

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

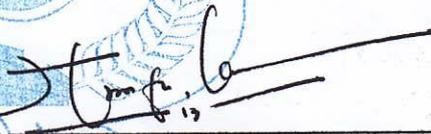
Nomor Pokok P1100209009

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/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

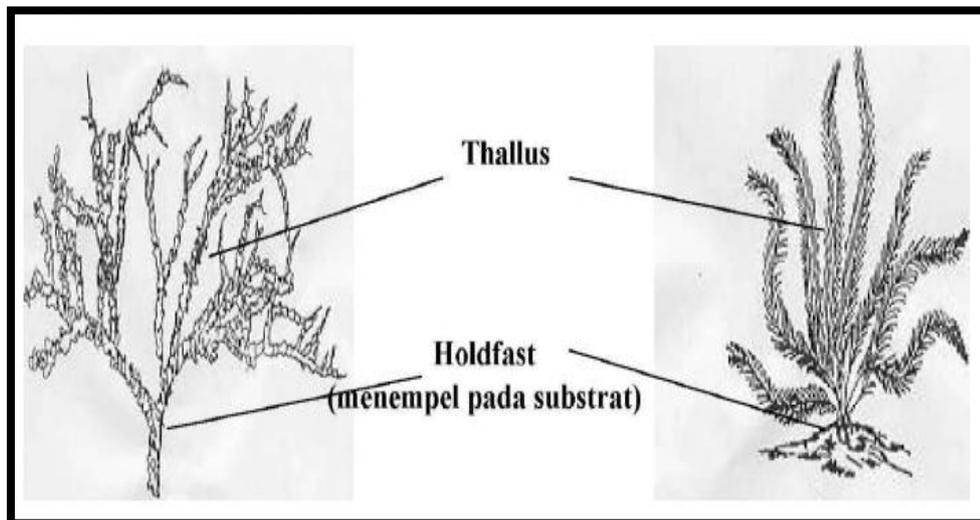
Indonesia dikenal sebagai negara kepulauan yang dua per tiga wilayahnya adalah lautan dan mempunyai garis pantai terpanjang di dunia yaitu kurang lebih 80.791,42 Km. Di lautan terdapat bermacam-macam makhluk hidup baik berupa tumbuhan maupun hewan air. Salah satu makhluk hidup yang tumbuh dan berkembang 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)
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. cotonii*.

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 sebaai berikut:

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

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 enzimatis 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 bantuan 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)

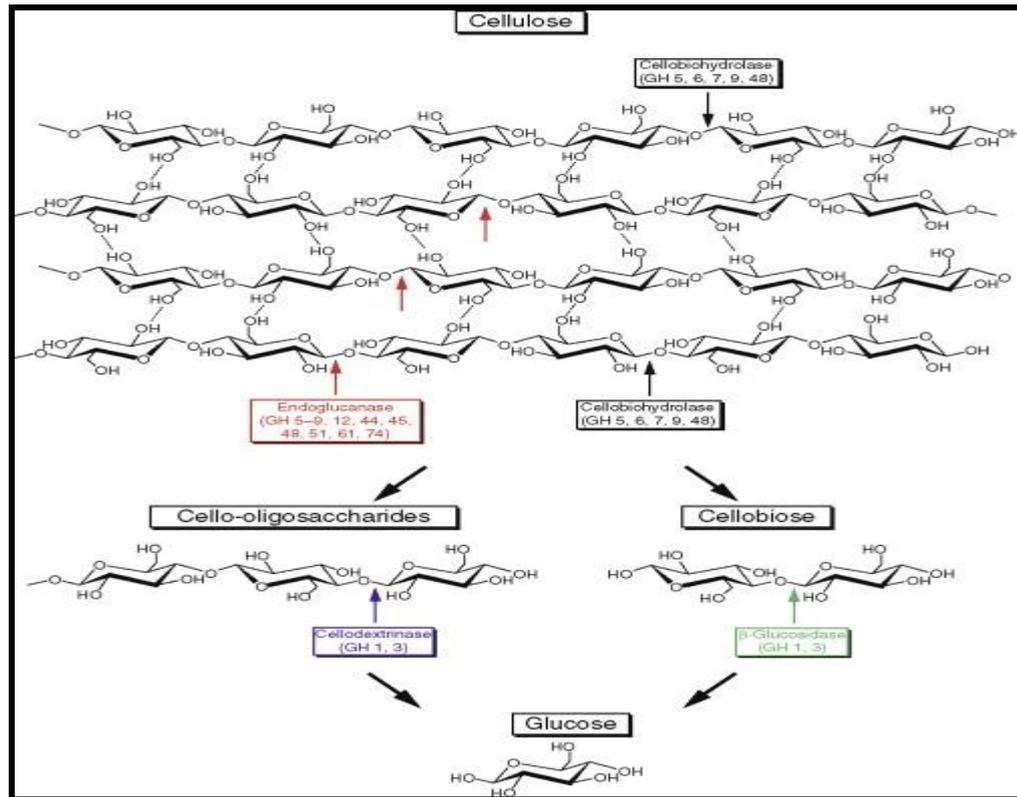
Enzim yang menyerang ujung rantai selulosa non pereduksi dan menghasilkan selobiosa. Enzim ini dapat menyerang selodekstrin tapi tidak dapat menghidrolisis selobiosa.

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

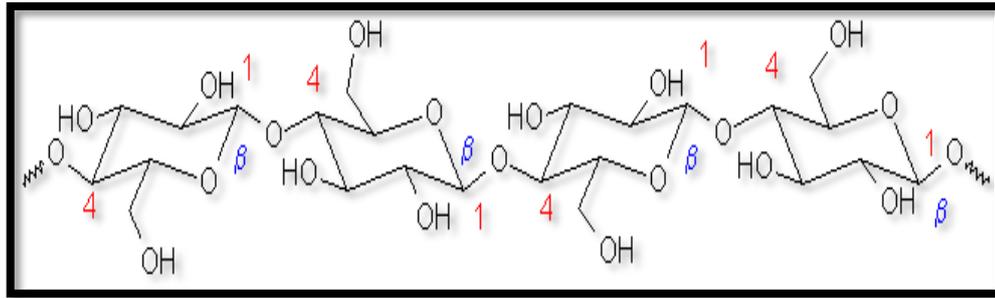
Bahan lignoselulosa merupakan biomassa yang berasal dari tanaman dengan komponen utama lignin, selulosa, dan hemiselulosa (Fujita dan Harada, 1991). Ketersediaannya yang cukup melimpah, terutama sebagai limbah pertanian, perkebunan, dan kehutanan, menjadikan bahan ini berpotensi sebagai salah satu sumber 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).

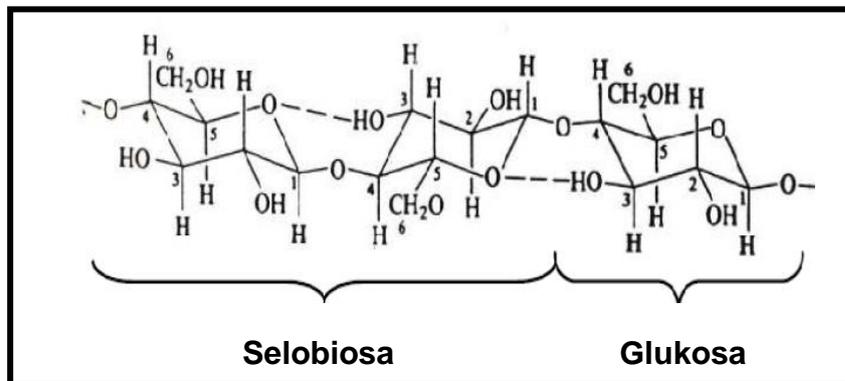
Selulosa hampir tidak pernah ditemui dalam keadaan murni di alam, melainkan selalu berikatan dengan bahan lain yaitu lignin dan hemiselulosa. Serat selulosa alami terdapat di dalam dinding sel tanaman dan material vegetatif lainnya. Selulosa murni mengandung 44,4% C; 6,2% H dan 49,3% O. Berat molekul 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 (Poedjadi, 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

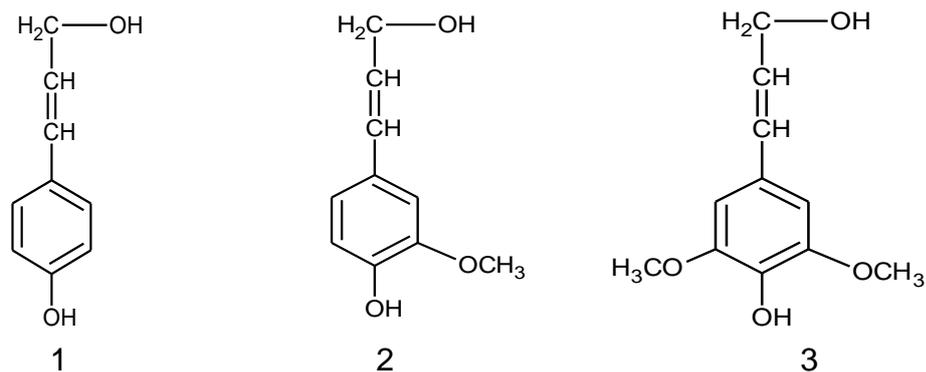
Sumber: Kim, dkk., 2008

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)

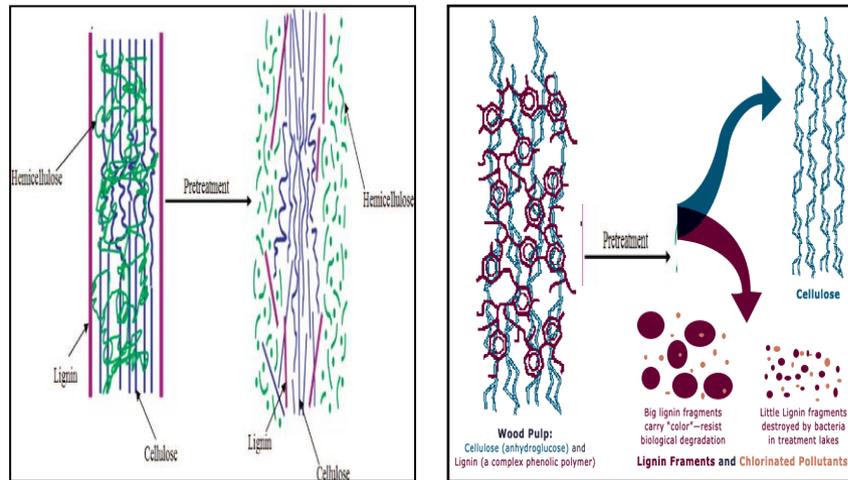
(1) p-kumaril alkohol (unit p-hidroksifenil), (2) koniferil alkohol (unit guaiasil), (3) sinapil alkohol (unit sirigil)

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 (Taherzadeh 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

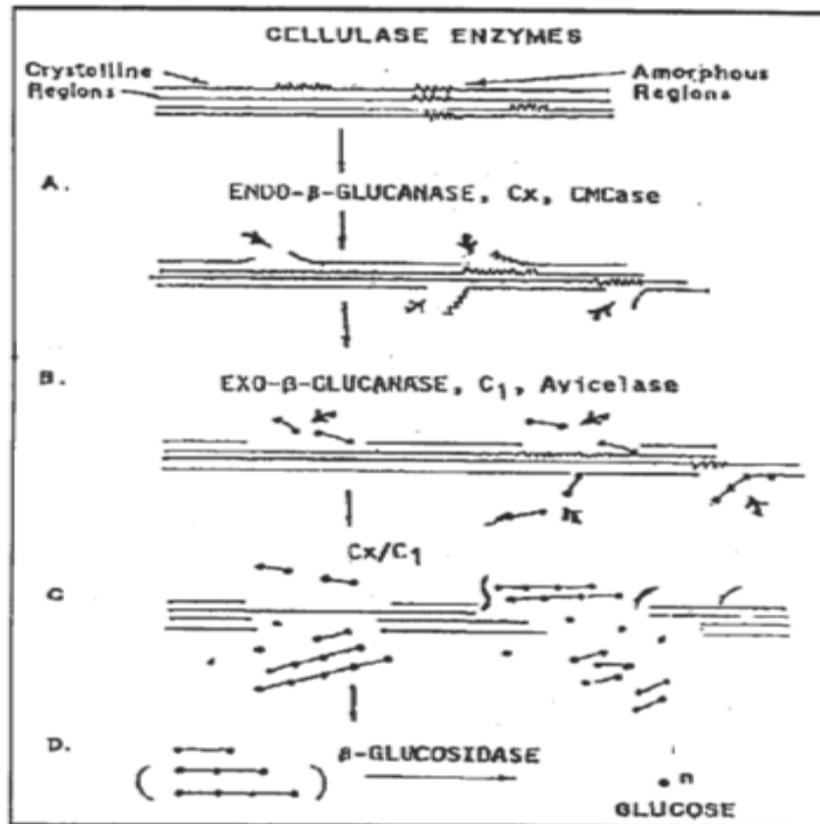
Nama	Sinonim	Reaksi
Endo- β -glukanase	Faktor C _x ; CMCase; 1,4- β - D-glukan glukanohidrolase	Endohidrolisis ikatan 1,4- β -D-glukosidik, membentuk glukosa dan selo-oligosakarida.
Ekso- β -glukanase	Faktor C ₁ ; avicelase; 1,4- β - D-glukan selobiohidrolase	Eksohidrolisis ikatan 1,4- β - D-glukosidik 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.



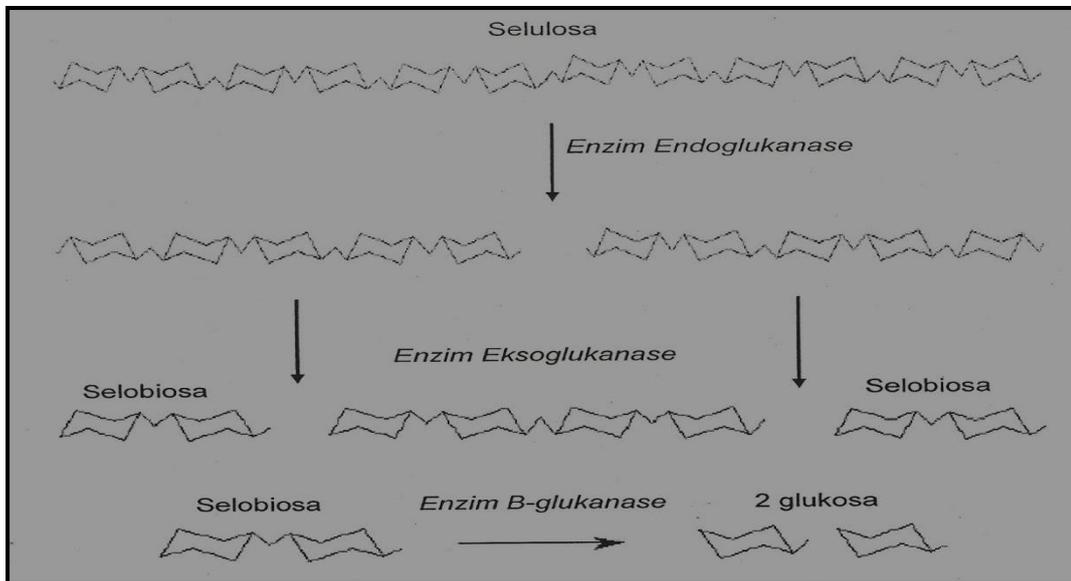
Gambar 10. Tahapan-tahapan hidrolisis selulosa
(Sumber: Ghori, 2001)

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*

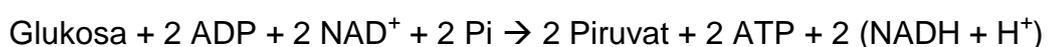
Mekanisme pembentukan bioetanol dari bakteri *Z. mobilis* melalui jalur Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) atau lebih dikenal dengan jalur glikolisis. Hasil dari tahap glikolisis adalah memecah glukosa menjadi dua molekul asam piruvat. Proses yang terjadi dalam jalur glikolisis dapat dilihat pada Gambar 12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

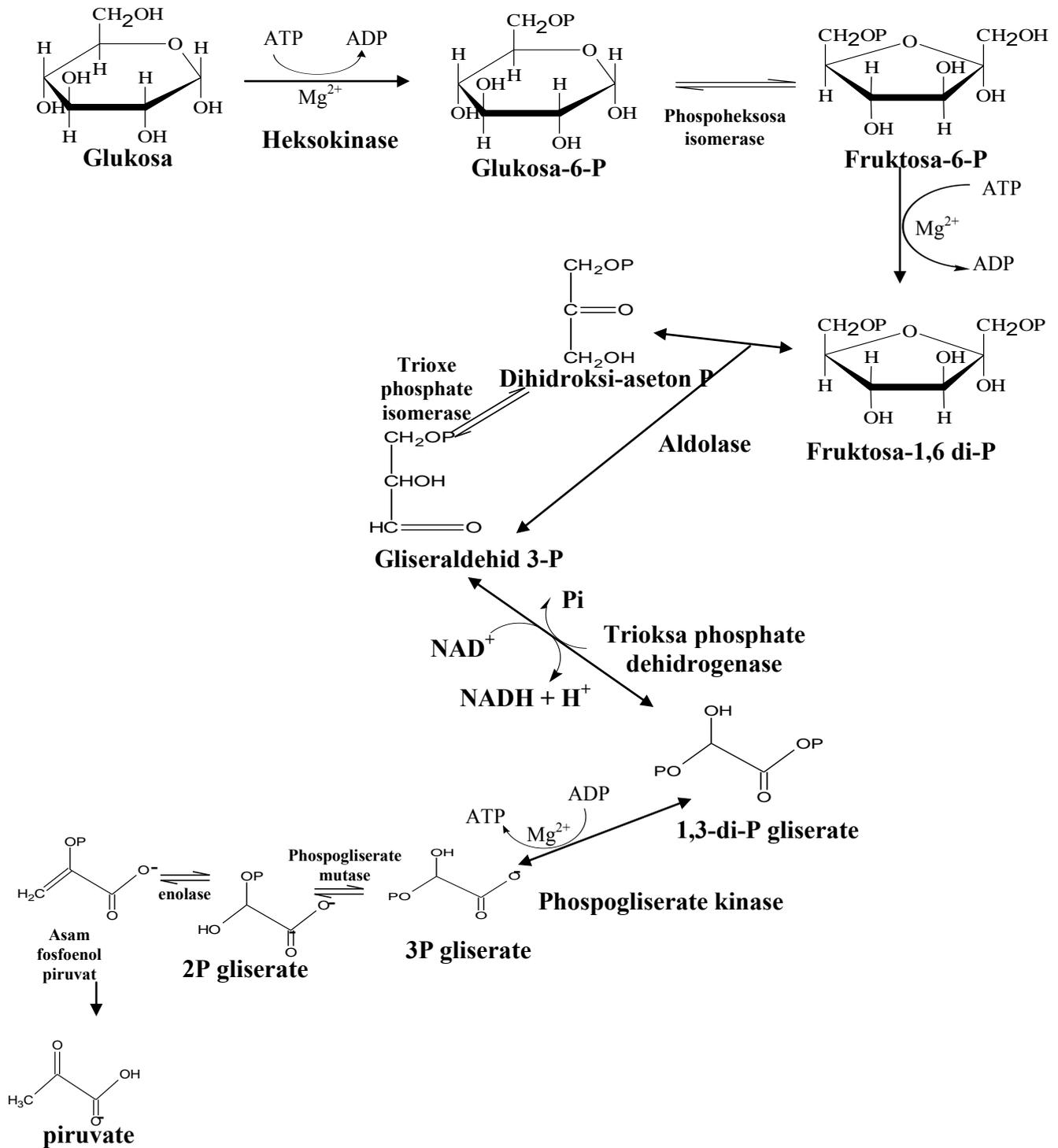
1. Glikolisis diawali dengan reaksi pembentukan senyawa glukosa-6-fosfat dari glukosa. Reaksi tersebut merupakan reaksi yang membutuhkan energi pemutusan ikatan fosfat dari ATP. Reaksi ini dikatalisis oleh enzim heksokinase atau glukokinase. Pada tahap ini, menggunakan satu mol ATP dan menghasilkan satu 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 ini pun 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.

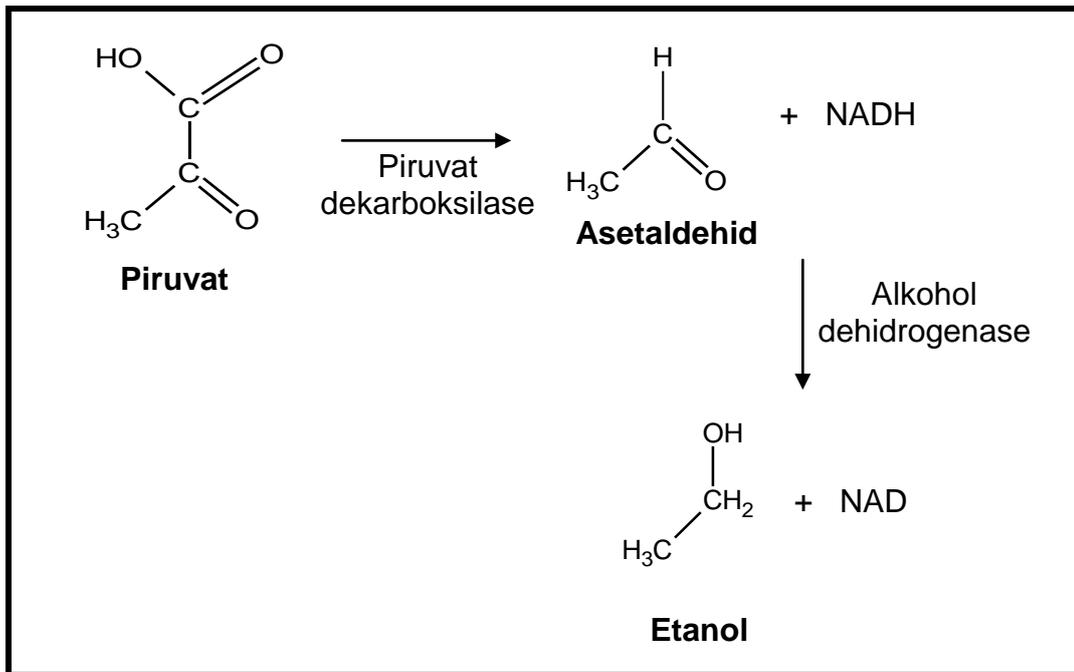
Setelah penambahan DHAP dan GA-3P selama proses glikolisis berlangsung sebanyak dua kali. Piruvat yang merupakan produk akhir dari tahap glikolisis ini merupakan kunci pada proses metabolisme. Secara keseluruhan reaksi yang terjadi pada proses glikolisis adalah sebagai berikut (Didu, 2010):





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.*, *Kluyveromyces 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 enzimatik 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:

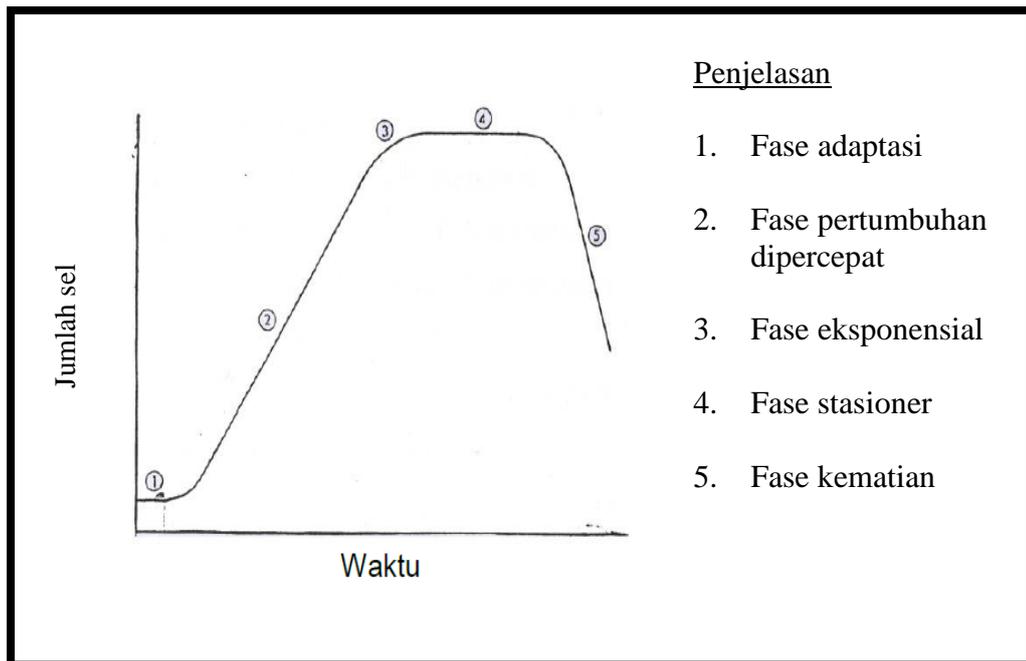
1. Mikroorganisme dapat membentuk produk yang diinginkan.
2. Organisme ini harus berpropagasi secara cepat dan dapat mempertahankan keseragaman biologis, sehingga memberikan yield yang dapat diprediksi.
3. Fermentasi dapat berlangsung dengan cepat.
4. Produk mudah diambil dan dimurnikan.

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

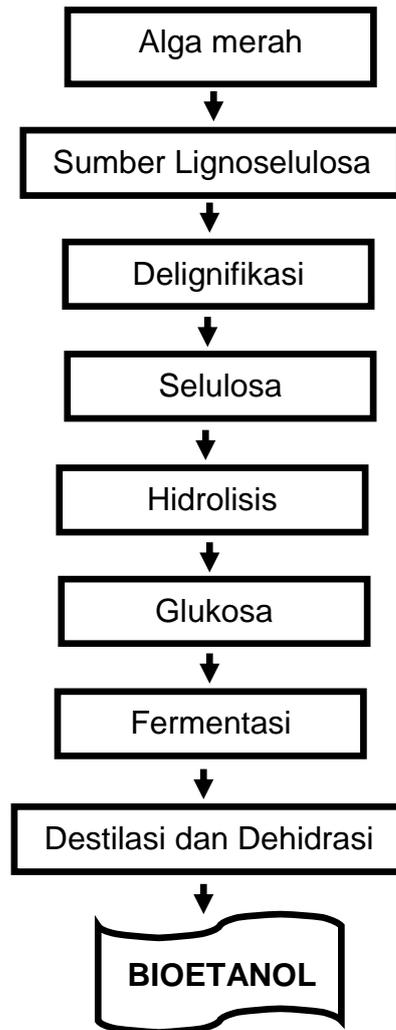
Biomassa berselulosa merupakan sumber daya alam yang melimpah dan murah yang memiliki potensi mendukung produksi komersial industri bahan bakar seperti bioetanol (Wyman, 1999). Indonesia merupakan salah satu negara maritim terbesar di dunia dengan garis pantai mencapai 81.000 km yang berpotensi dalam 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

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Juli 2011 sampai dengan Desember 2012. Proses delignifikasi, analisis kandungan selulosa dan lignin, destilasi, uji indeks bias, pemurnian, analisis berat jenis dilakukan di Laboratorium Organik Jurusan Teknik Kimia Politeknik Negeri Ujung Pandang dan untuk persiapan stok kultur murni, persiapan media inokulum, media hidrolisis, media fermentasi dilakukan di Laboratorium Bioproses Jurusan Teknik Kimia Politeknik Negeri Ujung Pandang. Selanjutnya analisis kadar glukosa dengan UV-VIS dan analisis kadar etanol dengan kromatografi gas dilakukan di Ruang Instrumen Jurusan Teknik Kimia Politeknik Negeri Ujung Pandang.

B. Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah peralatan gelas, crusher, oven, waterbath, lemari sterilisasi, neraca analitik, inkubator, peralatan destilasi, refraktometer, piknometer, termometer, sentrifugasi, fermentor, autoklaf, shaker inkubator, peralatan inokulasi, GC Shimadzu 2010, Spektrofotometer UV VIS Shimadzu 1800.

C. Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah alga merah jenis *Gracilaria verrucosa* dan *Euचेuma cottonii*, jamur *Trichoderma viride*,

bakteri *Zymomonas mobilis*, NaOH, CuSO₄, H₂SO₄, KI, Na₂S₂O₃, ekstrak ragi, glukosa, ekstrak taube, bacto agar, KH₂PO₄, K₂HPO₄, urea, FeCl₃, MgSO₄, glukosa monohidrat, aluminium foil, kertas pH universal, akuades, etanol absolut/murni, aseton, n-pentana.

D. Prosedur Kerja

Penelitian ini merupakan eksperimental murni dengan tujuan untuk mengolah selulosa alga merah menjadi bioetanol yang dilakukan dengan menggunakan sistem fermentasi dua tahap atau lebih dikenal dengan sistem SHF (*Separated Hydrolysis and Fermentation*) dengan beberapa tahapan sebagai berikut:

1. **Pretreatment** (persiapan bahan baku, proses delignifikasi, analisis glukosa setelah proses delignifikasi, analisis kandungan selulosa dan lignin sebelum dan sesudah proses delignifikasi).
2. **Proses hidrolisis secara enzimatis** (persiapan stok kultur murni *Trichoderma viride*, persiapan media inokulum *Trichoderma viride*, analisis kadar glukosa untuk penentuan kondisi (waktu dan pH) optimum hidrolisis oleh *Trichoderma viride*).
3. **Proses fermentasi** (persiapan stok kultur murni *Zymomonas mobilis*, persiapan media inokulum *Zymomonas mobilis*, penentuan kondisi (waktu dan pH) optimum fermentasi oleh *Zymomonas mobilis*, hasil fermentasi dipisahkan dengan destilasi, uji indeks bias etanol).
4. **Proses produksi** (proses hidrolisis dan fermentasi menggunakan *Trichoderma viride* dan *Zymomonas mobilis*, hasil fermentasi

dipisahkan dengan destilasi, pemurnian, analisis berat jenis, analisis kadar etanol dengan menggunakan kromatografi gas)

1. Tahap *pretreatment*

a. Persiapan bahan baku

Material berselulosa yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari alga merah yaitu *Gracilaria verrucosa* dan *Euclima cottonii*. Kedua jenis alga dipotong kecil-kecil kemudian dijemur hingga kering dan digiling dengan menggunakan crusher hingga halus.

b. Proses delignifikasi

Proses delignifikasi dilakukan dengan mencampur masing-masing serbuk alga merah dengan larutan natrium hidroksida (NaOH) 4% b/b (Lampiran 30H) dalam suatu wadah tertutup dan dibiarkan selama 24 jam sambil sesekali diaduk lalu disaring dengan kain penyaring. Residu dicuci dengan akuades hingga lignin yang berwarna coklat kehitaman keluar. Proses pencucian dihentikan setelah cairan pencuci sudah jernih dan pH netral, kemudian sampel dikeringkan dalam oven pada suhu 110 °C hingga kering (Seligh dkk., 2009).

Proses delignifikasi bertujuan untuk memecah ikatan antara lignin dan hemiselulosa. Hal ini dilakukan agar enzim selulase dapat mengikat selulosa sehingga proses hidrolisis selulosa secara enzimatik pada biomassa tidak terhambat.

c. Analisis kandungan glukosa metode Luff Schoorl

Analisis glukosa menggunakan metode Luff Schoorl dilakukan untuk mengetahui adanya proses hidrolisis (terbentuknya glukosa) yang dapat terjadi setelah proses delignifikasi karena menggunakan basa kuat.

Kedua jenis alga laut yang telah didelignifikasi (*G. verrucosa* dan *E. cottonii*) ditimbang masing-masing sebanyak 10 gram kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL kemudian ditambahkan 50 mL akuades lalu masing-masing ditambahkan 3 mL Pb asetat diberikan tetes demi tetes sampai tidak menimbulkan pengkeruhan lagi kemudian dicukupkan volumenya dengan akuades dan dibiarkan semalam hingga larutannya menjadi jernih dan disaring.

Sebanyak 25 mL sampel jernih diambil kemudian ditambahkan 25 mL larutan Luff (Lampiran 30C) dan 15 mL akuades lalu dididihkan selama 10 menit.

Setelah itu didinginkan kemudian ditambahkan 2 g KI dan 25 mL H₂SO₄ kemudian dititrisi dengan menggunakan larutan Na₂S₂O₃ 0,1 N (Lampiran 30D) dan ditambahkan sedikit larutan amilum 1% (Lampiran 30E) sebagai indikator. Titrasi dilakukan hingga sampel berubah warna menjadi putih susu. Dilakukan perlakuan yang sama pada blanko yaitu 25 mL akuades dan 25 mL larutan Luff (Sudarmadji dkk., 1984).

Analisis:

$$\text{Konsentrasi gula pereduksi (\%)} = \frac{(v \text{ tit. blanko} - v \text{ tit. sampel}) \times fp}{mg \text{ sampel}} \times 100 \% \dots(1)$$

Volume Na-tiosulfat yang diperoleh kemudian dicocokkan dengan daftar Luff (Lampiran 12) untuk mengetahui kadar gula reduksinya.

d. Analisis kandungan selulosa dan lignin

Analisis kandungan selulosa dan lignin dilakukan dengan metode Chesson (Datta, 1981). Analisis kandungan selulosa dan lignin dilakukan sebelum dan setelah proses delignifikasi. Tahapan proses analisis kandungan selulosa dan lignin yaitu:

Sebanyak 1 gram **(a)** sampel kering ditambahkan 150 mL akuades, dipanaskan pada suhu 90-100 °C dengan water bath selama 1 jam. Hasilnya disaring, residu dicuci dengan air panas (300 mL). Residu kemudian dikeringkan dengan oven kemudian ditimbang sampai bobot konstan **(b)**. Residu ditambahkan 150 mL H₂SO₄ 1 N kemudian dipanaskan dengan water bath selama 1 jam pada suhu 90 - 100 °C. Hasilnya disaring dan dicuci dengan akuades sampai netral dan dikeringkan **(c)**. Residu kering ditambahkan 10 mL H₂SO₄ 72% dan direndam pada suhu kamar selama 4 jam. Ditambahkan 150 mL H₂SO₄ 1 N dan direfluks pada water bath selama 1 jam pada pendingin balik. Residu disaring dan dicuci dengan akuades sampai netral kemudian dipanaskan dalam oven pada suhu 105 °C dan hasilnya ditimbang sampai bobot konstan **(d)**, selanjutnya residu diabukan dan hasilnya ditimbang **(e)**. Perhitungan kadar selulosa dan kadar lignin sebagai berikut:

$$\text{Kadar selulosa} = \frac{c-d}{a} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (2)$$

$$\text{Kadar lignin} = \frac{d-e}{a} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (3)$$

Dimana: a = berat sampel (gram)

c = berat residu pada penimbangan ketiga (gram)

d = berat residu pada penimbangan keempat (gram)

e = berat abu (gram)

Setelah melewati proses treatment, kedua jenis alga merah yaitu *G. verrucosa* dan *E. cottonii* dapat digunakan pada tahap selanjutnya yaitu proses hidrolisis secara enzimatik.

2. Proses hidrolisis secara enzimatik

a. Peremajaan jamur *Trichoderma viride* dengan media agar miring

Jamur *T. viride* digunakan pada proses hidrolisis yang dapat mengubah material berselulosa (alga merah) menjadi glukosa. Stok kultur murni *T. viride* diperoleh dari Laboratorium Bioproses Jurusan Teknik Kimia Politeknik Negeri Ujung Pandang dan diremajakan pada medium PDA menurut tahap-tahap berikut (Yuliar, 2003):

Tabel 3. Komposisi bahan untuk media agar miring *T. viride*

Bahan	Jumlah
Bubuk Potato Dextrose Agar	3,9 gram
Akuades	100 mL

Bahan-bahan pada Tabel 3 di atas dicampur dengan 100 mL akuades lalu dipanaskan kemudian diaduk sampai homogen dengan magnetic stirrer sambil diaduk hingga bahan larut. Disiapkan beberapa tabung reaksi lalu pipet 7 mL larutan kemudian dimasukkan kedalam tiap tabung reaksi, disumbat dengan kapas dan aluminium foil. Media disterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit lalu didinginkan dalam keadaan miring (media agar miring). Biakan murni *T. viride* digoreskan secara zig-zag pada media PDA miring dengan menggunakan ose steril.

Pengerjaan ini dilakukan dalam lemari sterilisasi (*ent case*) lalu ditumbuhkan dalam inkubator pada suhu 30 °C selama 4 hari. Jamur *T. viride* yang telah diremajakan digunakan selanjutnya untuk pembuatan media inokulum *T. viride*.

b. Pembuatan Media Inokulum jamur *T. viride*

Tabel 4. Komposisi bahan untuk media inokulum *T. viride*

Bahan	Jumlah
Ekstrak taugé	
Akuades	150 mL
Taugé	15 gram
Alga Imerah	3 gram
Ekstrak ragi	1,5 gram
KH ₂ PO ₄	0,015 gram
Glukosa	3 gram

Kedalam Erlenmeyer 250 mL yang berisi seluosa dari serbuk alga merah ditambahkan 150 mL ekstrak taugé. Larutan tersebut ditambahkan nutrien seperti pada Tabel 4 di atas dan diaduk hingga larut lalu pH diatur dengan buffer asetat hingga pH larutan menjadi 5,0. Erlenmeyer kemudian ditutup dengan kapas dan aluminium foil lalu disterilkan dalam autotoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Dinginkan lalu ditambahkan stok kultur murni *T. viride* dengan menggunakan ose steril dalam ruang sterilisasi. Erlenmeyer ditutup kembali dengan kapas dan aluminium foil lalu difermentasi pada shaker inkubator selama 48 jam pada suhu 27 °C dengan kecepatan 150 rpm. Setelah 48 jam, media inokulum ini

digunakan untuk penentuan kondisi optimum dari proses hidrolisis *T. viride*.

c. Pembuatan media hidrolisis enzimatikoleh jamur *T. viride*

Pembuatan media hidrolisis ini digunakan untuk penentuan kondisi (waktu dan pH) optimum dari proses hidrolisis *T. viride*. Adapun tahapan pembuatan media hidrolisis yaitu:

Tabel 5. Komposisi bahan untuk media hidrolisis oleh jamur *T. viride*

Bahan	Jumlah
Ekstrak tauge	
Akuades	1050 mL
Tauge	105 gram
Alga merah	21 gram
Ekstrak ragi	10,5 gram
KH ₂ PO ₄	0,105 gram
Glukosa	21gram
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,0525 gram

Kedalam beaker gelas 1500 mL yang berisi serbuk alga merah ditambahkan 1050 mL ekstrak tauge kemudian ditambahkan nutrien diatas, diaduk hingga larut. Atur pH larutan diatur hingga pH 5 dengan buffer asetat. Disiapkan 7 buah Erlenmeyer 250 mL lalu tuangkan masing-masing 150 mL larutan ke dalam tiap erlenmeyer, disumbat dengan kapas dan aluminium foil dan disterilisasi dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121 °C. Erlenmeyer dipindahkan kedalam ruang steril lalu tambahkan 15 mL media inokulum kedalam setiap erlenmeyer dengan menggunakan gelas ukur yang steril. Tutup kembali erlenmeyer dengan

kapas lalu difermentasi pada shaker incubator selama 2, 4, 6, 8, 10, 12, dan 14 hari pada suhu 27 °C dengan kecepatan 150 rpm. Setelah 48 jam (2 hari) salah satu erlenmeyer pada media fermentasi diambil, disaring kemudian diukur gula reduksinya menggunakan metode Nelson-Somogyi.

Selanjutnya dilakukan variasi pH pada 4,5; 5; 5,5; 6 dan 6,5 untuk menentukan pH optimum terhadap waktu hidrolisis jamur *T. viride* seperti pada penambahan nutrient pada Tabel 5 di atas.

d. Analisis kadar glukosa metode Nelson-Somogyi

Pada penelitian ini, hidrolisis secara enzimatik oleh jamur *T. viride* diharapkan mampu menghidrolisis material berselulosa (alga merah) menjadi material yang mengandung glukosa, sehingga material yang mengandung glukosa tersebut selanjutnya dapat difermentasi menjadi bioetanol.

Analisis kadar glukosa hasil hidrolisis dilakukan dengan menggunakan metode Nelson-Somogyi untuk mengetahui kondisi optimum hidrolisis dari jamur *T. viride*. Analisis ini menggunakan spektrofotometer UV-VIS Shimadzu 1800 dengan membuat kurva standar hubungan antara konsentrasi standar glukosa dengan absorbansinya. Dari kurva standar, kadar glukosa hasil hidrolisis pada kondisi optimum dapat dihitung lewat persamaan regresi. Oleh karena besarnya nilai absorbansi berbanding lurus dengan konsentrasi glukosa maka nilai absorbansi yang tertinggi menunjukkan kondisi optimum hidrolisis (waktu dan pH optimum).

1. Pembuatan kurva standar glukosa

Sebelum analisa kadar gula reduksi terlebih dahulu dibuat kurva standar glukosa. Sebanyak 0,11 g glukosa monohidrat dilarutkan dalam air hingga 100 mL, ini merupakan larutan standar dengan konsentrasi 10 mg/L. Dari larutan standar ini dibuat 6 kali pengenceran sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 dan 1 mg/L (Lampiran 18B). Disiapkan 7 tabung reaksi yang bersih, masing-masing diisi dengan 1 mL larutan glukosa standar dan satu tabung diisi dengan 1 mL aquades sebagai blanko. Pipet kedalam masing-masing tabung 1 mL reagensia Nelson (lampiran 30F) (campuran Nelson A dan B dengan perbandingan 4 :1) dan dipanaskan pada penangas air selama 10 menit. Diambil semua tabung dan didinginkan dalam beaker gelas yang berisi air dingin. Setelah itu tambahkan 1 mL reagensia arsenomolibdat (Lampiran 30G) serta 7 mL air. Absorbansi masing-masing larutan diukur pada panjang gelombang 540 nm. Kurva standar dibuat dengan membuat grafik hubungan antara konsentrasi glukosa sebagai gula reduksi dengan absorbansi (Sudarmadji, 1984).

2. Penentuan glukosa pada sampel

Disiapkan beberapa tabung reaksi kemudian dimasukan 1 mL larutan contoh yang jernih, ditambahkan 1 mL reagensia Nelson (campuran Nelson A dan B dengan perbandingan 4:1) dan semua tabung dipanaskan pada penangas air selama 10 menit, semua tabung diambil dan didinginkan dalam beaker gelas yang berisi air dingin. Setelah dingin ditambahkan 1 mL reagensia arsenomolibdat dan 7 mL air. Data

absorbansi sampel diplotkan pada persamaan regresi linier yang diperoleh dari kurva standar glukosa, sehingga diperoleh kadar glukosa sampel (Sudarmadji, 1984).

Setelah didapatkan hasil analisis glukosa pada sampel yang mencerminkan kondisi (waktu dan pH) optimum dari hidrolisis enzimatik *T. viride* kemudian dilanjutkan pada tahap fermentasi.

3. Proses fermentasi

a. Peremajaan Bakteri *Zymomonas mobilis* dengan Media Agar Miring

Bakteri *Z. mobilis* digunakan dalam proses fermentasi yang dapat mengubah material yang mengandung glukosa hasil hidrolisis menjadi etanol. Stok kultur murni *Z. mobilis* diperoleh dari Laboratorium Bioproses Jurusan Teknik Kimia Politeknik Negeri Ujung Pandang dan diremajakan pada medium NA dengan menurut tahap-tahap berikut (Yuliar, 2003):

Tabel 6. Komposisi bahan untuk media agar miring *Z. mobilis*

Bahan	Jumlah
Bubuk Nutrien Agar	2,3 gram
Akuades	100 mL

Bahan-bahan pada Tabel 6 di atas dicampur dengan dengan 100 mL akuades lalu dipanaskan kemudian diaduk sampai homogen dengan magnetic stirrer sambil diaduk hingga bahan larut. Disiapkan beberapa tabung reaksi lalu dipipet 7 mL larutan kemudian dimasukkan kedalam tiap tabung reaksi, disumbat dengan kapas dan aluminium foil. Media disterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit lalu didinginkan dalam

keadaan miring (media agar miring). Biakan murni *Z. mobilis* digoreskan secara zig-zag pada media NA miring dengan menggunakan ose steril. Pengerjaan ini dilakukan dalam lemari sterilisasi (*ent case*) lalu ditumbuhkan dalam inkubator pada suhu 30 °C selama 7 hari. Bakteri *Z. mobilis* yang telah ditumbuhkan digunakan selanjutnya untuk pembuatan media inokulum.

b. Pembuatan Media Inokulum bakteri *Z. mobilis*

Tabel 7. Komposisi bahan untuk media inokulum *Z. mobilis*

Bahan	Jumlah
Ekstrak tauge	
Akuades	150 mL
Tauge	15 gram
Ekstrak ragi	1,5 gram
KH ₂ PO ₄	0,015 gram
K ₂ HPO ₄	0,015 gram
Glukosa	3 gram
Ammonium sulfat	0,015 gram
Urea	0,015 gram

Kedalam Erlenmeyer 250 mL ditambahkan 150 mL ekstrak tauge dan bahan-bahan yang lain diaduk hingga larut lalu pH diatur dengan buffer asetat hingga pH larutan menjadi 5,0. Ditungkup dengan kapas dan aluminium foil lalu disterilkan dalam autotoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Dinginkan lalu ditambahkan 15 mL larutan glukosa hasil hidrolisis pada kondisi optimum dan stok kultur murni *Z. mobilis* dengan menggunakan ose dalam ruang sterilisasi. Ditungkup kembali dengan kapas dan aluminium foil lalu difermentasi pada shaker inkubator selama 48 jam

pada suhu 27 °C dengan kecepatan 150 rpm. Setelah 48 jam, media inokulum ini digunakan untuk penentuan kondisi optimum dari proses fermentasi *Z. mobilis*.

c. Pembuatan Media Fermentasi bakteri *Z. mobilis*

Pembuatan media fermentasi ini digunakan untuk penentuan kondisi (waktu dan pH) optimum dari proses fermentasi *Z. mobilis*. Adapun tahapan pembuatan media fermentasi yaitu:

Tabel 8. Komposisi bahan untuk media fermentasi *Z. mobilis*

Bahan	Jumlah
Ekstrak ragi	10,5 gram
KH ₂ PO ₄	0,105 gram
K ₂ HPO ₄	0,105 gram
Glukosa	21 gram
Ammonium sulfat	0,0525 gram
Urea	0,0525 gram
FeSO ₄	0,0525 gram

Kedalam beaker gelas 1500 mL yang ditambahkan 1050 mL larutan glukosa hasil hidrolisis pada kondisi optimum setelah dipasteurisasi pada suhu 70 °C kemudian ditambahkan nutrien diatas, diaduk hingga larut. pH larutan diatur hingga pH 5 dengan buffer asetat. Disiapkan 7 buah Erlenmeyer 250 mL lalu tuangkan masing-masing 150 mL larutan kedalam tiap erlenmeyer, sumbat dengan kapas dan aluminium foil dan sterilisasi dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121 °C. Erlenmeyer dipindahkan kedalam ruang steril, kemudian ditambahkan 15 mL media inokulum kedalam setiap Erlenmeyer dengan

menggunakan gelas ukur yang steril. Tutup kembali Erlenmeyer dengan kapas lalu difermentasi pada shaker inkubator selama 1, 3, 5, 7, 9, 11, dan 13 hari pada suhu 27 °C dengan kecepatan 150 rpm. Setelah 48 jam (2 hari) salah satu erlenmeyer pada media fermentasi diambil, disaring lalu didestilasi pada suhu 78°C hingga volume tertentu.

Selanjutnya dilakukan variasi pH untuk menentukan pH optimum terhadap waktu fermentasi bakteri *Z. mobilis* seperti pada penambahan nutrient pada Tabel 8 di atas.

d. Penentuan Indeks Bias

Uji indeks bias terhadap etanol hasil fermentasi dilakukan dengan menggunakan alat refraktometer. Uji indeks bias dilakukan untuk menentukan kondisi optimum fermentasi dari bakteri *Z. mobilis*. Oleh karena besarnya nilai indeks bias berbanding lurus dengan konsentrasi etanol maka nilai indeks bias yang tertinggi menunjukkan kondisi optimum fermentasi.

Cara menentukan indeks bias dengan alat refraktometer dengan membuat kurva standar hubungan antara kadar etanol standar dengan nilai indeks biasnya (Lampiran 25). Dari kurva standar, kadar bioetanol hasil fermentasi pada kondisi optimum dapat dihitung lewat persamaan regresi. Konsentrasi standar etanol yang digunakan pada pembuatan kurva kalibrasi adalah 0%, 2,5%, 5,%, 7,5%, 10%, 12,5%. Untuk pembuatan standar etanol tersebut dapat dilihat pada Lampiran 24.

Setelah menentukan indeks bias, dan mendapatkan kondisi optimum dari proses hidrolisis oleh *T. viride* dan kondisi optimum dari

proses fermentasi oleh *Z. mobilis*, maka tahap selanjutnya adalah proses produksi skala besar bioetanol.

4. Proses Produksi Bioetanol

a. Pembuatan Media Inokulum jamur *T. viride*

Tabel 9. Komposisi bahan untuk media produksi inokulum jamur *T. viride*

Bahan	Jumlah
Ekstrak tauge	
Akuades	600 mL
Tauge	60 gram
Alga merah	12 gram
Ekstrak ragi	6 gram
KH ₂ PO ₄	0,06 gram
Glukosa	12 gram

Kedalam beaker gelas 1000 mL yang berisi seluosa dari serbuk alga merah ditambahkan 600 mL ekstrak tauge. Kedalam larutan tersebut ditambahkan nutrisi seperti pada Tabel 9 di atas dan diaduk hingga larut lalu pH diatur dengan buffer asetat hingga pH larutan menjadi 5,0. Sebanyak 600 mL larutan dipindahkan ke Erlenmeyer kemudian ditutup dengan kapas dan aluminium foil lalu disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Dinginkan lalu ke dalam setiap erlenmeyer ditambahkan stok kultur murni jamur *T. viride* dengan menggunakan ose steril dalam ruang sterilisasi. Erlenmeyer ditutup kembali dengan kapas dan aluminium foil lalu difermentasi pada shaker inkubator selama 48 jam pada suhu 27 °C dengan kecepatan 150 rpm.

b. Pembuatan Media Produksi Glukosa dari jamur *T. viride*

Tabel 10. `Komposisi bahan untuk media produksi hidrolisis enzimatik oleh jamur *T. viride*

Bahan	Jumlah
Ekstrak taugé	
Akuades	6 L
Taugé	600 gram
Alga merah	120 gram
Ekstrak ragi	60 gram
KH ₂ PO ₄	0,6 gram
Glukosa	120 gram
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,3 gram

Kedalam wadah 10 Liter yang berisi selulosa dari serbuk alga merah ditambahkan 6 L ekstrak taugé kemudian ditambahkan nutrisi pada Tabel 10 di atas, diaduk hingga larut kemudian disterilisasi pada autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Setelah dingin larutan kemudian dituangkan dalam tabung fermentor steril berkapasitas 10 L dan pH larutan diatur pada pH optimumnya dengan buffer. Ditambahkan secara aseptik 600 mL media inokulum *T. viride* ke dalam tabung fermentor. Ditungkat kembali tabung fermentor lalu difermentasi pada waktu optimum dengan suhu 27 °C.

Setelah melewati waktu optimum proses hidrolisis oleh *T. viride*. Kemudian larutan ini dipasteurisasi pada suhu 70 °C yang selanjutnya disebut larutan glukosa yang akan digunakan pada media produksi bioetanol oleh *Z. mobilis*.

c. Pembuatan Media Inokulum bakteri *Zymomonas mobilis*

Tabel 11. Komposisi bahan untuk media produksi inokulum bakteri *Z. mobilis*

Bahan	Jumlah
Ekstrak taugé	
Akuades	600 mL
Tauge	60 gram
Ekstrak ragi	6 gram
KH ₂ PO ₄	0,06 gram
K ₂ HPO ₄	0,06 gram
Glukosa	12 gram
Ammonium sulfat	0,06 gram
Urea	0,06 gram

Kedalam beaker gelas 1000 mL ditambahkan 600 mL ekstrak taugé kedalam larutan tersebut ditambahkan nutrient diatas dan diaduk hingga larut lalu pH diatur dengan buffer asetat hingga pH larutan menjadi 5,0. Disiapkan 3 buah erlenmeyer 250 mL, sebanyak 200 mL larutan dipindahkan ke dalam masing-masing erlenmeyer kemudian ditutup dengan kapas dan aluminium foil lalu disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Didinginkan lalu ke dalam setiap erlenmeyer ditambahkan 60 mL larutan glukosa dan stok kultur murni bakteri *Z. mobilis* dengan menggunakan ose steril dalam ruang sterilisasi. Erlenmeyer ditutup kembali dengan kapas dan aluminium foil lalu difermentasi pada shaker inkubator selama 48 jam pada suhu 27 °C dengan kecepatan 150 rpm.

d. Pembuatan Media Produksi Bioetanol dari bakteri *Zymomonas mobilis*

Tabel 12. Komposisi bahan untuk media produksi bioetanol bakteri *Z. mobilis*

Bahan	Jumlah
Larutan glukosa	6 L
Ekstrak ragi	60 gram
KH ₂ PO ₄	0,6 gram
K ₂ HPO ₄	0,6 gram
Glukosa	120 gram
Ammonium sulfat	0,3 gram
Urea	0,3 gram
FeCl ₃	0,3 gram

Kedalam wadah 10 Liter yang berisi 6 L larutan glukosa kemudian ditambahkan nutrien pada Tabel 12 diatas, diaduk hingga larut kemudian disterilisasi pada autoklaf selama 15 menit pada suhu 121 °C. Setelah dingin larutan kemudian dituangkan dalam tabung fermentor steril berkapasitas 10 L dan pH larutan diatur pada pH optimumnya dengan buffer. Tambahkan secara aseptik 600 mL media inokulum ke dalam tabung fermentor. Tutup kembali tabung fermentor lalu difermentasi pada waktu optimum pada suhu 27 °C. Hasil fermentasi selanjutnya didestilasi.

e. Proses Destilasi Dan Dehidrasi Bioetanol

1. Destilasi dilakukan untuk memisahkan etanol dan destilat (sebagian besar adalah air dan etanol) sehingga etanol dan air terkondensasi secara keseluruhan.
2. Cairan didestilasi dengan menggunakan alat destilasi fraksionasi.

3. Fraksi bioetanol dikeringkan dengan menggunakan zeolit atau CaCO_3 anhidrat.
4. Kadar bioetanol ditentukan dengan alat instrumen GC Shimadzu 2010.

f. Penentuan berat jenis sampel

Piknometer yang bertutup termometer ditimbang dalam keadaan kosong kemudian diisi akuades sampai penuh ditutup kembali dengan termometer lalu ditimbang. Suhu cairan dicatat. Akuades dikeluarkan dari piknometer lalu diganti dengan sampel bioetanol hasil fermentasi. Piknometer yang berisi sampel ditimbang.

$$\text{Berat Jenis} = \frac{\text{Berat sampel}}{\text{Volume piknometer}} \text{ g/cm}^3 \dots\dots\dots (4)$$

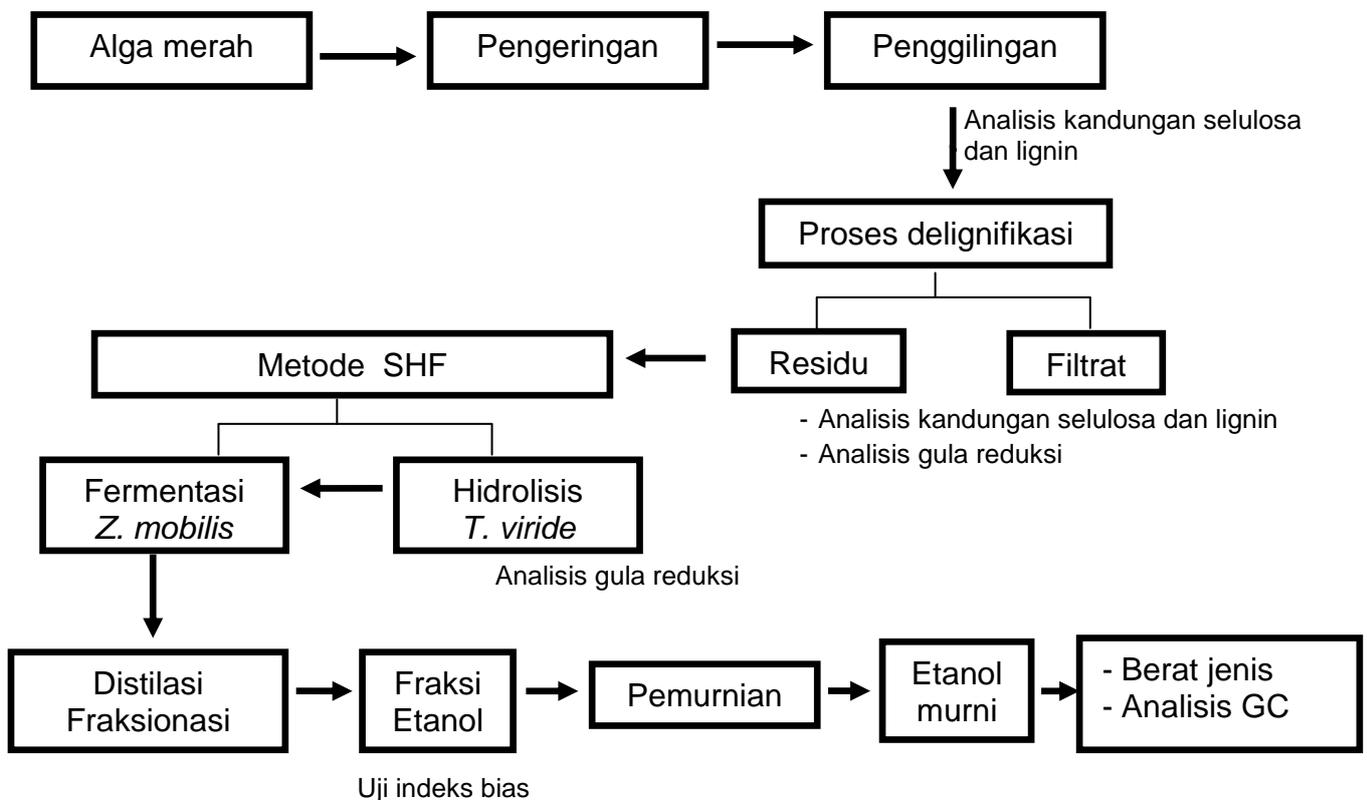
g. Analisis Kadar Bioetanol Dengan Kromatografi Gas

Etanol absolut dan sampel bioetanol sebelum dan setelah dehidrasi dianalisis dengan menggunakan alat kromatografi gas (GC) Shimadzu 2010. Perhitungan kadar bioetanol yang diperoleh dilakukan dengan cara persentase perbandingan luas area etanol pada sampel dengan luas area etanol murni.

$$\text{Kadar bioetanol sampel} = \frac{\text{Luas area etanol pada sampel}}{\text{Luas area etanol murni}} \times 100\% \dots(5)$$

Sebelum alat kromatografi gas digunakan, komputer dinyalakan dan kompressor langsung dinyalakan kemudian alat GC langsung dinyalakan. Selanjutnya kran gas He dibuka. Program GC dibuka dan dipilih operation, ditunggu sampai posran tampil pada layar monitor. Setelah itu program metode dibuka dan dipilih metode etil alkohol, terprogram suhu injektor 80 °C, kecepatan alir gas He 1,25 mL/menit, suhu FID 100 °C dan lama analisis 10 menit. Setelah metode dipilih

komputer di download dan start on, kemudian ditunggu sampai muncul pada display “ready”. Setelah “ready” tampil, kran gas H₂ dibuka dan flame diaktifkan kemudian ditunggu sampai timbul bunyi. Setelah terdengar bunyi dibuatlah file (masukkan identitas yang dibutuhkan) selanjutnya start pada program di klik dan ditunggu sampai tampil “ready” pada display (*stand by*). Jika “ready” atau “stand by” sudah tampil pada display maka sampel dan standar segera diinjeksi dan sesegera mungkin tombol start pada alat ditekan kemudian ditunggu sampai analisis selesai. Pada layar monitor akan ditampilkan gambar hasil analisis dan selanjutnya disimpan pada file yang telah dibuat tadi untuk di print out. Proses kerja pembuatan bioetanol dari alga merah pada Gambar 16.



Gambar 16. Skema proses kerja pembuatan bioetanol melalui proses fermentasi dua tahap (SHF) dari alga merah oleh jamur dan bakteri.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada bagian ini akan dibahas mengenai data penelitian yang meliputi penentuan berat kering alga merah, penentuan kadar air, selulosa dan lignin sebelum dan sesudah proses delignifikasi, penentuan gula reduksi setelah proses delignifikasi, penentuan kondisi (waktu dan pH) optimum hidrolisis dengan menggunakan nilai konsentrasi glukosa, penentuan kondisi (waktu dan pH) optimum fermentasi dengan menggunakan nilai indeks bias bioetanol, dan penentuan kadar bioetanol hasil fermentasi dengan menggunakan piknometer dan kromatografi gas.

E. Penentuan kadar air, selulosa, dan lignin alga laut

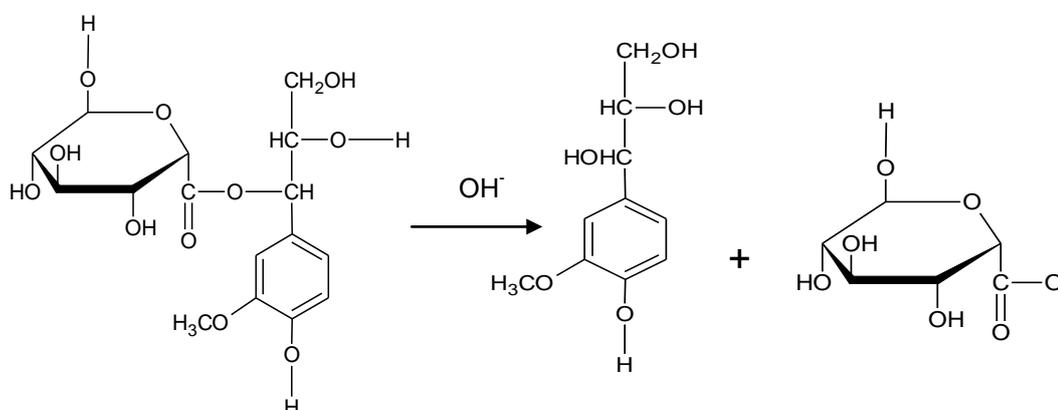
Secara kimia alga merah terdiri dari air, selulosa, lignin, polisakarida, protein, lemak, serat kasar. Hasil analisis kadar air (Lampiran 3), selulosa dan lignin (Lampiran 6-7) dapat dilihat pada Tabel 13.

Tabel 13. Komposisi kandungan kimia serbuk alga merah sebelum dan setelah proses delignifikasi

Jenis alga laut	Komposisi Kandungan					
	Kadar air		Kadar Selulosa		Kadar Lignin	
	Sblm	Stlh	Sblm	Stlh	Sblm	Stlh
<i>Gracilaria verrucosa</i>	9,23	8,87	8,76	13,04	8,23	3,84
<i>Euclima cottoni</i>	9,56	8,75	7,43	9,51	6,52	3,52

Penggunaan bahan baku berlignoselulosa untuk produksi bioetanol mendapatkan perhatian khusus untuk pengembangan energi terbarukan. Akan tetapi dari hasil analisis kadar lignin yang terdapat dalam alga merah

sebesar 8,23% untuk *G. verrucosa* dan 6,52% untuk *E. cottonii*. Kandungan lignin yang tinggi dapat menghambat akses enzim selulase oleh jamur *T. viride* dalam menghidrolisis selulosa menjadi glukosa sehingga jika glukosa yang dihasilkan tidak maksimal juga dapat mengakibatkan menurunnya jumlah etanol yang diproduksi. Untuk meningkatkan proses hidrolisis secara enzimatik maka perlu dilakukan perlakuan awal yang disebut proses delignifikasi dengan menggunakan bantuan senyawa katalis, salah satu caranya adalah dengan menggunakan katalis kimia berupa senyawa NaOH (Anindyawati, 2009). 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 maserasi dengan NaOH cukup efektif untuk mendegradasi lignin. Semakin banyak lignin yang terdegradasi maka hidrolisis akan semakin sempurna. Reaksi proses delignifikasi kompleks lignin-karbohidrat dengan menggunakan NaOH seperti terlihat pada Gambar 17.



Gambar 17. Reaksi delinifikasi kompleks lignin-karbohidrat
(Sumber: Usman, 2013)

Dari Tabel 13 dapat dilihat bahwa alga merah yang telah melalui proses delignifikasi dengan NaOH selama 24 jam terjadi penurunan kadar lignin dan peningkatan kadar selulosa. Hal ini terjadi karena banyaknya lignin yang hilang akibat terdegradasi oleh NaOH yang menyebabkan pula terjadinya safonifikasi ikatan ester dari residu lignin dan hemiselulosa menjadi lebih terbuka (Sun, 2002) sehingga struktur selulosa lebih mudah untuk dihidrolisis oleh enzim dan menghasilkan glukosa yang maksimal.

F. Penentuan berat kering alga laut

Penentuan berat kering alga merah ini dilakukan untuk mengetahui rendamen dari selulosa alga merah dengan membandingkan berat alga basah dengan berat alga kering. Kehilangan berat bahan tersebut disebabkan oleh pengeringan karena alga laut memiliki kadar air yang cukup tinggi, setelah dicrusher dan kehilangan berat akibat lepasnya lignin setelah perlakuan awal (proses delignifikasi) dengan menggunakan NaOH 4%.

Tabel 14. Penentuan rendamen selulosa alga merah setelah proses delignifikasi

Alga merah	Berat alga laut basah (g)	Berat alga laut setelah kering (g)	Berat selulosa alga laut	Rendamen selulosa alga laut (%)
<i>G. verrucosa</i>	2000	1346	191,266	14,21
<i>E. cottonii</i>	2000	1275	134,257	10,53

Dari Tabel 14 dapat diketahui bahwa jumlah serbuk alga merah yang tersisa setelah melalui proses pengeringan, crusher dan proses delignifikasi mengalami penyusutan menjadi masing-masing 191,266 g

untuk *G. verrucosa* dan 134,257 gram untuk *E. cottonii* dari 2000 gram bahan baku alga merah basah.

G. Penentuan gula reduksi setelah proses delignifikasi

Natrium hidroksida (NaOH) merupakan basa kuat yang juga dapat menyebabkan terjadinya hidrolisis selulosa menjadi glukosa. Untuk mengetahui adanya hidrolisis selulosa yang terjadi pada alga merah setelah proses delignifikasi maka dilakukan penentuan kadar glukosa setelah proses delignifikasi dengan menggunakan metode Luff-Schrool. Hasil perhitungan dapat dilihat pada Lampiran 9-11.

Tabel 15. Penentuan gula reduksi metode Luff Schrool pada alga merah setelah proses delignifikasi

Jenis alga merah	Volume titrasi $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ pada blanko(mL)	Volume titrasi $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ pada sampel(mL)	Kadar gula reduksi (%)
<i>G. verrucosa</i>	9,37	9,56	Tidak ada
<i>E. cottonii</i>	9,37	9,47	Tidak ada

Penentuan gula reduksi setelah delignifikasi bertujuan untuk mengetahui kandungan glukosa awalyang terdapat pada sampel alga merahsetelah proses delignifikasi dilakukan. Pada Tabel 15 terlihat bahwa sebelum fermentasi kedua jenis sampel alga laut tidak mengandung gula reduksi berarti pada sampel tidak mengandung glukosa awal.

H. Penentuan kondisi optimum hidrolisis selulosa berdasarkan pengaruh pH dan waktu hidrolisis oleh jamur *T. viride*

1. Produksi bioetanol dengan metode SHF

Produksi bioetanol dapat dilakukan dengan menggunakan biomassa melalui dua tahap yaitu hidrolisis dan fermentasi. Proses hidrolisis dan fermentasi ini dapat dilakukan secara terpisah atau *Separated Hydrolysis and Fermentation* (SHF). Setelah proses hidrolisis selesai dilanjutkan proses fermentasi. Karena prosesnya yang terpisah maka sistem SHF ini dapat memudahkan pengontrolan terhadap tiap tahap. Dengan adanya pengontrolan maka hasil yang diinginkan dapat tercapai maksimal dan interaksi antara dua tahap (hidrolisis dan fermentasi) dapat diminimalkan dan kelebihan lain dari metode ini kandungan glukosa yang dihasilkan dari proses hidrolisis lebih maksimal.

Hidrolisis merupakan proses untuk mengubah selulosa menjadi glukosa. Hidrolisis selulosa dapat menggunakan katalis asam atau enzim. Penelitian hidrolisis selulosa dengan asam sudah berkembang cukup lama. Permasalahannya adalah hidrolisis ini menggunakan bahan yang sangat korosif dan produk akhirnya menghasilkan limbah yang berbahaya. Hidrolisis menggunakan metode enzimatik lebih efisien, prosesnya ramah lingkungan karena sedikit menghasilkan limbah berbahaya dan juga menghasilkan gula reduksi lebih banyak dibandingkan dengan hidrolisis dengan asam (Patle & Lal, 2007).

Pada penelitian ini, hidrolisis dilakukan secara enzimatik menggunakan jamur *T. viride* yang menghasilkan enzim selulase. Enzim ini merupakan biokatalis yang dapat mengaktifkan senyawa lain secara

spesifik dan dapat meningkatkan kecepatan reaksi kimia. Enzim selulase merupakan enzim kompleks yang terdiri dari eksoselulase atau eksobiohidrolase, endoselulase atau endo- β -1,4-glukanase atau β -1,4-glukosidase atau selulobiase. Berdasarkan data analisis diatas ternyata kandungan selulosa dari kedua jenis alga merah bervariasi. *G. verrucosa* memiliki kadar selulosa paling tinggi yaitu sebesar 13,04% sedangkan *E. cottonii* sebesar 9,51%. Selulosa adalah salah satu komponen utama dari lignoselulosa yang terdiri dari unit monomer D-glukosa yang terikat pada ikatan β -1,4-glikosidik. Oleh karena itu digunakan mikroorganisme yang dapat menghasilkan enzim selulase untuk memecah monomer-monomer pada selulosa menjadi glukosa, setelah dipecah menjadi glukosa selanjutnya akan diubah menjadi etanol. Monosakarida yang terbentuk akan diubah oleh enzim oksidase menjadi etanol dan karbondioksida (CO₂).

Pada penelitian ini dilakukan beberapa variasi perlakuan yang berbeda agar hasil yang diperoleh dapat dibandingkan satu sama lain. Perlakuan tersebut meliputi variasi waktu dan kondisi derajat keasaman (pH) yang berlainan baik kondisi optimum dari hidrolisis selulosa oleh jamur *Trichoderma viride*.

Waktu hidrolisis selulosa secara enzimatik yang digunakan variasi 2, 4, 6, 8, 10, 12, dan 14 hari sedangkan pH pada proses ini dikontrol dengan menggunakan buffer asetat dan buffer fosfat. Variasi pH yang digunakan 4,5; 5; 5,5; 6 dan 6,5. Dari variasi waktu optimum tersebut dapat ditentukan waktu optimum untuk proses hidrolisis.

2. Penentuan Waktu Optimum Hidrolisis Enzimatik

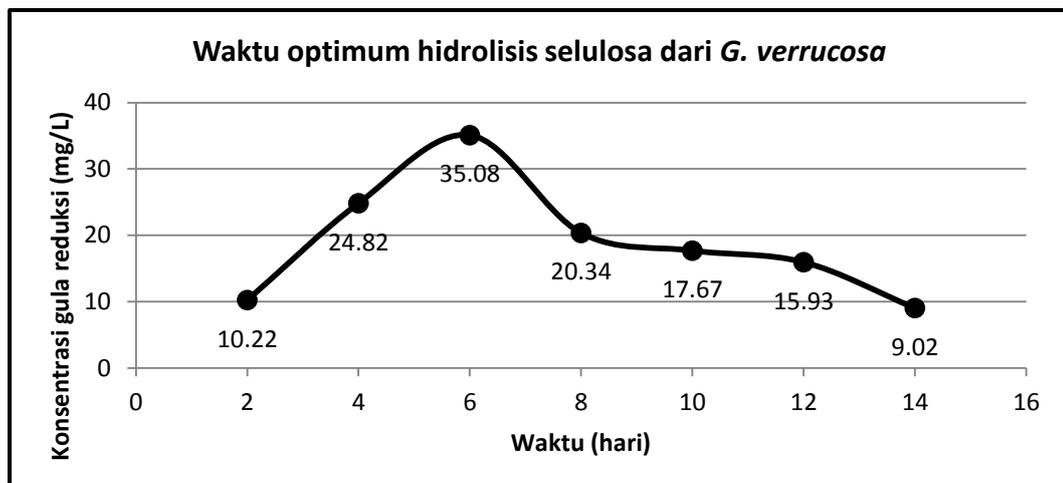
Waktu merupakan hal yang paling penting dalam proses hidrolisis sebab mikroorganisme dalam perkembangannya memerlukan waktu untuk menghasilkan enzim selulase yang berperan sebagai biokatalis untuk merubah selulosa menjadi glukosa.

Proses pembuatan bioetanol dilakukan dengan menambahkan konsentrasi starter 10% ke dalam substrat dengan variasi waktu selama 2, 4, 6, 8, 10, 12 dan 14 hari pada pH 5. Berdasarkan literatur pH 5 merupakan pH optimum hidrolisis jamur *T. viride*. Kemudian hasil hidrolisis disaring dan diukur kadar gula reduksinya dengan metode Nelson Somogyi. Penentuan waktu optimum berdasarkan kadar gula reduksi metode Nelson-Somogyi dapat di lihat pada Lampiran 20. Data hasil pengaruh waktu hidrolisis selulosa terhadap konsentrasi gula reduksi dapat dilihat pada Tabel 16.

Tabel 16. Pengaruh waktu hidrolisis enzimatik terhadap konsentrasi gula reduksi dari kedua jenis alga merah pada pH 5,0

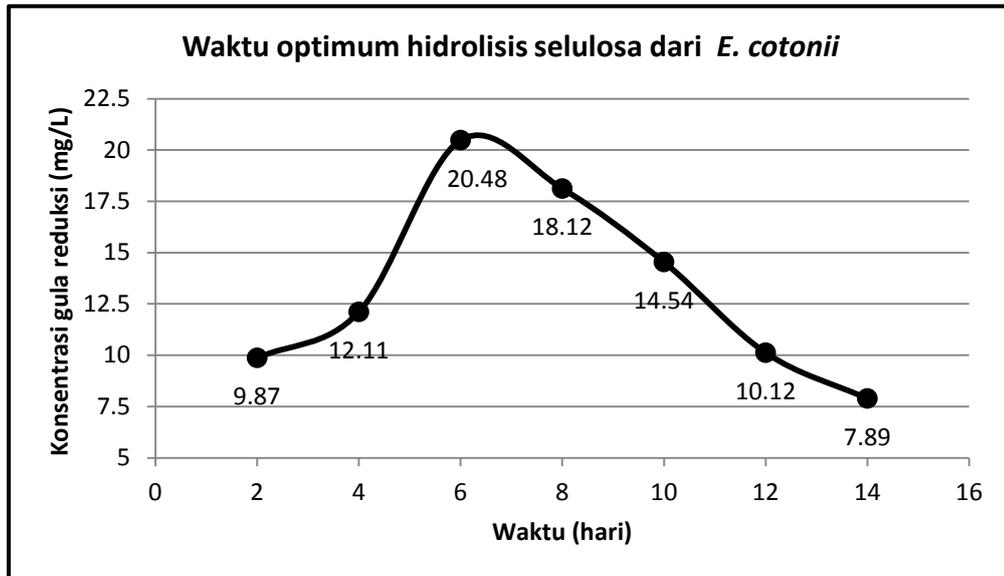
Alga Laut	Waktu Hidrolisis (hari)	Konsentrasi glukosa (mg/L)
<i>G. verrucosa</i>	2	10,22
	4	24,82
	6	35,08
	8	20,34
	10	17,67
	12	15,93
	14	9,02
<i>E.cottonii</i>	2	9,87
	4	12,11
	6	20,48
	8	18,12
	10	14,54
	12	10,12
	14	7,89

Grafik pengaruh waktu hidrolisis terhadap kadar gula reduksi pada pH 5,0 untuk jenis merah *G. Verrucosa* dapat dilihat pada Gambar 18. Dari Gambar 18 dapat diketahui bahwa penentuan waktu optimum hidrolisis dari *G. verrucosa*. Pada hari ke-2 sampai hari ke-4 jamur masih berada pada tahap penyesuaian sehingga peningkatan kadar glukosa masih sangat lambat. Konsentrasi glukosa meningkat pada hari ke-6 sebesar 35,08 mg/L yang merupakan kadar glukosa tertinggi. Ini disebabkan karena jamur telah menyesuaikan diri dengan kondisi untuk melakukan proses hidrolisis enzimatik. Setelah hari ke-6 terjadi penurunan secara drastis dari 35,08 mg/L menjadi 20,34 mg/L kemudian akhirnya turun pada hari ke-14 menjadi 9,02 mg/L.



Gambar 18. Grafik penentuan waktu optimum hidrolisis *G. verrucosa* pada pH 5.0

Untuk penentuan waktu optimum hidrolisis enzimatik pada pH 5,0 untuk jenis alga *E. cottonii* dapat dilihat pada Gambar 19.



Gambar 19. Grafik penentuan waktu optimum hidrolisis *E. cottonii* pada pH 5.0

Dari Gambar 19 terlihat pada hari ke-2 hingga hari ke-4 peningkatan konsentrasi glukosa masih lambat, pada hari ke-6 konsentrasi glukosa mengalami peningkatan secara signifikan dari 12,11 mg/L menjadi 20,48 mg/L ini merupakan konsentrasi glukosa tertinggi yang diperoleh karena selanjutnya pada hari ke-12 dan ke-14 kadar bioetanol semakin menurun menjadi 7,89 mg/L.

Secara umum untuk kedua jenis alga laut pada variasi waktu fermentasi dapat diketahui bahwa pada hari ke-2 sampai hari ke-4 peningkatan konsentrasi glukosa sangat lambat. Pada tahap ini terjadi fase lag yakni fase dimana mikroba/jamur masih menyesuaikan diri dengan kondisi lingkungan sehingga aktivitas jamur belum optimal melakukan hidrolisis selulosa. Selama fase ini massa sel bertambah sangat sedikit tanpa disertai penambahan densitas jumlah sel oleh karena itu laju pertumbuhan sel bisa saja sama dengan nol. Ketika sel telah menyesuaikan diri dengan lingkungan yang baru maka sel mulai

membelah hingga mencapai populasi yang maksimum. Fase ini disebut fase eksponensial. Fase eksponensial ditandai dengan terjadinya periode pertumbuhan yang cepat. Setiap sel dalam populasi membelah menjadi dua sel. Variasi derajat pertumbuhan jamur pada fase eksponensial ini sangat dipengaruhi oleh sifat genetik yang diturunkannya. Selain itu, derajat pertumbuhan juga dipengaruhi oleh kadar nutrient dalam media, suhu inkubasi, kondisi pH dan aerasi. Pada penelitian ini fase terjadi pada hari ke-6 yang ditandai dengan peningkatan konsentrasi gula reduksi. Pada hari ke-6 mulai terjadi reproduksi seluler, dimana perlahan-lahan konsentrasi biomassa meningkat disertai dengan penambahan jumlah sel. Pada saat ini laju pertumbuhan atau reproduksi seluler mencapai titik maksimum, maka terjadi pertumbuhan secara eksponensial, laju pertumbuhan sel meningkat sebanding dengan konsentrasi sel pada saat itu.

Waktu hidrolisis hari ke-12, bakteri mengalami fase stasioner yang menunjukkan jamur sudah tidak bekerja lagi secara optimal. Fase stasioner terjadi pada saat laju pertumbuhan mikrobasama dengan laju kematiannya, sehingga jumlah keseluruhan akan tetap. Fase tersebut terjadi karena nutrient yang semakin berkurang sehingga terjadi akumulasi produk yang toksik yang dapat mengganggu pembelahan sel, serta terjadinya produk samping dari proses hidrolisis yang tidak terkait dengan pertumbuhan dan produktivitas mikroba, akibatnya pada hari berikutnya produktivitas jamur *T. viride* untuk menghasilkan enzim selulase semakin berkurang sehingga diperoleh konsentrasi glukosa yang kecil.

Pada hari ke-14 konsentrasi glukosa yang dihasilkan sudah turun dan cenderung konstan. Pada tahap ini jamur mengalami fase kematian yang ditandai dengan peningkatan laju kematian yang melampaui laju pertumbuhan, sehingga secara keseluruhan terjadi penurunan jumlah bakteri. Sehingga dapat dikatakan bahwa waktu optimum dari kinerja jamur *T. viride* pada proses hidrolisis selulosa dengan bahan *G. verrucosa* dan *E.cotonii* adalah 6 hari.

3. Penentuan pH optimum hidrolisis enzimatik

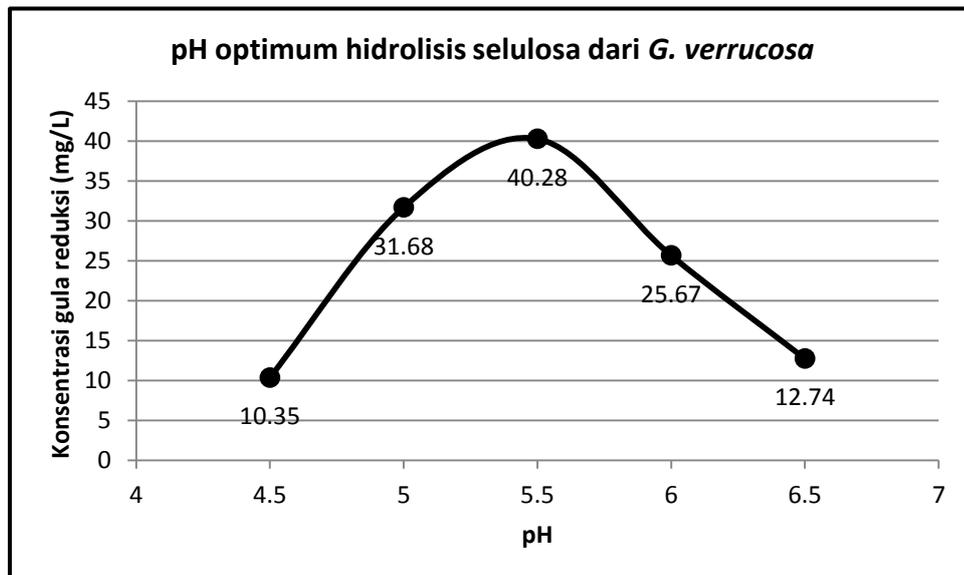
Derajat keasaman (pH) merupakan salah satu faktor penting yang mempengaruhi hidrolisis glukosa. Derajat keasaman optimum untuk proses hidrolisis secara enzimatik antara 4,0-7,0. Pada pH dibawah 4,0 proses fermentasi akan berkurang kecepatannya. Pada penelitian ini divariasikan pH antara 4,5 hingga 6,5. Derajat keasaman yang diinginkan diperoleh dengan menambahkan buffer posfat dan buffer asetat. Penambahan buffer dimaksudkan agar kondisi pH sesuai dengan besaran yang diinginkan. Hasil yang diperoleh dengan perlakuan variasi pH terhadap konsentrasi glukosa (Lampiran 20) untuk setiap jenis alga laut dapat dilihat pada Tabel 17.

Tabel 17. Pengaruh pH hidrolisis enzimatik terhadap konsentrasi gula reduksi dari kedua jenis alga merah setelah 6 hari

Alga Laut	pH Hidrolisis	Konsentrasi glukosa (mg/L)
<i>G. verrucosa</i>	4,5	10,35
	5,0	31,68
	5,5	40,28
	6,0	25,67
	6,5	12,74

Alga Laut	pH Hidrolisis	Konsentrasi glukosa (mg/L)
<i>E.cottonii</i>	4,5	12,45
	5,0	18,78
	5,5	25,90
	6,0	16,72
	6,5	10,66

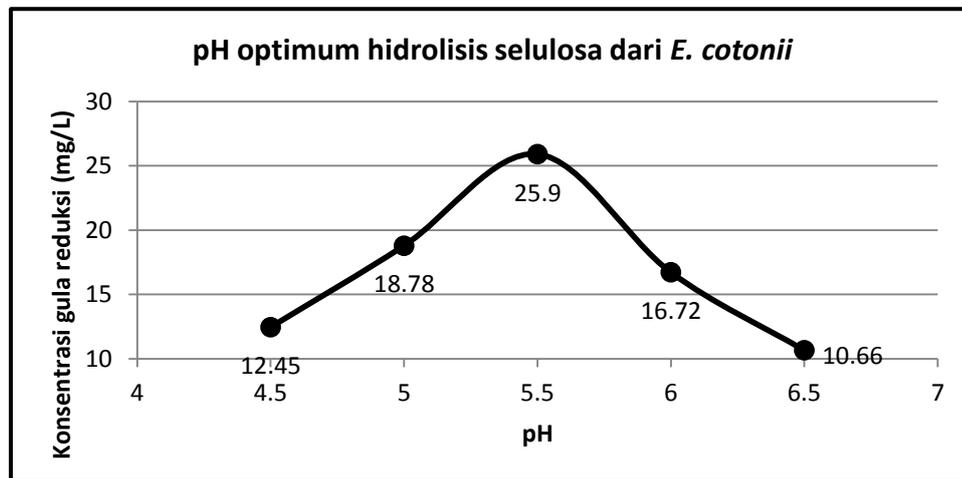
Pengaruh pH hidrolisis oleh jamur *T. viride* terhadap konsentrasi glukosa dari *G. verrucosa* pada waktu optimum 6 hari dapat dilihat pada Gambar 20. Dari gambar diketahui bahwa konsentrasi glukosa paling tinggi dihasilkan pada pH 5,5 sebesar 40,28 mg/L. Konsentrasi ini merupakan konsentrasi glukosa tertinggi yang diperoleh dibandingkan dengan variasi pH lainnya.



Gambar 20. Grafik penentuan pH optimum hidrolisis *G. verrucosa*

Pengaruh pH hidrolisis oleh jamur *T. viride* terhadap konsentrasi glukosa dari *E. cottonii* pada waktu optimum 6 hari dapat dilihat pada Gambar 21. Dari gambar diketahui bahwa konsentrasi glukosa paling

tinggi dihasilkan pada pH 5,5 sebesar 25,90 mg/L. pH optimum pada *E. cottonii* sama dengan pH optimum yang diperoleh dari jenis *G. verrucosa*.



Gambar 21. Grafik penentuan pH optimum hidrolisis *E. cottonii*

I. Penentuan kondisi optimum fermentasi bioetanol berdasarkan pengaruh pH dan waktu fermentasi oleh bakteri *Z. mobilis*

Proses selanjutnya setelah proses hidrolisis selulosa yaitu proses fermentasi etanol dimana glukosa yang dihasilkan pada proses hidrolisis difermentasikan menjadi etanol. Fermentasi etanol pada umumnya menggunakan jasa mikroba yaitu bakteri atau khamir. Berbagai jenis mikroba telah banyak digunakan dalam fermentasi untuk menghasilkan etanol. Penelitian terkini difokuskan pada bakteri Gram negatif *Zymomonas mobilis* yang sangat prospektif untuk memproduksi etanol skala industri dan memiliki kelebihan dibandingkan dengan *Saccharomyces cerevisiae*, diantaranya konversi yang lebih cepat, toleran terhadap suhu dan pH rendah, serta tahan terhadap etanol konsentrasi tinggi.

Pada penelitian ini dilakukan beberapa variasi perlakuan yang berbeda agar hasil yang diperoleh dapat dibandingkan satu sama lain. Perlakuan tersebut meliputi variasi waktu dan kondisi derajat keasaman (pH) yang berlainan baik kondisi optimum dari fermentasi bioetanol oleh bakteri *Zymomonas.mobilis*.

Waktu fermentasi bioetanol yang digunakan variasi 1, 3, 5, 7, 9, 11, dan 13 hari sedangkan pH pada proses ini dikontrol dengan menggunakan buffer asetat dan buffer fosfat. Variasi pH yang digunakan 4, 5, 6, 7, dan 8. Dari variasi waktu optimum tersebut dapat ditentukan waktu optimum untuk proses fermentasi dari setiap perlakuan.

1. Penentuan waktu optimum fermentasi

Waktu merupakan hal yang paling penting dalam proses fermentasi sebab bakteri *Z. mobilis* dalam perkembangannya memerlukan waktu untuk menghasilkan enzim yang berperan sebagai biokatalis untuk merubah glukosa menjadi etanol. Proses uji pengaruh perbedaan waktu fermentasi dilakukan untuk mengetahui pengaruh lama waktu fermentasi terhadap kadar etanol. Hasil proses ini akan digunakan sebagai acuan lama waktu proses produksi bioetanol selanjutnya.

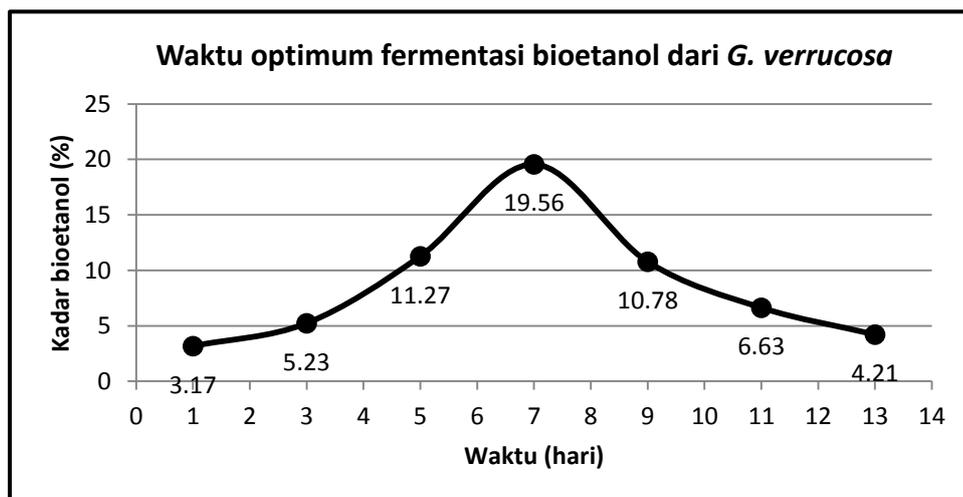
Proses pembuatan bioetanol dilakukan dengan menambahkan konsentrasi starter 10% ke dalam substrat dengan variasi waktu selama 1, 3, 5, 7, 9, 11, dan 13 hari pada pH 5. pH 5 dipilih berdasarkan literatur yang diperoleh tentang pH optimum fermentasi menggunakan bakteri *Z. mobilis*. Kemudian hasil fermentasi didestilasi untuk menghasilkan etanol dengan konsentrasi yang lebih tinggi dan dianalisis indeks biasanya

dengan menggunakan refraktometer (Lampiran 26). Data hasil pengaruh waktu terhadap kadar bioetanol dapat dilihat pada Tabel 18.

Tabel 18. Pengaruh waktu fermentasi bioetanol terhadap nilai indeks bias dari kedua jenis alga merah pada pH 5,0

Alga Laut	Waktu Fermentasi (hari)	Kadar bioetanol (%)
<i>G. verrucosa</i>	1	3,17
	3	5,23
	5	11,27
	7	19,56
	9	10,78
	11	6,63
	13	4,21
<i>E.cottonii</i>	1	1,12
	3	1,85
	5	2,31
	7	5,60
	9	3,21
	11	2,89
	13	1,53

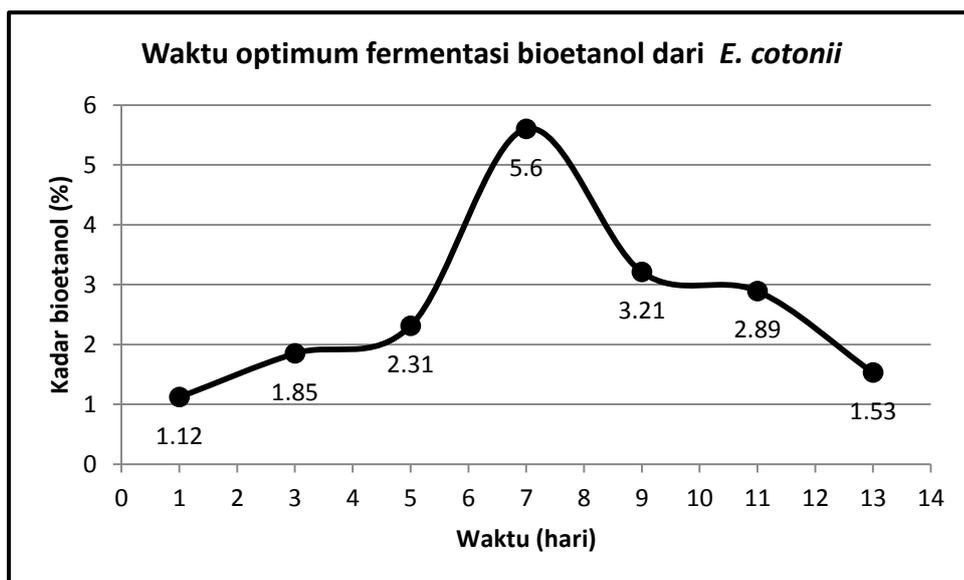
Grafik pengaruh waktu fermentasi terhadap kadar bioetanol pada pH 5,0 untuk jenis alga laut *G. verrucosa* dapat dilihat pada Gambar 22.



Gambar 22. Grafik penentuan waktu optimum fermentasi bioetanol *G. verrucosa* pada pH 5.0

Dari Gambar 22 dapat diketahui bahwa pada hari ke-1 sampai hari ke-3 bakteri masih berada pada tahap penyesuaian sehingga peningkatan kadar bioetanol masih sangat lambat. Kadar bioetanol mulai meningkat pada hari ke-5 dan semakin meningkat pada hari ke-7 sebesar 19,56 % yang merupakan kadar bioetanol tertinggi ini disebabkan karena bakteri telah menyesuaikan diri dengan kondisi fermentasi. Setelah hari ke-11 dan ke-13 terjadi penurunan kadar bioetanol yang signifikan menjadi 6,63% dan 4,21%.

Grafik pengaruh waktu fermentasi terhadap kadar bioetanol pada pH 5,0 untuk jenis alga laut *E. cottonii* dapat dilihat pada Gambar 23.



Gambar 23. Grafik penentuan waktu optimum fermentasi bioetanol *E. cottonii* pada pH 5.0

Dari Gambar 23 terlihat pada hari ke-1 hingga hari ke-5 peningkatan kadar bioetanol masih lambat, pada hari ke-7 kadar bioetanol mengalami peningkatan secara signifikan yaitu sebesar 5,60% ini

merupakan kadar bioetanol tertinggi yang diperoleh. Selanjutnya pada hari ke-11 dan ke-13 kadar bioetanol semakin menurun.

Secara umum untuk kedua jenis alga laut pada variasi waktu fermentasi dapat diketahui bahwa pada hari ke-1 sampai hari ke-3 peningkatan kadar bioetanol sangat lambat. Pada tahap ini terjadi fase lag yakni fase dimana mikroba masih menyesuaikan diri dengan kondisi lingkungan sehingga aktivitas mikroba belum optimal. Selama fase ini massa sel bertambah sangat sedikit tanpa disertai penambahan densitas jumlah sel oleh karena itu laju pertumbuhan sel bisa saja sama dengan nol. Lama fase lag pada bakteri sangat bervariasi, tergantung pada komposisi media, pH, suhu, aerasi, jumlah sel pada inokulum awal dan sifat fisiologis mikroorganisme pada media sebelumnya. Ketika sel telah menyesuaikan diri dengan lingkungan yang baru maka sel mulai membelah hingga mencapai populasi yang maksimum. Fase ini disebut fase eksponensial. Fase eksponensial ditandai dengan terjadinya periode pertumbuhan yang cepat. Setiap sel dalam populasi membelah menjadi dua sel. Variasi derajat pertumbuhan bakteri pada fase eksponensial ini sangat dipengaruhi oleh sifat genetik yang diturunkannya. Selain itu, derajat pertumbuhan juga dipengaruhi oleh kadar nutrient dalam media, suhu inkubasi, kondisi pH dan aerasi. Pada penelitian ini fase terjadi pada hari ke-7 yang ditandai dengan peningkatan kadar bioetanol. Pada hari ke-7 mulai terjadi reproduksi seluler, dimana perlahan-lahan konsentrasi biomassa meningkat disertai dengan penambahan jumlah sel. Pada saat ini laju pertumbuhan atau reproduksi seluler mencapai titik maksimum,

maka terjadi pertumbuhan secara eksponensial, laju pertumbuhan sel meningkat sebanding dengan konsentrasi sel pada saat itu.

Waktu fermentasi hari ke-11, bakteri mengalami fase stasioner yang menunjukkan bakteri sudah tidak bekerja lagi secara optimal. Fase stasioner terjadi pada saat laju pertumbuhan bakteri sama dengan laju kematiannya, sehingga jumlah bakteri keseluruhan akan tetap. Fase terjadi akumulasi produk toksik sehingga mengganggu pembelahan sel., serta terjadinya produk samping dari fermentasi yang tidak terkait dengan pertumbuhan dan produktivitas bakteri, akibatnya proses fermentasi pada hari berikutnya produktivitas bakteri untuk menghasilkan enzim semakin berkurang sehingga diperoleh kadar bioetanol yang kecil. Produk samping yang terbentuk dapat berupa asam asetat atau asam organik yang terbentuk dari etanol yang mengalami reaksi lanjut.

Pada hari ke-13 kadar bioetanol yang dihasilkan sudah turun dan cenderung konstan. Pada tahap ini bakteri mengalami fase kematian yang ditandai dengan peningkatan laju kematian yang melampaui laju pertumbuhan, sehingga secara keseluruhan terjadi penurunan jumlah bakteri. Sehingga dapat dikatakan bahwa waktu optimum dari kinerja bakteri *Z. mobilis* pada proses fermentasi bioetanol dengan bahan *G. verucosa* dan *E. cotonii* adalah 7 hari.

2. Penentuan pH optimum fermentasi

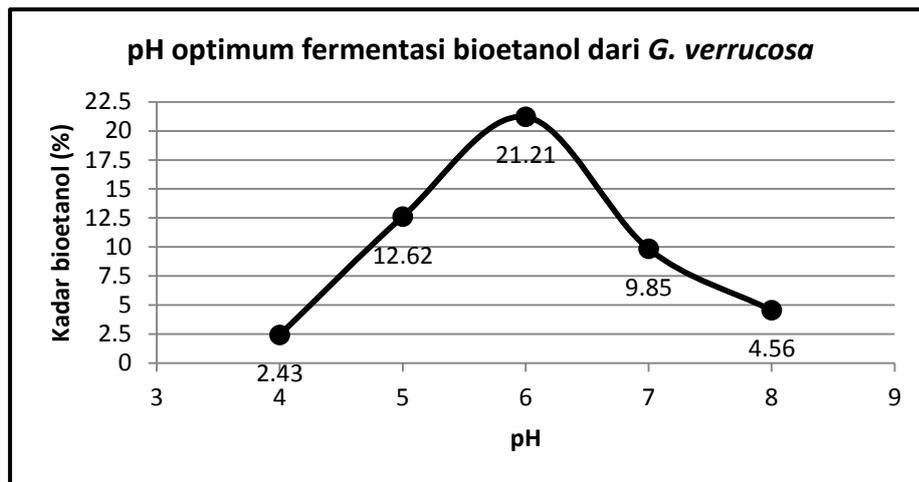
Derajat keasaman (pH) merupakan salah satu faktor penting yang mempengaruhi fermentasi etanol. Derajat keasaman optimum untuk proses fermentasi antara 4,0-7,0. Pada pH dibawah 4,0 proses fermentasi

akan berkurang kecepatannya. Pada penelitian ini divariasikan pH antara 4,0 hingga 8,0. Derajat keasaman yang diinginkan diperoleh dengan menambahkan buffer posfat dan buffer asetat. Penambahan buffer dimaksudkan agar kondisi pH sesuai dengan besaran yang diinginkan. Hasil yang diperoleh dengan perlakuan variasi pH (Lampiran 26) terhadap kadar bioetanol untuk setiap jenis alga merah dapat dilihat pada Tabel 19.

Tabel 19. Pengaruh pH fermentasi bioetanol terhadap nilai indeks bias dari kedua jenis alga merah selama 7 hari

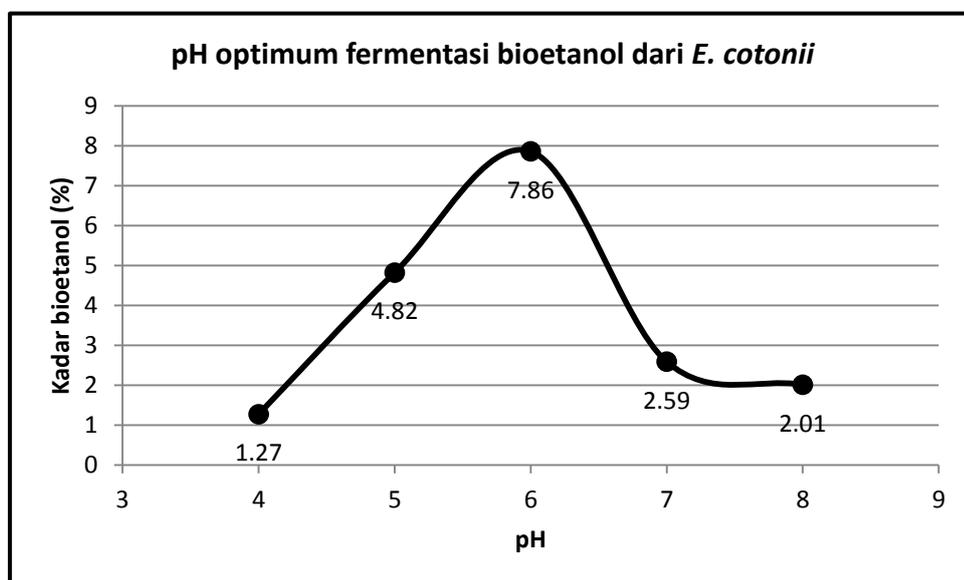
Alga Laut	pH Fermentasi	Kadar bioetanol (%)
<i>G. verrucosa</i>	4	2,43
	5	12,62
	6	21,21
	7	9,85
	8	4,56
<i>E.cottonii</i>	4	1,27
	5	4,82
	6	7,86
	7	2,59
	8	2,01

Pengaruh pH fermentasi terhadap kadar bioetanol alga merah jenis *G. verrucosa* pada kondisi waktu 7 hari fermentasi dapat dilihat pada Gambar 24.



Gambar 24. Grafik penentuan pH optimum fermentasi Bioetanol *G. verrucosa*

Dari Gambar 24 dapat diketahui bahwa konsentrasi bioetanol paling tinggi dihasilkan pada proses fermentasi dengan pH dengan pH 6,0 yaitu 21,21 %. Konsentrasi ini merupakan konsentrasi bioetanol tertinggi yang diperoleh dibandingkan variasi pH lainnya.



Gambar 25. Grafik penentuan pH optimum fermentasi *E. cottonii*

Pengaruh pH fermentasi terhadap alga merah *E. cottonii* pada waktu fermentasi 7 hari dapat dilihat pada Gambar 25. Dari pH fermentasi 6,0 yaitu sebesar 7,86%. pH optimum ini sama dengan pH optimum yang diperoleh pada jenis *G. verrucosa*.

Perubahan pH bisa terjadi karena fermentasi tidak hanya menghasilkan etanol tetapi juga menghasilkan senyawa lain seperti asam asetat, asam butirat, dan asam formiat. Asam asetat dapat dihasilkan oleh sel kontaminan yang hidup bersama bakteri. Namun ada juga kemungkinan glukosa yang terhidrolisis telah habis terfermentasi.

Tinggi rendahnya kadar bioetanol pada proses fermentasi dapat disebabkan oleh aktivitas enzim yang dihasilkan oleh bakteri. Aktivitas enzim dipengaruhi pH, karena sifat ionik gugus karboksil dan gugus amino mudah dipengaruhi pH. Perubahan pH atau pH yang tidak sesuai akan menyebabkan daerah katalik atau konformasi enzim serta mengakibatkan hilangnya aktivitas enzim berubah. Selain itu pengaruh pH juga menyebabkan denaturasi enzim serta mengakibatkan hilangnya aktivitas enzim. Bakteri *Z. mobilis* dapat berkembang dengan baik pada pH 6,0 karena itu konsentrasi bioetanol yang dihasilkan lebih tinggi dari perlakuan pH yang lain.

Dari kedua jenis alga laut yang digunakan ternyata kadar bioetanol yang paling tinggi pada saat penentuan kondisi optimum semuanya diperoleh pada pH 6,0.

J. Produksi Bioetanol

1. Konsentrasi Substrat

Konsentrasi substrat yang digunakan untuk memproduksi bioetanol dari alga laut jenis *G. verrucosa* dan *E. cottoni* adalah 2%, ini merupakan kadar optimum sebab jika diatas kadar ini maka akan membentuk gel padat pada saat didinginkan.

Pada penelitian ini untuk produksi bioetanol digunakan alga laut sebanyak 120 gram yang diencerkan menjadi 6000 mL. Untuk memperoleh 120 gram substrat dibutuhkan bahan baku *G. verrucosa* sebesar 844,48 gram dan *Euclima cottoni* sebesar 1139,6 gram.

2. Hidrolisis dan Fermentasi

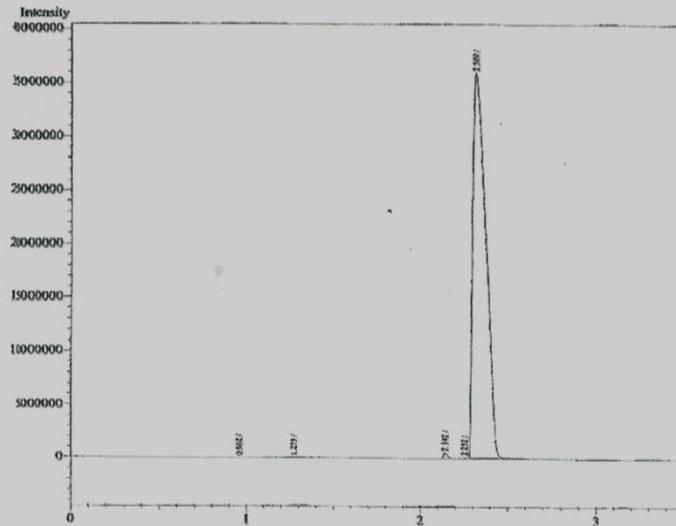
Sebanyak 6000 mL larutan substrat difermentasikan pada kondisi optimum yakni pada pH 6,0 selama 7 hari. Setelah didestilasi diperoleh bioetanol sebanyak 39,6 mL untuk jenis *G. verrucosa* dan 30,4 mL untuk *E. cottoni* kemudian setelah dikeringkan dengan CaCO_3 anhidrat diperoleh bioetanol sebanyak 34,53 mL untuk *G. verrucosa* dan 26,3 mL untuk *E. cottonii*.

3. Penentuan Kadar Bioetanol

Bioetanol yang telah di dehidrasi kemudian ditentukan kadarnya dengan menggunakan alat kromatografi gas (GC 2010 Shimadzu). Pada analisis ini digunakan etanol murni sebagai pembanding, dari hasil analisis dengan menggunakan GC pada Gambar 26 terlihat bahwa etanol murni berada pada waktu retensi 2,369.

REPORT ANALYSIS GAS CHROMATOGRAPHY

Analysis Date & Time : 12/19/2012 10:51:42 AM
User Name : Admin
Sample Name : Standar Etanol 100%



Peak Table - Channel 1

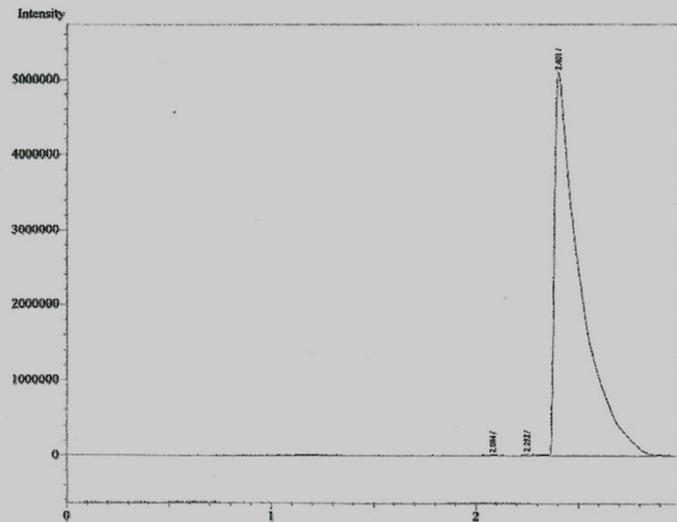
Peak#	Ret.Time	Area	Height	Conc.	Units	Mark	Name
1	0.962	5762	141	0.000			
2	1.275	1517	60	0.000		V	
3	2.142	779463	504175	0.000			
4	2.252	100145	62745	0.000		V	
5	2.369	185820106	35908166	0.000		V	
Total		186706993	36475287				

Gambar 26. Data analisis etanol murni pada GC

Pada analisis pertama diperoleh data seperti yang ditunjukkan pada Gambar 27. Dari Gambar 27 dapat diketahui bahwa peak sampel bioetanol dari *G. verrucosa* terdapat pada peak ke-3 dengan waktu retensi 2,401. Waktu retensi ini hampir mendekati dengan waktu retensi etanol murni.

REPORT ANALYSIS GAS CHROMATOGRAPHY

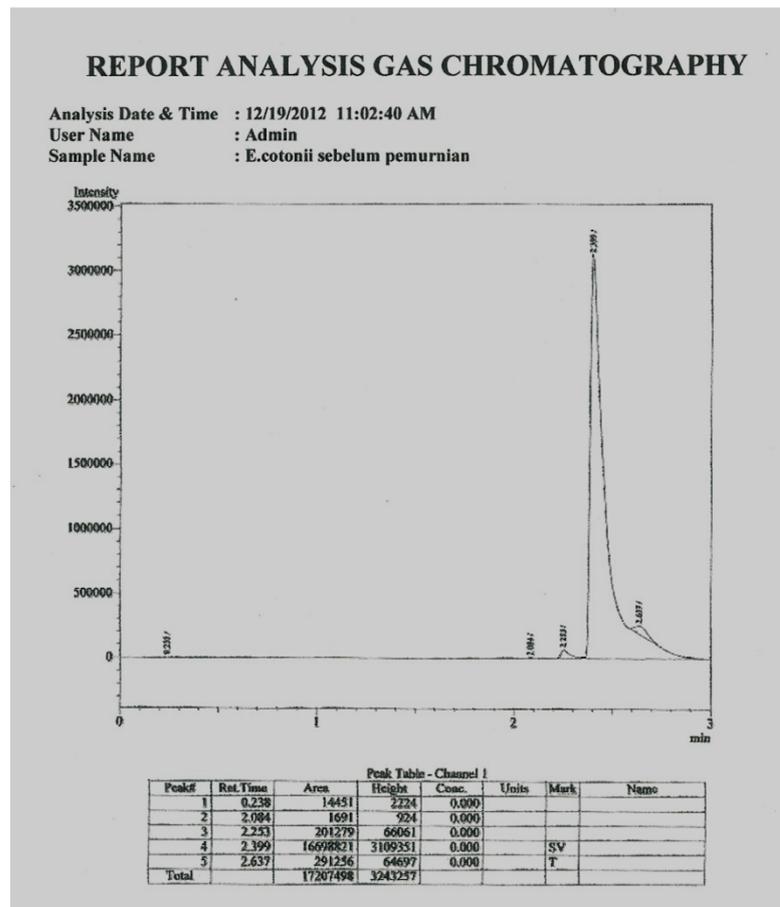
Analysis Date & Time : 12/19/2012 11:11:30 AM
User Name : Admin
Sample Name : Gracilaria sebelum pemurnian



Peak Table - Channel 1							
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Units	Mark	Name
1	2.084	16057	7004	0.000			
2	2.252	79127	20508	0.000		V	
3	2.401	43777947	5086571	0.000		V	
Total		43873131	5114083				

Gambar 27. Analisis bioetanol hasil fermentasi sebelum pemurnian selulosa *G. verrucosa* menggunakan Kromatografi Gas

Untuk jenis *E. cottonii* hasilnya dapat ditunjukkan pada Gambar 28. Gambar 28 memperlihatkan peak sampel bioetanol berada pada peak ke-4 dengan waktu retensi 2,399. Waktu retensi ini hampir sama dengan waktu retensi etanol murni sebesar 2,369.



Gambar 28. Analisis bioetanol hasil fermentasi sebelum pemurnian selulosa *E. cottonii* menggunakan Kromatografi Gas

Untuk menentukan kadar sampel dengan alat GC dilakukan dengan cara membandingkan luas area antara bioetanol murni (standar) dengan luas area sampel. Penunjukan area pada alat ini sebagai berikut:

- a. Area standar etanol murni ($W_R = 2,369$) = 185820106
- b. Area bioetanol *G. verrucosa* ($W_R = 2,401$) = 43777947
- c. Area bioetanol *E. cottonii* ($W_R = 2,399$) = 16698821

Kadar etanol yang diperoleh untuk kedua jenis alga merah adalah sebagai berikut:

$$a. \text{ Gracillaria verrucosa} = \frac{43777947}{185820106} \times 100\% = 23,56\% \dots (6)$$

$$b. \textit{Eucheuma cottoni} = \frac{16698821}{185820106} \times 100\% = \mathbf{8,99\%} \quad \dots(7)$$

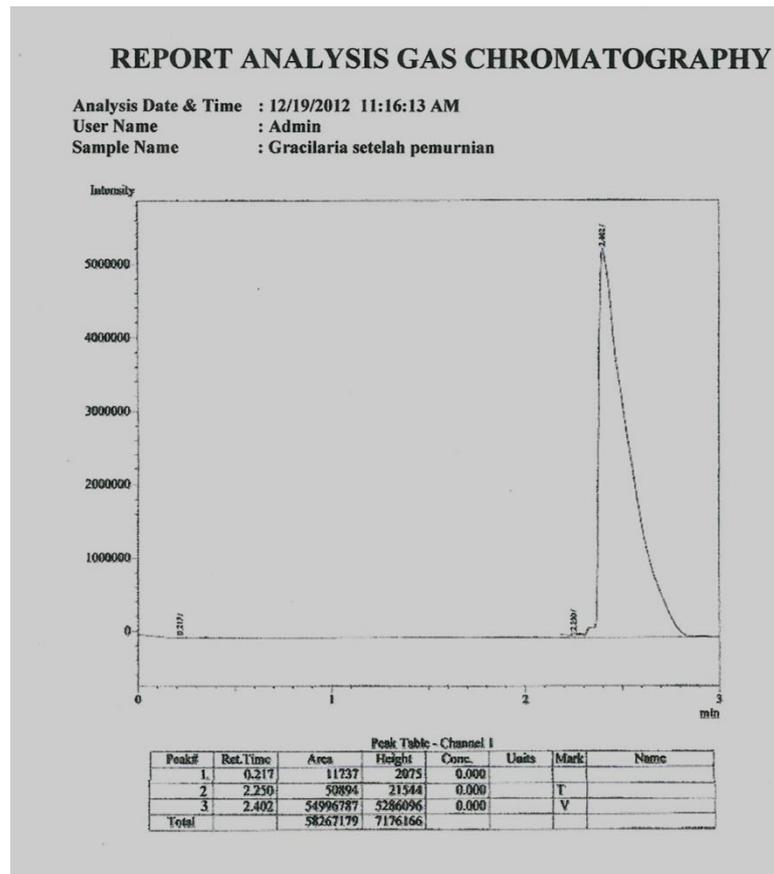
Kadar bioetanol yang diperoleh sangat rendah, hal ini dimungkinkan karena bioetanol yang diperoleh pada tahap destilasi masih belum murni karena masih mengandung air. Pengotor ini dapat disebabkan oleh adanya produk samping yang terbentuk berupa asam asetat atau asam organik lain yang terbentuk dari etanol yang mengalami reaksi lebih lanjut, bisa juga oleh injector yang tidak bersih pada saat injeksi. Oleh karena itu sampel harus dimurnikan kembali.

Pemurnian (dehidrasi) kembali dilakukan dengan cara penambahan CaCO_3 anhidrat, dan setelah pemurnian diperoleh data seperti pada Gambar 29. Pada Gambar 29 terlihat bahwa sampel bioetanol *G. verrucosa* sudah mulai murni. Sampel bioetanol terdapat pada peak ke-4 waktu retensinya 2,402 dengan luas area 54996787, sehingga kadar etanol yang diperoleh adalah :

Bioetanol *G. verrucosa* setelah pemurnian

$$= \frac{54996787}{185820106} \times 100\% = \mathbf{29,60\%} \quad \dots(8)$$

Kadar bioetanol yang diperoleh meningkat dari kadar bioetanol yang diperoleh sebelum dehidrasi dengan CaCO_3 anhidrat dilakukan.

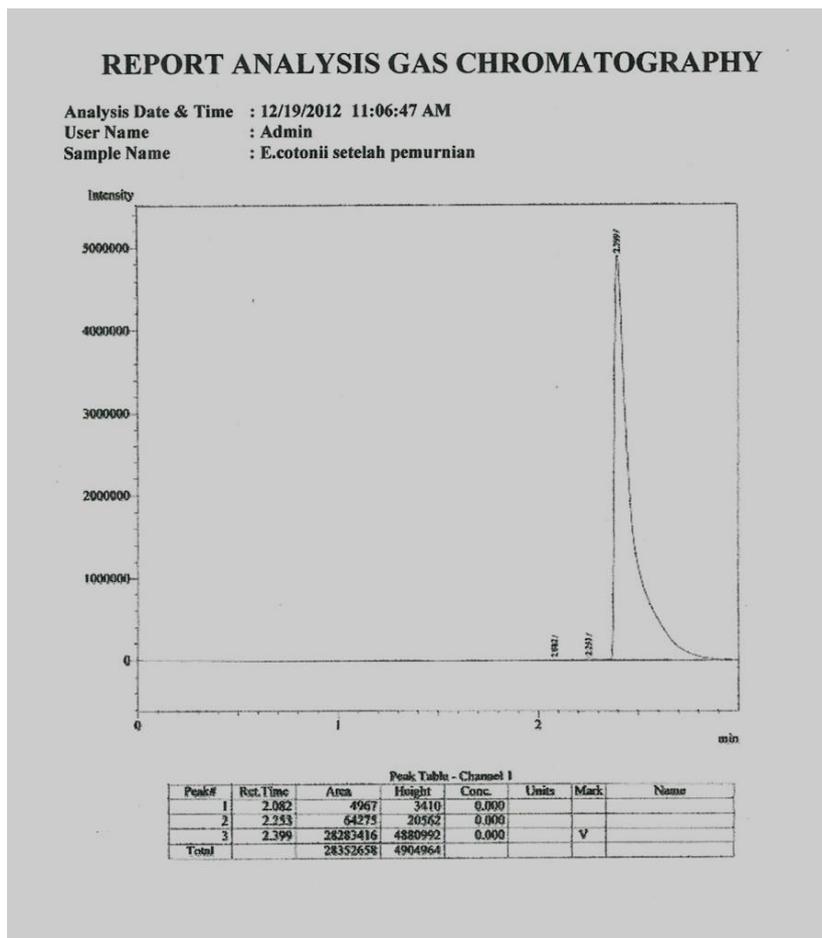


Gambar 29. Analisis bioetanol hasil fermentasi setelah pemurnian selulosa dari *G. verrucosa* menggunakan Kromatografi Gas

Demikian pula sampel bioetanol dari *E. cottoni* pada Gambar 30 terlihat peak-peak yang lain sudah mulai berkurang. Sampel bioetanol terdapat pada peak ke-3 waktu retensinya 2,399 dengan luas area 28283416, sehingga kadar etanol yang diperoleh adalah:

Bioetanol *E. cottonii* setelah pemurnian

$$= \frac{28283416}{185820106} \times 100\% = 15,22 \%\dots\dots(9)$$



Gambar 30. Analisis bioetanol hasil fermentasi setelah pemurnian selulosa dari *E. cotonii* menggunakan Kromatografi Gas

Kadar bioetanol yang diperoleh meningkat dari kadar bioetanol yang diperoleh sebelum dehidrasi dilakukan.

Pembuatan bioetanol dari selulosa alga merah dengan sistem fermentasi dua tahap menggunakan jamur *Trichoderma viride* dan *Zymomonas mobilis* lebih sulit karena membutuhkan proses tambahan sebelum fermentasi yaitu hidrolisis. Akan tetapi pada tahap penelitian ini, hasil kadar bioetanol lebih besar jika dibandingkan dengan hasil kadar bioetanol maksimum dari penelitian Sari (2012) sebelumnya yaitu 17,04% dari *G. verrucosa* dan kadar bioetanol *E. cotonii* sebesar 8,42%.

Apabila dilakukan konversi perhitungan jumlah etanol per 1 kg berat kering alga merah *G. verrucosa* akan menghasilkan 40,92 mL etanol dan untuk alga merah *E. cottonii* akan menghasilkan 23,06 mL etanol.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

1. Kondisi optimum hidrolisis selulosa *Gracilaria verrucosa* dan *Euclima cottonii* menjadi glukosa menggunakan jamur *Trichoderma viride* adalah pH 5,5 dengan waktu hidrolisis selama 6 hari sedangkan kondisi optimum fermentasi etanol menggunakan bakteri *Zymomonas mobilis* adalah pH 6,0 dengan waktu hidrolisis selama 7 hari.
2. Bioetanol dapat diproduksi dari alga merah jenis *Gracilaria verrucosa* dan *Euclima cottonii* dengan menggunakan fermentasi dua tahap dengan kemurnian bioetanol *Gracilaria verrucosa* sebesar 29,60% dan *E. cottonii* sebesar 15,22%.
3. Bioetanol maksimum dihasilkan oleh alga merah jenis *Gracilaria verrucosa* dimana setiap 1 kg selulosa *Gracilaria verrucosa* menghasilkan 23,01% bioetanol

B. SARAN

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang proses pretreatment dalam menentukan konsentrasi NaOH yang tepat untuk memecah struktur selulosa sehingga diperoleh kadar selulosa yang murni.
2. Mengingat hasil rendamen yang dihasilkan masih rendah maka diperlukan penelitian lanjutan untuk mendapatkan hasil yang optimal seperti proses perlakuan awal yang lebih optimal dengan

memaksimalkan produk selulosa dengan proses delignifikasi secara enzimatik menggunakan jamur.

3. Perlu dicari spesies alga laut yang lain seperti alga coklat yang tidak dikonsumsi ekonomis oleh masyarakat agar tidak terjadi persaingan antara kebutuhan industri etanol dan konsumsi masyarakat dimasa yang akan datang.

DAFTAR PUSTAKA

- Akmal, Ilham, Suaib, Irwan dan Muhidin, 2007, *Budidaya Rumput Laut Metode Lepas Dasar Bersusun di Kabupaten Takalar*, Laporan Perekayasaan, Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya, Balai Besar Budidaya Air Payau, Takalar.
- Alexopoulos, C. J. dan C. W. Mims, 1979, *Introductory Micology*, Third Edition John Willey and Sons, New York.
- Alfena, 2008, *Produksi Etanol Menggunakan Mutan Zymomonas mobilis yang Dimutasi dengan Hidroksilamin*, Skripsi tidak diterbitkan, ITS, Surabaya.
- Anggadiredja, J. T., Zalnika, H., Purwoto dan Istini, 2006, *Rumput Laut Pembudidayaan, Pengolahan, dan Pemasaran Komoditas Perikanan Potensial*, Jakarta.
- Anindyawati, T., 2009, *Prospek Enzim dari Limbah Lignoselulosa untuk Produksi Bioetanol*, Pusat Penelitian Bioteknologi, LIPI, Bogor.
- Afrianto, E. dan Liviawati, E., 1989, *Budidaya Rumput Laut dan Cara Pengolahannya*, PT Bhratara Niaga Media, Jakarta.
- Aslan, L., 1998, *Budidaya Rumput Laut*, Yogyakarta: Kanisius.
- Atmajdja, Kadi, Sulistidjo dan Rachmaniar, 1996, *Pengenalan Jenis-jenis Rumput Laut Indonesia*, Puslitbang Oseanologi-LIPI, Jakarta.
- Buana, F. C., 2009, *Pembuatan Bioetanol dari Singkong (Manihot Utilissima Pohl) melalui Proses Fermentasi*, Universitas Muhammadiyah, Malang, (online), <http://eprints.umm.ac.id/5519/>, diakses 26 Februari 2011.
- Castro, P. dan M. E., Huber, 2003, *Marine Biology*, 4th ed. McGraw-Hill. Boston-USA, 468p.
- Chang, F., Kuo, W. dan Lee, K., 2003, Dehydrogenation of Ethanol Over Copper Catalyst On Rice Husk Ash Prepared By Incipient Wetness Impregnation, *Applied Catalysis*, **246** : 253-264.
- Darmajana, D. A., Rachmini, S., Edi, S., Fitri, W., Candro, S., Cecep, E., 2007, *Rumput Laut*, Penelitian Penguasaan Teknologi, Bogor.
- Datta, R., 1981, Acidogenic Fermentation of Lignocellulose-acid yield and Conversion of Components, *Biotechnology and Bioengineering*, **23** (9) : 2167-2170.

- Davin, L. B., Lewis, N. G., 2005, Lignin Primary Structures and Dirigent sites, *Current Opinon in Biotechnology*, **16** : 407-415.
- Davis, L., dkk., 2006, Evaluation of Zymomonas-based ethanol production from hydrolysed waste starch stream, *Biomass and bioenergy*, **30** : 809-814.
- Dawes, C. J. 1981. *Marine Botany*. Jhon Wiley & Sons, Inc.
- Enari, T. M., 1983, *Microbial Enzimatic and Biotechnology*, W. M. Fogarty (ed), *Applied Science*, London.
- Evan, S., 2006, *Alga laut sebagai Biotarget Industri*, FMIPA, Universitas Lampung.
- Fengel D. dan Wegener, 1995, *Kayu Kimia Ultra Struktur Reaksi-reaksi*, Gajah Mada University Pers, Yogyakarta.
- Franvius, M., 2009, *Wawasan Nusantara*, (online), <http://martias-db21.blogspot.com/2010/03/wawasan-nusantara.html>, diakses 26 Februari 2011.
- Frazier, W. C. dan D. C. Westhoff, 1981, *Food Microbiology*, McGraw Hill, Published Co. Ltd., New Delhi.
- Ghori, M. I., 2001, *Production and Kinetic Study of Cellulose from Agricultural Wastes*, Tesis untuk filosofi doctor Kimia.
- Gunasekaran, P., dan Raj, K. C., 1999, Fermentation Technology- *Zymomonas mobilis*, Departement of microbial Technology, *School of Biological Sciences*, Mandurai Kamaraj University, India.
- Gumay, M. H., Suhartono, dan Aryawati, 2002, *Distribusi dan Kelimpahan Rumput Laut di Pulau Karimunjawa*, Semarang.
- Hanny, S. H., 2009, *Penentuan pH Optimum dalam Produksi Bioetanol dengan Menggunakan Zymomonas mobilis ATCC 19088*, Skripsi tidak diterbitkan, Fakultas Teknobiologi, Universitas Surabaya, Surabaya.
- Harvey F. 2009. *Produksi bioetanol dari limbah Karegenan*, Skripsi tidak diterbitkan, Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Insitut Pertanian Bogor.
- Herawati, R. A., 2011, *Pemanfaatan Buah Nanas sebagai Bahan Baku Pembuatan Bioetanol*, Skripsi tidak diterbitkan, Fakultas Teknik Kimia, Universitas Diponegoro, Semarang.

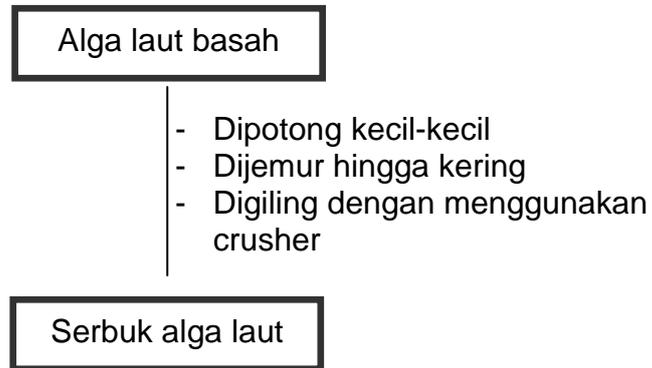
- Imamah, A., 2006, *Pemanfaatan Sari Buah Pisang sebagai Substrat untuk Pembuatan etanol dengan Menggunakan Zymomonas mobilis*, Tesis tidak diterbitkan, ITS, Surabaya.
- Jalaluddin dan Risal S., 2003, *Pembuatan Pulp dan Jerami Padi dengan Menggunakan Natrium Hidroksida*, Jurusan Teknik Kimia, Universitas Mallikulsaleh, Lhoksumawe.
- Joedodibroto, R. dan Pangalila, W. T., 1977, Pulp Rendamen Tinggi *Albazia falcataria* dan Pemutihannya dengan Hidrogen Peroksida, *Berita Selulosa*, **XIII** (4).
- Judoamidjojo, M., A., Darwis, Gumbira, 1990, *Teknologi Fermentasi*, Pusat Antar Universitas Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Kadi, A., 2004, Potensi Rumput Laut di beberapa Perairan Pantai Indonesia, *Oseana*, **XXIX** (4) : 25 – 36.
- Kennedy, J. F. dan Philips G. O., 1985, *Cellulose and Derivates*, John Wiley and Sons, New York.
- Khamdiyah, N., 2010, *Pembuatan Etanol dari Alga Merah jenis Eucheuma spinosum dengan Sakarifikasi dan tanpa Sakarifikasi pada Variasi Lama Fermentasi*, Skripsi tidak diterbitkan, Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri, Malang.
- Kim G. S. Myung, K. S., Kim Y. J. Oh K. K, Kim J. S, Ryu H. J, dan Kim K. H, 2007, *Method of Producing Biofuel Using Sea Algae*, Seoul, World Intellectual Property Organization
- Lehninger, A. H., 1995, *Dasar-dasar biokimia*, Erlangga, Jakarta.
- Mandels, M., 1982, *Cellulases*, Dalam Tsao, G. Annual Reports on Fermentation, Processes, 5, Academic Press, New York.
- Mushlihah, S., dan Harumurti, W., 2011, *Pengaruh pH dan konsentrasi Zymomonas mobilis untuk produksi bioetanol dari sampah buah jeruk*, Prosiding Skripsi Semester Genap 2010/2011, Jurusan Teknik Lingkungan Institut Teknologi Sepuluh Nopember.
- Nurcholis M dan Sumarsih S. 2007. *Jarak Pagar dan Pembuatan Biodiesel*. Yogyakarta: Kanisius.
- Patle, S., Lal, B., 2007, Ethanol Production from Hydrolyzed Agricultural Wastes using Mixed Culture of Zymomonas mobilis and Candida Tropicals, *Biotechnol let*, **29** (12) : 1839-43.

- Pancasning, P.H., 2008, *Produksi Etanol Menggunakan Zymomonas mobilis yang Amobilisasi dengan Agarosa*, FMIPA, ITS.
- Pelczar, M. J. dan R. D. Reid, 1974, *Microbiology*, McGraw Hill Book Company, New York.
- Poedjadi, A., 1994, *Dasar-dasar Biokimia*, Universitas Indonesia Press, Jakarta.
- Poncomulyo, T., 2006, *Budidaya dan Pengolahan Rumput Laut*, Agromedia, Pustaka, Jakarta.
- Riyanti, E. I., 2009, Biomassa sebagai Bahan Baku Bioetanol, *Jurnal Litbang Pertanian*, **28** (3) : 101-110.
- Ruso, S., 2011, *Pembuatan Bioetanol dari Batang Rumput Gajah (Pennisetum purpureum Schumach) dengan Sistem Fermentasi Simultan menggunakan Bakteri Clostridium acetobutylicum*, Tesis tidak diterbitkan, Program Pascasarjana, Universitas Hasanuddin, Makassar
- Sari, N. K., 2009, Produksi Bioethanol dari Rumput Gajah secara Kimia, *Jurnal Teknik Kimia*, **4** (1) : 265-273.
- Selig, M. J., Todd, B., Vinzant, T. B., Himmel, M. E., Decker, S. R., 2009, The Effect of Lignin Removal by Alkaline Peroxide Pretreatment on The Susceptibility of Corn Stover to Purified Cellulolytic and Xylanolytic Enzymes, *Appl Biochem Biotechnol*.
- Shaw, J., 2006, *Consolidated Bioprocessing an Alternate Method for Lignocellulose Processing Executive Office of a Environmental Affairs Workshop Thayer School of Enggineering Dartmouth College*, Hanover, NH Lynd Lab, Thayer School of Enggineering and The University of Stellenboschm, South Africa.
- Sinulingga, M., dan Darmanti, S., 2006. Kemampuan Mengikat Air oleh Tanah Pasir yang Diperlukan dengan Tepung Rumput Laut *Gracilaria verrucosa*. Laboratorium Biologi Struktur dan Fungsi Tumbuhan, Jurusan Biologi, FMIPA UNDIP.
- Soeprijanto, Ratnaningsih, T., dan Prasetyaningrum, I., 2007, *Biokonversi Selulosa dari Limbah Tomngkol Jagung menjadi Glukosa menggunakan Jamur Aspergillus Niger*, Jurusan Teknik Kimia, Fakultas Teknologi Industri, ITS, Surabaya.
- Sudarmadji, S., Haryono, B., dan Suhardi, 1984, *Prosedur Analisa untuk Bahan Makanan dan Pertanian*, Liberty, Yogyakarta.

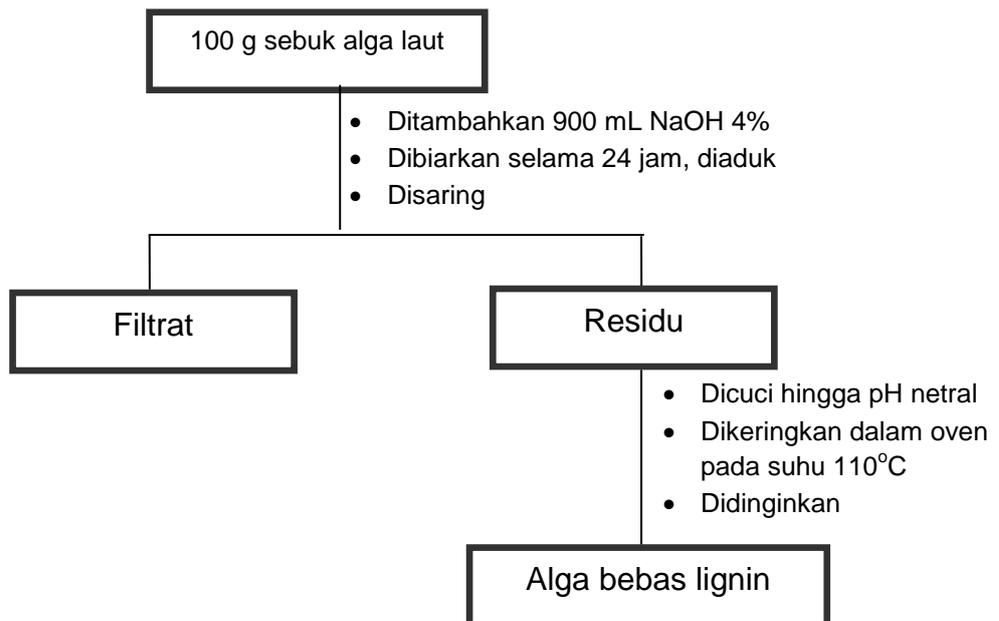
- Sukumaran, R.K., . (2008), Cellulase Production Using Biomassa Feed Stock and Its Application in Lignocellulosa Saccharification for Bioethanol Production, *Renewable Energy*, **30** : 1-4.
- Sun, Y., 2002, *Enzymatic Hydrolysis of Rye Straw and Bermudagrass for Ethanol Production*, Dissertation for the Degree of Doctor of Philosophy, Departement of Biological and Agricultural Engineering, North Carolina State University, North Carolina.
- Sunarto, 2003, *Potensi Nutrisi Rumput Laut (Eucheuma cottonii) Sebagai Sumber Bahan Pakan*, Skripsi tidak diterbitkan, Program Studi Nutrisi dan Makanan Ternak. Departemen Ilmu Nutrisi dan Makanan Ternak, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor.
- Suriawiria, U. 2003. *Mikrobiologi Air dan Dasar-Dasar Pengolahan Buangan Secara Biologis*. PT. Alumni. Bandung.
- Suwirta, I. W., 2009, Preparasi Biodiesel dari Minyak Jelantah Kelapa Sawit, *Jurnal Kimia*, **3** (1) : 1-6
- Syakir, 2010, Prospek dan Kendala Pengembangan Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.) sebagai Bahan Bakar Nabati di Indonesia, *Perspektif*, **9** (2) : 55 – 65.
- Taherzadeh, M. J. dan Karimi, Keikhosro, 2008, Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas production: A Review, *International Journal of Molecular Sciences*, **9** : 1621-1651.
- Tanaka, K. Hilary, Z. D., dan Ishizaky, 1999, A Investigation of the Utility of Pineapple Juice and Pineapple Waste Material as Low-Cost Substrate for Ethanol Fermentation by *Zymomonas mobilis*, *J.Biosci Bioeng*, **87** (5) : 642-646.
- Tripetchkul, S., Tonokawa, M., dan Ishizaki, A., 1992, Ethanol Production by *Zymomonas mobilis* Using Natural Rubber Waste as a Nutritional Source, *Journal Fermentation and Bioengineering*, **74** (6) : 384-388.
- Triwisari, D. A., Ulfana P. D., 2009, *Potensi Limbah Industri Rumput Laut sebagai Bahan Baku Alternatif Pembuatan Bioetanol di Indonesia*, Program Kreativitas Mahasiswa, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Usman, H., 2013, *Dasar-dasar Kimia Organik Bahan Alam*, Dua Satu Press, Makassar.
- Volk, T. J., 2004, *Trichoderma viride, The Dark Green Parasitic Mold and Maker of Fungal-Digested*, (Online), http://botit.botany.wisc.edu/toms_fungi.html., diakses 28 Februari 2011.

- Widaryanto, E., 2008, *Kajian Komprehensif Tanaman Jarak Pagar (Jatropha curcas L) dalam Upaya Peningkatan Hasil dan Pemanfaatannya*, Disertasi tidak diterbitkan, _Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya.
- Winarno, F.G., 1985, *Kimia Pangan dan Gizi*, Gramedia, Jakarta.
- Wirahadikusumah, M., dan Madayanti, F., 1990, *Teknologi Enzim*, Pusat Antar Universitas Bioteknologi, ITB, Bandung.
- Wyman, C. E., 1999, Biomass Ethanol: Technical Progress, Opportunities, and Comercial Challenges, *Annual Review of Energy and The Environment*, **24** :189-226.
- Yeoman, C. J., Han, Y., Dodd, D., Schroeder, C. M., Mackie R. I., Cann, I. K., 2010, Thermostable Enzymes as Biocatalysts in the Biofuel Industry, *Applied Microbiology*, **70** : 1-55.
- Yuliar, 2003, Peningkatan produksi iturin A sebagai biofungisida dengan menggunakan *Bacillus subtilis* RB14 –CS, *Biodiversitas*, **9** : 99-104.
- Yulneriwarni, Noverita, Sari, I. M., 2008, Pemanfaatan Jerami Padi dan Alang-alang dalam Fermentasi Etanol menggunakan Kapang *Trichoderma viride* dan Khamir *Saccharomycess cerevisiae*, *Vis Vitalis*, **1** (2) : 55-62.

Lampiran 1. Skema persiapan bahan baku



Lampiran 2. Skema kerja proses delignifikasi alga laut



Lampiran 3. Data penentuan kadar air alga merah sebelum proses delignifikasi

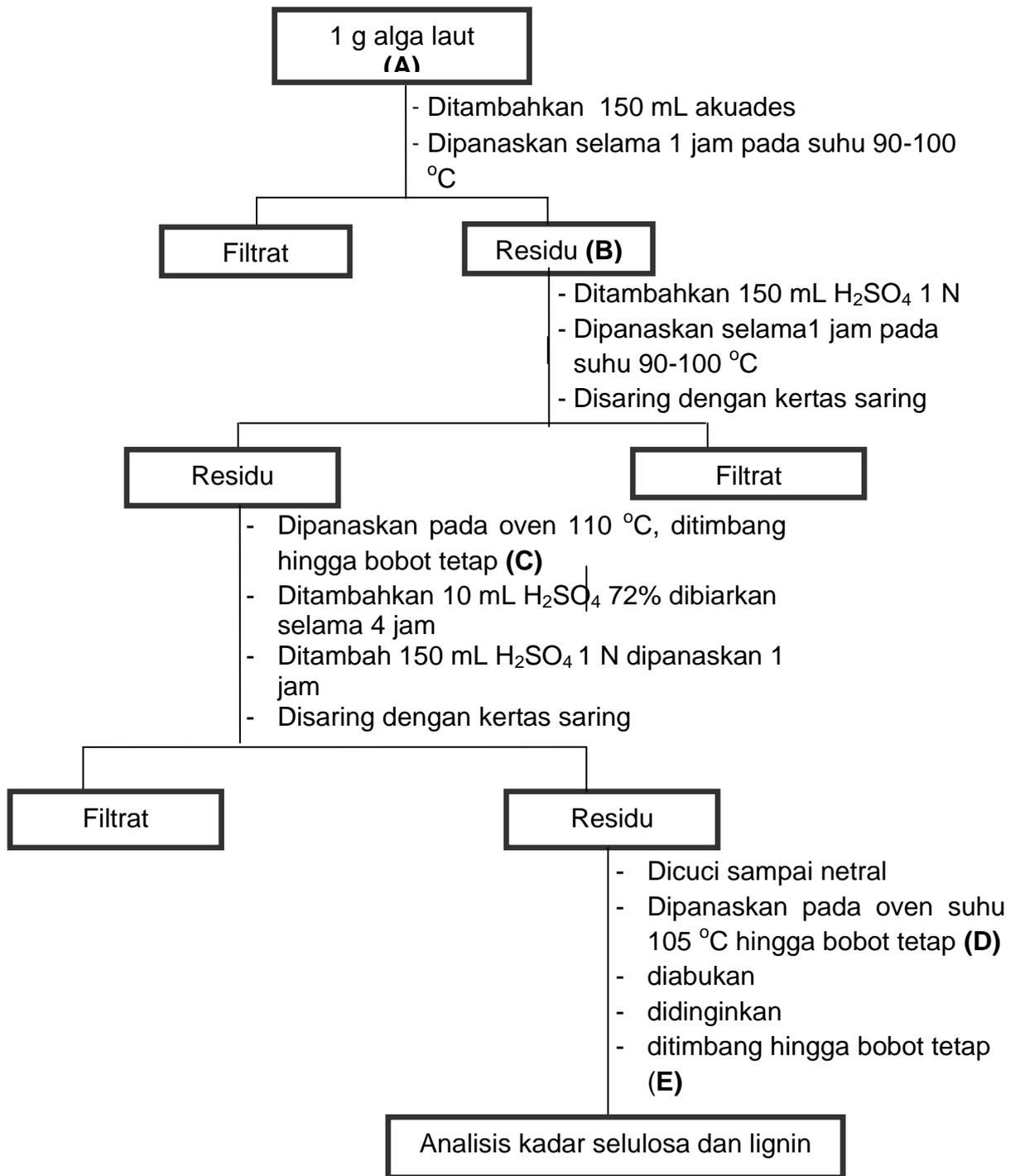
Jenis sampel	Berat Sampel (g)	Berat Residu (g)	Berat air	Kadar air (%)
<i>Gracilaria verrucosa</i>	1,0023	0,9100	0,0923	9,23
<i>Eucheuma cottonii</i>	1,0031	0,9075	0,0956	9,56

Lampiran 4. Data penentuan kadar air alga merah setelah proses delignifikasi

Jenissampel	Berat sampel	Berat Residu	Berat air	Kadar air (%)
<i>G. verrucosa</i>	1,0012	0,9125	0,0887	8,87
<i>E. cottonii</i>	1,0018	0,9143	0,0875	8,75

Kadar air = (berat sampel – berat residu) x 100%(10)

Lampiran 5. Skema kerja penentuan kandungan lignin dan selulosa



Rumus penentuan kadar selulosa dan lignin

Kadar selulosa = $\frac{c-d}{a} \times 100\%$ (2)

Kadar lignin = $\frac{d-e}{a} \times 100\%$(3)

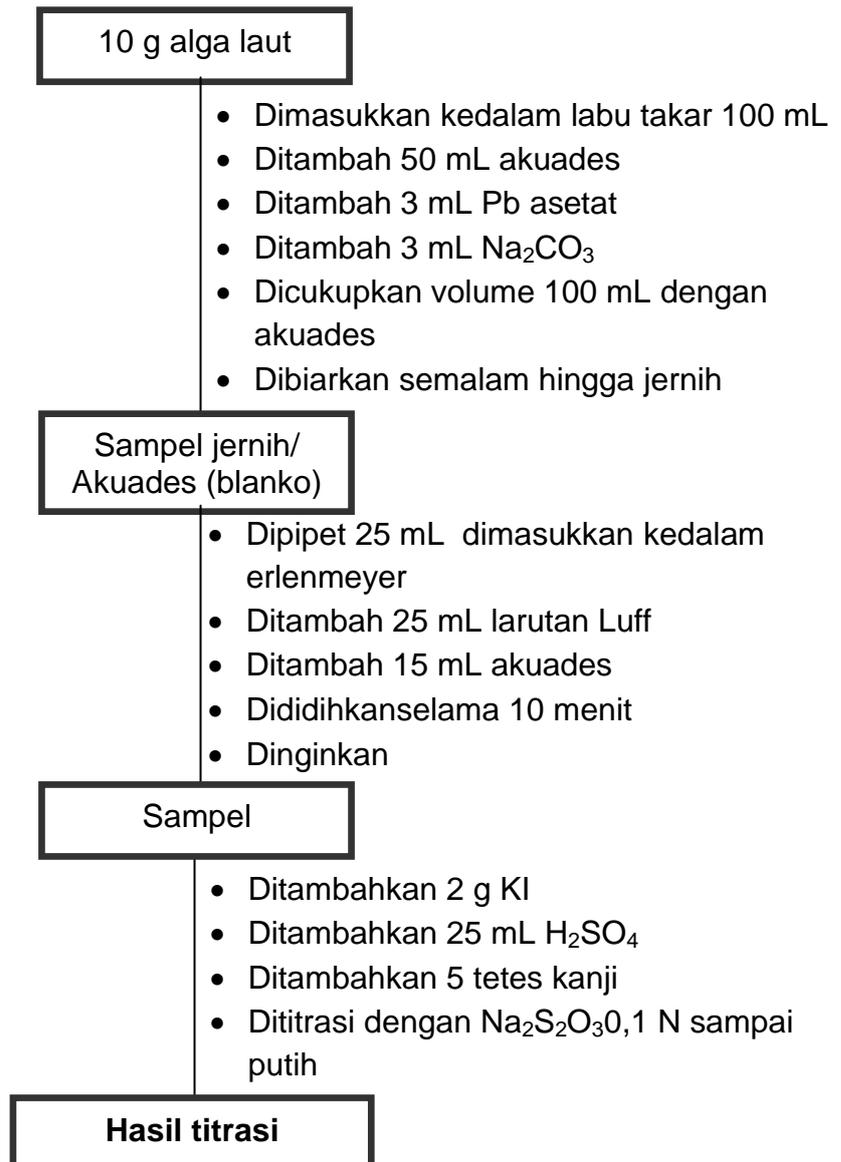
Lampiran 6. Data penentuan kadar selulosa dan lignin alga merah sebelum proses delignifikasi

Jenis sampel	Berat sampel (a)	Berat residu (c)	Berat residu (d)	Berat abu (e)	Kadar Selulosa (%)	Kadar Lignin (%)
<i>G. verrucosa</i>	1,0023	0,8921	0,8043	0,7218	8,76	8,23
<i>E. cottonii</i>	1,0005	0,7325	0,6582	0,5930	7,43	6,52

Lampiran 7. Data penentuan kadar selulosa dan lignin alga merah setelah proses delignifikasi

Jenis sampel	Berat sampel (a)	Berat residu (c)	Berat residu (d)	Berat abu (e)	Kadar Selulosa (%)	Kadar Lignin (%)
<i>G. verrucosa</i>	1,0035	0,9872	0,8563	0,8178	13,04	3,84
<i>E. cottonii</i>	1,0421	0,9345	0,8354	0,7987	9,51	3,52

Lampiran 8. Penentuan gula reduksi Metode Luff-Schoorl



$$\text{Konsentrasi Gula pereduksi (\%)} = \frac{(v \text{ tit. blanko} - v \text{ tit. sampel}) \times fp}{mg \text{ sampel}} \times 100 \%$$

Volume Na-tiosulfat yang diperoleh kemudian dicocokkan dengan daftar Luff (Lampiran 12) untuk mengetahui kadar gula reduksinya.

Lampiran 9. Standarisasi larutan Na₂S₂O₃ 0,1 N (larutan penitrasi gula reduksi)

No	Volume Na ₂ S ₂ O ₃ (mL)	Volume KIO ₃ (mL)
1	39,7	0,14
2	35	0,14
3	42,7	0,14
Rata-rata	39,17	0,14

$$N \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 = \frac{mL \text{ KIO}_3}{BM \text{ KIO}_3 \times mL \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} \times 1000 = \frac{0,14}{35,67 \times 39,17} \times 1000 =$$

0,1 N.....(11)

Jadi normalitas Na₂S₂O₃ sesungguhnya = 0,1 N

Lampiran 10. Hasil titrasi blanko metode Luff Schroll

No	Volume akuades(mL)	Volume titrasi Na ₂ S ₂ O ₃ (mL)
1	25	9,26
2	25	9,48
Rata-rata	25	9,37

Lampiran 11. Hasil titrasi gula reduksi pada sampel alga merah metode Luff Schroll

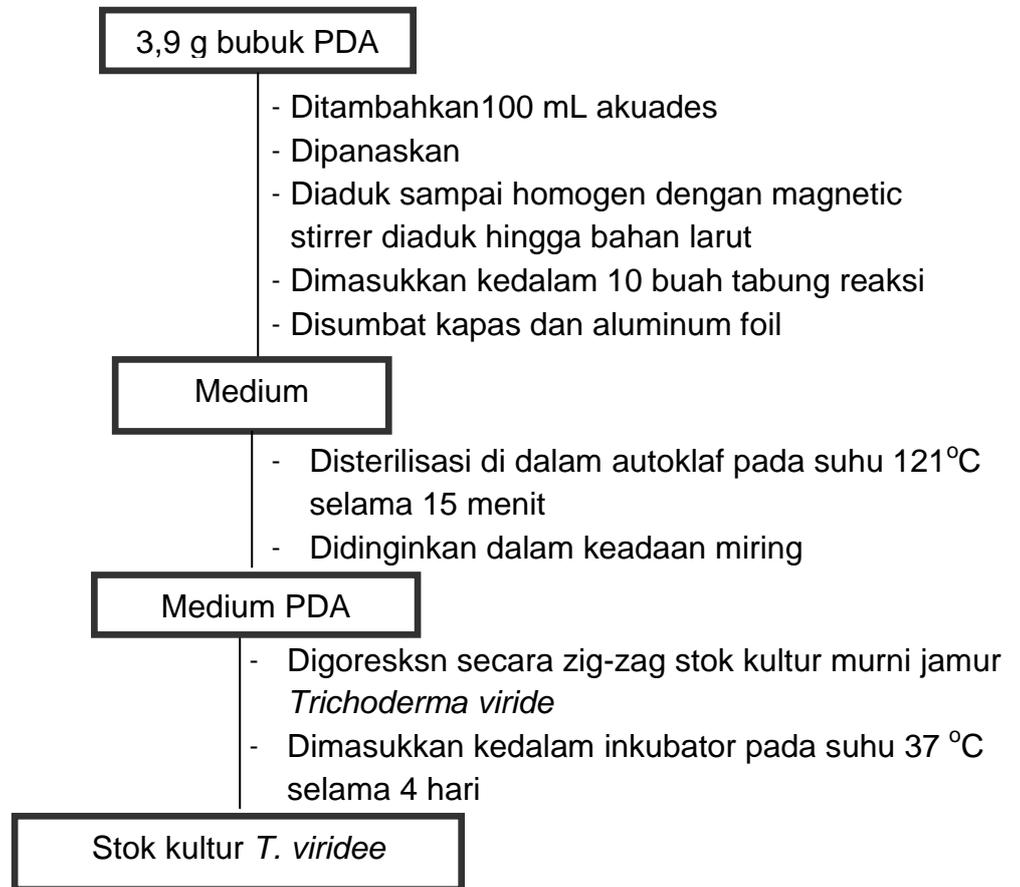
Jenis Sampel	Volume titrasi Na ₂ S ₂ O ₃ pada blanko (mL)	Volume titrasi Na ₂ S ₂ O ₃ pada sampel (mL)	% kadar gula reduksi
Gracilaria verrucosa	9,37	9,56	Tidakada
Euचेuma cottonii	9,37	9,47	Tidakada

Lampiran12. Daftar Penetapan Kadar Gula menurut Luff-Schoorl

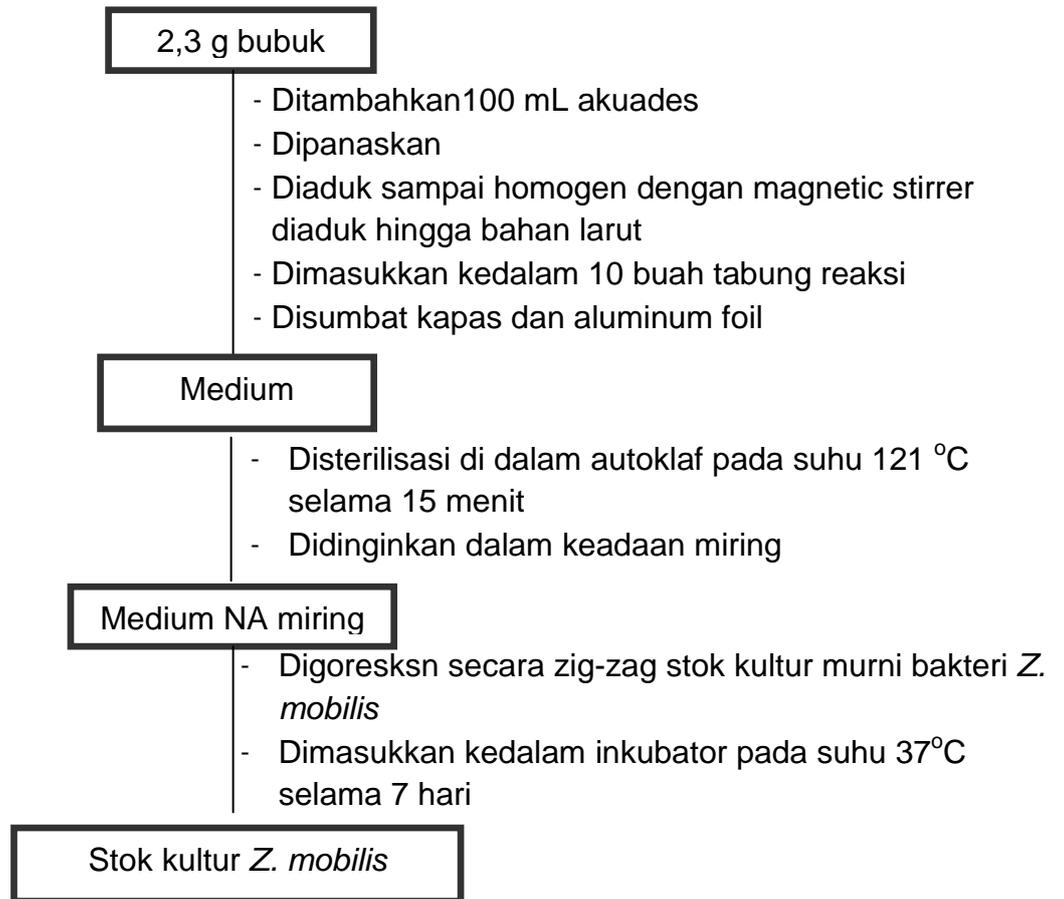
Volume Na-Tiosulfat (mL)	Glukosa, fruktosa, gula invert (mg C₆H₁₂O₆)
1	2,4
2	4,8
3	7,2
4	9,7
5	12,2
6	14,7
7	17,2
8	19,8
9	22,4
10	25,0
11	27,6
12	30,3
13	33,0
14	35,7
15	38,5
16	41,3
17	44,2
18	47,1
19	50,0
20	53,0
21	56,0
22	59,1
23	62,2

(Sumber: SNI 3547.1:2008 bagian B.5)

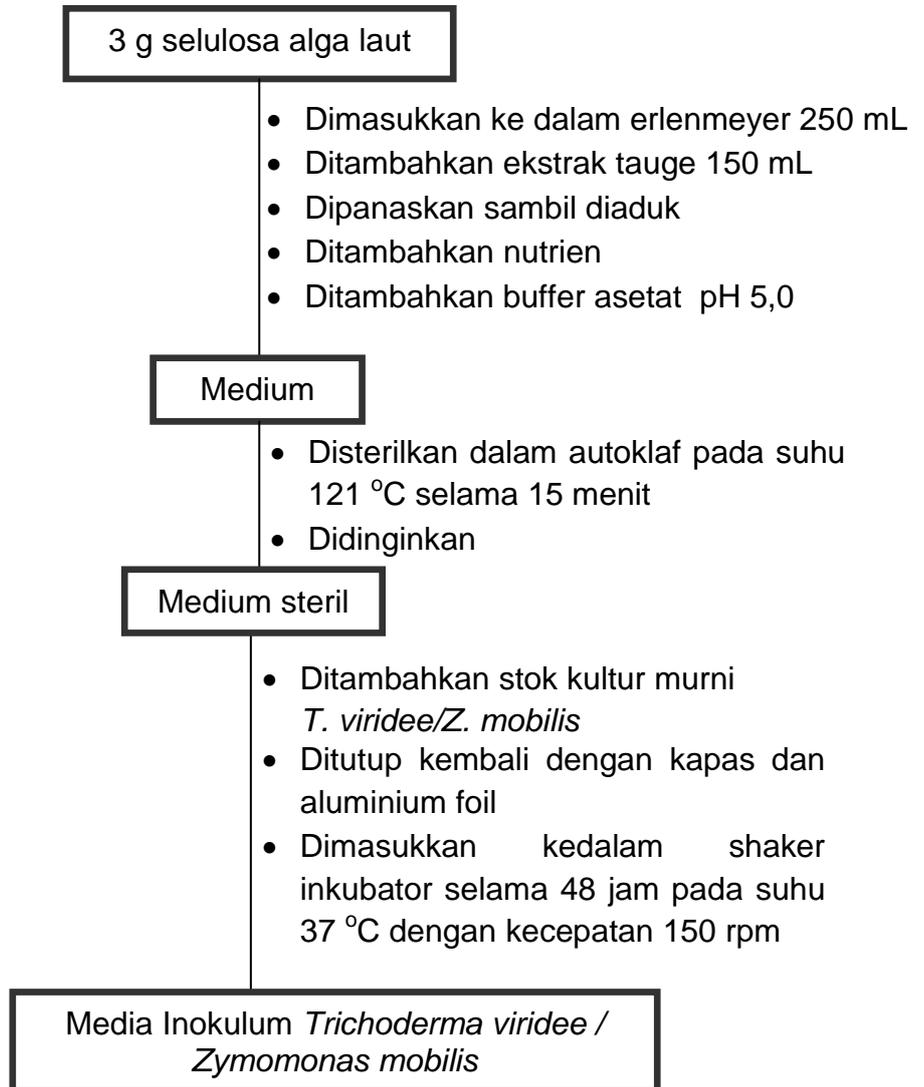
Lampiran 13. Skema kerja peremajaan jamur *T. viride* pada media Potato Dextrose Agar (PDA)



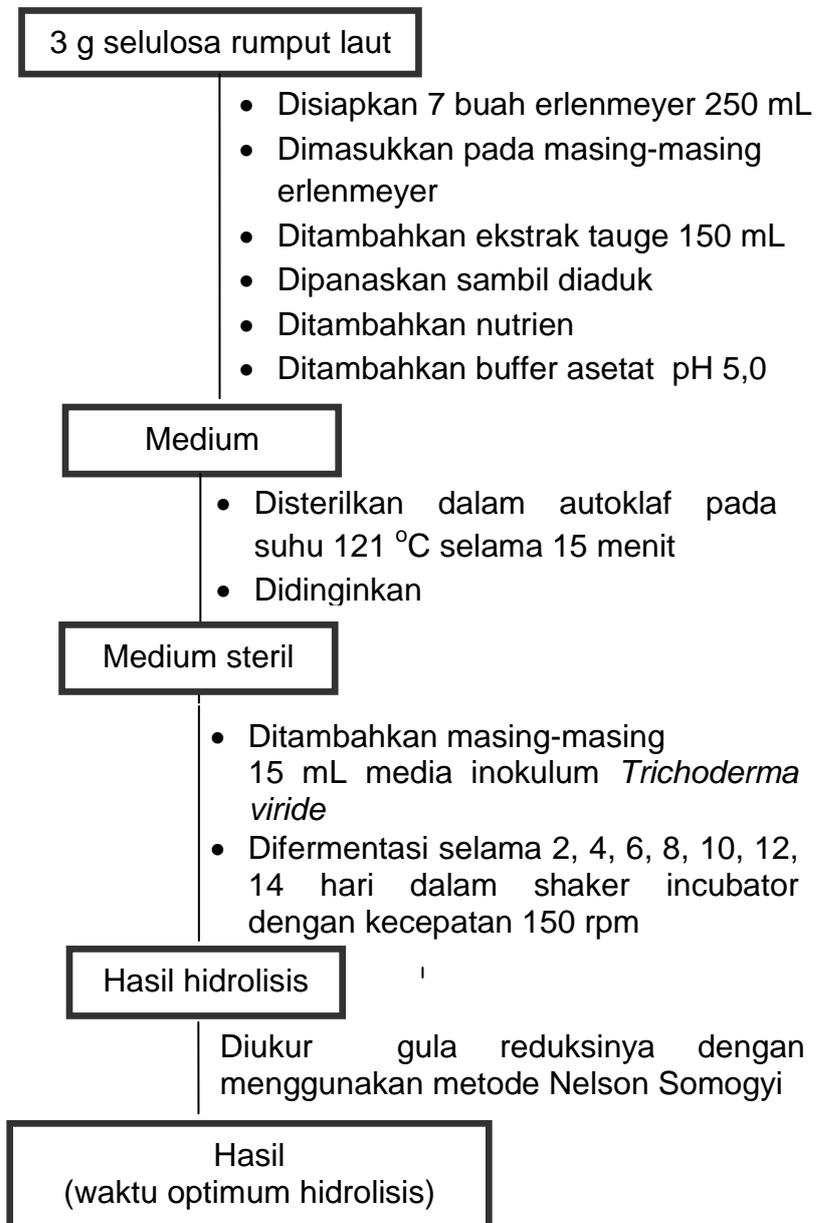
Lampiran 14. Skema kerja peremajaan bakteri *Z. mobilis* pada media Nutrien Agar (NA)



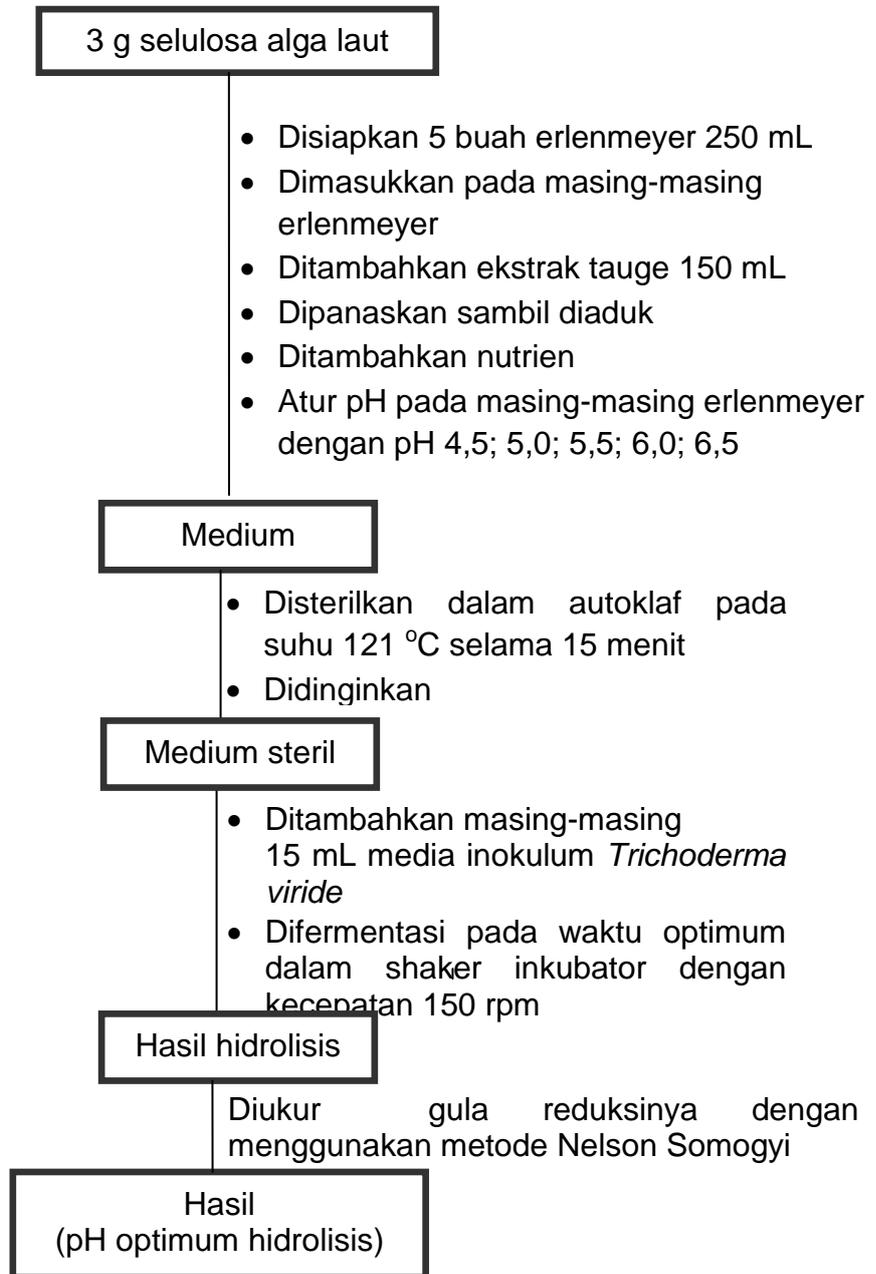
Lampiran 15. Pembuatan Media inokulum *T. viride* / *Z. mobilis*



Lampiran 16. Skema penentuan waktu optimum hidrolisis *T. viride*



Lampiran 17. Skema penentuan pH optimum hidrolisis *T. viridee*



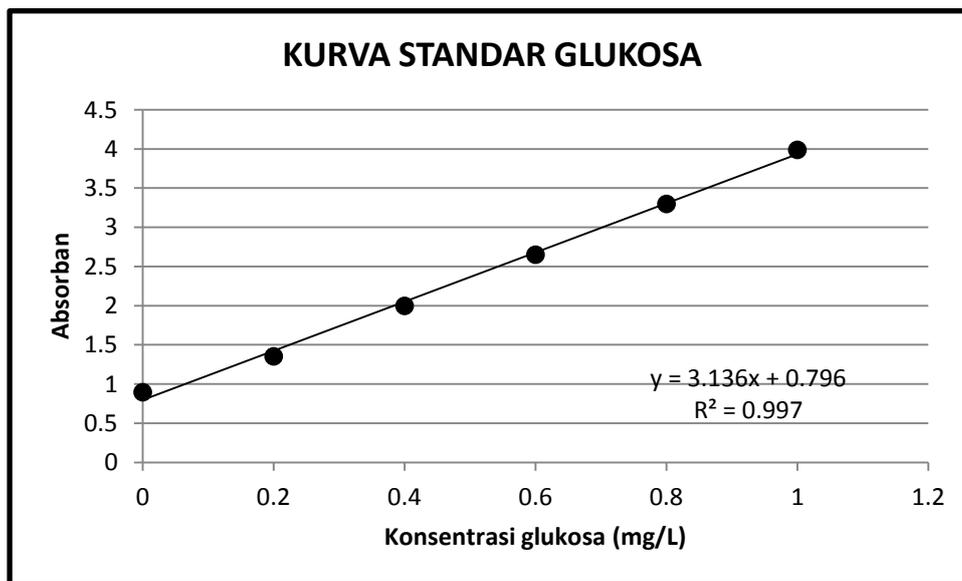
Lampiran18. Pembuatan larutan standar glukosa 10 mg/L

Sebanyak 0,11 g glukosa monohidrat dilarutkan dalam air hingga 100 mL, ini merupakan larutan standar dengan konsentrasi 10 mg/L. Dari larutan standar ini dibuat 6 kali pengenceran dengan komposisi campuran larutan dalam penentuan konsentrasi gula reduksi. Pembuatan larutan standar glukosa 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 mg/mL dari 10 mg/L.

No	Konsentrasi standar glukosa (mg/L)	Volume campuran	
		Standar glukosa 10 mg/L (mL)	Akuades (mL)
1	0,0	0,0	10
2	0,2	0,2	9,8
3	0,4	0,4	9,6
4	0,6	0,6	9,4
5	0,8	0,8	9,2
6	1,0	1,0	9,0

Lampiran 19. Kurva kalibrasi standar glukosa

Konsentrasi standar glukosa (mg/L)	Absorban
0	0,896
0,2	1,354
0,4	1,998
0,6	2,651
0,8	3,299
1	3,989



Contoh perhitungan:

Dari kurva diperoleh persamaan regresi $y = 3,136x + 0,796$(12)

dimana y = absorban

dan x = konsentrasi glukosa (mg/L)

Jika diketahui pada hari ke-6 absorban sampel *G. verrucosa* pada pH 5,0 sebesar 1,896. Maka konsentrasi glukosanya:

$$\text{Kadar bioetanol } G. \text{ verrucosa } (x) = (y-0,796)/3,136$$

$$= (1,896-0,796)/3,136$$

$$= 0,350765 \text{ (pengenceran 100x)}$$

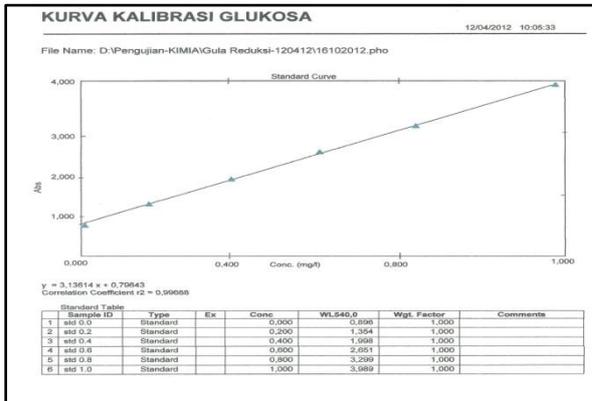
$$= 35,08 \text{ mg/L}$$

Lampiran 20. Penentuan kadar glukosa metode Nelson Somogyi pada kondisi optimum proses hidrolisis oleh jamur *T. viride*

Jenis alga merah	Waktu hidrolisis	Absorban	Konsentrasi gula reduksi sebelum pengenceran (mg/L)	Konsentrasi gula reduksi pengenceran 100x (mg/L)
Gracilaria verrucosa	2	1,116	0,1022	10,22
	4	1,574	0,2482	24,82
	6	1,896	0,3508	35,08
	8	1,434	0,2034	20,34
	10	1,350	0,1767	17,67
	12	1,296	0,1593	15,93
	14	1,079	0,0902	9,02
Eucheuma cottonii	2	1,106	0,0987	9,87
	4	1,176	0,1211	12,11
	6	1,438	0,2048	20,48
	8	1,364	0,1812	18,12
	10	1,252	0,1454	14,54
	12	1,113	0,1012	10,12
	14	1,043	0,0789	7,89

Jenis alga merah	pH hidrolisis	Absorban	Konsentrasi gula reduksi sebelum pengenceran (mg/L)	Konsentrasi gula reduksi pengenceran 100x (mg/L)
Gracilaria verrucosa	4,5	1,121	0,1035	10,35
	5,0	1,789	0,3168	31,68
	5,5	2,059	0,4028	40,28
	6,0	1,601	0,2567	25,67
	6,5	1,196	0,1274	12,74
Eucheuma cottonii	4,5	1,186	0,1245	12,45
	5,0	1,385	0,1878	18,78
	5,5	1,608	0,2590	25,90
	6,0	1,320	0,1672	16,72
	6,5	1,130	0,1066	10,66

Lampiran 21. Data hasil analisa kadar gula reduksi pada spektrofotometer UV VIS



HASIL PENGUJIAN GULA REDUKSI

12/04/2012 10:34:21

File Name: D:\Pengujian-KIMIA\Gula Reduksi-120412\16102012.pho

Sample Table

Sample ID	Type	Ex	Conc	WL540,0	Comments
1	Gra 2 hari	Unknown	0,1022	1,116	
2	Eco 2 hari	Unknown	0,0987	1,108	
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					

HASIL PENGUJIAN GULA REDUKSI

14/04/2012 11:02:41

File Name: D:\Pengujian-KIMIA\Gula Reduksi-140412\16102012.pho

Sample Table

Sample ID	Type	Ex	Conc	WL540,0	Comments
1	Gra 4 hari	Unknown	0,2482	1,574	
2	Eco 4 hari	Unknown	0,1211	1,176	
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					

HASIL PENGUJIAN GULA REDUKSI

16/04/2012 09:42:25

File Name: D:\Pengujian-KIMIA\Gula Reduksi-160412\16102012.pho

Sample Table

Sample ID	Type	Ex	Conc	WL540,0	Comments
1	Gra 6 hari	Unknown	0,3508	1,896	
2	Eco 6 hari	Unknown	0,2048	1,438	
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					

HASIL PENGUJIAN GULA REDUKSI

18/04/2012 13:21:43

File Name: D:\Pengujian-KIMIA\Gula Reduksi-180412\16102012.pho

Sample Table

Sample ID	Type	Ex	Conc	WL540,0	Comments
1	Gra 8 hari	Unknown	0,2034	1,434	
2	Eco 8 hari	Unknown	0,1812	1,364	
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					

HASIL PENGUJIAN GULA REDUKSI

22/04/2012 11:23:31

File Name: D:\Pengujian-KIMIA\Gula Reduksi-220412\16102012.pho

Sample Table

Sample ID	Type	Ex	Conc	WL540,0	Comments
1	Gra 12 hari	Unknown	0,1593	1,296	
2	Eco 12 hari	Unknown	0,1012	1,113	
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					

Lampiran 21. Data hasil analisa kadar gula reduksi pada spektrofotometer UV VIS (Lanjutan)

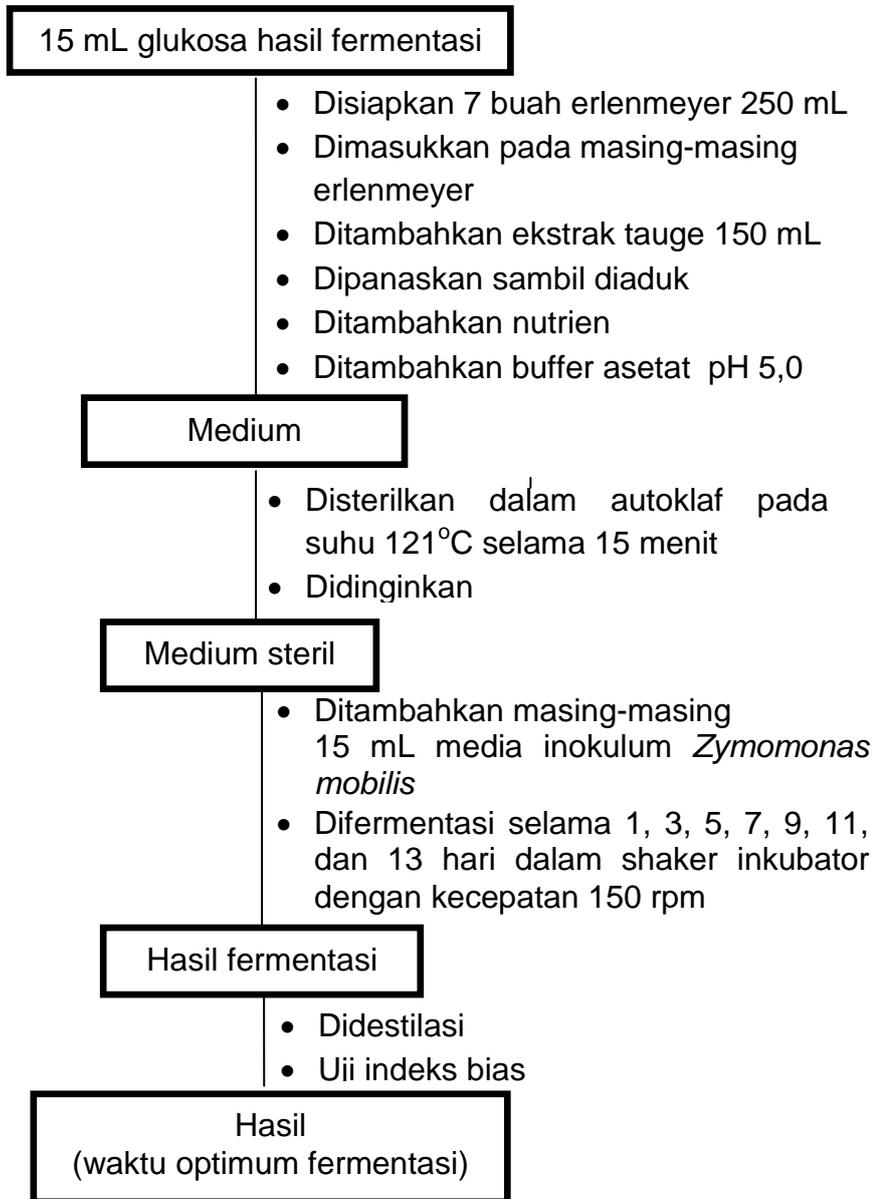
HASIL PENGUJIAN GULA REDUKSI						
						22/04/2012 11:23:31
File Name: D:\Pengujian-KIMIA\Gula Reduksi-220412\16102012.pho						
Sample Table						
Sample ID	Type	Ex	Conc	WL540,0	Comments	
1	Gra 12 hari		0,1593	1,296		
2	Eco 12 hari		0,1012	1,113		
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						

HASIL PENGUJIAN GULA REDUKSI						
						24/04/2012 09:20:52
File Name: D:\Pengujian-KIMIA\Gula Reduksi-240412\16102012.pho						
Sample Table						
Sample ID	Type	Ex	Conc	WL540,0	Comments	
1	Gra 14 hari		0,0902	1,079		
2	Eco 14 hari		0,0789	1,043		
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						

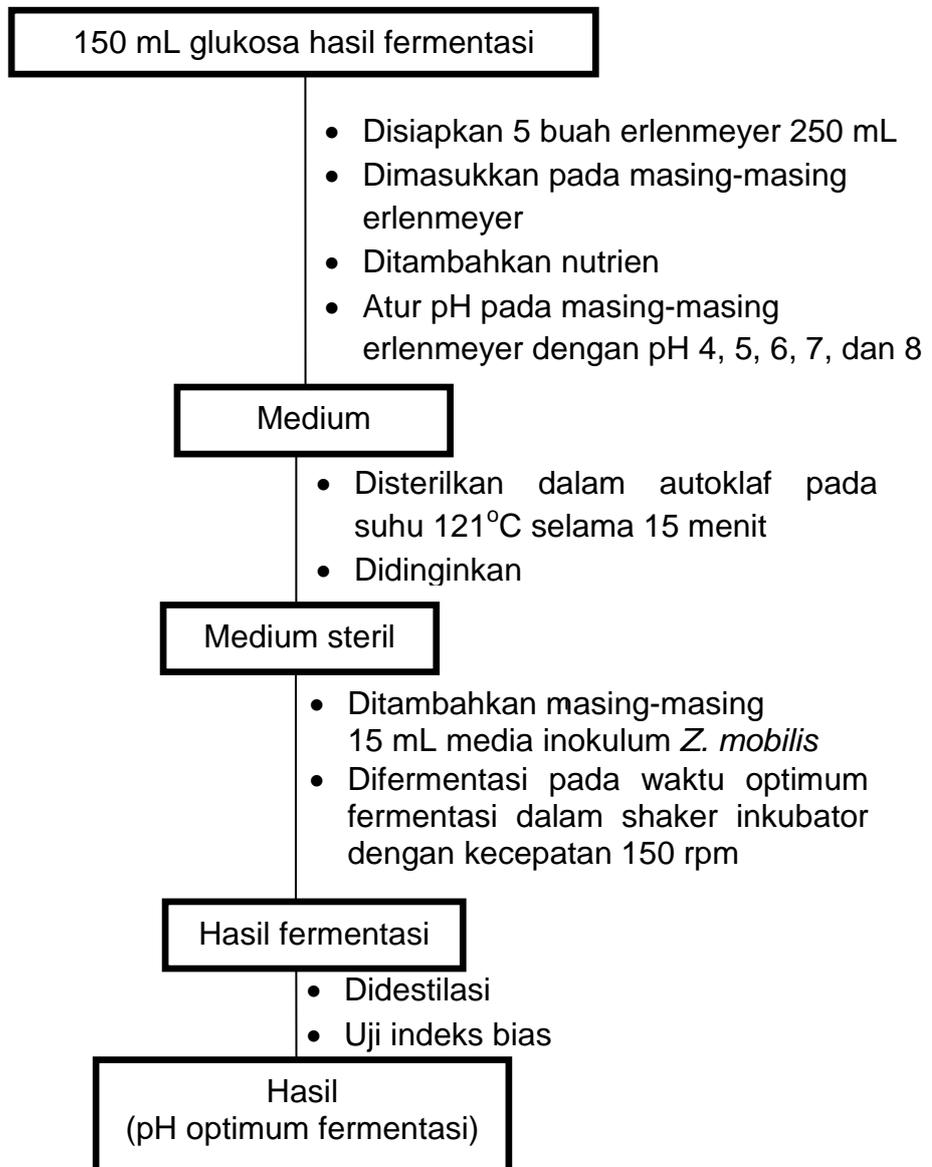
HASIL PENGUJIAN GULA REDUKSI						
						16/05/2012 10:43:13
File Name: D:\Pengujian-KIMIA\Gula Reduksi-160512\16102012.pho						
Sample Table						
Sample ID	Type	Ex	Conc	WL540,0	Comments	
1	Eco pH 4,5		0,1245	1,186		
2	Eco pH 5		0,1878	1,385		
3	Eco pH 5,5		0,2590	1,608		
4	Eco pH 6		0,1672	1,320		
5	Eco pH 6,5		0,1066	1,130		
6						
7						
8						
9						

HASIL PENGUJIAN GULA REDUKSI						
						07/05/2012 13:34:21
File Name: D:\Pengujian-KIMIA\Gula Reduksi-070512\16102012.pho						
Sample Table						
Sample ID	Type	Ex	Conc	WL540,0	Comments	
1	Gra pH 4,5		0,1035	1,121		
2	Gra pH 5		0,3168	1,789		
3	Gra pH 5,5		0,4028	2,059		
4	Gra pH 6		0,2567	1,601		
5	Gra pH 6,5		0,1274	1,196		
6						
7						
8						
9						

Lampiran 22. Skema penentuan waktu optimum fermentasi *Z. mobilis*



Lampiran 23. Skema penentuan pH optimum fermentasi *Z. mobilis*



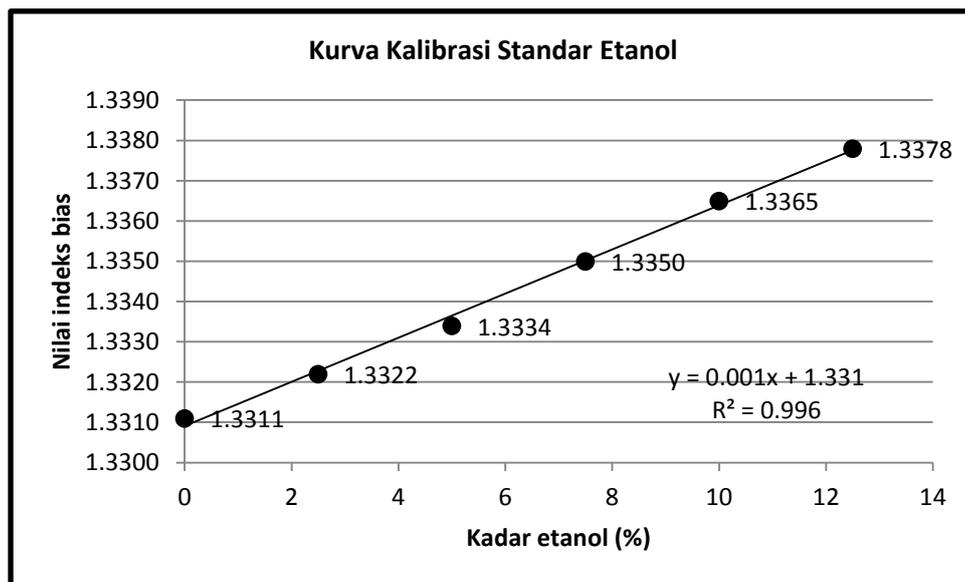
Lampiran 24. Pembuatan larutan standar etanol untuk penentuan indeks bias

Komposisi campuran larutan dalam penentuan indeks bias standar etanol. Pembuatan larutan standar etanol 0 %; 2,5 %; 5 %; 7,5 %; 10 %; 12,5%

No	Konsentrasi standar etanol (%)	Volume campuran	
		Etanol murni (mL)	Akuades (mL)
1	0,0	0	1,000
2	2,5	0,025	0,975
3	5,0	0,050	0,950
4	7,5	0,075	0,925
5	10,0	0,100	0,900
6	12,5	0,125	0,875

Lampiran 25. Kurva kalibrasi standar etanol vs indeks bias

Konsentrasi standar etanol (%)	Nilai indeks bias
0,0	1,3311
2,5	1,3322
5,0	1,3334
7,5	1,3350
10,0	1,3365
12,5	1,3378



Contoh perhitungan:

Dari kurva diperoleh persamaan regresi $y = 0,001x + 1,331$(13)

dimana y = indeks bias,

dan x = kadar etanol pada sampel

Jika diketahui pada hari ke-7 nilai indeks bias sampel *G. verrucosa* pada pH 5,0 sebesar 1,3506. Maka kadar bioetanolnya:

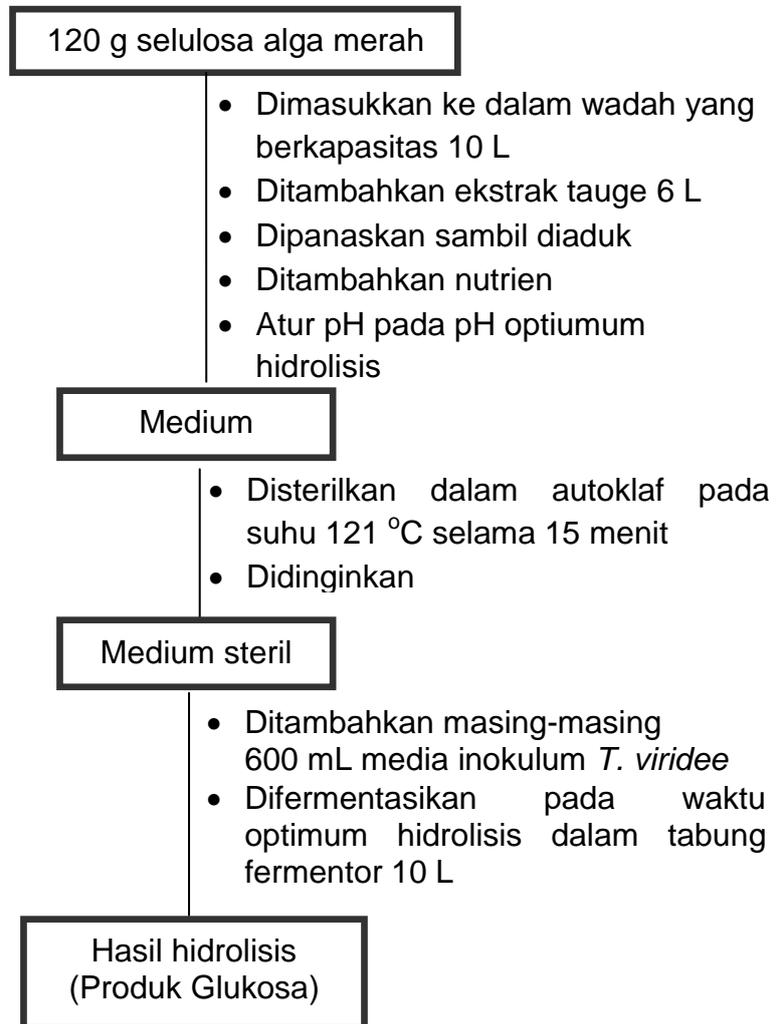
$$\begin{aligned}
 \text{Kadar bioetanol } G. \text{ verrucosa } (x) &= (y-1,331)/0,001 \\
 &= (1,3506-1,331)/0,001 \\
 &= 19,56\%
 \end{aligned}$$

Lampiran 26. Data penentuan kondisi optimum fermentasi berdasarkan nilai indeks bias bioetanol hasil fermentasi pada variasi pH dan waktu fermentasi dari *Z. mobilis*

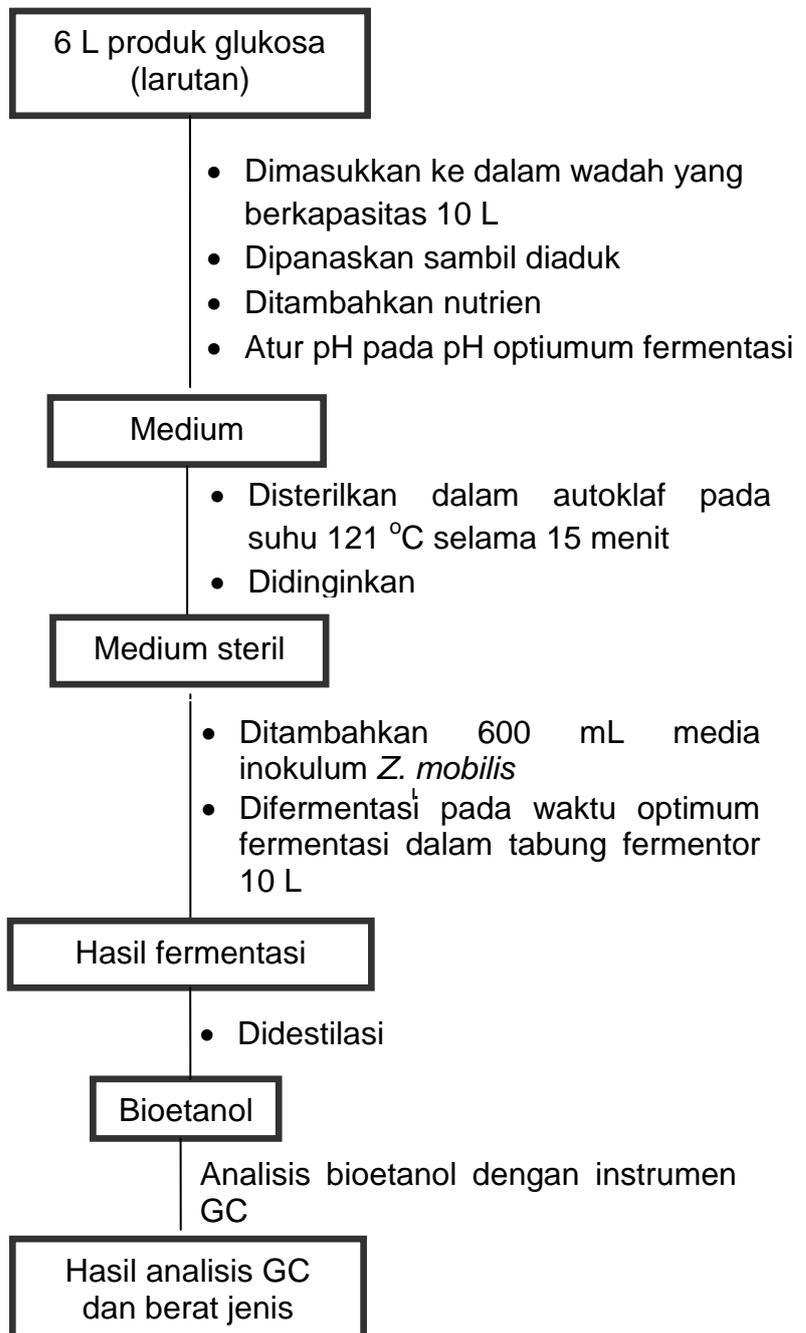
Jenis sampel	Waktu fermentasi (hari)	Kadar substrat (% b/v)	Jumlah inokulum (% v/v)	Indeks bias	Kadar bioetanol (%)
G. verrucosa	1	2	10	1,3342	3,17
	3	2	10	1,3362	5,23
	5	2	10	1,3423	11,27
	7	2	10	1,3506	19,56
	9	2	10	1,3418	10,78
	11	2	10	1,3376	6,63
	13	2	10	1,3352	4,21
E. cottonii	1	2	10	1,3321	1,12
	3	2	10	1,3329	1,85
	5	2	10	1,3333	2,31
	7	2	10	1,3366	5,60
	9	2	10	1,3342	3,21
	11	2	10	1,3339	2,89
	13	2	10	1,3325	1,53

Jenis sampel	pH fermentasi (hari)	Kadar substrat (% b/v)	Jumlah inokulum (% v/v)	Indeks bias	Kadar bioetanol (%)
G. verrucosa	4	2	10	1,3334	2,43
	5	2	10	1,3436	12,62
	6	2	10	1,3522	21,21
	7	2	10	1,3409	9,85
	8	2	10	1,3356	4,56
E. cottonii	4	2	10	1,3323	1,27
	5	2	10	1,3358	4,82
	6	2	10	1,3389	7,86
	7	2	10	1,3336	2,59
	8	2	10	1,3330	2,01

Lampiran 27. Skema produksi glukosa berdasarkan kondisi optimum hidrolisis



Lampiran 28. Skema produksi bioetanol berdasarkan kondisi optimum fermentasi



Lampiran 29. Penentuan berat jenis sampel bioetanol setelah dehidrasi

1. Berat piknometer kosong + termometer (a) = 34,2666 gram
2. Berat piknometer + termometer + air (b) = 60,4761 gram
3. Suhu air = 29 °C
4. Berat air pada 29 °C (b-a) = 26,2095 gram
5. Berat piknometer + termometer + sampel bioetanol (c) = 55,5321 gram
6. Berat sampel bioetanol (c-a) = 21,2655 gram
7. Berat jenis air pada 29 °C = 0,99594 g/cm³

Penghitungan:

$$\text{Berat jenis} = \frac{\text{Berat sampel}}{\text{Volume}} \text{ g/cm}^3 \quad \dots\dots\dots(14)$$

$$\text{Volume piknometer} = \frac{\text{Berat air}}{\text{Berat jenis air}} = \frac{26,2095 \text{ g}}{0,99594 \text{ g/cm}^3} = 26,31634 \text{ cm}^3$$

Volume piknometer = volume sampel

$$\text{Berat jenis sampel} = \frac{21,2655 \text{ g}}{26,31634 \text{ cm}^3} = 0,80 \text{ g/cm}^3$$

Lampiran 30. Data penggunaan bahan baku serta jumlah rendamen hasil fermentasi *G. verrucosa* menjadi bioetanol

Berat selulosa dari *G. verrucosa* yang digunakan = 120 gram

Volume larutan fermentasi = 6000 mL

Volume bioetanol setelah didestilasi = 39,6 mL

Volume bioetanol setelah dehidrasi = 34,53 mL

Berat jenis bioetanol = 0,80 g/mL

Berat bioetanol (bj x volume) = 0,80 g/mL x 34,53 mL = 27,62 gram

Kadar bioetanol = 29,6 %

Jumlah rendamen bioetanol terhadap selulosa *G. verrucosa*:

$$\text{Yield} = \frac{1000 \text{ gram}}{120 \text{ gram}} \times 27,62 \text{ g} = 230,17 \text{ gram}$$

= 230,17 gram bioetanol setiap kg selulosa

$$\% \text{ rendamen} = \frac{230,17 \text{ gram}}{1000 \text{ gram}} \times 100\% = 23,01 \%$$

Lampiran 31. Data penggunaan bahan baku serta jumlah rendamen hasil fermentasi *E. cottonii* menjadi bioetanol

Berat selulosa dari <i>E. cottonii</i> yang digunakan	= 120 gram
Volume larutan fermentasi	= 6000 mL
Volume bioetanol setelah didestilasi	= 30,4 mL
Volume bioetanol setelah dehidrasi	= 26,3 mL
Berat jenis bioetanol	= 0,80 g/mL
Berat bioetanol (bj x volume) = 0,80 g/mL x 26,3 mL	= 21,04 gram
Kadar bioetanol	= 15,22 %

Jumlah rendamen bioetanol terhadap selulosa *E. cottonii*:

$$\text{Yield} = \frac{1000 \text{ gram}}{120 \text{ gram}} \times 21,04 \text{ g} = 175,33 \text{ gram}$$

= 175,33 gram bioetanol setiap kg selulosa

$$\% \text{ rendamen} = \frac{175,33 \text{ gram}}{1000 \text{ gram}} \times 100\% = 17,53 \%$$

Lampiran 32. Perhitungan konversi volume bioetanol dari 1 kg berat kering *G. verrucosa*

Berat basah <i>G. verrucosa</i> yang digunakan	= 1485 gram
Berat kering <i>G. verrucosa</i> yang digunakan	= 1000 gram
Berat selulosa <i>G. verrucosa</i>	= 14,21% x 1000 gram
	= 142,1 gram
Volume larutan fermentasi	= 7105 mL
Volume bioetanol setelah dehidrasi	= 40,92 mL
Kadar bioetanol	= 29,6 %

Jadi 1 kg berat kering *G. verrucosa* dari 1485 gram berat basah *G. verrucosa* menghasilkan 40,92 mL bioetanol.

Lampiran 33. Perhitungan konversi volume bioetanol dari 1 kg berat kering *E. cottonii*

Berat basah <i>E. cottonii</i> yang digunakan	= 1568 gram
Berat kering <i>E. cottonii</i> yang digunakan	= 1000 gram
Berat selulosa <i>E. cottonii</i>	= 10,53% x 1000 gram
	= 105,3 gram
Volume larutan fermentasi	= 5265 mL
Volume bioetanol setelah dehidrasi	= 23,06 mL
Kadar bioetanol	= 15,22 %

Jadi 1 kg berat kering *E. cottonii* dari 1568 gram berat basah *E. cottonii* menghasilkan 23,06 mL bioetanol

Lampiran 34. Pembuatan Larutan Kerja

A. Larutan Buffer asetat

Larutan A

Larutan 1,2 mL asam asetat dalam 100 mL akuades

Larutan B

Larutan 2,7 g $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ dalam 100 mL akuades

pH	A	B
4,0	80	20
4,5	62	38
5	30	70

B. Larutan Buffer fosfat

Larutan A

Timbang 17,799 gram $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ masukkan ke dalam labu takar 1 L

Larutan B

Timbang 15,601 gram $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ masukkan kedalam labu takar 1 L

pH	A	B
5,5	4,0	96
6,0	12,3	87,7
6,5	31,7	68,3
7,0	61,1	38,9
7,5	84,1	15,9
8,0	94,7	5,3

C. Larutan Luff-Schoorl

Sebanyak 25 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ sejauh mungkin bebas besi, dilarutkan dalam 100 mL air, 50 g asam sitrat dilarutkan dalam 50 mL air dan 388 $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan dalam 300-400 mL air mendidih. Larutan asam sitratnya dituangkan kedalam larutan natrium karbonat sambil dikocok hati-hati. Selanjutnya ditambahkan larutan CuSO_4 , sesudah dingin ditambahkan air sampai 1 Liter. Bila terjadi kekeruhan diamkan kemudian disaring.

D. Larutan Natrium tiosulfat 0,1 N

Sebanyak 25 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan kedalam 100 mL ke dalam labu ukur 1 liter dan tambahkan 0,3 g Na_2CO_3 dan diencerkan dengan akuades sampai tanda. Larutan ini disimpan tertutup untuk distandarisasi dengan KIO_3 dan siap digunakan.

E. Larutan indikator amilum 1%

Sebanyak 1 gram amilum yang dapat larut dicampur dengan 1 mg Hgl dan 30 mL akuades, ditambahkan pada 100 mL akuades yang sedang mendidih.

F. Larutan reagensian Nelson

Reagensia Nelson A

Larutkan 12,5 g Natrium karbonat anhidrat, 12,5 g garam Rochele, 10 g natrium bikarbonat dan 100 g natrium sulfat anhidrat dalam 350 mL akuades. Encerkan sampai 500 mL.

Reagensia Nelson B

Larutkan 7,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dalam 50 mL akuades dan tambahkan 1 tetes asam sulfat pekat.

Reagensia Nelson dibuat dengan cara mencampur 15 bagian reagensia Nelson A dan 1 bagian reagensia Nelson B. Pencampuran dikerjakan ada setiap akan digunakan.

G. Larutan reagensia arseno molibdat

Larutkan 25 g ammonium molibdat dalam 450 mL akuades dan tambahkan 25 mL asam sulfat pekat. Larutkan pada tempat yang lain 3 g $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dalam 25 mL akuades, kemudian tuang larutan ini kedalam larutan yang pertama. Simpan dalam botol berwarna coklat dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Reagensia ini baru bisa digunakan setelah masa inkubasi tersebut, reagensia ini berwarna kuning.

H. Larutan Natrium Hidroksida (NaOH) 4%

Sebanyak 4 gram NaOH dilarutkan dalam 100 mL akuades.

Lampiran 35. Dokumentasi



Analisa kandungan glukosa awal metode Luff Schoorl



Isolat jamur *Trichoderma viride*



Media inokulum hidrolisis alga oleh *T. viride*



Pembuatan media fermentasi pengaruh pH alga oleh *Z. mobilis*



Proses destilasi etanol



Proses produksi bioetanol di fermentor