

PEMBUATAN BIOETANOL DARI SUBSTRAT MAKROALGA
GENUS *Eucheuma* DAN *Gracilaria*

ATIKAH ASHRIYANI

030403009X



UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN KIMIA
DEPOK
2009

PEMBUATAN BIOETANOL DARI SUBSTRAT MAKROALGA
GENUS *Eucheuma* DAN *Gracilaria*

**Skripsi diajukan sebagai salah satu syarat
untuk memperoleh gelar Sarjana Sains**

Oleh :

ATIKAH ASHRIYANI

030403009X



DEPOK

2009

SKRIPSI : PEMBUATAN BIOETANOL DARI SUBSTRAT MAKROALGA

GENUS *Eucheuma* DAN *Gracilaria*

NAMA : ATIKAH ASHRIYANI

NPM : 030403009X

SKRIPSI INI TELAH DIPERIKSA DAN DISETUJUI

DEPOK, 14 Desember 2009

Dra. SISWATI SETIASIH, Apt., M. Si

Dra. SRI HANDAYANI, M. Biomed

PEMBIMBING I

PEMBIMBING II

Tanggal Lulus Ujian Sidang Sarjana : 5 Januari 2009

Penguji I : Prof. Dr. Sumi Hudyono PWS

Penguji II : Dra. Susilowati Hadisusilo, M.Sc

Penguji III : Dr. Herry Cahyana

KATA PENGANTAR

Bismillahirrohmanirrohim.

Hamdalah terucap ketika menyampaikan rasa syukur pada ALLAH yang senantiasa memberikan pertolongan sangat dekat. Sholawat dan salam juga disampaikan pada Rosul yang senantiasa memberikan pengetahuan kesabaran pada penulis dalam perjuangan menyelesaikan skripsi ini.

Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya pada ibu Dra. Siswati Setiasih, Apt., M. Si dan Ibu Sri Handayani, M. Biomed yang telah menjadi pembimbing dalam pengerjaan skripsi ini. Penulis menyampaikan terima kasih untuk bimbingan, arahan, waktu, dan juga ilmu yang telah diberikan selama penelitian ini.

Selanjutnya, ucapan terima kasih juga penulis sampaikan pada pembimbing akademik, bapak Dr. Yoki Yulizar, bapak Dr. Ridla Bakri selaku ketua Departemen Kimia, ibu Ir. Widyastuti Samadi M. Si selaku koordinator akademik, dan ibu Tresye Utari sebagai koordinator penelitian. Selain itu, terima kasih untuk seluruh dosen yang telah memberikan banyak hal untuk penulis saat menimba ilmu di tempat ini.

Terima kasih kembali penulis ucapkan kepada seluruh staf Departemen Kimia atas semua bantuannya. Ucapan ini juga diperuntukkan bagi Mba Deva dari Departemen Farmasi UI Depok, Mba Ari dari Departemen Teknologi Pangan IPB Bogor dan Dinar dari Departemen Biologi

ITB yang telah memberikan kemudahan pada penulis untuk mendapatkan bahan-bahan penelitian.

Ucapan terima kasih yang sangat dalam juga penulis sampaikan pada orang-orang yang senantiasa memberikan banyak hal, yaitu kepada :

1. Ibu, Bapak dan orang-orang dirumah (Arfan, Dede, Mb Eni, Mb Ismi, Mas Moko) yang senantiasa memberikan semangat dan do'a.
2. Ana dan "mas-nya" yang sudah membantu penulis mendapatkan bahan baku penelitian ini.
3. Teman-teman seperjuangan lantai 4, Purnama, Riyanti, Ardi, Meta, Ferry, Syarif. Untuk Purnama, terima kasih yang sangat besar karena sudah menjadi teman seperjuangan.
4. Sahabat sekaligus saudari tercinta, Nurma Nugraha. Terimakasih untuk nasihat dan semangat selama ini.
5. Sahabat-sahabat lain, Dewi, Pemi, Mb Tina, Ani, Citra, Esti, Ayu, Dwi, Mba Rina. Terimakasih karena sudah menjaga penulis dalam semangat sampai saat ini.
6. Adik-adik kelas, Rani, Zetry, Bandu, Evi, Vitri, Imas, Ikor, Mila, Putri, Ayu, Bhekti, Qonita, Sari, Icha, Itin, Yuli, Anita, dan Annisa yang selalu memberikan dukungan dan pelajaran yang sangat berharga.
7. Tim Tarbawi UI 2009, Bang Tami, Anita, Femmi, Uti, Ica, Erlangga, Firdus, dan Gilang. Terima kasih yang mendalam atas pengertiannya selama ini

8. Tim BPH akhwat Salam 1 Dekade, Susan, Etha, Mia, Meirna. Spesial untuk Susan, terima kasih untuk bantuannya.

Hamdalah selanjutnya terucap ketika penulisan skripsi ini bisa berjalan dengan lancar, walaupun senantiasa ada hambatan yang memang menjadi ujian untuk kita senantiasa bersyukur dan bersabar pada ALLAH. Do'a juga terucap untuk semua pihak yang telah disebutkan ataupun tidak disebutkan agar semua kebaikan dibalas pahala oleh ALLAH karena penulis tidak bisa memberikan apapun.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna, maka dengan segala kerendahan hati penulis memohon maaf bila ada salah kata dalam penulisan. Penulis membuka diri jika ada saran atau kritik yang sifatnya membangun. Semoga skripsi ini bukan hanya akan menjadi koleksi di Perpustakaan Departemen Kima, namun bermanfaat dan memberikan inspirasi bagi siapapun.

Penulis

2009

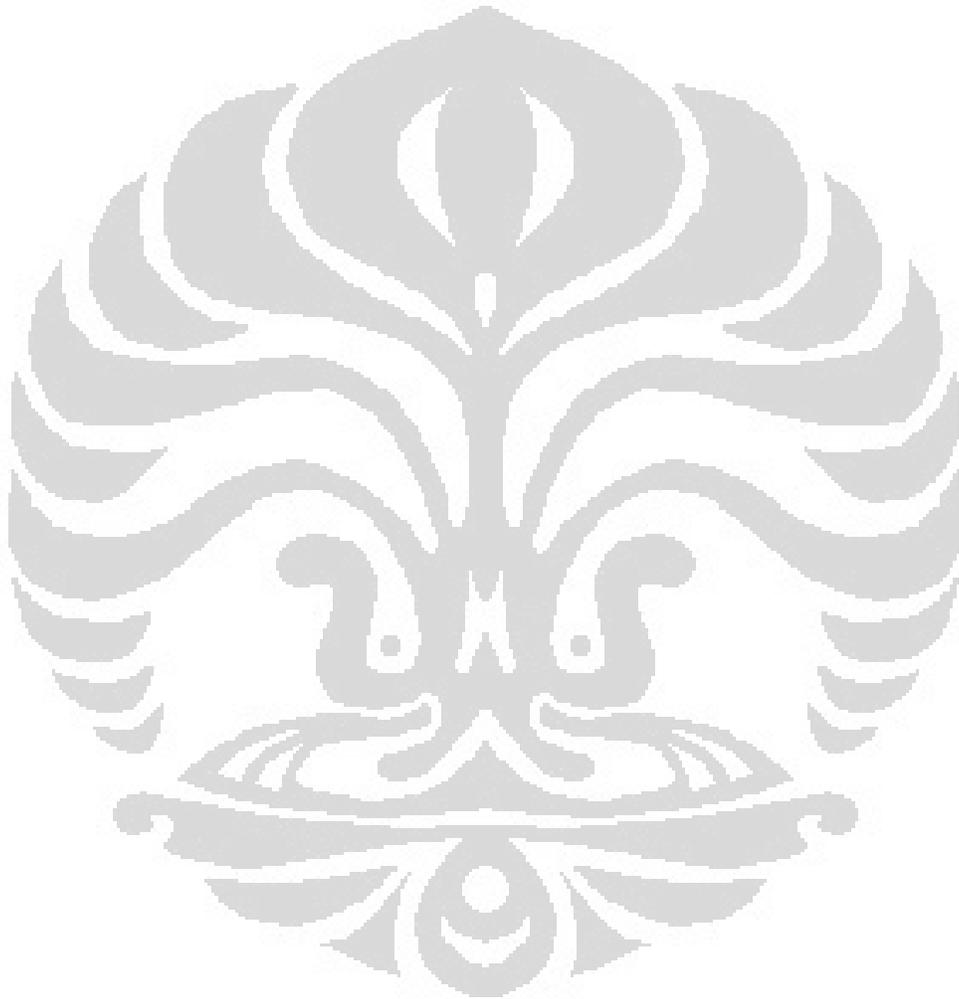
ABSTRAK

Dalam kondisi krisis energi seperti saat ini, pemanfaatan sumber daya yang dapat diperbarui diharapkan dapat membantu pemenuhan kebutuhan energi. Makroalga merupakan salah satu sumber daya yang dapat dimanfaatkan sebagai penghasil energi alternatif dalam bentuk bioetanol. Pada penelitian ini, dipilih makroalga genus *Eucheuma* dan *Gracilaria* karena memiliki kandungan selulosa serta mudah dan cepat pembudidayaannya. *Eucheuma* dan *Gracilaria* dihidrolisis oleh jamur *Trichoderma viride* yang menghasilkan enzim selulase. Konsentrasi senyawa gula pereduksi yang dihasilkan dari proses hidrolisis ditentukan dengan metode Somogyi Nelson. Gula pereduksi paling tinggi yang dihasilkan dari hidrolisis *Eucheuma* adalah 0,090 mg/mL pada konsentrasi 7,5% dan waktu inkubasi 48 jam, sedangkan pada *Gracilaria*, gula pereduksi yang dihasilkan sebesar 0,089 mg/mL pada konsentrasi 5% dan waktu inkubasi yang sama. Hidrolisat *Eucheuma* dan *Gracilaria* difermentasi oleh sel *Saccharomyces cerevisiae* yang terimobilisasi dalam Ca alginat. Kondisi optimum proses fermentasi diperoleh pada pH 4 dan waktu inkubasi 24 jam yang menghasilkan kadar etanol sebesar 0,698% dari hidrolisat *Eucheuma* dan 0,530% dari *Gracilaria*. Kadar etanol ditentukan dengan *Gas Chromatography*.

Kata kunci : *Trichoderma viride*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Eucheuma*,
Gracilaria, selulosa, fermentasi, immobilisasi sel

xvi + 73 hlm

Bibliografi : 43

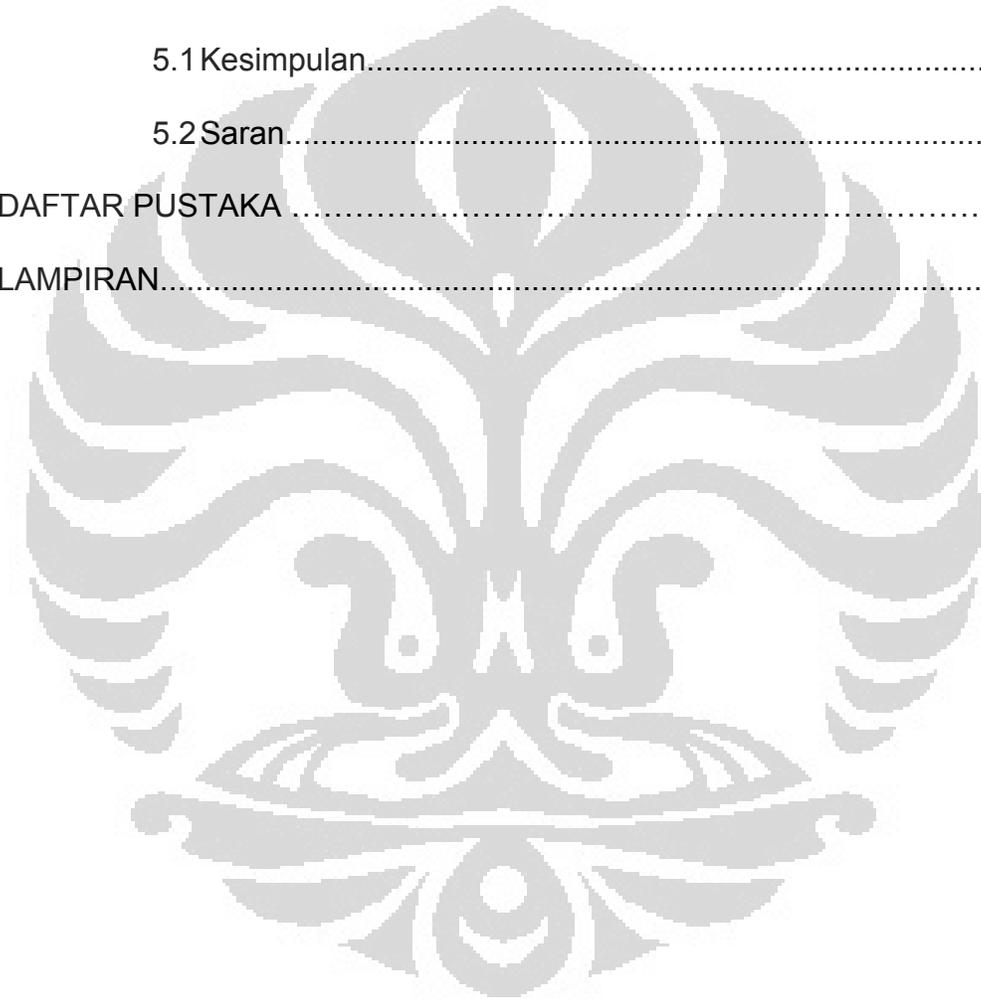


DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	i
ABSTRAK	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar belakang masalah	1
1.2 Perumusan masalah	4
1.3 Tujuan penelitian	5
1.4 Hipotesis	5
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 Bioetanol	7
2.2 <i>Eucheuma</i>	10
2.3 <i>Gracilaria</i>	12
2.4 Selulosa	14
2.5 <i>Trichoderma viride</i>	15
2.6 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
2.7 Hidrolisis	20
2.8 Fermentasi	22
2.9 Immobilisasi sel	26

BAB III. METODE PENELITIAN.....	29
3.1 Bahan-bahan.....	29
3.1.1 Mikroorganisme	29
3.1.2 Substrat dan bahan kimia	29
3.2 Peralatan yang digunakan.....	30
3.3 Prosedur Kerja.....	30
3.3.1 Persiapan substrat	30
3.3.2 Sterilisasi alat dan bahan	31
3.3.3 Pembuatan media pemeliharaan <i>Trichoderma viride</i> dan <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
3.3.4 Pembuatan suspensi sel <i>Trichoderma viride</i> dan <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
3.3.5 Pembuatan media aktivasi <i>Trichoderma viride</i>	31
3.3.6 Hidrolisis substrat menggunakan <i>Trichoderma viride</i> ...32	
3.3.7 Penentuan kadar gula dengan metode Somogyi Nelson	33
3.3.8 Pembuatan media aktivasi <i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i>	33
3.3.9 Pembuatan sel imobil <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	34
3.3.10 Fermentasi oleh <i>Saccharomyces cerevisiae</i> terimobilisasi	34
3.3.11 Pengukuran konsentrasi etanol	35

BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	37
4.1 Hidrolisis substrat oleh <i>Trichoderma viride</i>	37
4.2 Fermentasi hidrolisat substrat oleh <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	41
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	47
5.1 Kesimpulan.....	47
5.2 Saran.....	47
DAFTAR PUSTAKA	49
LAMPIRAN.....	55

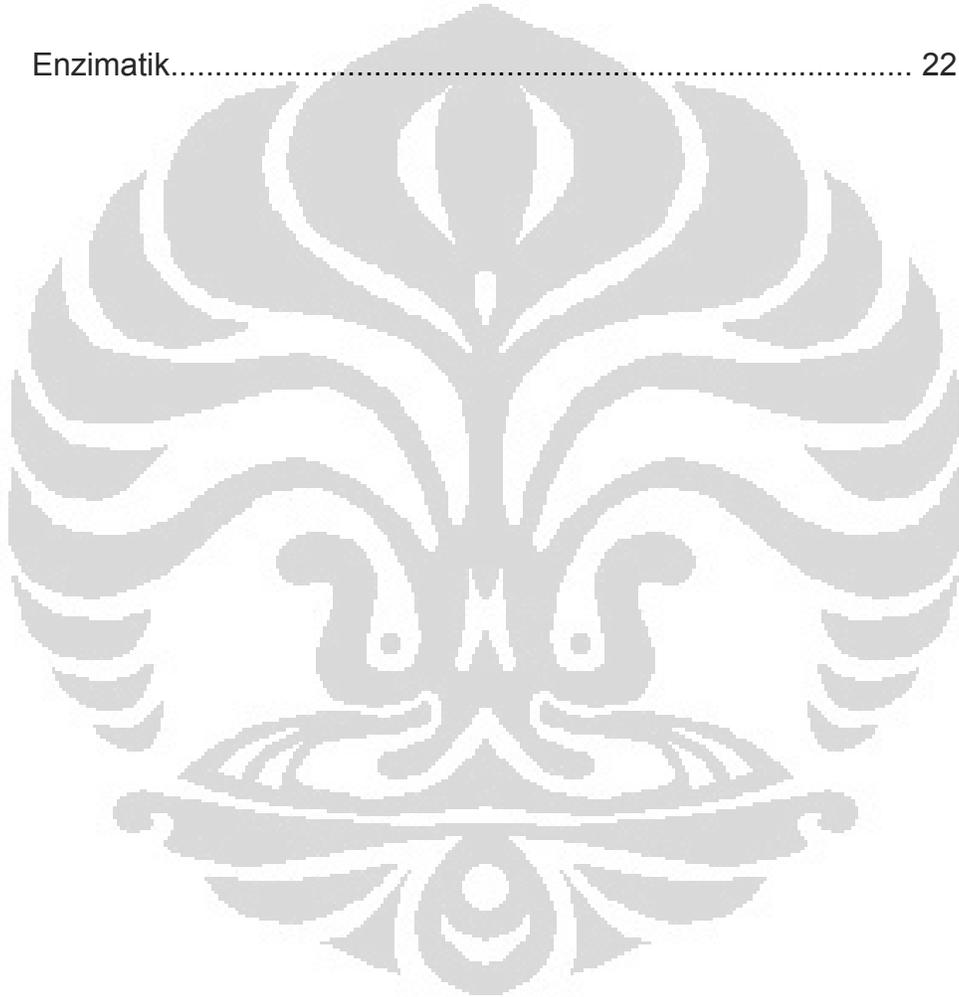


DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
Gambar 2.1 Struktur etanol.....	7
Gambar 2.2 <i>Euchema</i>	11
Gambar 2.3 <i>Gracilaria</i>	12
Gambar 2.4 Struktur Selulosa (i).....	14
Gambar 2.5 Struktur Selulosa (ii).....	15
Gambar 2.6 <i>Trichoderma viride</i>	16
Gambar 2.7 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
Gambar 2.8 Reaksi pembentukan etanol.....	23
Gambar 4.1 Grafik kadar gula pereduksi (mg/mL) terhadap waktu hidrolisis.....	38
Gambar 4.2 Grafik kadar gula pereduksi (mg/mL) terhadap jumlah substrat.....	40
Gambar 4.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> terimobilisasi dalam gel alginat.....	41
Gambar 4.4 Grafik kadar etanol terhadap waktu fermentasi	42
Gambar 4.5 Grafik kadar etanol terhadap pH media fermentasi.....	43
Gambar 4.6 Grafik kadar etanol terhadap pengulangan fermentasi menggunakan sel <i>Saccharomyces cerevisiae</i> terimobilisasi.....	44

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
Tabel 2.1. Perbandingan antara hidrolisis asam dan hidrolisis Enzimatik.....	22



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Standar Glukosa.....	55
2. Variasi waktu hidrolisis substrat.....	56
3. Variasi konsentrasi substrat saat hidrolisis.....	57
4. Standar etanol.....	58
5. Variasi waktu fermentasi.....	60
6. Variasi pH fermentasi.....	62
7. Uji pengulangan.....	64
8. Pengukuran jumlah sel dengan metode <i>counting chamber</i>	66
9. Penghitungan kadar air pada substrat.....	68
10. Penghitungan <i>yield</i> penelitian.....	69
11. Bagan penelitian.....	71

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia sebagai negara kepulauan dengan panjang garis pantai 81.000 km memiliki kawasan pesisir dan lautan yang mengandung berbagai sumber daya hayati yang sangat besar dan beragam. Berbagai sumber daya hayati tersebut merupakan potensi pembangunan yang sangat penting sebagai sumber-sumber pertumbuhan ekonomi baru.¹ Sumber daya hayati tersebut salah satunya adalah makroalga, atau biasa disebut rumput laut.

Rumput laut, sebagai salah satu komoditas ekspor, merupakan sumber devisa bagi negara yang peluangnya terbuka luas. Rumput laut memiliki beberapa keunggulan, yaitu harga relatif stabil, teknologi pembudidayaannya sederhana, siklus pembudidayaannya relatif singkat sehingga cepat memberikan keuntungan, kebutuhan modal relatif kecil, dan merupakan komoditas yang tak tergantikan karena tidak ada produk sintetisnya. Budidayanya juga merupakan sumber pendapatan nelayan, dapat menyerap tenaga kerja, serta mampu memanfaatkan lahan perairan pantai di kepulauan Indonesia yang sangat potensial.

Perkembangan penelitian rumput laut di Indonesia telah dimulai sejak *Ekspedisi Siboga* yang dilakukan antara tahun 1899 -1900. Pada penelitian selanjutnya tahun 1913 – 1928, *van Bosse* telah berhasil mengoleksi jenis

rumput laut yang tumbuh di perairan Indonesia sebanyak 555 jenis. Pada penelitian *Van Bosse* tahun 1914 - 1916 di Kepulauan Kai, pada *Ekspedisi Danish*, ditemukan sebanyak 25 jenis alga merah, 28 jenis alga hijau, dan 11 jenis alga coklat. Penelitian identifikasi jenis rumput laut berlanjut pada penelitian *Snellius-II* pada tahun 1985 yang menemukan 41 jenis alga merah, 59 jenis alga hijau, dan 9 jenis alga coklat, sedangkan pada penelitian *Buginesia-III* pada tahun 1988 – 1990 ditemukan sebanyak 118 jenis alga merah, 80 jenis alga hijau, dan 36 jenis alga coklat.²

Saat ini, Indonesia memiliki luas area untuk kegiatan budidaya rumput laut seluas 1.110.900 ha, tetapi pengembangan budidaya rumput laut baru memanfaatkan lahan seluas 222.180 ha (20% dari luas areal potensial). Produksi rumput laut secara nasional pada tahun 2005 mencapai 910.636 ton dan meningkat menjadi 1.079.850 ton pada tahun 2006. Angka ini merupakan angka yang cukup signifikan dalam pencapaian sasaran yang telah ditetapkan, yakni 933,000 ton untuk sasaran tahun 2005, dan 1.120.000 ton sasaran pada tahun 2006. Dalam program revitalisasi budidaya perikanan, sasaran produksi rumput laut pada tahun 2009 adalah sebesar 1.900.000 ton.³

Hingga saat ini, pemanfaatan rumput laut di Indonesia paling besar adalah sebagai sumber pangan, yaitu *Euchema spinosum*, *Euchema cottonii*, dan *Gracilaria sp.* Selain itu, rumput laut juga dimanfaatkan sebagai bahan kosmetik, pasta gigi, obat-obatan, dll. Baru – baru ini rumput laut di Indonesia mulai dilirik sebagai sumber energi alternatif, yaitu sebagai bahan *biofuel*.³

Pemikiran untuk memanfaatkan rumput laut sebagai energi alternatif di Indonesia timbul karena cadangan bahan bakar minyak (BBM) yang semakin menipis, sedangkan populasi manusia semakin meningkat, sehingga kebutuhan energi bagi kelangsungan hidup manusia serta aktivitas ekonomi dan sosialnya juga meningkat. Sejak lima tahun terakhir, Indonesia mengalami penurunan produksi minyak nasional akibat cadangan minyak yang menurun secara alamiah pada sumur-sumur produksi. Sementara itu, bertambahnya jumlah penduduk, meningkatkan pula kebutuhan akan sarana transportasi dan aktivitas industri yang berakibat pada peningkatan kebutuhan dan konsumsi bahan bakar minyak. Oleh karena itu, penggunaan rumput laut, yang memang mudah dibudidayakan di Indonesia sebagai sumber alternatif energi merupakan hal baru yang patut didukung dan dikembangkan. Menurut data dari Inha Universitas Korea, satu hektar areal rumput laut bisa menghasilkan 58.700 liter biodiesel, dengan asumsi kandungan minyak dalam rumput laut yang dihasilkan berkisar 30%. Pemanfaatan rumput laut sebagai *biofuel* di Indonesia ini mulai digagas pemerintah Indonesia yang bekerjasama dengan pemerintah Korea Selatan. Rumput laut yang digunakan adalah *Gellidium sp* karena rumput laut jenis itu tidak dimanfaatkan untuk bahan makanan.⁴

Dari semua penjabaran itulah, penelitian ini dilakukan untuk memanfaatkan rumput laut sebagai bahan baku pembuatan bioetanol dalam skala yang lebih kecil yang akan bisa dimanfaatkan sebagai sumber energi alternatif. Hal ini merupakan studi pendahuluan untuk memproduksi bioetanol dalam skala

lebih besar. Tujuan besarnya adalah pembuatan bioetanol dengan menggunakan teknik fermentasi termodifikasi menggunakan limbah ataupun bahan-bahan sekitar yang tidak terpakai yang mengandung substrat selulosa. Dari pemanfaatan bahan-bahan tadi, produksi bioetanol ini dapat dilakukan oleh penduduk pada tingkat ekonomi menengah kebawah.

1.2 Perumusan Masalah

Pemberdayaan rumput laut di Indonesia sebagai sumber energi alternatif masih sangat jarang, padahal rumput laut diketahui bisa menghasilkan sumber daya energi seperti bioetanol. Bioetanol dapat diproduksi dari bahan dasar selulosa yang dihidrolisis menjadi glukosa, kemudian, glukosa difermentasi menjadi etanol. Secara enzimatik, hidrolisis selulosa biasanya dilakukan dengan menambahkan enzim pemecah selulosa, tapi, pada penelitian kali ini, hidrolisis selulosa dilakukan dengan penambahan langsung mikroorganisme (*Trichoderma viride*) yang menghasilkan enzim yang berperan dalam proses tersebut. Selanjutnya, proses fermentasi dilakukan dengan menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* sebagai mikroorganisme yang akan berperan sebagai pelaku fermentasi. *Saccharomyces cerevisiae* akan diimobilisasi terlebih dahulu sebelum melakukan fermentasi. Metode imobilisasi sel menggunakan suatu material pendukung berupa sistem matriks, membran, atau permukaan zat padat yang berfungsi sebagai *carrier*. Pada penelitian kali ini digunakan Ca

alginat sebagai matriks yang menjebak sel *Saccharomyces cerevisiae*.⁵

1.3 Tujuan

Tujuan penelitian ini adalah untuk memanfaatkan substrat selulosa pada makroalga genus *Eucheuma* dan *Gracilaria* sebagai sumber bioetanol. Hidrolisis substrat selulosa dilakukan oleh jamur *Trichoderma viride* sebagai penghasil enzim selulase yang dapat memecah selulosa menjadi glukosa. Proses selanjutnya adalah fermentasi oleh khamir *Saccharomyces cerevisiae* yang akan mengubah glukosa menjadi etanol.

1.4 Hipotesis

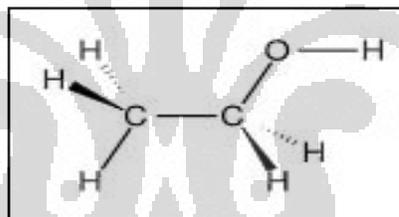
Makroalga genus *Eucheuma* dan *Gracilaria* bisa dimanfaatkan sebagai penghasil etanol karena memiliki kandungan selulosa yang dapat diubah secara bertahap menjadi etanol. Jamur *Trichoderma viride* berperan sebagai mikroorganisme penghasil enzim selulase yang dapat menghidrolisis selulosa menjadi glukosa. Selanjutnya, proses fermentasi glukosa menjadi etanol dilakukan oleh khamir *Saccharomyces cerevisiae* terimobilisasi.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bioetanol

Bioetanol adalah etanol yang diproduksi dari bahan baku berupa biomassa ataupun limbahnya yang diproduksi dengan teknologi biokimia, melalui proses fermentasi bahan baku. Pada dasarnya, bioetanol dan etanol adalah zat yang sama. Etanol atau etil alkohol merupakan senyawa organik dengan struktur kimia C_2H_5OH .



Gambar 2.1 Struktur etanol

Bioetanol tidak berwarna dan tidak berasa, tetapi memiliki bau yang khas. Bahan ini dapat memabukkan jika diminum, tapi tidak beracun. Karena sifat inilah etanol banyak dipakai sebagai pelarut dalam dunia farmasi dan industri makanan dan minuman. Karakteristik etanol antara lain mudah terbakar, larut dalam air, *biodegradable*, dan tidak karsinogenik.⁶

Di bawah ini adalah sifat fisik etanol :

Massa molekul relatif : 46,07 g/mol

Titik didih : 78,4°C

Titik leleh : $-114,3^{\circ}\text{C}$

Titik nyala : 13°C

Densitas : $0,789 \text{ gr/cm}^3$

Keasaman : 15,9

Viskositas pada 20°C : 1,200 cP

Tekanan uap : 44 mmHg

2.1.1 Spesifikasi Bioetanol

Spesifikasi alkohol didasarkan pada kadar alkohol, dapat dibagi menjadi 3 tingkatan, yaitu :

1. Kadar 90 – 96,5 % adalah bioetanol yang digunakan pada industri.
2. Kadar 96 – 99,5 % adalah bioetanol yang digunakan sebagai campuran miras dan bahan dasar industri farmasi.
3. Kadar 99,5 – 100 %, yaitu alkohol yang digunakan sebagai bahan campuran bahan bakar untuk kendaraan, oleh sebab itu harus benar-benar kering dan *anhydrous* supaya mesin tidak korosif.

2.1.2 Karakterisasi Bioetanol

Keunggulan-keunggulan etanol sebagai bahan bakar dibandingkan bahan bakar minyak adalah sebagai berikut:

1. Gas emisi etanol lebih ramah lingkungan karena adanya gugus OH dalam susunan molekulnya. Oksigen yang terdapat di dalam molekul etanol

tersebut membantu penyempurnaan pembakaran antara campuran udara-bahan bakar di dalam silinder. Selain itu, etanol memiliki rentang keterbakaran (*flammability*) yang lebar, yakni 4,3 - 19 vol% (dibandingkan dengan *gasoline* yang memiliki rentang keterbakaran 1,4 – 7,6 vol%, membuat pembakaran campuran udara-bahan bakar etanol menjadi lebih baik. Hal ini merupakan faktor penyebab relatif rendahnya emisi CO dibandingkan dengan pembakaran udara-gasolin, yakni sekitar 4%.

2. Etanol merupakan energi alternatif yang dapat diperbaharui. Etanol diproduksi dari tanaman-tanaman yang mengandung biomassa (bukan dari minyak bumi). Oleh karena tanaman-tanaman tersebut dapat diperbaharui, maka tidak perlu mengkhawatirkan akan kehabisan etanol.
3. Kandungan energi etanol lebih tinggi dari gasolin. Etanol memiliki panas penguapan (*heat of vaporization*) yang tinggi, yakni 842 kJ/kg. Etanol juga memiliki angka *research octane* 108,6 dan *motor octane* 89,7. Angka tersebut (terutama *research octane*) melampaui nilai maksimal yang mungkin dicapai oleh gasolin yang sudah ditambahkan aditif tertentu pada gasolin (bensin yang dijual Pertamina memiliki angka *research octane* 88).
4. Penggunaan etanol tidak rumit. Etanol yang biasa diproduksi bisa dicampur dengan bensin dan digunakan tanpa memerlukan modifikasi mesin.

Kegunaan Bioetanol⁶ :

Bioetanol memiliki banyak kegunaan, di antaranya adalah sebagai berikut :

1. Sebagai bahan bakar
2. Sebagai bahan dasar minuman beralkohol
3. Sebagai bahan kimia dasar senyawa organik
4. Sebagai antiseptik
5. Sebagai antidote beberapa racun
6. Sebagai pelarut untuk parfum, cat, dan larutan obat
7. Digunakan untuk pembuatan beberapa deodoran
8. Digunakan untuk pengobatan untuk mengobati depresi dan sebagai obat bius

2.2 *Eucheuma*

Eucheuma merupakan salah satu genus rumput laut merah.

Umumnya, *Eucheuma* tumbuh dengan baik di daerah pantai terumbu (*reef*).

Habitat khasnya adalah daerah yang memperoleh aliran air laut yang tetap, variasi suhu harian yang kecil, dan batu karang mati. *Eucheuma* juga memiliki keunggulan mudah dikembangbiakkan dan siklus hidupnya singkat, sehingga mudah untuk mendapatkannya. Rumput laut ini memiliki kandungan air (21,9%), protein (5,12%), lemak (0,13%), abu (14,21%), selulosa (15%) dan sisanya adalah karagenan (43,46%).^{8,9}



Gambar 2.2 *Eucheuma*

2.2.1 Morfologi *Eucheuma*

Ciri fisik *Eucheuma* adalah mempunyai thallus silindris dan permukaan licin. Keadaan warna tidak selalu tetap, kadang-kadang berwarna hijau, hijau kuning, abu-abu atau merah. Perubahan warna sering terjadi karena faktor lingkungan seperti suatu proses adaptasi kromatik yaitu penyesuaian antara proporsi pigmen dengan berbagai kualitas cahaya.⁷ Penampakan thallus bervariasi mulai dari bentuk sederhana sampai kompleks. Duri-duri pada thallus runcing memanjang, agak jarang-jarang dan tidak bersusun melingkari thallus. Percabangan ke berbagai arah dengan batang-batang utama keluar saling berdekatan ke daerah pangkal serta tumbuh melekat ke substrat dengan alat perekat berupa cakram. Cabang-cabang pertama dan kedua tumbuh dengan membentuk rumpun yang rimbun dengan ciri khusus mengarah ke arah datangnya sinar matahari.¹⁰

2.2.2 Taksonomi *Eucheuma*¹¹

Klasifikasi *Eucheuma* adalah sebagai berikut :

Kingdom : *Plantae*

Divisi : *Rhodophyta*

Kelas : *Rhodophyceae*

Ordo : *Gigartinales*

Famili : *Solieracea*

Genus : *Eucheuma*

2.3 *Gracilaria*

Gracilaria merupakan genus dari alga merah. Makroalga ini adalah satu-satunya dari 700 spesies makroalga yang ditanam di tambak. Pembudidayaan *Gracilaria* juga cukup mudah dan cepat. Selain itu, *Gracilaria* memiliki banyak manfaat, diantaranya untuk bahan makanan, industri, dan untuk pembuatan bioetanol karena memiliki kandungan selulosa.^{12, 13}



Gambar 2.3 *Gracilaria*

2.3.1 Morfologi *Gracilaria*

Makroalga ini memiliki panjang sekitar 3 – 18 cm dan lebarnya sekitar 1,5 – 4 mm. Bentuknya silinder, dengan percabangan yang tidak teratur. Selain itu, thallus *Gracilaria* berbentuk silindris atau gepeng dengan percabangan dari sederhana sampai rumit. Bentuk thallus mengecil diatas percabangan dengan warna yang beragam. Substansi thallus menyerupai gel atau lunak seperti tulang rawan. *Gracilaria* hidup di dasar perairan dengan melekatkan thallus pada substrat, umumnya pasir, lumpur, karang, kulit kerang, karang mati, batu maupun kayu. Tanaman ini mampu hidup ada pada kedalaman hingga 10 - 15 m pada salinitas 12 – 30 ppt.¹⁴

2.3.2 Taksonomi *Gracilaria*

Klasifikasi *Gracilaria* adalah sebagai berikut :

Kingdom : *Plantae*

Divisi : *Rhodophyta*

Kelas : *Florideophyceae*

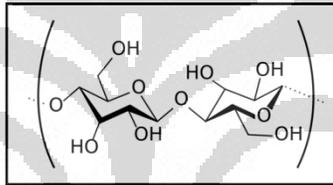
Ordo : *Gracilariales*

Famili : *Gracilariaceae*

Genus : *Gracilaria*

2.4 Selulosa

Selulosa adalah zat organik yang memiliki rumus kimia $(C_6H_{10}O_5)_n$. Polisakarida ini merupakan rantai lurus yang tersusun atas lebih dari sepuluhribu D-glukosa yang dihubungkan dengan ikatan $\beta(1\rightarrow4)$. Selulosa adalah komponen dinding sel primer dari tanaman hijau, alga, dan *oomycetes*. Selulosa tidak berwarna dan tidak berasa, tidak larut dalam air dan beberapa pelarut organik.^{15,16}

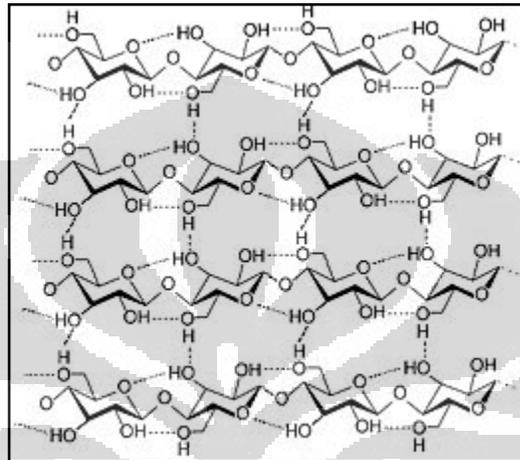


Gambar 2.4 Struktur selulosa¹⁷ (i)

Selulosa terbentuk dari monomer-monomer D-glukosa yang terikat dengan ikatan $\beta(1\rightarrow4)$ -glikosidik. Banyaknya gugus hidrogen dalam zat tersebut membuat banyak terbentuk ikatan hidrogen dengan molekul oksigen intra ataupun intermolekular. Ikatan hidrogen intermolekular membentuk lembaran-lembaran. Lembaran-lembaran ini tersusun menjadi suatu lapisan membentuk mikrofibril.¹⁵

Selulosa lebih kristalin dibandingkan polisakarida lain. Jika kanji berubah dari struktur kristalin menjadi amorf saat dipanaskan antara $60-70^{\circ}C$, tapi selulosa membutuhkan panas $320^{\circ}C$ dan tekanan 25 MPa untuk menjadi amorf.¹⁸

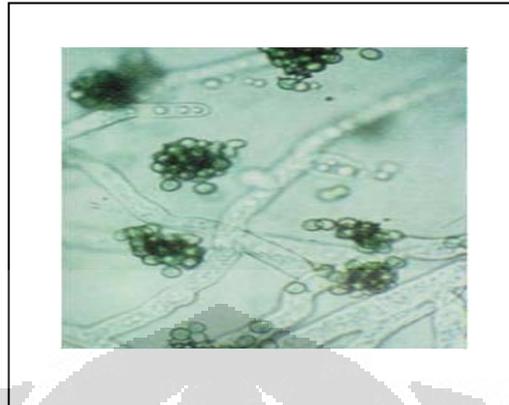
Panjang molekul selulosa ditentukan oleh jumlah glukosa di dalamnya. Selulosa yang berasal dari kayu memiliki 300-1700 unit glukosa, sedangkan selulosa pada serat tanaman tersusun atas 800-10000 unit glukosa.¹⁹



Gambar 2.5 Struktur selulosa (ii)

2.5 *Trichoderma viride*

Trichoderma viride adalah salah satu jenis jamur yang bersifat selulolitik karena dapat menghasilkan selulase. Banyak kapang yang bersifat selulolitik tetapi tidak banyak yang menghasilkan enzim selulase yang cukup banyak untuk dapat dipakai secara langsung. *Trichoderma viride* mampu menghancurkan selulosa tingkat tinggi dan memiliki kemampuan mensintesis beberapa faktor esensial untuk melarutkan bagian selulosa yang terikat kuat dengan ikatan hidrogen.^{20,21,22}



Gambar 2.6 *Trichoderma viride*

2.5.1 Taksonomi *Trichoderma viride*²³

- Divisi : *Amastigomycota*
- Sud Divisi : *Deuteromycotina*
- Kelas : *Deuteromycetes*
- Sub Kelas : *Hyphomycetidae*
- Ordo : *Moniliales*
- Famili : *Moniliaceae*
- Genus : *Trichoderma*
- Species : *Trichoderma viride*

2.5.2 Morfologi *Tricoderma viride*

Koloni dari kapang *Trichoderma* berwarna putih, kuning, hijau muda, dan hijau tua. Dijelaskan lebih lanjut bahwa kultur kapang *Trichoderma*

viride pada skala laboratorium berwarna hijau, hal ini disebabkan oleh adanya kumpulan konidia pada ujung hifa kapang tersebut. Susunan sel kapang *Trichoderma* 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 sifat inilah *Trichoderma* dikatakan memiliki daya kompetitif yang tinggi. Dalam pertumbuhannya, bagian permukaan akan terlihat putih bersih, dan bermiselium kusam. Setelah dewasa, miselium memiliki warna hijau kekuningan.^{21,23,24}

Kapang ini memiliki bagian yang khas antara lain miselium berseptat, bercabang banyak, konidia spora berseptat dan cabang yang paling ujung berfungsi sebagai sterigma. Pada bagian ujung konidiofornya tumbuh sel yang bentuknya menyerupai botol (*fialida*), sel ini dapat berbentuk tunggal maupun berkelompok. Konidianya berwarna hijau cerah bergerombol membentuk menjadi seperti bola dan berkas-berkas hifa terlihat menonjol jelas diantara konidia spora.²⁵ *Trichoderma* berkembangbiak secara aseksual dengan membentuk spora di ujung *fialida* atau cabang dari hifa.

2.5.3 Fisiologi *Trichoderma viride*

Trichoderma adalah salah satu jamur tanah yang tersebar luas, yang hampir dapat ditemui di lahan-lahan pertanian dan perkebunan.

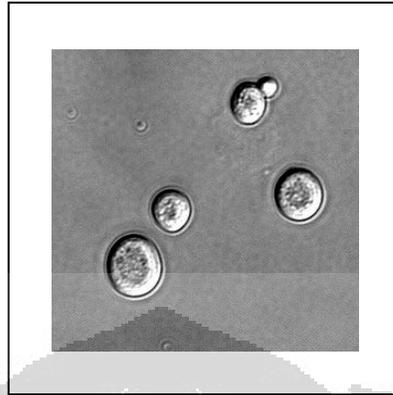
Trichoderma bersifat saprofit pada tanah, kayu, dan beberapa jenis bersifat parasit pada jamur lain. *Trichoderma viride* merupakan jenis yang paling banyak dijumpai diantara genusnya dan mempunyai kelimpahan yang tinggi pada tanah dan bahan yang mengalami dekomposisi. Suhu optimal untuk pertumbuhan kapang ini adalah 32-35°C dan pH optimal sekitar 4.0.^{21,26}

Trichoderma viride banyak digunakan dalam penelitian karena memiliki beberapa keuntungan, diantaranya adalah :

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

2.6 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae di Indonesia lebih dikenal dengan nama jamur ragi. Jamur ini merupakan jamur yang sangat dibutuhkan untuk membuat roti dan bir sejak zaman kuno. Ini adalah mikroorganisme yang berperan dibelakang fermentasi. Mikroorganisme ini berasal dari golongan khamir yang mampu memfermentasi glukosa, maka dimanfaatkan untuk memproduksi bioetanol.²⁷



Gambar 2.7 *Saccharomyces cerevisiae*

2.6.1 Taksonomi *Saccharomyces cerevisiae*²⁷

Kingdom : *Fungi*

Divisi : *Ascomycota*

Kelas : *Saccharomycetes*

Ordo : *Saccharomycetales*

Famili : *Saccharomycetaceae*

Genus : *Saccharomyces*

Species : *Saccharomyces cerevisiae*

2.6.2 Morfologi *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae merupakan khamir atau fungi uniseluler golongan eukariot. Mikroorganisme ini berbentuk bulat atau oval dengan diameter 5 – 20 mikrometer dan bermultifikasi membentuk *bud* yang setelah dewasa akan pecah menjadi sel induk.²⁸ Strukturnya mempunyai dinding

polisakarida tebal yang menutup protoplasma. Ciri umum *Saccharomyces cerevisiae* yaitu tidak mempunyai hifa dan tubuh buah.

Khamir ini bereproduksi dengan cara bertunas. Tempat melekatnya tunas pada induk sel sangat kecil, sehingga seolah-olah tidak terbentuk septa, sehingga tidak dapat terlihat dengan mikroskop biasa. Reproduksi khamir dipengaruhi oleh keadaan lingkungan serta jumlah nutrisi yang tersedia bagi pertumbuhan sel.²⁹

2.6.3 Fisiologi *Saccharomyces cerevisiae*

Khamir *Saccharomyces cerevisiae* ini dapat tumbuh dan berkembang biak dalam gula sederhana seperti glukosa, maupun kompleks disakarida sukrosa. Selain itu, untuk menunjang kebutuhan hidup, diperlukan oksigen, karbohidrat, dan nitrogen. Konsentrasi gula yang baik untuk fermentasi menggunakan khamir adalah diantara 10-18% dengan pH bahan 4 – 5 dan waktu yang digunakan biasanya 30 – 72 jam.

2.7 Hidrolisis

Hidrolisis secara bahasa diartikan reaksi dengan air. Reaksi hidrolisis merupakan reaksi pemutusan ikatan sebuah molekul oleh air. Contoh reaksi hidrolisis adalah inversi gula, pemutusan ikatan glikosidik pada polisakarida, dan pemecahan protein menjadi asam amino penyusunnya.³⁰

Monosakarida dapat saling berikatan dengan ikatan glikosidik membentuk polisakarida. Polisakarida ini dapat dipisahkan kembali dengan hidrolisis. Prinsip dari hidrolisis polisakarida ini adalah pemutusan ikatan yang menghubungkan monosakarida yang satu dengan yang lain. Hidrolisis dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu secara kimiawi dan enzimatik.

Secara kimiawi, hidrolisis polisakarida ini menggunakan asam. Hidrolisis menggunakan asam terbagi menjadi dua lagi, yaitu hidrolisis dengan asam encer dan asam pekat. Secara umum hidrolisis asam encer terdiri dari dua tahap. Tahap pertama sebagian besar hemiselulosa akan terhidrolisis, sedangkan tahap kedua dioptimasi untuk menghidrolisis selulosa. Untuk hidrolisis dengan asam pekat, proses yang terjadi yaitu dekristalisasi selulosa dengan asam pekat dan dilanjutkan dengan hidrolisis selulosa dengan asam encer. Tantangan utama dari hidrolisis dengan asam pekat ini adalah pemisahan gula dengan asam, *recovery* asam, dan rekonsentrasi asam. Proses hidrolisis enzimatik mirip dengan proses di atas, tetapi, hidrolisis dilakukan dengan mengganti asam menjadi enzim. Penggunaan enzim ini lebih efisien.³¹

Hidrolisis secara kimiawi dan enzimatik memiliki perbedaan yang mendasar. Asam yang merupakan zat yang berperan pada hidrolisis kimiawi akan memutus ikatan rantai polimer secara acak, sedangkan enzim akan memutus ikatan secara spesifik.

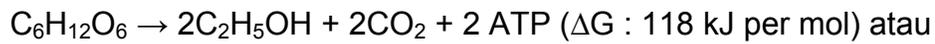
Variabel Pembandingan	Hidrolisis Asam	Hidrolisis Enzimatis
Kondisi hidrolisis yang 'lunak' (mild)	Tidak	Ya
Hasil hidrolisis tinggi	Tidak	Ya
Penghambatan produk selama hidrolisis	Tidak	Ya
Pembentukan produk samping yang menghambat	Ya	Tidak
Katalis yang murah	Ya	Tidak
Waktu hidrolisis yang cepat	Ya	Tidak

Tabel 2.1. Perbandingan antara hidrolisis asam dan hidrolisis enzimatis³²

2.8 Fermentasi

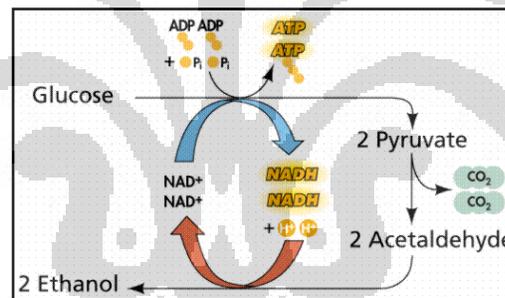
Fermentasi adalah suatu kultur mikroba dalam kondisi optimum untuk menghasilkan produk berupa metabolit-metabolit, enzim, atau produk lain (seperti biomassa).³³ Awalnya fermentasi didefinisikan sebagai anggur yang mendidih, kemudian pengertiannya berkembang secara luas menjadi penggunaan mikroorganisme untuk bahan pangan. Oleh Louis Pasteur, fermentasi didefinisikan sebagai proses penguraian gula pada buah anggur menjadi gelembung-gelembung udara (CO₂) oleh khamir yang terdapat pada cairan ekstrak buah anggur tersebut. Fermentasi etanol yang juga biasa disebut fermentasi alkohol, adalah proses biologi dimana gula seperti glukosa, fruktosa, dan sukrosa dirubah menjadi energi selular dan menghasilkan etanol dan karbondioksida sebagai metabolit samping.³⁴

Persamaan reaksi kimia pada fermentasi alkohol:



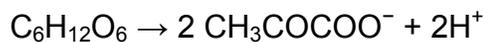
Gula \rightarrow Alkohol + Karbon dioksida + Energi (ATP)

Fermentasi yang dilakukan dalam penelitian kali ini menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* sebagai mikroorganisme yang berperan dalam mengubah 1 mol glukosa menjadi 2 mol etanol. Pada proses ini, *Saccharomyces cerevisiae* akan memetabolisme glukosa membentuk asam piruvat melalui tahapan reaksi pada jalur Embden-Meyerhof-Parnas, sedangkan asam piruvat yang dihasilkan akan didekarboksilasi menjadi asetaldehida yang kemudian mengalami dehidrogenasi menjadi etanol.³⁵



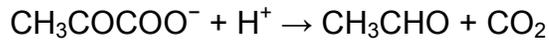
Gambar 2.8 Reaksi pembentukan etanol

Prosesnya dimulai ketika satu molekul glukosa dipecah menjadi piruvat melalui proses glikolisis (jalur Embden-Meyerhof-Parnas).³⁶



Reaksi ini mengubah dua molekul NAD^+ menjadi NADH dan menghasilkan 2 ATP serta 2 molekul air. Piruvat lalu diubah menjadi asetaldehid dan

karbondioksida oleh enzim piruvat dekarboksilase dan menghasilkan thiamin difosfat sebagai kofaktor.³⁶



Setelah itu, asetaldehid direduksi oleh NADH yang dihasilkan dari glikolisis menjadi etanol.



Alkohol yang diperoleh dari proses fermentasi ini, biasanya alkohol dengan kadar hanya 8 sampai 10 persen volume, sebab, bila dari proses fermentasi sudah diperoleh alkohol dengan kadar 10%, mikroba akan mengalami lisis karena pengaruh dari alkohol tersebut.

Proses fermentasi dapat digolongkan berdasarkan cara operasinya, sebagai berikut:

1. Fermentasi Cair³⁵

Submerged Fermentation adalah fermentasi yang melibatkan air sebagai fase kontinyu dari sistem pertumbuhan sel bersangkutan atau substrat, baik sumber karbon maupun mineral terlarut atau tersuspensi sebagai partikel-partikel dalam fase cair.

Fermentasi cair dengan teknik tradisional tidak dilakukan pengadukan, berbeda dengan teknik fermentasi cair modern melibatkan fermentor yang dilengkapi dengan : pengaduk (agar medium tetap homogen), aerasi,

pengatur suhu (pendinginan dan pemanasan) dan pengaturan pH.

Fermentasi ini dapat dibagi menjadi 3 macam:

- *Batch process*, yaitu fermentasi dengan cara memasukkan media dan inokulum secara bersamaan ke dalam bioreaktor dan pengambilan produk dilakukan pada akhir fermentasi. Pada sistem *batch*, bahan media dan inokulum dalam waktu yang hampir bersamaan dimasukkan ke dalam bioreaktor. Pada saat proses berlangsung, akan terjadi perubahan kondisi dalam bioreaktor (nutrient akan berkurang sedangkan produk serta limbah bertambah), hingga pada suatu keadaan tertentu (sesuai keadaan yang diinginkan). Untuk proses fermentasi yg baru, maka bioreaktor harus dikosongkan
- *Fed-batch process*, yaitu fermentasi dengan cara memasukkan sebagian sumber nutrisi ke dalam bioreaktor dengan volume tertentu hingga diperoleh produk yang mendekati maksimal, akan tetapi konsentrasi sumber nutrisi dibuat konstan.
- *Continuous process*, yaitu fermentasi yang dilakukan dengan cara pengaliran substrat dan pengambilan produk dilakukan secara terus-menerus (sinambung) setiap saat setelah diperoleh konsentrasi produk maksimal atau substrat pembatasnya mencapai konsentrasi yang hampir tetap.

2. Fermentasi Padat (*Solid State Fermentation*)³⁷

Fermentasi media padat merupakan proses fermentasi yang

berlangsung dalam substrat tidak larut, namun mengandung air yang cukup sekalipun tidak mengalir bebas. *Solid State Fermentation* mempunyai kandungan nutrisi per volum jauh lebih pekat sehingga hasil per volum dapat lebih besar.

Keuntungan fermentasi dengan cara ini adalah :

- Medium yang digunakan relatif sederhana
- Ruang yang diperlukan untuk peralatan fermentasi relatif kecil, karena air yang digunakan sedikit.
- Inokulum dapat disiapkan secara sederhana
- Kondisi medium tempat pertumbuhan mikroba mendekati kondisi habitat alaminya
- Aerasi dihasilkan dengan mudah karena ada ruang di antara setiap partikel substratnya
- Produk yang dihasilkan dapat dipanen dengan mudah

2.9 Imobilisasi Sel

Imobilisasi sel adalah suatu metode bioteknologi yang memanfaatkan mikroorganisme dengan membatasi ruang geraknya pada material yang inert dan tidak larut. Hal ini akan meningkatkan resistensi terhadap perubahan pH ataupun temperatur. Metode imobilisasi sel antara lain adsorpsi, ikatan kovalen, ikatan silang, dan penjebakan.⁵

Imobilisasi sel ini merupakan salah satu teknologi yang dewasa ini banyak diterapkan dalam industri fermentasi (bioproses) karena memiliki beberapa kelebihan. Penerapan teknik imobilisasi sel dapat meningkatkan produktivitas dan efisiensi produksi. Keuntungan penggunaan sel hidup yang diimobilkan dalam proses biokatalitik/bioproses diantaranya adalah³⁸:

1. Mempermudah proses pemisahan biokatalis dari produknya
2. Memungkinkan penggunaan ulang (*reuse*) dari biokatalis yang bersangkutan
3. Mampu mempertinggi kerapatan sel di dalam bioreaktor
4. Dapat diterapkan dengan baik pada sistem bioreaktor kontinyu.

BAB III

METODE PENELITIAN

Proses produksi bioetanol dengan substrat makroalga ini dapat dibagi dalam dua tahap, yaitu, hidrolisis dan fermentasi. Hidrolisis dilakukan hingga diperoleh hidrolisat yang selanjutnya difermentasi. Kedua proses ini melibatkan mikroorganisme dalam pengerjaannya.

3.1 BAHAN – BAHAN

3.1.1 Mikroorganisme

Mikroorganisme yang digunakan pada penelitian ini adalah *Trichoderma viride* dan *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 yang merupakan koleksi Laboratorium Mikrobiologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian IPB.

3.1.2 Substrat dan bahan kimia

Substrat yang digunakan pada penelitian ini adalah makroalga genus *Eucheuma* dan *Glacilaria* yang berasal dari perairan daerah Bantaeng, Sulawesi Selatan. Bahan-bahan yang dipakai dalam penelitian kali ini, adalah KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, urea, CaCl_2 , pepton, Na alginat (Merck),

carboxymethylcellulose, *yeast extract*, glukosa, $ZnSO_4$, $Ba(OH)_2$, Na_2SO_4 , $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, Na_2CO_3 anhidrat, K-Na tartrat, H_2SO_4 pekat, dan air suling.

3.2 Peralatan yang digunakan

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini meliputi : peralatan gelas, *blender*, penyaring, oven, jarum ose, *vortex*, pembakar spiritus, timbangan, autoklaf, pH meter, *hot plate*, *shaker incubator*, Shimadzu UV-Vis Spectrophotometer 2450, dan Shimadzu *Gas Chromatography* GC-9A dengan detektor FID dan kolom PEG.

3.3 Prosedur kerja

3.3.1 Persiapan substrat

Substrat berupa makroalga genus *Eucheuma* yang untuk selanjutnya disebut substrat 1 dan *Glacilaria* yang selanjutnya akan disebut substrat 2, dicuci, kemudian dikeringkan dengan oven selama 12 jam pada suhu $60-70^\circ C$ sehingga kadar air maksimal 10%. Substrat 1 dan 2 kemudian dihaluskan menggunakan *blender*, lalu disaring dengan penyaring ayakan. Selanjutnya, substrat yang sudah berbentuk serbuk halus ini disimpan dalam wadah kedap udara.

3.3.2 Sterilisasi alat dan bahan

Bahan-bahan seperti substrat dan media disterilisasi dalam uap panas menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Peralatan gelas disterilisasi dalam oven dengan suhu 160 °C selama 120 menit.

3.3.3 Pembuatan media pemeliharaan *Trichoderma viride* dan *Saccharomyces cerevisiae*

Trichoderma viride dan *Sccharomyces cerevisiae* dipelihara dalam agar miring yang berisi media PDA (*potato dextrose agar*) dan masing-masing diinkubasi selama 5 dan 2 hari pada suhu ruang (28 – 30°C).

3.3.4 Pembuatan suspensi sel *Trichoderma viride* dan *Saccharomyces cerevisiae*

Suspensi sel dibuat dengan memasukkan 10 ml air suling steril ke dalam media kultur yang berisi *Trichoderma viride* yang kemudian disebut inokulum 1. Dengan cara yang sama, suspensi sel *Saccharomyces cerevisiae* dibuat dan selanjutnya akan disebut inokulum 2.

3.3.5 Pembuatan media aktivasi *Trichoderma viride*

Media aktivasi *Trichoderma viride* dibuat dengan melarutkan

KH_2PO_4 (2 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (3 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,4 g/L), urea (0,3 g/L), CaCl_2 (4 g/L), pepton (1 g/L), dan *carboxymethylcellulose* (10 g/L) dengan sejumlah air suling. Media aktivasi ini lalu disterilisasi dalam uap panas menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Selanjutnya 10% inokulum 1 dimasukkan dalam media, lalu diinkubasi dalam *shaker incubator* selama 48 jam pada suhu 30°C dengan kecepatan 130 rpm. Media kultur ini akan disebut *starter 1*. Setelah itu, banyaknya sel *Trichoderma viride* dalam *starter 1* dihitung dengan metode *counting chamber*.

3.3.6 Hidrolisis substrat menggunakan *Trichoderma viride*

Hidrolisis substrat ini bertujuan untuk mendapatkan glukosa yang nantinya akan diukur kandungannya dengan metode Somogyi Nelson. Media yang digunakan meliputi KH_2PO_4 (2 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (3 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,4 g/L), urea (0,3 g/L), CaCl_2 (4 g/L), pepton (1 g/L). Bahan-bahan tersebut dilarutkan dalam air suling, lalu disterilisasi dalam uap panas menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Selanjutnya, 2 mL *starter 1* dimasukkan dalam media diatas. Hidrolisat yang diperoleh akan diukur jumlah gula pereduksinya dengan menggunakan metode Somogyi Nelson. Hidrolisat diambil setiap 24 jam selama 4 kali. Selain itu, untuk mendapatkan konsentrasi substrat optimum saat hidrolisis, dilakukan percobaan dengan memvariasikan konsentrasi substrat yaitu 0,25; 0,5; 0,75; dan 1 gram per 10 mL media.

3.3.7 Penentuan kadar gula pereduksi dengan metode Somogyi Nelson

Sebanyak 0,5 mL hidrolisat ditambahkan 1,5 mL air suling, kemudian ditambahkan 0,5 mL larutan ZnSO_4 0,3 M dan 0,5 mL larutan $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 0,3 M. Campuran ini diaduk dan disentrifugasi. Selanjutnya 1 mL supernatan yang diperoleh dicampur dengan pereaksi tembaga alkali, lalu dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 15 menit. Setelah itu, campuran didinginkan pada suhu ruang, kemudian ditambahkan 1 mL pereaksi arsenomolibdat dan dikocok sampai tidak timbul gelembung. Campuran tersebut diencerkan menjadi 10 mL. Lalu, serapannya diukur dengan UV pada panjang gelombang 520 nm. Kadar gula pereduksi dihitung menggunakan kurva absorbansi terhadap konsentrasi yang dibuat dari larutan standar gula pereduksi dengan kadar 0,02 – 0,5 mg/mL.

3.3.8 Pembuatan media aktivasi *Saccharomyces cerevisiae*

Media aktivasi *Saccharomyces cerevisiae* terdiri dari *yeast extract* (1,5 g/L), KH_2PO_4 (2 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1 g/L), dan glukosa 8%. Bahan-bahan tersebut dilarutkan dalam sejumlah air suling, lalu disterilisasi dalam uap panas menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Selanjutnya, media ini dicampur dengan inokulum 2 sebanyak 10%. Setelah itu, campuran diinkubasi dalam *shaker incubator* selama 48 jam dengan suhu 30°C dan kecepatan 130 rpm. Kultur ini

selanjutnya disebut *starter 2*. Selanjutnya, banyaknya sel *Saccharomyces cerevisiae* dalam *starter 2* dihitung dengan metode *counting chamber*.

3.3.9 Pembuatan sel imobil *Saccharomyces cerevisiae*

Starter 2 dicampur dengan larutan Na alginat 4% dengan perbandingan 1 : 1 (v/v) untuk pembuatan sel imobil. Campuran ini kemudian dihomogenasi menggunakan *vortex*. Setelah itu, campuran tersebut ditetaskan ke dalam larutan CaCl_2 1,5% sehingga terbentuk butiran-butiran (*beads*) gel Ca alginat. Butiran-butiran ini didiamkan selama 10-15 menit, kemudian dicuci dengan air suling steril.

3.3.10 Fermentasi oleh sel *Saccharomyces cerevisiae* terimobilisasi

Fermentasi ini bertujuan mengubah glukosa menjadi etanol dengan sel *Saccharomyces cerevisiae* terimobilisasi. Hidrolisat substrat ditambahkan butiran-butiran sel imobil *Saccharomyces cerevisiae*, lalu diinkubasi dalam *shaker incubator* dengan suhu 30°C dan kecepatan 130 rpm. Dalam percobaan ini dilakukan variasi sebagai berikut :

- a. Variasi waktu fermentasi (sampling setiap 24 jam, 48 jam, 72 jam, dan 96 jam)
- b. Variasi pH media (pH 3,5, 4, 4,5, 5,5)
- c. Uji pengulangan (*Saccharomyces cerevisiae* terimobilisasi digunakan berulang untuk 3 kali fermentasi)

3.3.11 Pengukuran konsentrasi etanol

Cairan hasil fermentasi diambil dan disentrifugasi selama 15 menit dalam tabung sentrifuge tertutup. Setelah itu, diambil supernatannya.

Supernatan ini diukur konsentrasi alkoholnya dengan *Gas Chromatography* GC-9A Shimadzu dengan suhu kolom 120°C. Sebagai pembanding, dilakukan pengukuran larutan standar menggunakan etanol.



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

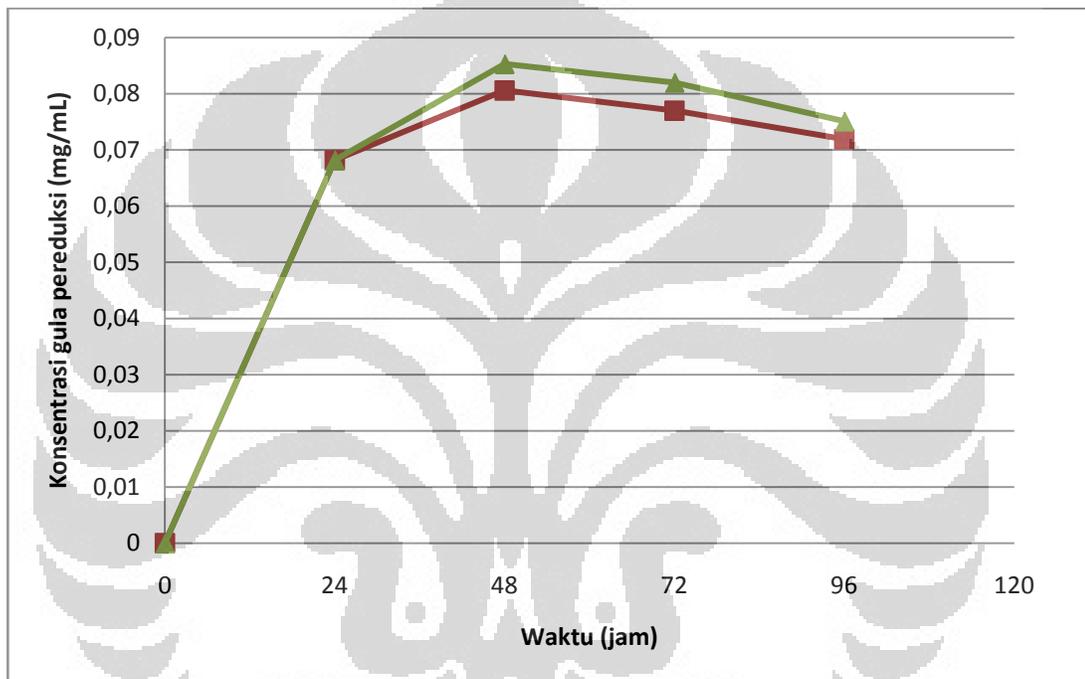
Eucheuma dan *Gracilaria* merupakan makroalga dari divisi *Rhodophyta* yang dapat dimanfaatkan untuk pembuatan bioetanol. Keunggulan yang dimiliki makroalga ini adalah mudah dibudidayakan dan siklus pembudidayaannya juga relatif sederhana. Dua makroalga ini juga mengandung selulosa walaupun dalam jumlah yang relatif kecil dibandingkan dengan sumber biomassa lain seperti bagas atau jerami.^{9,13} Substrat selulosa inilah yang akan dimanfaatkan untuk menghasilkan bioetanol. Walaupun kandungan utama *Eucheuma* dan *Gracilaria* adalah karagenan yang dapat dimanfaatkan sebagai bahan makanan, kosmetik, dan lain-lain, tapi penelitian kali ini mencoba untuk memberdayakan komponen selulosa yang ada pada makroalga ini sebagai penghasil bioetanol.

4.3 Hidrolisis substrat oleh *Trichoderma viride*

Proses hidrolisis substrat dilakukan dengan cara enzimatik menggunakan *Trichoderma viride*. Jamur *Trichoderma viride* yang digunakan dalam penelitian kali ini menghasilkan enzim selulase ekstraselular dan bersifat induktif yang dapat memecah selulosa menjadi glukosa secara langsung. Untuk menginduksi enzim selulase pada *Trichoderma viride*, kapang tersebut diaktivasi terlebih dahulu pada media yang berisi

carboxymethylcellulose (CMC) sebelum bekerja untuk memecah selulosa pada substrat.

Proses hidrolisis substrat dioptimasi dengan memvariasikan waktu untuk mendapatkan waktu optimal. Hasil yang diperoleh ditunjukkan pada Gambar 4.1.

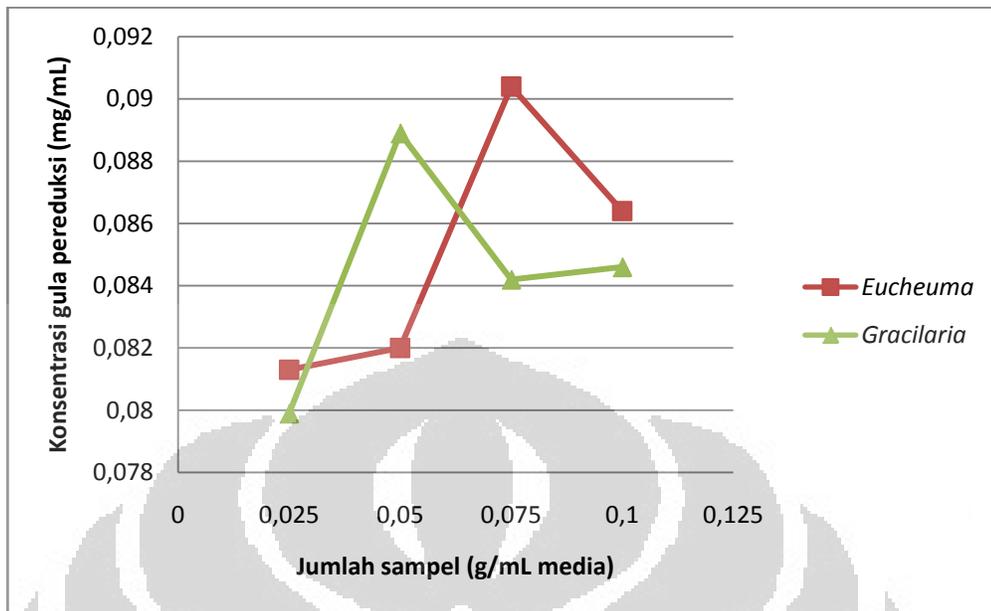


Gambar 4.1 Grafik kadar gula pereduksi (mg/mL) terhadap waktu hidrolisis

Dari grafik dapat dilihat bahwa kadar gula pereduksi (glukosa) optimum didapatkan pada 48 jam. Saat *Trichoderma viride* dimasukkan dalam substrat, kapang ini berada pada fasa log, yaitu pada saat pembelahan diri sel sedang berlangsung dengan sangat cepat. Ketika mencapai waktu 48 jam, produksi selulase semakin banyak sehingga hidrolisis selulosa dapat berjalan optimal. Selanjutnya, setelah 48 jam,

produksi gula pereduksi hasil hidrolisis semakin menurun. Hal ini bisa disebabkan oleh dua hal. Kemungkinan pertama glukosa menghambat enzim selulase. Glukosa dapat menghambat enzim selulase, sehingga aktivitas enzim ini akan berkurang. Aktivitas enzim yang berkurang juga akan menyebabkan proses hidrolisis semakin berkurang.³⁹ Kemungkinan kedua adalah *Trichoderma viride* menggunakan glukosa yang terbentuk dari hasil hidrolisis sebagai sumber karbon karena selulosa yang berasal dari substrat telah habis. Ini menyebabkan produksi glukosa juga akan berkurang dari waktu ke waktu. Kadar glukosa yang dihasilkan *Eucheuma* dan *Gracilaria* terbanyak saat 48 jam, yaitu sebesar 0,0806 mg/mL dan 0,0853 mg/mL.

Untuk mengetahui konsentrasi substrat makroalga yang paling baik untuk proses ini, dilakukan percobaan dengan memvariasikan konsentrasi substrat. Kadar substrat divariasikan 0,025; 0,050; 0,075; dan 0,100 gram per mL media. Proses hidrolisis selulosa dari substrat ini diinkubasi selama 48 jam sesuai dengan waktu optimum yang sudah didapatkan sebelumnya. Hasil yang diperoleh dapat dilihat pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2 Grafik kadar gula pereduksi (mg/mL) terhadap jumlah substrat

Dari percobaan variasi konsentrasi substrat ini, kadar substrat optimum untuk hidrolisis *Eucheuma* adalah pada 0,075 g/mL media dengan jumlah gula pereduksi yang dihasilkan sebanyak 0,0904 mg/mL, sedangkan untuk *Gracilaria*, kadar substrat optimumnya adalah 0,050 g/mL media dengan jumlah gula pereduksi yang dihasilkan 0,0889 mg/mL. Diatas konsentrasi 0,075 g/mL media untuk *Eucheuma* dan 0,05 g/mL media untuk *Gracilaria*, hasil hidrolisis menurun. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh media yang terlalu pekat, sehingga kandungan oksigen terlarut semakin kecil.⁴⁰

Proses hidrolisis dua makroalga ini menghasilkan kadar gula pereduksi terbanyak untuk *Eucheuma* sebesar 0,0904 mg/mL pada hidrolisis 0,075 gram substrat dan untuk *Gracilaria* didapatkan kadar gula pereduksi 0,0889 mg/mL pada hidrolisis 0,05 gram substrat. Dari hasil tersebut

didapatkan yield gula pereduksi untuk *Eucheuma* sebesar 0,12% dan 0,178% untuk *Gracilaria*.

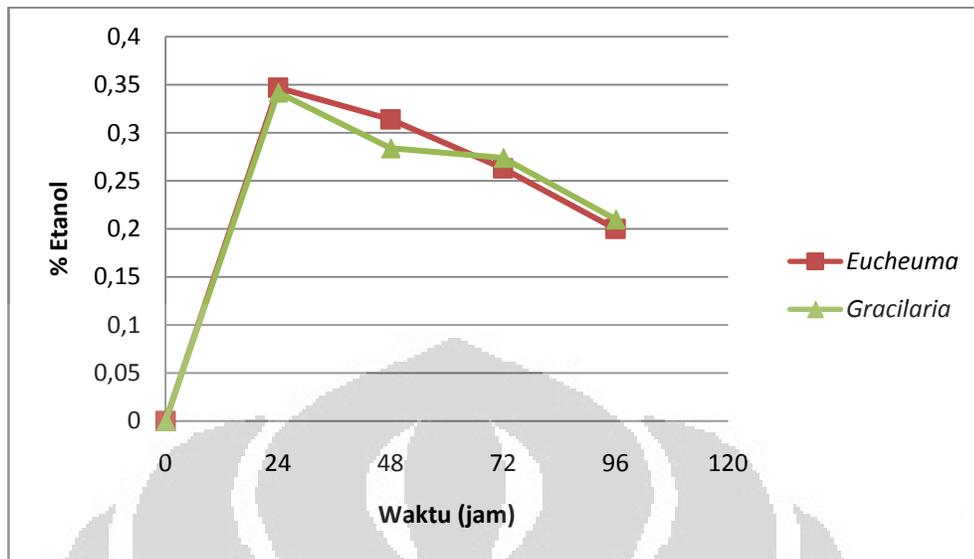
4.4 Fermentasi hidrolisat substrat oleh *Saccharomyces cerevisiae*

Selanjutnya, dilakukan proses fermentasi untuk mengubah hidrolisat yang mengandung gula pereduksi (glukosa) menjadi etanol. Proses ini menggunakan sel *Saccharomyces cerevisiae* terimobilisasi dengan Ca alginat sebagai matriks yang menjebak mikroorganisme. Ca alginat dipilih karena ramah lingkungan dan mampu menjebak sel tanpa merusak metabolisme sel tersebut. Selain itu, Ca alginat memiliki pori-pori yang besar sehingga khamir dapat masuk ke dalamnya. Metode imobilisasi sel ini dipilih karena memungkinkan penggunaan kembali sel-sel imobil ini untuk proses yang sama, juga memudahkan pemisahan sel dengan media produksinya.



Gambar 4.3 *Saccharomyces cerevisiae* terimobilisasi dalam gel alginat

Pengukuran waktu optimum fermentasi dilakukan dengan mengambil hasil fermentasi etanol setiap 24 jam sebanyak 4 kali.

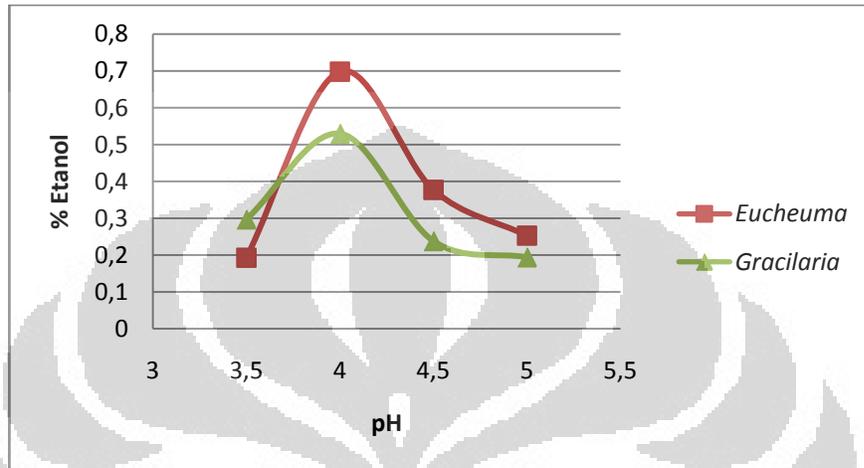


Gambar 4.4 Grafik kadar etanol terhadap waktu fermentasi

Dari hasil yang didapat, diperlihatkan bahwa pada waktu optimum khamir untuk proses fermentasi adalah pada waktu 24 jam. Hal ini sesuai bila dibandingkan dengan pertumbuhan *Saccharomyces uvarium* yang telah mengalami fasa stasioner setelah masuk masa 30 jam.⁴¹ Setelah 24 jam, kadar etanol makin berkurang. Hal ini mungkin disebabkan karena substrat fermentasi telah habis, sehingga etanol yang sudah diproduksi, digunakan kembali oleh khamir untuk mendapatkan energi.⁴² Kadar etanol yang didapat pada waktu fermentasi 24 jam adalah 0,347% untuk *Eucheuma* dan 0,342% untuk *Gracilaria*.

Derajat keasaman merupakan faktor yang juga penting untuk optimasi kerja mikroorganisme. Oleh karena itu, optimasi pH media pertumbuhan khamir dilakukan untuk mengetahui pada pH berapa khamir dapat bekerja

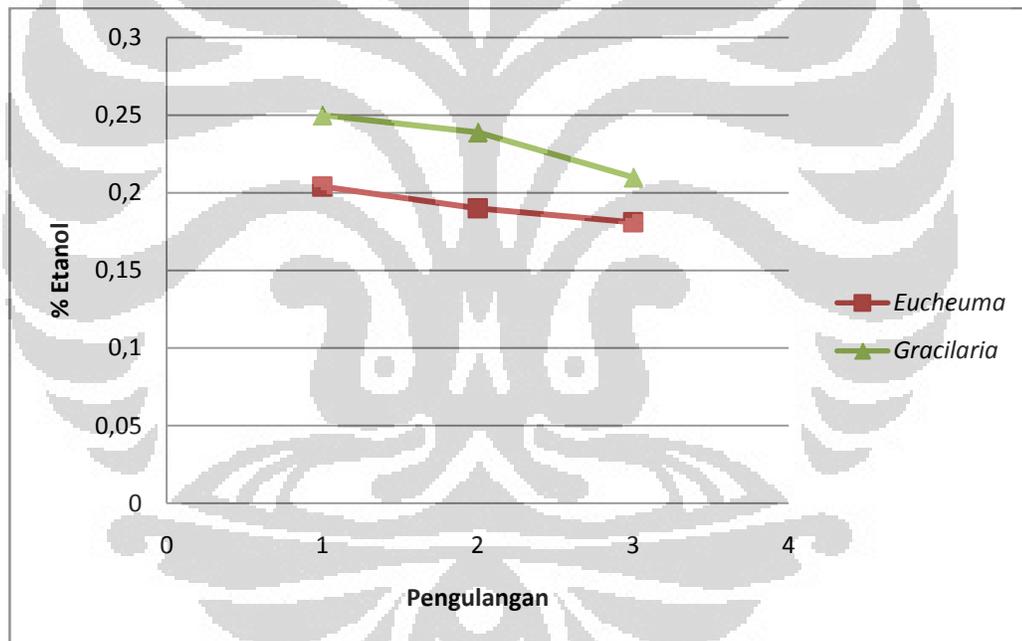
optimal. *Saccharomyces cerevisiae* tumbuh pada kisaran pH 3,5 – 6,5, maka diambil kisaran pH 3,5 – 5 pada proses fermentasi ini.³⁴ pH yang divariasikan pada penelitian ini adalah 3,5; 4; 4,5; dan 5.



Gambar 4.5 Grafik kadar etanol terhadap pH media fermentasi

Dari hasil yang didapat pH optimum untuk pertumbuhan khamir *Saccharomyces cerevisiae* adalah pada pH 4. Kadar etanol yang didapatkan pada pH 4 ini adalah 0,698% untuk *Eucheuma* dan 0,53% untuk *Gracilaria*. Di atas dan di bawah pH 4 dapat dilihat bahwa kadar etanol yang dihasilkan lebih rendah. Rendahnya kadar etanol di atas dan di bawah pH 4 ini karena semakin asam atau semakin basa lingkungan pertumbuhan khamir dapat memperlambat proses metabolisme sel sehingga pertumbuhan sel juga akan rendah. Derajat keasaman ini berpengaruh pada jalur Embden Meyerhoff, di antaranya proton akan berpengaruh pada kinerja enzim fosfofruktokinase dalam konversi fruktosa-6-fosfat menjadi fruktosa-1,6-difosfat. Jika satu tahap dari proses glikolisis ini terhambat, maka produksi piruvat yang akan diteruskan pada pembentukan etanol juga akan berkurang.⁴³

Pada penelitian ini juga dilakukan uji penggunaan kembali *Saccharomyces cerevisiae* yang telah diimobilisasi untuk proses fermentasi. Uji ini dilakukan dengan penggunaan berulang sel imobil pada proses fermentasi dengan keadaan substrat yang sama. Penggunaan metode imobilisasi sel ini memiliki beberapa keunggulan, yaitu memungkinkan penggunaan kembali sel *Saccharomyces cerevisiae* ini untuk proses yang sama, juga memudahkan pemisahan sel dengan media produksinya. Pada penelitian kali ini, uji pengulangan dilakukan sebanyak tiga kali.



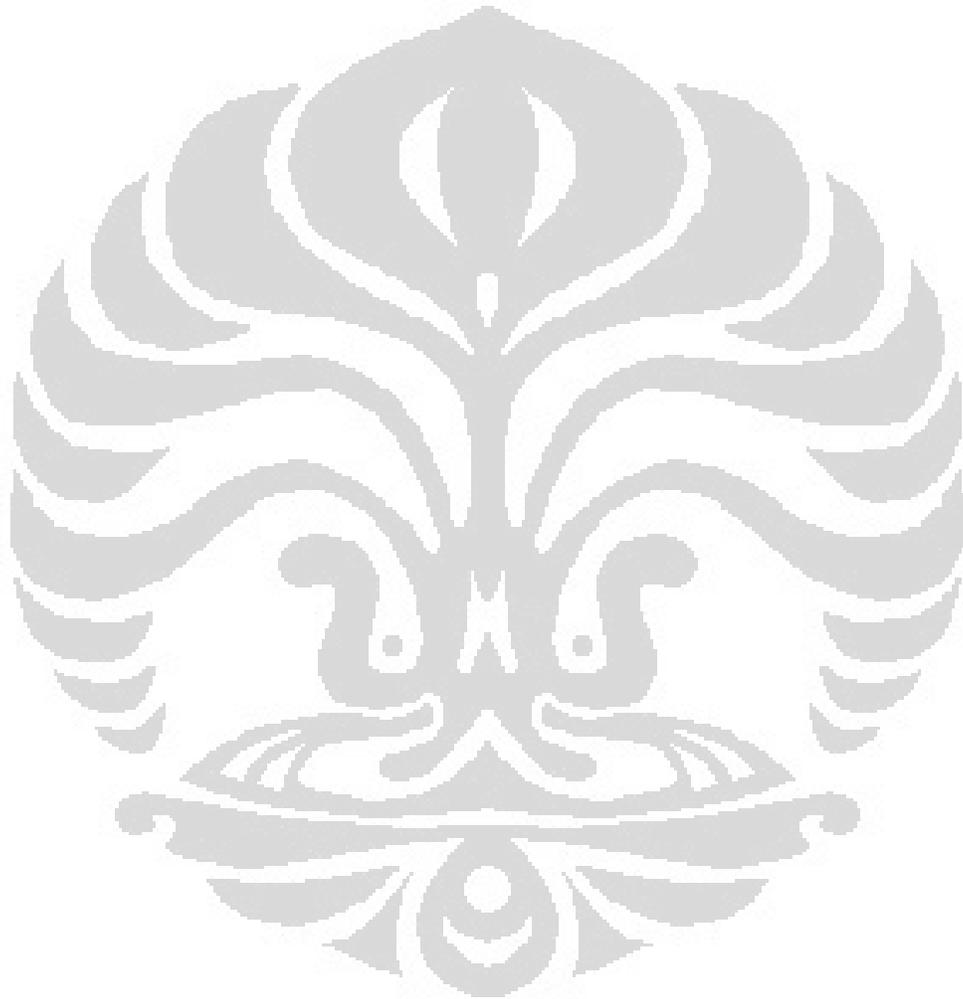
Gambar 4.6 Grafik kadar etanol terhadap pengulangan fermentasi menggunakan sel *Saccharomyces cerevisiae* terimobilisasi

Kadar etanol yang didapatkan pada pengulangan proses fermentasi dengan *Saccharomyces cerevisiae* terimobilisasi yang sama dapat dilihat pada Gambar 4.6. Dapat dilihat bahwa terdapat penurunan kadar etanol pada

setiap pengulangan. Kadar etanol yang didapat untuk *Eucheuma* berturut-turut dari pengulangan pertama sampai ketiga adalah 0,204%, 0,19%, dan 0,181%, sedangkan untuk *Gracilaria* 0,25%, 0,239%, dan 0,21%. Jika dilihat, penurunan produksi etanol setelah pengulangan ketiga adalah sebesar 11,28% untuk *Eucheuma* dan 16% untuk *Gracilaria*. Hal ini menunjukkan bahwa penggunaan sel imobil untuk proses fermentasi berulang cukup efektif, sehingga cukup baik untuk digunakan pada proses fermentasi kontinyu. Penurunan kadar etanol ini mungkin disebabkan karena terjadinya kerusakan pada gel akibat pengaruh mekanik ataupun gas CO₂ yang terbentuk, sehingga sel tidak lagi bekerja optimal. Jika sel imobil ini rusak, maka khamir yang tejabak dalam gel Ca alginat juga akan keluar. Saat tidak di dalam gel, khamir akan dapat bereproduksi, sehingga substrat yang ada juga akan dipakai untuk memperbanyak diri selain untuk memproduksi etanol. Hal ini akan mempengaruhi jumlah etanol yang terbentuk. Usia khamir yang sudah memasuki fasa stasioner atau kematian juga berpengaruh pada penurunan produksi etanol. Hal ini menyebabkan jumlah khamir yang memproduksi etanol semakin sedikit.

Pada proses fermentasi ini, dihasilkan kadar etanol terbesar untuk *Eucheuma* adalah 0,698% dan untuk *Gracilaria* sebesar 0,53%. Dari hasil tersebut didapatkan *yield* etanol untuk *Eucheuma* terhadap gula pereduksi adalah sebesar 0,077 mL/mg dan terhadap substrat makroalga 0,093 mL/g.

Untuk *Gracilaria*, *yield* etanol terhadap gula pereduksi yang dihasilkan adalah sebesar 0,0596 mL/mg dan *yield* etanol terhadap substrat adalah 0,106 mL/g.



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.3 Kesimpulan

Dalam penelitian ini dapat disimpulkan bahwa makroalga genus *Eucheuma* dan *Gracilaria* dapat menghasilkan bioetanol dari kandungan selulosa yang diubah secara bertahap. Gula pereduksi hasil hidrolisis selulosa paling tinggi yang dihasilkan *Eucheuma* adalah 0,090 mg/mL pada konsentrasi 7,5% dan waktu inkubasi 48 jam, sedangkan pada *Gracilaria*, gula pereduksi yang dihasilkan sebesar 0,089 mg/mL pada konsentrasi 5% dan waktu inkubasi yang sama. Kondisi optimum proses fermentasi diperoleh pada pH 4 dan waktu inkubasi 24 jam yang menghasilkan kadar etanol sebesar 0,698% dari hidrolisat *Eucheuma* dan 0,530% dari *Gracilaria*. *Yield* etanol pada *Eucheuma* terhadap kadar gula pereduksi adalah sebesar 0,077 mL/mg dan terhadap substrat makroalga 0,093 mL/g. Untuk *Gracilaria*, *yield* etanol terhadap gula pereduksi yang dihasilkan sebesar 0,0596 mL/mg dan *yield* etanol terhadap substrat adalah 0,106 mL/g.

5.2 Saran

1. Mencari substrat makroalga lain yang memiliki kandungan selulosa

lebih banyak dan bukan merupakan bahan pangan, sehingga produksi bioetanol akan semakin besar dari sumber yang tidak digunakan.

2. Mencari metode lain untuk mendegradasi kandungan polisakarida selain selulosa yang ada dalam makroalga genus *Eucheuma* dan *Gracilaria*, sehingga dapat dimanfaatkan untuk produksi bioetanol dengan kadar yang lebih besar.
3. Melakukan penelitian lebih lanjut tentang fermentasi kontinyu yang dapat memanfaatkan imobilisasi sel.



DAFTAR PUSTAKA

1. Dahuri R. 2002. *Paradigma Baru Pembangunan Indonesia Berbasis Kelautan*. Orasi Ilmiah Guru Besar Pengelolaan Sumberdaya Pesisir dan Kelautan. Institut Pertanian Bogor. 233 hlm.
2. Basmal J. 2001. *Perkembangan Teknologi Riset Penanganan Pasca Panen dan Industri Rumput Laut*. Forum Rumput Laut. Jakarta : Pusat Riset Pengolahan Produk dan Sosial Ekonomi
3. Pariama Hutasoit. 2008. DKP Dorong Rumput Laut Sebagai Sumber Pangan dan Energi. www.globlue.or.id. 25 Juli 2009 pk 09.00.
4. No name. 2008. Rumput Laut untuk Biodiesel. 4 November 2008. cetak.kompas.com . 25 Juli 2009 pk 10.00.
5. Prakasham, R.S., Ramakhrisna, S.V. 1998. Microbial fermentations with immobilized cells, Lecture handouts, Biochemical and Enviromental Engineering, Indian Institute of Chemical Technology, India.
6. No name. 2009. Bioethanol. nurma.staff.uns.ac.id/files/2009/06/bioethanol.ppt. 29 Sepetmber 2009 pk 13.00
7. Aslan M. 1998. *Budidaya Rumput Laut*. Yogyakarta: Kanisius. 89 hlm.
8. Istini, S., Zatnika, A., Suhaimi. Manfaat dan Pengolahan Rumput Laut. rumputlaut.org. 19 Agustus 2009 pk 10.00

9. No Name. Processed Eucheuma Seaweed. www.cybercolloids.net. 5 Oktober 2009 pk 09.00
10. Atmadja WS. 1996. *Pengenalan Jenis Algae Merah*. Di dalam: *Pengenalan Jenis-Jenis Rumput Laut Indonesia*. Jakarta: Pusat Penelitian dan Pengembangan Oseanologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. hlm 147 – 151.
11. Doty MS. 1985. *Eucheuma alvarezii* sp.nov (Gigartinales, Rhodophyta) *from Malaysia*. Di dalam: Abbot IA, Norris JN (editors). *Taxonomy of Economic Seaweeds*. California Sea Grant College Program. p 37 – 45.
12. No name. 2009. Rumput laut gracilaria meminimalisir global warming. 5 juni. www.koranlokal.com. 5 Juli 2009 pk 10.00
13. No name. 2009. Undip Kembangkan Bahan Bakar dari Bioetanol Rumput Laut. www.suaramerdeka.com. 11 September 2009
14. Grand Strategi Pengembangan Budidaya Rumput Laut di Propinsi Sulawesi Tengah “Menuju Sulawesi Tengah sebagai Propinsi Rumput Laut Tahun 2011”. 2007. Dinas Perikanan dan Kelautan Propinsi Sulawesi Tengah.
15. Cellulose. www.wikipedia.org. 19 Juli 2009 pk 09.00
16. Cellulose. 2008. In *Encyclopædia Britannica*. Diambil pada 11 January 2008 dari Encyclopædia Britannica Online.
17. Nishiyama, Yoshiharu; Langan, Paul; Chanzy, Henri. 2002. "Crystal Structure and Hydrogen-Bonding System in Cellulose I β from

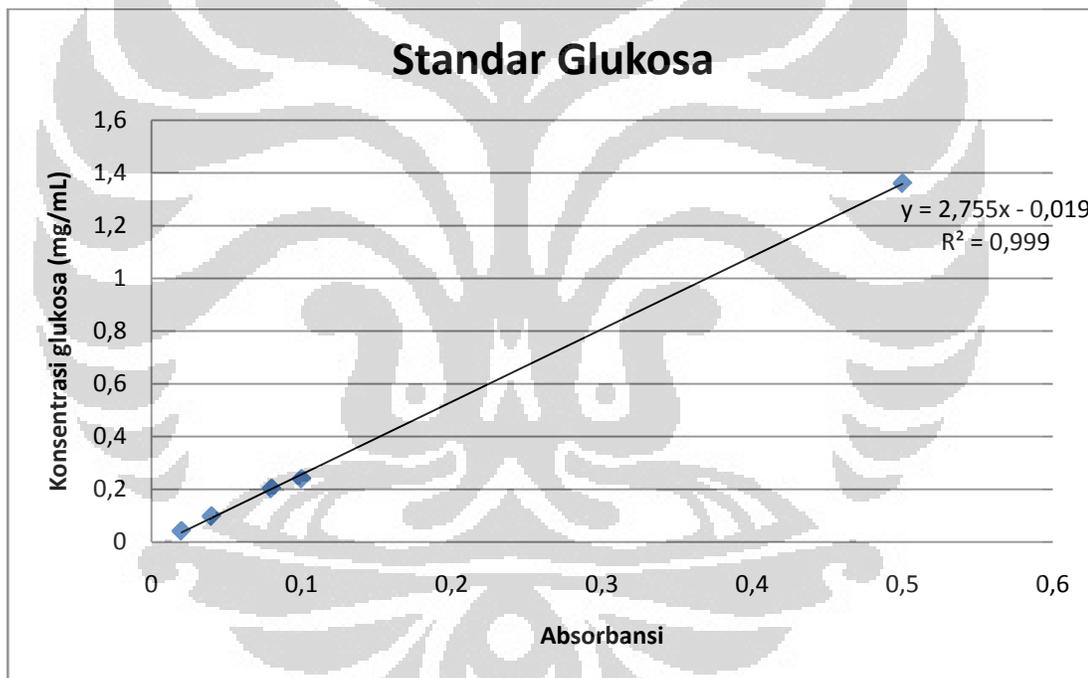
- Synchrotron X-ray and Neutron Fiber Diffraction". *J. Am. Chem. Soc* 124 (31): 9074–82
18. Deguchi, S., Tsujii K., Chem, K.H. 2006. Cooking cellulose in hot and compressed water. 3293 – 3295
 19. Klemm, Dieter, Heublein, B. Fink, H.P., Bohn, A. 2005. "Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material". *ChemInform* 36 (36).
 20. Judoamidjojo, M., A. Darwis, E. Gumbira. 1990. *Teknologi Fermentasi*. Pusat Antar Universitas Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
 21. Pelczar, M. J., and R. D. Reid. 1974. *Microbiology*. McGraw Hill Book Company. New York.
 22. Wood, T. M. 1985. *Aspects of the Biochemistry of Cellulose Degradation*. p. 173-187. In. J. F. Kennedy, G. O. Phillips, D. J. Wedlock, and P. A. Williams (eds). *Cellulose and its Derivte; Chemistry, Biochemistry and Applications*. Eleis Horwood Limeted, Jhon Wiley and Sons. New York.
 23. Alexopoulos, C.J. and C. W. Mims. 1979. *Introductory Mycology*. Third edition John Wiley and Sons. New York.
 24. Larry, R. 1977. *Food and Beverage Mycology*. Department of Food Science Agricultural Experiment Station. University of Georgia.
 25. Frazier, W. C. And D. C. Westhoff. 1981. *Food Microbiology*. Tata McGraw Hill. Published Co. Ltd. New Delhi.

26. Enari, T. M. 1983. *Microbial Enzimatic and Biotechnology*. W. M. Fogarty (ed). Applied Science Published London.
27. *Saccharomyces cerevisiae*. www.wikipedia.org. 19 Juli 2009 pk 09.00
28. Haetami, K., Abun, MP., Mulyani, Y. 2008. Studi Pembuatan Probiotik BAS (*Bacillus licheniformis*, *Aspergillus niger*, dan *Sacharomices cereviseae*) Sebagai Feed Supplement Seta Implikasinya Terhadap Pertumbuhan Ikan Nila Merah.
29. Mandels, M. 1970. Cellulases. In G.T. Tsao (ed) Annual Report on Fermentation Processes. Vol 5. Academic Press. New York
30. Risvan Kuswurj. 2008. Proses Hidrolisis dan Aplikasinya di Industri. 29 Juli. www.risvank.com. 12 September 2009 pk 19.00
31. No name. 2008. Teknologi Selulosic Etanol. 18 Mei. isroi.wordpress.com. 19 Agustus 2009 pk 12.00
32. Taherzadeh & Karimi. 2006. Perbandingan antara hidrolisis asam dan hidrolisis enzimatik
33. Saepudin, E., Setiasih, S. 2009. Kuliah Bioteknologi. 1 Mei. Departemen Kimia FMIPA UI
34. Ethanol fermentation. www.wikipwdia.org. 1 November 2009 pk 06:35.
35. Roukas T. (1996), " Continuous Ethanol Production from Nonsterilized Carob Pod Extract by Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* on mineral Kissiris Using A Two Reactor System. Journal Applied Biochemistry and Biotechnology Vol 59 No 3.
36. Stryer, Lubert (1975). *Biochemistry*. W. H. Freeman and Company.

37. No name. 2008. Solid State Fermentation and Submerge Fermentation. riezz.wordpress.com. 24 November.
38. Hakim Kurniawan dan Lukman Gunarto. 2004. Aspek Industri Sistem Kultivasi Sel Mikroalga Imobil. Bogor : Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan. biogen.litbang.deptan.go.id
39. Katz, M. & Reese, E.T. 1968. Production of glucose by enzymatic hydrolysis of cellulose. *J. Am. O. Microbiology. Soc.* 16: 419-420.
40. Kamara, D.S., Rachman S.D., Gaffar, S. 2006. Degradasi Enzimatik Selulosa dari Batang Pohon Pisang untuk Produksi Glukosa Dengan Bantuan Aktivitas Selulolitik *Trichoderma viride*. Fakultas MIPA Universitas Padjajaran.
41. Sen, D. C. 1989. "Ethanol Fermentation", *Biomass Handbook*, Gordon & Breach Science Publishers, 254-270.
42. No name. 1996. Bioprocess Engineering, University of Colorado Boulder, Chemical Engineering Dept.
43. Reibstein, D., Hollander, J. A., Pilkis, S. J. dan Shulman, R. G. (1986), "Studies on The Regulation of Yeast Phosphofructo-1-kinase: Its Role in Aerobic and Anaerobic Glycolysis", *Biochemistry*, 25: 219-227.

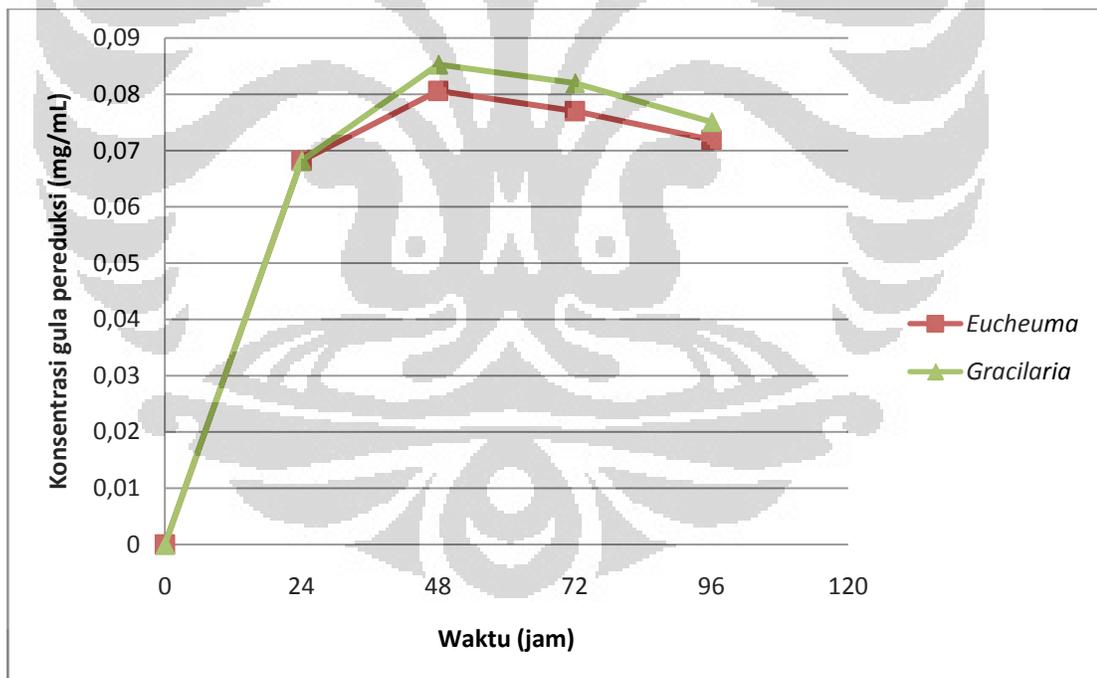
Lampiran 1 : Standar Glukosa

Konsentrasi glukosa (mg/mL)	Absorbansi (520 nm)
0,02	0,042
0,04	0,098
0,08	0,203
0,1	0,24
0,5	1,361



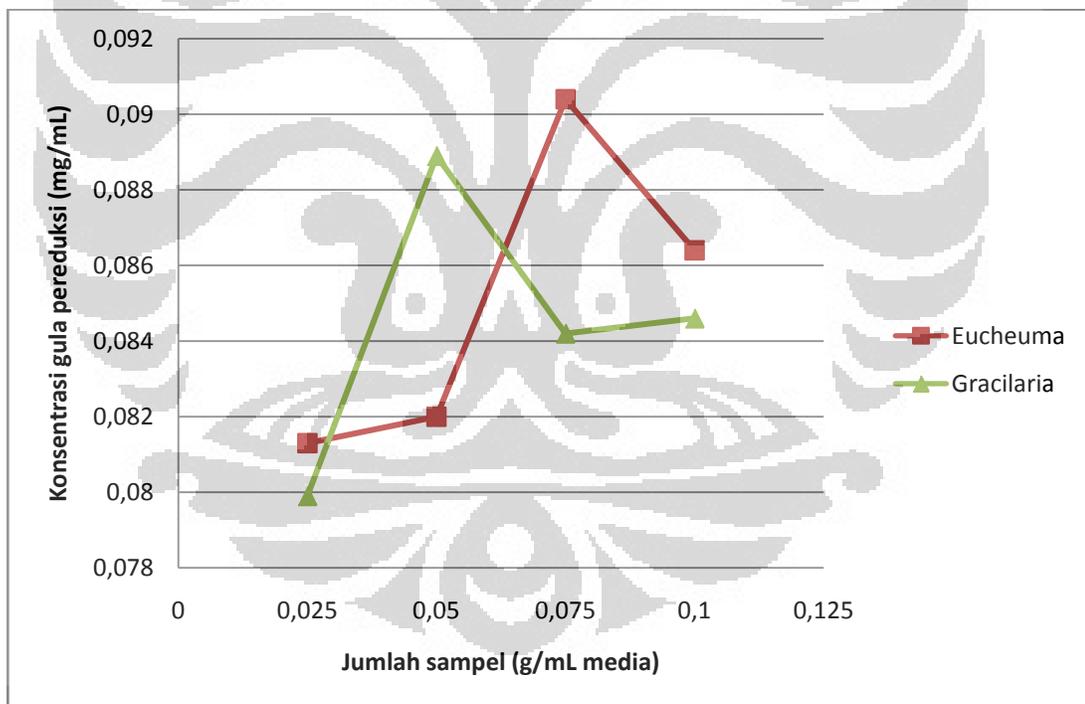
Lampiran 2 : Variasi waktu hidrolisis substrat

Waktu (jam)	<i>Eucheuma</i>		<i>Gracilaria</i>	
	Absorbansi (520 nm)	Konversi ke Glukosa (mg/mL)	Absorbansi (520 nm)	Konversi ke Glukosa (mg/mL)
0	0	0	0	0
24	0,169	0,0682	0,169	0,0682
48	0,218	0,0806	0,216	0,0853
72	0,193	0,077	0,207	0,082
96	0,179	0,0719	0,188	0,0751



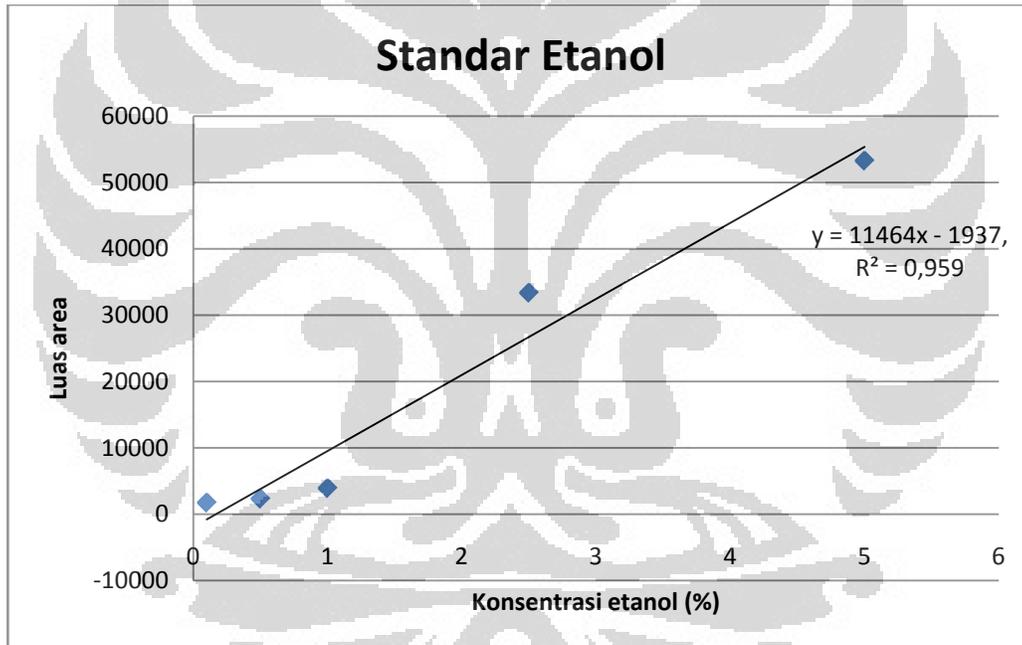
Lampiran 3 : Variasi konsentrasi substrat saat hidrolisis

Konsentrasi substrat (g/mL media)	<i>Eucheuma</i>		<i>Gracilaria</i>	
	Absorbansi (520 nm)	Konversi ke Glukosa (mg/mL)	Absorbansi (520 nm)	Konversi ke Glukosa (mg/mL)
0,025	0,205	0,0813	0,201	0,0799
0,050	0,207	0,0820	0,226	0,0889
0,075	0,230	0,0904	0,213	0,0842
0,1	0,219	0,0864	0,214	0,0846



Lampiran 4 : Standar etanol

Konsentrasi etanol (%)	Luas area
0,1	1738
0,5	2327
1,0	3924
2,5	33373
5,0	53276



START
4
STOP

CHROMATOPAC C-R3A FILE METHOD 0 41
SAMPLE NO 0
REPORT NO 1557

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	4	1738			100	
TOTAL		1738			100	

START
4.017
STOP

CHROMATOPAC C-R3A FILE METHOD 0 41
SAMPLE NO 0
REPORT NO 1556

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	4.017	2327			100	
TOTAL		2327			100	

START
4.005
STOP

CHROMATOPAC C-R3A FILE METHOD 0 41
SAMPLE NO 0
REPORT NO 1555

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	4.005	3924			100	
TOTAL		3924			100	

START
3.955
STOP

CHROMATOPAC C-R3A FILE METHOD 0 41
SAMPLE NO 0
REPORT NO 1554

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	3.955	33373			100	
TOTAL		33373			100	

START
3.91
STOP

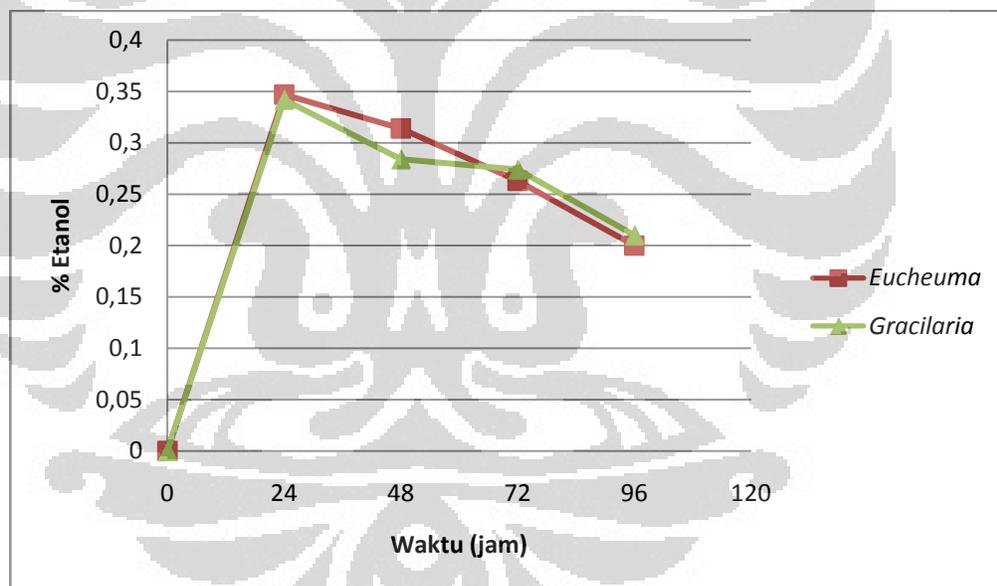
CHROMATOPAC C-R3A FILE METHOD 0 41
SAMPLE NO 0
REPORT NO 1558

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	3.91	53276			100	
TOTAL		53276			100	

Standar etanol, kadar 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5% dari atas ke bawah

Lampiran 5 : Variasi waktu fermentasi

Waktu (jam)	<i>Eucheuma</i>		<i>Gracilaria</i>	
	Luas area	Kadar etanol (%)	Luas area	Kadar etanol (%)
0	0	0	0	0
24	2037	0,347	1983	0,342
48	1661	0,314	1317	0,284
72	1077	0,263	1202	0,274
96	356	0,200	474	0,210



START
3.305
STOP

CHROMATOPAC C-R3A FILE METHOD 0 41
SAMPLE NO 0
REPORT NO 1656

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	3.305	2037			100	
TOTAL		2037			100	

START
3.25
STOP

CHROMATOPAC C-R3A FILE METHOD 0 41
SAMPLE NO 0
REPORT NO 1647

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	3.25	1661			100	
TOTAL		1661			100	

START
3.242
STOP

CHROMATOPAC C-R3A FILE METHOD 0 41
SAMPLE NO 0
REPORT NO 1658

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	3.242	1077			100	
TOTAL		1077			100	

START
0.173
3.267
STOP

CHROMATOPAC C-R3A FILE METHOD 0 41
SAMPLE NO 0
REPORT NO 1661

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	0.173	354			49.8872	
2	3.267	356			50.1128	
TOTAL		709			100	

Dari kiri ke kanan berturut-turut (*Eucheuma* 24, 48, 72, dan 96 jam)

START
3.265
STOP

CHROMATOPAC C-R3A FILE METHOD 0 41
SAMPLE NO 0
REPORT NO 1655

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	3.265	1983			100	
TOTAL		1983			100	

START
2.275
3.232
STOP

CHROMATOPAC C-R3A FILE METHOD 0 41
SAMPLE NO 0
REPORT NO 1657

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	2.275	142			9.7217	
2	3.232	1317			90.2783	
TOTAL		1459			100	

START
3.242
STOP

CHROMATOPAC C-R3A FILE METHOD 0 41
SAMPLE NO 0
REPORT NO 1659

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	3.242	1202			100	
TOTAL		1202			100	

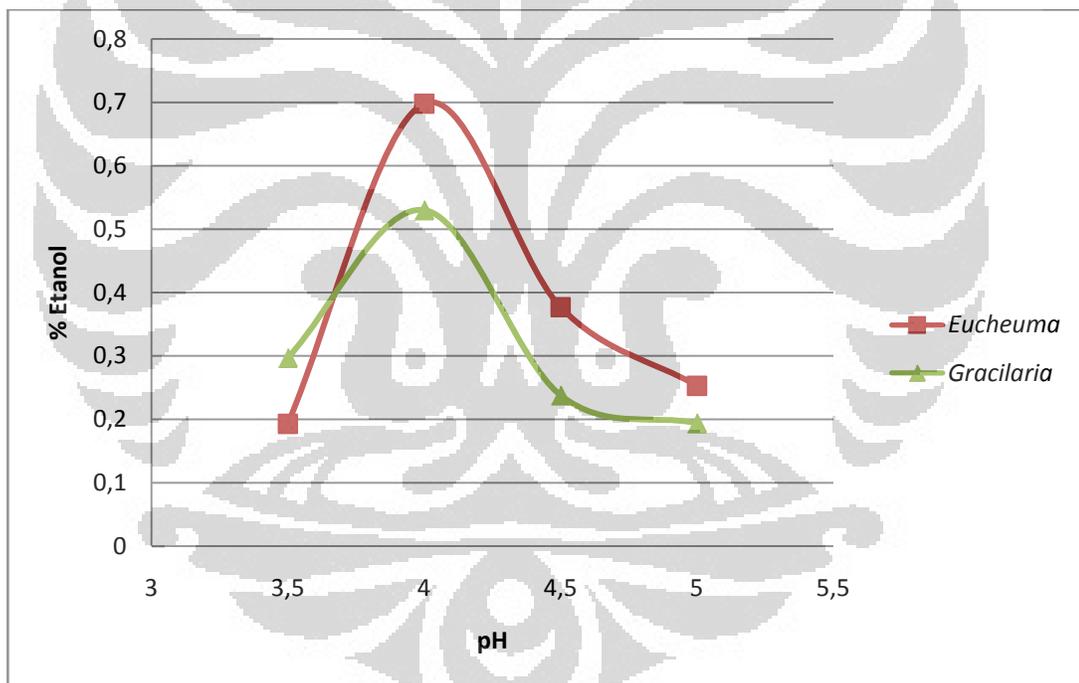
CHROMATOPAC C-R3A FILE METHOD 0 41
SAMPLE NO 0
REPORT NO 1660

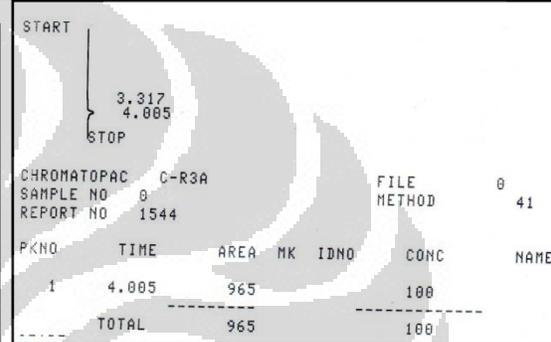
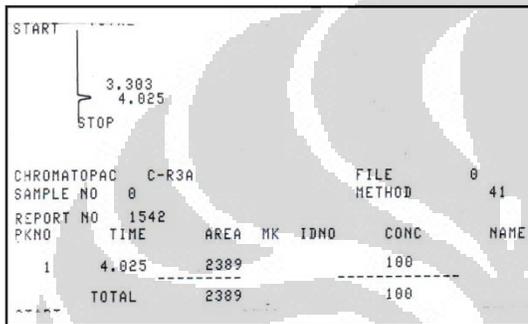
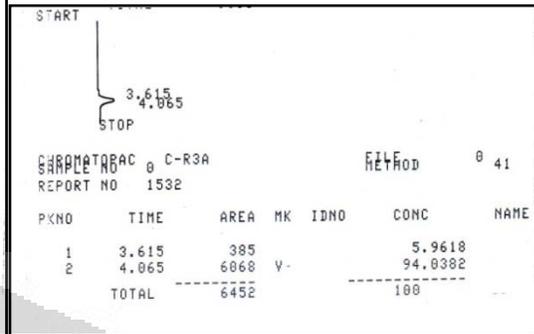
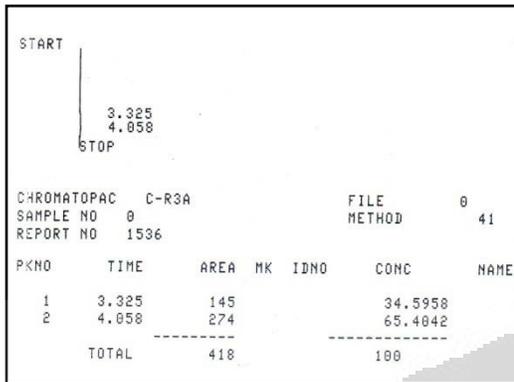
PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	3.267	474			100	
TOTAL		474			100	

Dari kiri ke kanan berturut-turut (*Gracilaria* 24, 48, 72, dan 96 jam)

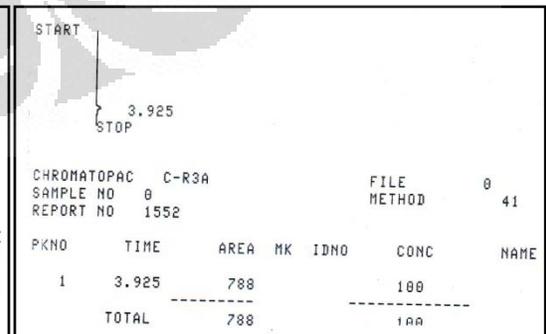
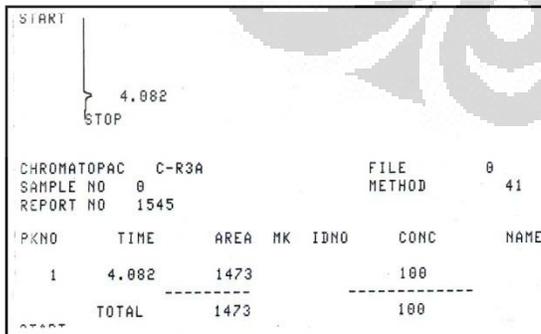
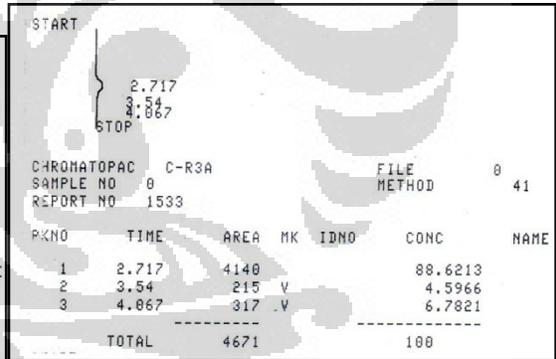
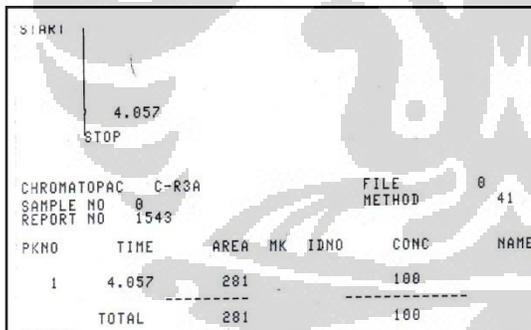
Lampiran 6 : Variasi pH fermentasi

pH	<i>Eucheuma</i>		<i>Gracilaria</i>	
	Luas area	Kadar etanol (%)	Luas area	Kadar etanol (%)
3,5	274	0,193	281	0,297
4,0	6068	0,698	4140	0,530
4,5	2389	0,377	1473	0,238
5,0	965	0,253	788	0,194





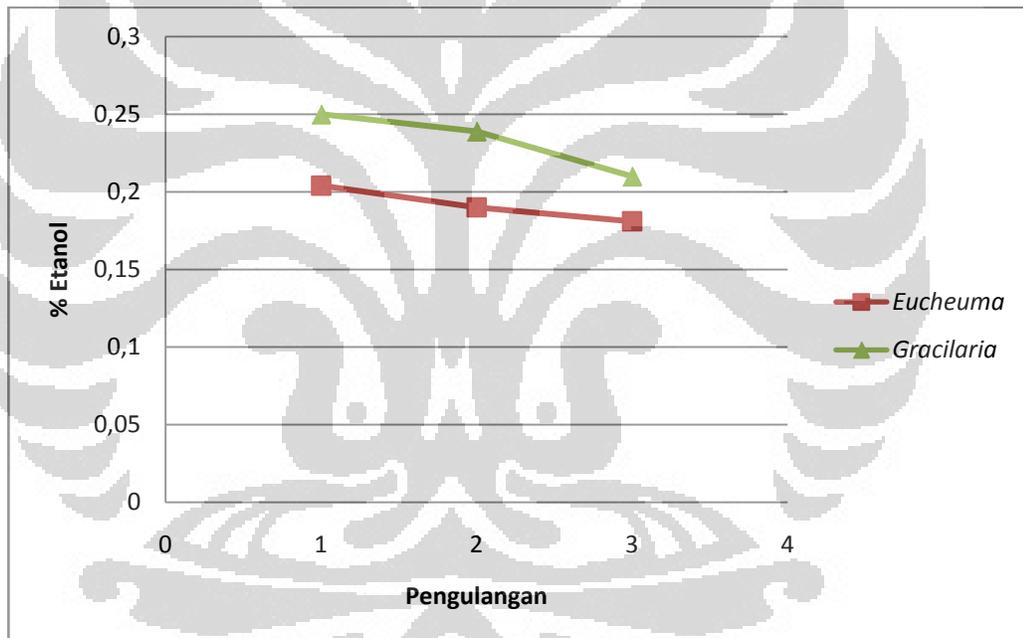
Dari kiri ke kanan berturut-turut (*Eucheuma* pH 3,5; 4; 4,5; 5)



Dari kiri ke kanan berturut-turut (*Gracilaria* pH 3,5; 4; 4,5; 5)

Lampiran 7 : Uji pengulangan

Fermentasi ke :	<i>Eucheuma</i>		<i>Gracilaria</i>	
	Luas area	Kadar etanol (%)	Luas area	Kadar etanol (%)
1	402	0,204	926	0,250
2	238	0,190	807	0,239
3	143	0,181	468	0,210



```

START
|
3.258
STOP

CHROMATOPAC C-R3A      FILE METHOD 0 41
SAMPLE NO 0
REPORT NO 1664

PKNO  TIME  AREA  MK  IDNO  CONC  NAME
-----
1      3.258  402          100
-----
TOTAL  402          100

```

```

START
|
3.277
STOP

CHROMATOPAC C-R3A      FILE METHOD 0 41
SAMPLE NO 0
REPORT NO 1663

PKNO  TIME  AREA  MK  IDNO  CONC  NAME
-----
1      3.277  238          100
-----
TOTAL  238          100

```

```

START
|
3.273
STOP

CHROMATOPAC C-R3A      FILE METHOD 0 41
SAMPLE NO 0
REPORT NO 1662

PKNO  TIME  AREA  MK  IDNO  CONC  NAME
-----
1      3.273  143          100
-----
TOTAL  143          100

```

Dari kiri ke kanan (fermentasi *Eucheuma* pertama, kedua, dan ketiga)

```

START
|
2.532
3.248
STOP

CHROMATOPAC C-R3A      FILE METHOD 0 41
SAMPLE NO 0
REPORT NO 1667

PKNO  TIME  AREA  MK  IDNO  CONC  NAME
-----
1      2.532  151          14.0083
2      3.248  926          85.9917
-----
TOTAL  1076          100

```

```

START
|
3.265
STOP

CHROMATOPAC C-R3A      FILE METHOD 0 41
SAMPLE NO 0
REPORT NO 1665

PKNO  TIME  AREA  MK  IDNO  CONC  NAME
-----
1      3.265  807          100
-----
TOTAL  807          100

```

```

START
|
3.258
STOP

CHROMATOPAC C-R3A      FILE METHOD 0 41
SAMPLE NO 0
REPORT NO 1666

PKNO  TIME  AREA  MK  IDNO  CONC  NAME
-----
1      3.258  468          100
-----
TOTAL  468          100

```

Dari kiri ke kanan (fermentasi *Gracilaria* pertama, kedua, dan ketiga)

Lampiran 8 : Pengukuran jumlah sel dengan metode *counting chamber*

8.1 *Trichoderma viride*

Hasil penghitungan jumlah kapang dengan *counting chamber* pada 5 kotak adalah : 234 sel, 135 sel, 162 sel, 151 sel, dan 195 sel. Jika dirata-rata, maka jumlah sel yang didapatkan adalah :

$$\text{Jumlah sel } \textit{Trichoderma viride} = \frac{234+135+162+151+195}{5} = 175,4$$

Setiap kotak tersebut memiliki volume = 0,2 mm x 0,2 mm x 0,1 mm

$$= 4 \times 10^{-3} \text{ mm}^3$$

$$= 4 \times 10^{-6} \text{ cm}^3$$

$$1 \text{ cm}^3 = 1 \text{ mL}$$

$$\text{Maka, } 4 \times 10^{-6} \text{ cm}^3 = 4 \times 10^{-6} \text{ mL}$$

$$\text{Jumlah sel/mL} = \text{jumlah sel} / 4 \times 10^{-6}$$

$$\text{Jumlah sel/mL} = \text{jumlah sel} \times 2,5 \times 10^5$$

$$\text{Jadi, jumlah sel } \textit{Trichoderma viride}/\text{mL} = 175,4 \times 2,5 \times 10^5$$

$$= 438,5 \times 10^5$$

$$= 4,39 \times 10^7$$

Dari hasil tersebut didapat bahwa terdapat $4,39 \times 10^7$ sel *Trichoderma viride* dalam setiap mL starter.

8.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Hasil penghitungan jumlah khamir : 464 sel, 432 sel, 224 sel, 240 sel, dan 352 sel. Jika dirata-rata, maka jumlah sel yang didapatkan adalah :

$$\text{Jumlah sel } \textit{Saccharomyces cerevisiae} = \frac{464+432+224+240+352}{5} = 342,4$$

$$\begin{aligned} \text{Jadi, jumlah sel } \textit{Saccharomyces cerevisiae} \text{ /mL} &= 342,4 \times 2,5 \times 10^5 \\ &= 8,56 \times 10^7 \end{aligned}$$

Dari hasil tersebut didapat bahwa terdapat $8,56 \times 10^7$ sel *Saccharomyces cerevisiae* dalam setiap mL starter.

Lampiran 9 : Penghitungan kadar air pada substrat

9.1 *Eucheuma*

Berat awal = 3,00 mg

Setelah dioven, didapat berat konstan = 2,76

$$\begin{aligned}\% \text{ Kadar air} &= \frac{\text{berat awal} - \text{berat konstan}}{\text{berat awal}} \times 100\% \\ &= \frac{3,00 - 2,76}{3,00} \times 100\% \\ &= 8\%\end{aligned}$$

9.2 *Gracilaria*

Berat awal = 3,00 mg

Setelah dioven, didapat berat konstan = 2,75

$$\begin{aligned}\% \text{ Kadar air} &= \frac{\text{berat awal} - \text{berat konstan}}{\text{berat awal}} \times 100\% \\ &= \frac{3,00 - 2,75}{3,00} \times 100\% \\ &= 8,3\%\end{aligned}$$

Lampiran 10 : Penghitungan *yield* penelitian

10.1 *Eucheuma*

Dari 0,075 gram substrat *Eucheuma* dihasilkan 0,0904 mg gula pereduksi dan 0,698% etanol.

0,075 gram substrat = 75 mg substrat

0,698% etanol = 0,00698 mL etanol

$$\begin{aligned} \text{Yield gula pereduksi terhadap substrat} &= \frac{\text{kadar gula pereduksi}}{\text{jumlah substrat}} \times 100\% \\ &= \frac{0,0904 \text{ mg}}{75 \text{ mg}} \times 100\% \\ &= 0,12\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Yield etanol terhadap gula pereduksi} &= \frac{\text{kadar etanol}}{\text{kadar gula pereduksi}} \\ &= \frac{0,00698 \text{ mL}}{0,0904 \text{ mg}} \\ &= 0,077 \text{ mL/mg} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Yield etanol terhadap substrat} &= \frac{\text{kadar etanol}}{\text{jumlah substrat}} \\ &= \frac{0,00698 \text{ mL}}{0,075 \text{ g}} \\ &= 0,093 \text{ mL/g} \end{aligned}$$

10.2 *Gracilaria*

Dari 0,050 gram substrat *Gracilaria* dihasilkan 0,0889 mg gula pereduksi dan 0,53% etanol.

0,050 gram substrat = 50 mg substrat

0,53% etanol = 0,0053 mL etanol

$$\begin{aligned} \text{Yield gula pereduksi terhadap substrat} &= \frac{\text{kadar gula pereduksi}}{\text{jumlah substrat}} \times 100\% \\ &= \frac{0,0889 \text{ mg}}{50 \text{ mg}} \times 100\% \\ &= 0,18\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Yield etanol terhadap gula pereduksi} &= \frac{\text{kadar etanol}}{\text{kadar gula pereduksi}} \\ &= \frac{0,0053 \text{ mL}}{0,0889 \text{ mg}} \\ &= 0,060 \text{ mL/mg} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Yield etanol terhadap substrat} &= \frac{\text{kadar etanol}}{\text{jumlah substrat}} \\ &= \frac{0,0053 \text{ mL}}{0,050 \text{ g}} \\ &= 0,106 \text{ mL/g} \end{aligned}$$

Lampiran 11 : Bagan Penelitian

