dari massa tumbuhan.

Polisakarida yang tinggi pada rumput laut *K. alvarezii* dapat diubah menjadi gula sederhana dengan metode hidrolisis. Glukosa adalah bentuk gula sederhana yang digunakan tubuh untuk menghasilkan energi.

B. Analisis hubungan konsentrasi inokulum dan waktu hidrolisis

Pada penelitian ini, proses hidrolisis karbohidrat menjadi gula reduksi dilakukan dengan menggunakan mikroba *T. harzianum* dengan beberapa parameter konsentrasi dan waktu hidrolisis. Hidrolisis merupakan reaksi kimia yang memecah molekul menjadi dua bagian dengan penambahan molekul air dengan tujuan untuk mengkonversi polisakarida menjadi monomer-monomer sederhana. Selulosa merupakan penyusun utama dinding sel rumput laut yang dapat di degradasi menjadi gula sederhana dengan proses hidrolisis. Dalam kondisi normal, hanya beberapa reaksi yang terjadi selama proses hidrolisis, oleh karena itu perlu adanya katalisator yang dapat mempercepat terjadinya reaksi seperti penambahan asam, basa atau enzim. Enzim dapat bekerja 10^8 sampai 10^{11} kali lebih cepat dibandingkan laju reaksi tanpa katalis (Poedjadi, 2006).

Trichoderma harzianum menghasilkan enzim selulase yang dapat mendegradasi substrat selulotik menjadi gula (Jamil *et al.*, 2009). Penggunaan mikroba dalam hidrolisis memberikan keuntungan yaitu proses yang berlangsung cepat dan tidak menimbulkan senyawa toksik. Souza *et al.* (2018) menyatakan

bahwa β -glukosidase yang dihasilkan oleh strain *T. harzianum* lebih tinggi dibandingkan dengan *T. reesei* dengan menggunakan laktosa sebagai sumber karbon.

Pengaruh konsentrasi dan waktu hidrolisis terhadap kandungan gula reduksi ditunjukkan pada Gambar 5. Hasil analisis menunjukkan bahwa konsentrasi inokulum dan waktu hidrolisis berpengaruh sangat nyata terhadap gula reduksi dan terdapat interaksi yang nyata antar kedua perlakuan tersebut. Gula reduksi tertinggi adalah 4,09 g/L diperoleh dari konsentrasi inokulum 20% dan waktu hidrolisis 24 jam. Sedangkan gula reduksi terendah adalah 1,51 g/L pada perlakuan konsentrasi inokulum 5% dan waktu hidrolisis 0 jam.

Gambar 5 menunjukkan adanya kecenderungan kadar gula reduksi terus meningkat seiring meningkatnya konsentrasi inokulum. Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas *T. harzianum* dalam menghidrolisis selulosa menjadi gula reduksi meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi inokulum. Kandungan selulosa yang tinggi pada rumput laut merupakan sumber karbon yang dibutuhkan untuk memperoleh energi untuk pertumbuhan *T. harzianum* dalam menghasilkan enzim selulase dan mendegradasi selulosa menjadi gula sederhana. Ul-Haq *et al.* (2005) menyatakan *Trichoderma* sp. adalah penghasil selulase dan crude enzim. *T. harzianum* merupakan jamur potensial dalam menghasilkan enzim selulase yang dapat menghidrolisis ikatan β -glukosidase (cellobiase) yang mengurai selobiosa untuk menghasilkan glukosa (Wang *et al.*, 2019). *T. harzianum* juga menghasilkan tingkat aktivitas selulolitik dan aktivitas β -glukosidase yang lebih tinggi dibandingkan *T. reesei* (Souza *et al.*, 2018).

Karbohidrat yang terkandung dalam rumput laut *K. alvarezii* merupakan media aplikatif untuk pertumbuhan *Trichoderma*. Tingginya unsur selulosa dan pati dalam suatu bahan dapat menjadi sumber nutrisi yang potensial untuk pertumbuhan *T. harzianum*. Konsentrasi inokulum sebesar 20% yang

diinokulasikan ke media rumput laut dapat menghasilkan enzim selulase yang tinggi sehingga mampu mendegradasi karbohidrat menjadi gula sederhana. Brijwani *et al.* (2010) menyatakan bahwa kemampuan *T. harzianum* menghasilkan enzim ditentukan oleh sumber nitrogen dan karbon yang menjadi media pertumbuhannya. Perlakuan dengan konsentrasi inokulum 10% menunjukkan total gula tertinggi pada jam ke 48 (Gambar 5), hal ini disebabkan karena konsentrasi inokulum yang lebih sedikit memerlukan waktu yang lebih lama untuk menghasilkan gula. Hasil penelitian Yong *et al.* (2018) menunjukkan jerami padi sebagai substrat pertumbuhan *T. harzianum* berpotensi memproduksi selulase dan xilanase. Konsentrasi substrat yang lebih tinggi menunjukkan lebih banyak jumlah molekul substrat yang terlibat dengan aktivitas enzim. Sedangkan konsentrasi substrat yang rendah berarti lebih sedikit jumlah molekul substrat yang dapat melekat pada enzim sehingga menyebabkan berkurangnya aktivitas enzim.

Menurut Triantarti (2009), aktivitas metabolisme yang tinggi akan mengakibatkan proses perbanyakan sel dan produksi metabolit yang tinggi juga seiring dengan meningkatnya ketersediaan nutrisi dan sumber karbon dalam media pertumbuhannya. Dengan demikian maka tingginya kadar glukosa menunjukkan aktivitas selulolitik yang tinggi pula.

Lama waktu hidrolisis mempengaruhi total gula yang dihasilkan. Hal ini berhubungan dengan aktivitas *T. harzianum* yang mampu menghasilkan enzim selulase untuk mendegradasi karbohidrat menjadi gula sederhana. Gambar 5 Menunjukkan pada perlakuan dengan konsentrasi 15% dan 20% menunjukkan peningkatan yang signifikan pada lama inkubasi 24 jam dan menurun pada jam berikutnya. Hal ini menunjukkan bahwa enzim selulase yang dihasilkan oleh *T. harzianum* hanya mampu bekerja maksimum selama 24 jam. Pada perlakuan 48

jam dan 72 jam aktivitas enzim menurun yang ditunjukkan oleh penurunan kadar gula reduksi.

Peningkatan kadar gula reduksi dari 0 jam ke 24 jam menunjukkan aktivitas *T. harzianum* dalam menghasilkan enzim selulosa untuk mendegradasi karbohidrat dari rumput laut *K. alvarezii*. Perlakuan dengan konsentrasi 20% inokulum menjadi sumber nutrisi yang besar bagi *T. harzianum* dalam menghasilkan enzim. Pada awal proses hidrolisis, masih banyak sumber nutrisi bagi *T. harzianum* yang tersedia. Setelah 24 jam, nutrisi pertumbuhan bagi *T. harzianum* berkurang karena telah digunakan untuk menghasilkan enzim untuk mendegradasi karbohidrat rumput laut. Hal ini menyebabkan konsentrasi enzim menjadi tidak seimbang sehingga menyebabkan kinerja enzim juga menurun.

Perlakuan dengan konsentrasi 20% inokulum setelah 24 jam menunjukkan jumlah gula reduksi hasil dari proses hidrolisis menurun. Hal ini disebabkan oleh akumulasi produk akhir dari proses hidrolisis yang menghambat kinerja enzim selulase (Binot *et al.*, 2019). Chen dan Jin (2006) menyatakan glukosa dan etanol adalah produk akhir yang dapat menghambat kinerja selulase. Pada konsentrasi substrat rumput laut tetap, laju reaksi enzimatik meningkat sebanding dengan meningkatnya konsentrasi enzim. Hal ini berarti makin banyak enzim sampai batas tertentu, makin banyak substrat yang terkonversi karena makin tinggi aktivitas enzim. Karena enzim bersifat spesifik terhadap substrat maka konsentrasi yang berlebihan juga akan mempengaruhi laju reaksi enzimatik. Hal ini berarti bahwa pada konsentrasi substrat tinggi dapat menyebabkan penghambatan substrat, yang secara substansial menurunkan laju hidrolisis. Tingkat penghambatan substrat tergantung pada rasio total substrat hingga total enzim.

C. Analisis hubungan konsentrasi khamir dan waktu fermentasi

Pada penelitian ini, setiap perlakuan dilakukan tiga kali ulangan untuk melihat pengaruh konsentrasi dan lama fermentasi terhadap kandungan glukosa dan galaktosa. Hal ini menunjukkan bahwa pada saat 0 jam belum terjadi proses fermentasi. Pengukuran gula dilakukan setiap 24 jam. Proses fermentasi mulai berlangsung setelah 0 jam dan meningkat pada lama fermentasi 24 jam dan kecenderungan menurun setelah 48 dan 72 jam pada masing-masing perlakuan.

Kandungan glukosa dan galaktosa tertinggi ditunjukkan pada perlakuan dengan konsentrasi inokulum 20% dengan waktu fermentasi 24 jam. Hal ini menunjukkan bahwa *S. fibuligera* memiliki kemampuan untuk menghasilkan enzim yang mampu mendegradasi pati menjadi gula sederhana. Hostinova (2002) menyatakan bahwa *S. fibuligera* mampu memproduksi dua enzim amilase yaitu α -amilase dan glukoamilase. Beberapa strain *S. fibuligera* membebaskan α -amilase dan glukoamilase, sedangkan yang lain hanya menghasilkan amilase. (son *et al.*, 2018).

Pada penelitian ini menunjukkan nilai kandungan galaktosa lebih tinggi daripada glukosa. Hal ini menunjukkan bahwa *S. fibuligera* memanfaatkan glukosa sebagai nutrisi terlebih dahulu untuk pertumbuhan. Lee *et al.* (2016) menyatakan bahwa gula dikonsumsi sebagai sumber karbon untuk menyediakan energi mikroba untuk pertumbuhan mikroorganisme melalui jalur metabolisme karbohidrat. Shudakar (2020) menambahkan, glukosa dikonsumsi langsung oleh ragi melalui jalur glikolitik sedangkan galaktosa membutuhkan jalur menengah sebelum jalur glikolitik untuk konversi. Galaktosa cenderung memiliki indeks glikemik yang rendah sehingga sehat untuk dikonsumsi.

Saccharomycopsis fibuligera dapat memproduksi α -amilase dan glukoamilase. Glukoamilase memiliki aktivitas tinggi terhadap α -1,6-keterkaitan dalam pati (Gonzales, 2008), yang dapat menghasilkan akumulasi glukosa dalam

jumlah besar melalui hidrolisis pati. Dengan aktivitas amilase yang lebih tinggi maka akumulasi gula pereduksi lebih cepat dalam kultur sel bebas selama awal 24 jam (Wang *et al.*, 2018).

Kandungan glukosa dan galaktosa tertinggi ditunjukkan pada perlakuan 20% konsentrasi khamir dengan lama fermentasi 24 jam. Hal ini menunjukkan bahwa *S. fibuligera* bekerja maksimal selama 24 jam dan aktivitasnya akan menurun seiring berjalannya proses fermentasi. Wang *et al.* (2018) menyatakan aktivitas amilase yang lebih tinggi akan mengakumulasi gula pereduksi lebih cepat dalam kultur sel bebas selama awal 24 jam. Khamir *S. fibuligera* dapat hidup pada media yang mengandung polisakarida dan disakarida. Hal ini didukung oleh penelitian dari Gonzales (2008) bahwa khamir *S. fibuligera* yang ditumbuhkan pada media tepung singkong, telah menguraikan pati dari tepung singkong menjadi gula sederhana dan menghasilkan enzim α -amilase.

Penelitian tentang produksi biosugar telah banyak dilakukan oleh beberapa peneliti sebelumnya. Metode kombinasi merupakan penyempurnaan dari metode yang dilakukan oleh peneliti sebelumnya. Penelitian ini menggunakan metode hidrolisis yang merupakan metode yang paling umum dilakukan kemudian dikombinasikan dengan fermentasi. Penggunaan kapang *T. harzianum* dalam proses hidrolisis mampu mendegradasi karbohidrat dari *K. alvarezii* menjadi gula sederhana dengan kandungan total gula yaitu 4,09 g/L. Setelah dihidrolisis kemudian difermentasi menggunakan *S. fibuligera* mampu menghasilkan 9,93 g/L galaktosa dan 1,74 g/L glukosa. Hal ini menunjukkan nilai yang cukup tinggi dibanding penelitian lain. Abd.Rahim *et al.* (2014) menunjukkan hasil penelitian dengan menggunakan rumput laut *K. alvarezii* sebanyak 8% mampu menghasilkan 49,8 g/L gula reduksi. Metode yang digunakan adalah metode kombinasi hidrolisis asam H_2SO_4 dan enzim *celluclast*. Tingginya gula reduksi yang dihasilkan disebabkan karena hydroxymethylfurfural

yang merupakan *by-product* dideteksi sebagai gula reduksi jika diukur menggunakan metode DNS.

Hasil penelitian Kim *et al.* (2015) menggunakan rumput laut *Gracilaria verrucosa* sebanyak 2% mampu menghasilkan 8,53 g/L gula reduksi dengan minimum *by-product*. Metode yang digunakan adalah kombinasi hidrolisis asam dan enzim. Asam yang digunakan adalah asam (H_2SO_4 dan HCL) dan enzim Cellic Ctec. Wu *et al.* (2014) dan Ra *et al.* (2013) memproduksi biosugar dari rumput laut untuk digunakan sebagai bahan untuk pembuatan ethanol. Oleh karena itu metode yang digunakan sangat penting untuk dapat menghasilkan kandungan gula yang tinggi.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan bahwa :

1. Konsentrasi inokulum 20% dengan waktu hidrolisis 24 jam menunjukkan keadaan optimum dalam menghasilkan total gula yaitu sebesar 4,09 g/L.
2. Kandungan gula tertinggi yang dihasilkan dari proses fermentasi menggunakan *S. fibuligera* yaitu perlakuan dengan konsentrasi inokulum 20% selama 24 jam.
3. Monosakarida yang terbentuk hasil dari kombinasi hidrolisis dan fermentasi adalah glukosa dan galaktosa.

B. Saran

Disarankan untuk menggunakan waktu 24 jam dalam proses hidrolisis dan fermentasi. Penggunaan rumput laut jenis lain perlu dilakukan untuk melihat kemampuan metode ini dalam menghasilkan bosugar.

DAFTAR PUSTAKA

- Abd-Rahim, F., Wasoh, H., Zakaria, M.R., Ariff, A., Kapri, R., Ramli, N., Siew-Ling, L. 2014. Production of high yield sugars from *Kappaphycus alvarezii* using combined methods of chemical and enzymatic hydrolysis. *Food Hydrocolloids* 42 (2), 309–315.
- Abirami, R. G. & Kowsalya, S. 2011. Nutrient and Nutraceutical Potentials of Seaweed Biomass *Ulva lactuca* and *Kappaphycus alvarezii*. *Journal of Agricultural Science and Technology*. 5(23): 111-115.
- Asni, A. 2015. Analisis Produksi Alga Laut (*Kappaphycus alvarezii*) Berdasarkan Musim dan Jarak Lokasi Budidaya di Perairan Kabupaten Bantaeng. *Jurnal Akuatika*. 4(2): 1-14.
- Ap, A. A. 2016. Estimasi Produksi Alga laut *Eucheuma* sp. di Teluk Mallasoro Kabupaten Jeneponto Menggunakan Citra Landsat-8. Skripsi. Makassar: Universitas Hasanuddin.
- Ayoola, A. A., Adeeyo, O. A., Efevbokhan, V. C., Ajileye, O. 2012. A Comparative Study on Glucose Production from *Sorghum Bicolor* and *Manihot Esculenta* Species in Nigeria. *Intl. J. Sci. Technol.* 2: 353-357
- Binod, P., Sindhu, R., Janu, K. U., & Pandey, A. 2019. Hydrolysis of Cellulosic and Hemicellulosic Biomass. *Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes for the Production of Liquid and Gaseous Biofuels*, 447–460. doi:10.1016/b978-0-12-816856-1.00019-1
- Borines, M.G., de Leon, R.L., Cuello, J.L. 2013. Bioethanol production from the macroalgae *Sargassum* spp.. *Bioresour. Technol.* 138, 22–29.
- Börjesson, M., & Westman, G. 2015. Crystalline nanocellulose—preparation, modification, and properties. In *Cellulose-fundamental aspects and current trends*: IntechOpen.
- Brijwani, K., Oberoi, H.S., Vadlani, P.V. 2010. Production of a cellulolytic enzymes system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. *Process Biochem.* 45, 120–128.
- Carvalho, A.F.A.; de Oliva Neto, P.; da Silva, D.F.; Pastore, G.M. 2013. Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. *Food Res. Int.*, 51, 75–85.
- Castelar, B., Reis, P. R., Moura, L. A. & Kirk, R. 2009. Invasive Potential of *Kappaphycus alvarezii* Off The South Coast Of Rio De Janeiro State, Brazil: A Contribution to Environmentally Secure Cultivation in The Tropics. *Botanica Marina*. 52:283-289.
- Chaverri, P., Castlebury, L.A., Samuels, G.J., Geiser, D.M. 2003. Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum*/Hypocrea lixii complex. *Mol. Phylogenet. Evol.* 27 (2), 302–313.
- Chang, V., Patrick, N. O., Swee-Sen, T. 2017. The Properties Of Red Seaweed (*Kappaphycus Alvarezii*) And Its Effect On Mammary Carcinogenesis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 296-301.

- Chi, Z., Zhe, C., Guaang, L., Fang, W., Liang, J., Tong, Z. 2009. *Saccharomycopsis fibuligera* and it's Applications in Biotechnology. *Research review paper Biotechnology Advances*. 27: 423–431.
- Danielson RM, Davey CB. 2002. Non nutritional factors affecting the growth of *Trichoderma* in culture. *Soil Biol Chem* 5:495-504.
- Dinas Kelautan dan Perikanan. 2018. Data Produksi Hasil Perikanan Provinsi Sulawesi Selatan. Data Statistik Dinas Kelautan Perikanan Provinsi Sulawesi Selatan Tingkat 1.
- Doty M.S. 1985. *Eucheuma* Farming for Carrageenan-sea grant advisory report. New Jersey : Prentice-Hall
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances, *Anal. Chem*. 28: 350-356.
- Edama, N. A., Alawi, S., Siti, N., Abd. R. 2014. Enzymatic Saccharification of Tapioca Processing Wastes Into Biosugars Through Immobilization Technology. *Biofuel Research Journal*. 1: 2-6
- Ega, L., Lopulalan, C., Melyasa, F. 2016. Kajian mutu karaginan rumput laut *Euchemia cottonii* berdasarkan sifat fisiko-kimia pada tingkat konsentrasi kalium hidroksida (KOH) yang berbeda. *Jurnal aplikasi teknologi pangan* 5 (2). Indonesian food technologies
- FAO. 2018. *The Global Status of Seaweed Production, Trade and Utilization* Vol. 124. Roma.
- Gen Q., Qi, W. and Zhen-Ming C. 2014. Direct conversion of cassava starch into single cell oil by co-cultures of the oleaginous khamir *Rhodospiridium toruloides* and immobilized amylases-producing khamir *Saccharomycopsis fibuligera*. *Renewable Energy*. 62(5): 522-526.
- Giannone, V., Pitino, I., Pecorino, B., Todaro, A., Spina, A., Lauro, M.R., Tomaselli, F., Restuccia, C. 2016. Effects of innovative and conventional sanitizing treatments on the reduction of *Saccharomycopsis fibuligera* defects on industrial durum wheat bread. *International Journal of Food Microbiology*. 235 : 71–76.
- González CF, Fariña JI, de Figueroa LIC. 2008. Optimized amylolytic enzymes production in *Saccharomycopsis fibuligera* DSM-70554 An approach to efficient cassava starch utilization. *Enzyme Microb Technol*;42:272–7
- Hasan, K., Ismaya, W. T., Kardi, I., Andiyana, Y., Kusumawidjaya, S., Ishmayana, S., Soemitro, S. 2008. Proteolysis of α -amylase from *Saccharomycopsis fibuligera*: Characterization of Digestion Products. *Section Cellular and Molecular Biology*. 63(1987). 1044–1050.
- <https://kkp.go.id/artikel/16505-genjot-nilai-ekspor-kkp-targetkan-produksi-10-99-juta-ton-rumput-laut-di-2020>. Admin kkp. 2020. Genjot Nilai Ekspor, KKP Targetkan Produksi 10,99 Juta Ton Rumput Laut di 2020 Diposting pada tanggal 18 januari 2020. Diakses pada tanggal 17 Mei 2020.
- <https://statistik.kkp.go.id/home.php?m=total&i=2#panel-footer>. Data Statistik Produksi perikanan. 2019. Diakses pada tanggal 17 Mei 2020.

- Holtzapfle, M.T. 2003. Hemicelluloses. In Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. pp. 3060-3071. Academic Press.
- Hostinová, E. 2002. Amylolytic Enzymes Produced by the Khamir *Saccharomycopsis fibuligera*. *Biologia Bratislava*. 11. 247–251.
- H. Chen, S. Jin. 2006. Effect of ethanol and khamir on cellulase activity and hydrolysis of crystalline cellulose, *Enzym. Microb. Technol.* 39.1430–1432.
- Irawan, M. A. 2007. Glukosa dan Metabolisme Energi. Polton Sports Science & Performance Lab.
- Irawan, M. A. 2007. Karbohidrat. Polton Sports Science & Performance Lab.
- Jamil, A., Ahmed, S., & Al, E. T. 2009. Production and Purification of Cellulose-Degrading Enzymes From a Filamentous Fungus. *Pak. J. Bot.*, 41(3), 1411–1419.
- Khambhaty, Y., Mody, K., Gandhi, M.R., Thampy, S., Maiti, P., Brahmabhatt, H., Eswaran, K., Ghosh, E.K. 2012. *Kappaphycus alvarezii* as a source of bioethanol. *Bioresour. Technol.* 103, 180–185.
- Khatri, K., Rathore, M. S., Agrawal, S., & Jha, B. 2019. Sugar contents and oligosaccharide mass profiling of selected red seaweeds to assess the possible utilization of biomasses for third-generation biofuel production. *Biomass and Bioenergy*, 130, 105392. doi:10.1016/j.biombioe.2019.105392
- Kim, S. W., Hong, C., Jeon, S. & Shin, H. 2015. High-yield Production of Biosugars from *Gracilaria verrucosa* by Acid and Enzymatic Hydrolysis Processes. *Bioresource Technology*. 196: 634–641.
- Laskin Al, Bennett JW, Gadd GM. *Advances in Applied Microbiology*. San Diego: Elsevier Academic Press. Hlm 314.
- Lee, H., Lee, Y.M., Heo, Y.M., Lee, H., Hong, J.H., Jang, S., Min, M., Lee, J., Kim, J.S., Kim, G.H., Kim, J.J., 2015. Optimization of endoglucanase production by *Trichoderma harzianum* KUC1716 and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Bioresources* 10 (4), 7466–7476.
- Lee, Sang-Bum, Sung-Koo, K., Yong-Ki, H., Gwi-Taek, J. 2016. Optimization of the Production of Platform Chemicals and Sugars from the Red Macroalga, *Kappaphycus alvarezii*. *Jurnal Alga Research*. 13: 303-310.
- Linder M, Teeri TT .1996. Cellulose binding domain of the major cellobiohydrolase of *Trichoderma reesei* exhibits true reversibility and a high exchange rate on crystalline cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 12251-12258.
- Luthfy, S. 1988. Mempelajari Ekstraksi Karagenan Dengan Metode Semi Refined dari *Euclima cottonii*, Fakultas Teknologi Pertanian IPB. Bogor
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Sthal, D. A., Clark, D. P. 2012. Brock, Biology of Microorganisms, Thirteenth Edition. Pearson Education. San Francisco

- Mahatama, E & Farid, M. 2013. Daya Saing dan Saluran Pemasaran Alga Laut: Kasus Kabupaten Jeneponto, Sulawesi Selatan. Buletin Ilmiah Litbang Perdagangan. 7(1): 55-72.
- Mahyati dan Octavianus SR Pasanda. 2016. Produksi Fruktosa dari Tongkol Jagung Sebagai Gula Rendah Kalori. Jurnal INTEK. Jurusan Teknik Kimia PNUP.
- Mandawat, P., 2016. Hydrolysis of Algal Biomass To Recover Nutrients and Sugar. Indian Institute of Technology Roorke. Indian.
- Maeda, R.N., Serpa, V.I., Rocha, V.A.L., Mesquita, R.A.A., Santa Anna, L.M.M., de Castro, A.M., Driemeier, C.E., Pereira, N., Polikarpov, I., 2011. Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases. Process Biochem. 46 (5), 1196–1201.
- Meinita, M.D.N., Kang, J.Y., Jeong, G.T., Koo, H.M., Park, S.M., Hong, Y.K., 2012. Bioethanol production from the acid hydrolysate of the carrageenophyte *Kappaphycus alvarezii* (cottonii). J. Appl. Phycol. 24 (4), 857–862.
- Meinita, M.D.H., Marhaeni, B., Winanto, T., Jeong, G.T., Khan, M.N.A.K., Hong, Y.K., 2013. Comparison of agarophytes (*Gelidium*, *Gracilaria*, and *Gracilariopsis*), as potential resources for bioethanol production. J. Appl. Phycol. 25 (6), 1957–1961.
- Milala, M.A., Shugaba, A., Gidado, A., Ene, A.C. and Wafar, J.A., 2005. Studies on the use of Agricultural waste for cellulase Enzyme production by *Aspergillusniger*. Journal of Agriculture and Biological Science 1 (4):325 - 328.
- Olanbiwoninu, A. A., Odunfa, S. A., 2012. Enhancing the Poduction of Reducing Sugars From Cassava Peels by Pretreatment Methods. Intl. J. Sci. Technol. 2: 650-657.
- Parenrengi, A. Syah,R dan Suryati, E. 2010. Budidaya Rumput Laut Penghasil Karaginan (karaginofit). Balai Riset Perikanan Budidaya Air Payau. Badan Penelitian dan Pengembangan Kelautan dan Perikanan. Kementerian Kelautan dan Perikanan, Jakarta.
- M.H. Penner, E.T. Liaw. 1994. Kinetic consequences of high ratios of substrate to enzyme saccharification systems based on *Trichoderma* cellulase, in: M.E. Himmel, J.O. Baker, R.P. Overend (Eds.), Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production, American Chemical Society, Washington, DC, pp. 363–371.
- Poedjiadi, Anna. 2006. Dasar-dasar Biokimia, Universitas Indonesia PRESS, Jakarta.
- Prasetyowati Jasmin dan Agustiawan P. 2008. Pembuatan Tepung Karaginan dari Rumput Laut (*Euchema cottonii*) Berdasarkan perbedaan metode pengendapan. Jurnal Teknik Kimia. Volume : 15.
- Prabhu, M., Chemodanov, A., Gottlieb, R., Kazir, M., Nahor, O., Gozin, M., Israel, A., Livney, Y. D., & Golberg, A. 2019. Starch from the sea: The green macroalga *Ulva ohnoi* as a potential source for sustainable starch

- production in the marine biorefinery. *Algal Research*, 37(November 2018), 215–227. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.11.007>
- Puspawati, S., Wagiman, Makhmudun, A., Darmawan, A. N. & Haslianti. 2015. The Production Of Bioethanol Fermentation Substrate From *Eucheuma Cottonii* Seaweed Through Hydrolysis By Cellulose Enzyme. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*. 3: 200 – 205.
- Ra, C. H., Jeong, G.-T., Shin, M. K., & Kim, S.-K. 2013. Biotransformation of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) by *Scheffersomyces stipitis* during ethanol fermentation of hydrolysate of the seaweed *Gelidium amansii*. *Bioresource Technology*, 140, 421–425. doi:10.1016/j.biortech.2013.04.122
- Rahmawati, N., Retni S Budiarti, dan Harlis. 2017. Kajian Pembuatan Gula Cair Berbahan Dasar Kulit Singkong dengan Pemanfaatan Bakteri *Bacillus licheniformis*. Jurusan MIPA. Universitas Jambi.
- Rifai, M. A. 1969. A revision of the *Trichoderma*. *Mycol. Paper*. 116:56 pp.
- Samuels GJ, *et al.* *Trichoderma Online*, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA
- Sandi, Y. A., Wiwik, S. R., dan Yenni C. 2016. Hidrolisis Alga Laut (*Glacilaria* sp.) Menggunakan Katalis Enzim dan Asam untuk Pembuatan Bioetanol. *Jurnal Kimia*. 10(1): 7-14
- Saravanan, K., Duraisamy, S., Ramasamy, G., Kumarasamy, A., & Balakrishnan, S. 2018. Evaluation of the saccharification and fermentation process of two different seaweeds for an ecofriendly bioethanol production. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 14, 444–449. doi:10.1016/j.bcab.2018.03.017
- Soesanto, L. 2004. Ilmu Penyakit Pascapanen: Sebuah Pengantar. Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto.
- Solorzano-Chavez, E. G., Paz-Cedeno, F. R., Ezequiel de Oliveira, L., Gelli, V. C., Monti, R., Conceição de Oliveira, S., & Masarin, F. 2019. Evaluation of the *Kappaphycus alvarezii* growth under different environmental conditions and efficiency of the enzymatic hydrolysis of the residue generated in the carrageenan processing. *Biomass and Bioenergy*, 127, 105254. doi:10.1016/j.biombioe.2019.105254
- Son, E. Y., Lee, S. M., Kim, M., Seo, J.-A., & Kim, Y.-S. 2018. Comparison of volatile and non-volatile metabolites in rice wine fermented by Koji inoculated with *Saccharomycopsis fibuligera* and *Aspergillus oryzae*. *Food Research International*, 109, 596–605. doi:10.1016/j.foodres.2018.05.008
- Souza, M. F. de, Silva, A. S. da, & Bon, E. P. S. 2018. A novel *Trichoderma harzianum* strain from the Amazon Forest with high cellulolytic capacity. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 14, 183–188.
- Sudhakar, M. P., Arunkumar, K., & Perumal, K. 2020. Pretreatment and process optimization of spent seaweed biomass (SSB) for bioethanol production using khamir (*Saccharomyces cerevisiae*). *Renewable Energy*. doi:10.1016/j.renene.2020.02.032

- Sulfahri, Amin, M., Sumitro, S.B., & Murni, S. 2016. Bioetanol Alga Spirogyra, Bahan Bakar Masa Depan. Yogyakarta.Leutikaprio
- Surni, W., 2014. Pertumbuhan Alga laut (*Euclima Cottonii*) pada Kedalaman Air Laut yang Berbeda di Dusun Kotania Desa Eti Kecamatan Seram Barat Kabupaten Seram Bagian Barat. *Biopendix*. 1(1): 92.
- Susmiati, Y. 2010. Rekayasa Proses Hidrolisis Pati dan Serat Ubi Kayu untuk Produksi Bioetanol. Sekolah Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Tapotubun AM. 2018. Komposisi kimia rumput laut *Caulerpa lentillifera* dari Perairan Kei Maluku dengan metode pengeringan berbeda. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 21(1): 13-23.
- Triantarti. 2009. Optimalisasi pH dan Suhu Sukrosa dengan Enzim Invertase pada Pembuatan Sirup Invert. *Jurnal Sains FMIPA Universitas Negeri Malang*, No 1, Vol 38, Juli-2009.
- Ul-Haq, I., Javed, M. M., Khan, T. S., & Siddiq, Z. 2005. Cotton Saccharifying Activity of Cellulases Produced by Co-culture of *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride*. *Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 1(3), 241–245.
- UN Comtrade Database, <http://comtrade.un.org/data/>
- Vanegas, C.H.; Hernon, A.; Bartlett, J. Enzymatic and organic acid pretreatment of seaweed: Effect on reducing sugars production and on biogas inhibition. *Int. J. Ambient Energy* 2015, 36, 2–7.
- Wang, H., Zhai, L., & Geng, A. 2019. Enhanced cellulase and reducing sugar production by a new mutant strain *Trichoderma harzianum* EUA20. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. doi:10.1016/j.jbiosc.2019.08.016
- Wang, S.-K., Wang, X., Tian, Y.-T., Tao, H.-H., & Sun, X.-S. 2018. Direct utilization of starch for heterotrophic cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* by co-culture with immobilized *Saccharomyces fibuligera*. *Algal Research*, 33, 406–411
- Wijffels, R.H., Barbosa, M. J., and Eppink, M.H.M. 2010. Microalgae for The Production fo Bulk Chemicals and Biofuels. *Biofuels Bioprod Biorefin*. 4: 28-795.
- Winarno, F. G. 2004. Kimia Pangan dan Gizi. Gramedia. Jakarta
- Wiratmaja, I. G., I. G. B. Wijaya, K., dan I. N. Suprpta, W. 2011. Pembuatan Etanol Generasi Kedua Dengan Memanfaatkan Limbah Rumput Laut *Euclima Cottonii* Sebagai Bahan Baku. *Jurnal Ilmiah Teknik Mesin*.5(1): 75-84.
- Woiciechowski, A. L., Nitsche, S., Pandey, A., Ricardo, C. 2002. Acid and Enzymatic Hydrolysis to Recover Reducing Sugars from Cassava Bagasse: an Economic Study. *J. Braz. Arch. Biol. Technol*. 45: 393-400

- Wu, F.-C., Wu, J.-Y., Liao, Y.-J., Wang, M.-Y., & Shih, I.-L. (2014). Sequential acid and enzymatic hydrolysis in situ and bioethanol production from *Gracilaria* biomass. *Bioresource Technology*, 156, 123–131. doi:10.1016/j.biortech.2014.01.024
- Yong Syuan, K., Ong Gaik Ai, L., & Kim Suan, T. 2018. Evaluation of cellulase and xylanase production from *Trichoderma harzianum* using acid-treated rice straw as solid substrate. *Materials Today: : Proceedings*, 5(10), 22109–22117. doi:10.1016/j.matpr.2018.07.077
- Yoonan, K., Kongkiattikajorn, J. 2004. A Study of Optimal Conditions for Reducing Sugars Production From Cassava Peels by Diluted Acid and Enzymes. *Kasetsart J.: Nat. Sci.* 38: 29-35
- Zhu, S., Huang, W., Wang, K., Chen, Q., Wu, Y. 2015. Pretreatment of Rice Straw for Ethanol Production by a Two-step Process Using Dilute Sulfuric Acid and Sulfomethylation Reagent. *Appl Energy*. 154:190–6

LAMPIRAN

Lampiran 1. Uji Tukey Hidrolisis

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant	Adjusted P Value
0				
5% vs. 10%	-0.1333	-0.5953 to 0.3286	No	0.4061
5% vs. 15%	-0.2666	-0.7286 to 0.1953	No	0.1382
5% vs. 20%	-0.4444	-1.060 to 0.1716	No	0.0924
10% vs. 15%	-0.1333	-0.1333 to -0.1333	Yes	<0.0001
10% vs. 20%	-0.3111	-0.4651 to -0.1570	Yes	0.0128
15% vs. 20%	-0.1778	-0.3318 to -0.02371	Yes	0.038
24				
5% vs. 10%	-1.022	-1.330 to -0.7143	Yes	0.0046
5% vs. 15%	-1.689	-1.997 to -1.381	Yes	0.0004
5% vs. 20%	-2.444	-3.000 to -1.889	Yes	0.0016
10% vs. 15%	-0.6667	-1.200 to -0.1334	Yes	0.0325
10% vs. 20%	-1.422	-2.280 to -0.5650	Yes	0.0187
15% vs. 20%	-0.7556	-1.163 to -0.3482	Yes	0.0151
48				
5% vs. 10%	-1.467	-1.929 to -1.005	Yes	0.0051
5% vs. 15%	-1.356	-1.663 to -1.048	Yes	0.0016
5% vs. 20%	-2.2	-2.662 to -1.738	Yes	0.001
10% vs. 15%	0.1111	-0.5602 to 0.7824	No	0.7051
10% vs. 20%	-0.7333	-0.7336 to -0.7331	Yes	<0.0001
15% vs. 20%	-0.8444	-1.516 to -0.1734	Yes	0.0321
20%				
5% vs. 10%	-0.4889	-1.105 to 0.1271	No	0.0774
5% vs. 15%	-0.1556	-0.7108 to 0.3997	No	0.4217
5% vs. 20%	-1.511	-2.066 to -0.9559	Yes	0.0073
10% vs. 15%	0.3333	-0.1286 to 0.7953	No	0.0924
10% vs. 20%	-1.022	-1.176 to -0.8682	Yes	<0.0001
15% vs. 20%	-1.356	-1.663 to -1.048	Yes	0.0016

Lampiran 2. Uji Tukey Glukosa

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant	Adjusted P Value
0				
5% vs. 10%	-0.324	-1.446 to 0.7985	No	0.4061
5% vs. 15%	-0.648	-1.770 to 0.4745	No	0.1382
5% vs. 20%	-1.079	-2.571 to 0.4134	No	0.0921
10% vs. 15%	-0.324	-0.3240 to -0.3240	Yes	<0.0001
10% vs. 20%	-0.7547	-1.124 to -0.3850	Yes	0.0125
15% vs. 20%	-0.4307	-0.8003 to -0.06104	Yes	0.0373
24				
5% vs. 10%	-1.667	-2.653 to -0.6800	Yes	0.0181
5% vs. 15%	-3.287	-3.652 to -2.921	Yes	<0.0001
5% vs. 20%	-5.121	-6.459 to -3.782	Yes	0.0029
10% vs. 15%	-1.62	-2.916 to -0.3239	Yes	0.0325
10% vs. 20%	-3.454	-5.536 to -1.372	Yes	0.0187
15% vs. 20%	-1.834	-2.827 to -0.8414	Yes	0.0152
48				
5% vs. 10%	-1.04	-2.441 to 0.3611	No	0.0877
5% vs. 15%	-0.77	-1.683 to 0.1426	No	0.069
5% vs. 20%	-2.822	-4.223 to -1.421	Yes	0.0129
10% vs. 15%	0.27	-1.361 to 1.901	No	0.7049
10% vs. 20%	-1.782	-1.782 to -1.782	Yes	<0.0001
15% vs. 20%	-2.052	-3.683 to -0.4211	Yes	0.0321
72				
5% vs. 10%	-0.03733	-0.6156 to 0.5410	No	0.9642
5% vs. 15%	0.2173	-0.5578 to 0.9924	No	0.4214
5% vs. 20%	-1.872	-2.241 to -1.503	Yes	0.0007
10% vs. 15%	0.2547	-1.006 to 1.516	No	0.6012
10% vs. 20%	-1.835	-2.326 to -1.343	Yes	0.0032
15% vs. 20%	-2.089	-2.884 to -1.295	Yes	0.0078

Lampiran 3. Uji Tukey Galaktosa

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant	Adjusted P Value
0				
5% vs. 10%	-0.05667	-0.2530 to 0.1397	No	0.4062
5% vs. 15%	-0.1133	-0.3120 to 0.08530	No	0.1411
5% vs. 20%	-0.1887	-0.4543 to 0.07697	No	0.0951
10% vs. 15%	-0.05667	-0.06129 to -0.05205	Yes	<0.0001
10% vs. 20%	-0.132	-0.2013 to -0.06271	Yes	0.0143
15% vs. 20%	-0.07533	-0.1424 to -0.008234	Yes	0.04
24				
5% vs. 10%	-0.4353	-0.5647 to -0.3060	Yes	0.0044
5% vs. 15%	-0.72	-0.8517 to -0.5883	Yes	0.0004
5% vs. 20%	-1.043	-1.284 to -0.8018	Yes	0.0017
10% vs. 15%	-0.2847	-0.5127 to -0.05663	Yes	0.0326
10% vs. 20%	-0.6073	-0.9749 to -0.2398	Yes	0.0189
15% vs. 20%	-0.3227	-0.4947 to -0.1506	Yes	0.0148
48				
5% vs. 10%	-0.6253	-0.8240 to -0.4267	Yes	0.0053
5% vs. 15%	-0.578	-0.7097 to -0.4463	Yes	0.0016
5% vs. 20%	-0.938	-1.132 to -0.7440	Yes	0.0009
10% vs. 15%	0.04733	-0.2431 to 0.3377	No	0.7125
10% vs. 20%	-0.3127	-0.3173 to -0.3080	Yes	<0.0001
15% vs. 20%	-0.36	-0.6461 to -0.07386	Yes	0.0321
72				
5% vs. 10%	-0.2093	-0.4750 to 0.05631	No	0.0785
5% vs. 15%	-0.06667	-0.3043 to 0.1710	No	0.4211
5% vs. 20%	-0.6453	-0.8830 to -0.4077	Yes	0.0073
10% vs. 15%	0.1427	-0.05369 to 0.3390	No	0.0912
10% vs. 20%	-0.436	-0.4985 to -0.3735	Yes	<0.0001
15% vs. 20%	-0.5787	-0.7126 to -0.4447	Yes	0.0017

Lampiran 4. Gambar Penelitian



Perendaman rumput laut



Penjemuran rumput laut



Penggilingan rumput laut



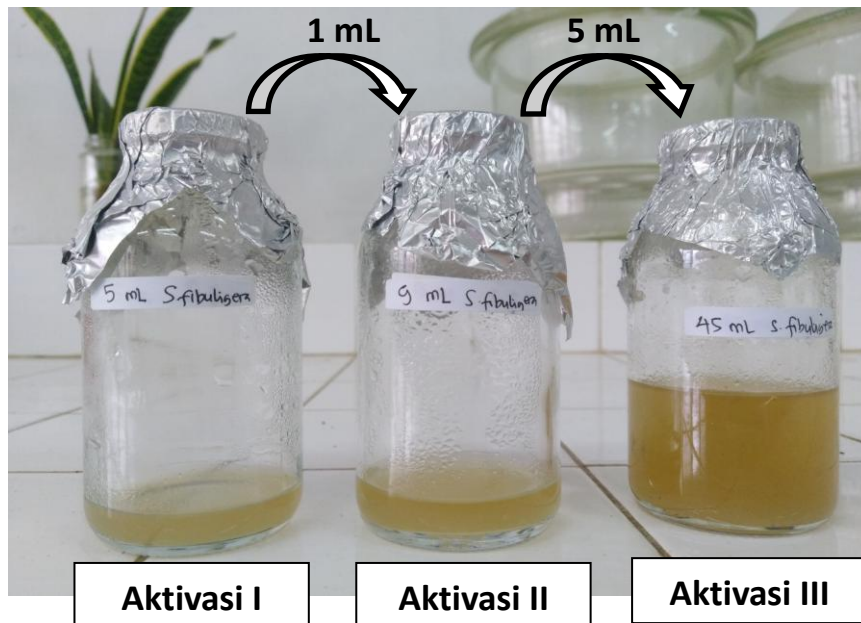
Pembuatan bubur rumput laut



Inokulasi *Trichoderma harzianum*



Inkubasi



Aktivasi *S. fibuligera*



Sentrifugasi



Pasteurisasi