

Produksi Bioetanol Dari Rumput Laut dan Limbah Agar *Gracilaria* sp. dengan Metode Sakarifikasi Yang Berbeda

Saniha Adini, Endang Kusdiyantini dan Anto Budiharjo

Magister Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Undip
JI Prof Soedharto, Tembalang Semarang

Abstract

The Indonesia needs of Bioethanol were 390.000 kL in 2012, but the local ethanol production only able to cover less than 4% from the needed. The high demand of the bioethanol encourage for another innovation in ethanol production more efficient and effectively. Seaweeds and the residual pulp of *Gracilaria* sp. could be useful as substrate for bioethanol production, because of the high amount of polysaccharide, cellulose and galactan type. Unfortunately, this cellulose and galactan had through the saccharification process first, before they can be used as substrates in bioethanol production. This study examined the difference between two saccharification process which are acid hydrolisis using H_2SO_4 1% and enzymatic process using *Aspergillus niger* on the use seaweed and the residual pulp of *Gracilaria* sp. for bioethanol production. Bioethanol production been conducted for 5 days and in each 24 hour, the sampling for cell number variable, reduction sugar amount variable, and medium fermentation pH variable had been retrieved. The ethanol amount calculation in the last incubation phase conducted using distillate fermentation spesific gravity method. The highest ethanol was obtained 5,50% by treatment using seaweed medium with acid hydrolisis. The anova analysis result showed that interaction between medium variable and hydrolisis didn't have significant influence toward ethanol product. It showed that seaweed and the residual pulp of *Gracilaria* sp. had same quality and they can be useful as main component of bioethanol production which are hydrolisis by enzymatic or acid hydrolisis.

Key Words : *Gracilaria* sp., the residual pulp, saccharification, reducing sugar, ethanol

Abstrak

Kebutuhan bioetanol di Indonesia secara nasional pada tahun 2012 sekitar 390.000 kiloliter, akan tetapi produksi bioetanol yang ada di dalam negeri hanya mampu memenuhi kurang dari 4% saja dari yang dibutuhkan. Tingginya kebutuhan tersebut mendorong untuk melakukan inovasi dalam produksi bioetanol agar efektif dan efisien. Rumput laut dan limbah agar *Gracilaria* sp. dapat digunakan sebagai substrat untuk produksi bioetanol, karena memiliki banyak kandungan polisakarida jenis selulosa dan galaktan. Namun, selulosa dan galaktan ini harus melalui tahapan sakarifikasi terlebih dahulu untuk dapat dijadikan sebagai substrat dalam produksi bioetanol. Penelitian ini mengkaji perbedaan metode sakarifikasi, yaitu hidrolisis secara asam menggunakan H_2SO_4 1% dan secara enzimatik menggunakan *Aspergillus niger* pada penggunaan bahan baku rumput laut dan limbah agar *Gracilaria* sp. untuk produksi bioetanol. Produksi bioetanol dilakukan selama 5 hari dan setiap 24 jam sekali dilakukan sampling untuk variabel jumlah sel, kadar gula reduksi dan pH medium fermentasi, untuk penghitungan variabel kadar etanol dilakukan pada masa akhir inkubasi menggunakan metode berat jenis destilat fermentasi. Kadar etanol tertinggi sebesar 5,50 % diperoleh dari perlakuan yang menggunakan medium rumput laut dengan hidrolisis asam. Hasil uji anova menunjukkan bahwa hasil interaksi variabel medium dan hidrolisis tidak memberikan pengaruh nyata terhadap kadar etanol yang dihasilkan. Hal tersebut menunjukkan bahwa rumput laut dan limbah agar *Gracilaria* sp. memiliki kualitas yang sama baiknya untuk dijadikan bahan baku produksi bioetanol baik hidrolisis secara enzimatik maupun secara asam.

Kata Kunci : *Gracilaria* sp., limbah agar, sakarifikasi, gula reduksi, kadar etanol

PENDAHULUAN

Kebutuhan bioetanol di dunia sangat tinggi, seperti halnya di negara Indonesia kebutuhan bioetanol secara nasional sekitar 390.000 kiloliter

per tahun, akan tetapi pabrik bioetanol yang ada di dalam negeri hanya mampu memenuhi kurang dari 4% saja dari yang dibutuhkan (Susilawati, 2012). Kebutuhan pemenuhan bioetanol yang tinggi

tersebut mendorong untuk melakukan inovasi dalam produksi bioetanol agar dapat berjalan efektif dan efisien, sehingga mampu memenuhi kebutuhan yang ada.

Pabrik bioetanol yang ada di Indonesia memproduksi etanol dari bahan baku singkong, tebu, ubi jalar dan jagung. Bahan-bahan baku tersebut termasuk dalam tanaman pangan yang pembudidayaannya masih terbatas, lambat, memerlukan lahan yang luas dan dapat menimbulkan persaingan dengan kebutuhan pangan manusia. Ketersediaan bahan baku yang seringkali dalam kondisi terbatas tersebut mengakibatkan produksi bioetanol belum bisa optimal (Susilawati, 2012). Kondisi tersebut mendorong pencarian sumber bahan baku alternatif yang ketersediaannya melimpah dan kontinyu sepanjang tahun.

Rumput laut merupakan salah satu jenis bahan yang potensial untuk dijadikan bahan baku dalam produksi bioetanol. Produktivitas rumput laut setiap tahunnya dapat menghasilkan 19.000 liter bioetanol per hektar. Produktivitas tersebut lima kali lebih besar jika dibandingkan dengan jagung dan dua kali lebih besar dibandingkan dengan tebu. Rumput laut hanya membutuhkan kurang dari 3% dari perairan pesisir dunia untuk menghasilkan rumput laut yang cukup untuk menggantikan 60 miliar galon bahan bakar fosil (Sanglap, 2012).

Rumput laut *Gracilaria* sp. termasuk jenis alga merah yang memiliki tingkat reproduksi cepat yaitu sekitar 7-13% dan dapat bertambah sampai 20% tingkat pertumbuhannya dalam sehari. *Gracilaria* sp. memiliki kandungan galaktan sebanyak 54,4% dan selulosa sebanyak 19,7% (Kim *et al.*, 2008). Adanya galaktan dan selulosa di dalam rumput laut tersebut, rumput laut *Gracilaria* sp. dapat dijadikan sebagai bahan baku alternatif penghasil bioetanol. Produksi bioetanol yang telah dilakukan Sari, dkk. (2010) menggunakan bakteri *Clostridium acetobutylicum* dengan sistem fermentasi simultan memperoleh 21,56% bioetanol dari 1 kg selulosa alga merah *Gracilaria verrucosa* dan 18,4% dari *Eucheuma cottoni*. Produksi bioetanol tersebut menggunakan sistem fermentasi simultan, sehingga kurang efisien karena membutuhkan waktu fermentasi selama 10 hari.

Bahan baku lainnya yang potensial untuk bioetanol adalah limbah agar yang diperoleh dari pabrik penghasil agar-agar. Proses pengolahan agar-agar dari rumput laut kelas *Rhodophyceae* (alga merah) menghasilkan hasil samping berupa limbah agar. Limbah agar mengandung selulosa, lignin, hemiselulosa, pektin dan bahan-bahan organik lain (Fahrani dkk., 2007). Penelitian yang telah dilakukan oleh Devis (2008) menghasilkan kadar etanol 4,15% dari produksi bioetanol berbahan baku ampas rumput laut kering *Eucheuma cottoni*.

Sentra pertanian rumput laut *Gracilaria* sp. salah satunya terdapat di daerah Brebes, tepatnya di desa Randusanga kecamatan Brebes. Sebagian besar penduduk desa tersebut bekerja sebagai petani tambak rumput laut yang dapat menghasilkan 500 ton rumput laut kering perbulannya (Widiyantoro, 2011). Di desa tersebut terdapat satu Usaha Kecil Menengah (UKM) Tunas Harapan yang mengolah rumput laut *Gracilaria* sp. menjadi produk agar kertas. Proses produksi agar kertas dari UKM Tunas Harapan tersebut menghasilkan produk samping berupa limbah agar yang belum dimanfaatkan secara optimal, karena hanya digunakan sebagai bahan tambahan pakan ternak. Berdasarkan hasil analisa proksimat yang telah dilakukan pada limbah agar dari UKM Tunas Harapan kadar karbohidratnya masih sangat tinggi yaitu sebesar 72,17%. Tingginya karbohidrat tersebut cukup potensial untuk dimanfaatkan sebagai bahan baku produksi bioetanol.

Bioetanol dapat dibuat secara fermentasi oleh khamir *S. cerevisiae* dari bahan polisakarida yang terdapat pada rumput laut dan limbah agar *Gracilaria* sp. dengan syarat dilakukan tahapan sakarifikasi terlebih dahulu. Salah satu jenis polisakarida yang terdapat di dalam rumput laut dan limbah agar *Gracilaria* sp. adalah selulosa. Hidrolisis sempurna selulosa akan menghasilkan monomer selulosa yaitu glukosa. Selulosa dapat dihidrolisis menjadi glukosa dengan menggunakan media air dan dibantu dengan katalis asam atau enzim. Hidrolisis selulosa dapat dilakukan dengan menggunakan larutan asam seperti asam sulfur (H_2SO_4) atau secara enzimatik menggunakan enzim selulase dari *Aspergillus niger* (Eshaq *et al.*, 2011). Optimasi metode sakarifikasi untuk bahan

baku dengan kandungan utama selulosa merupakan faktor yang dapat meningkatkan produksi bioetanol.

Efisiensi dan efektifitas proses produksi bioetanol memerlukan beberapa teknik produksi agar dapat mengurangi biaya yang dikeluarkan untuk produksi dalam pemakaian medium dan energi. Penelitian ini akan mengkaji perbedaan metode sakarifikasi yaitu hidrolisis secara asam menggunakan H_2SO_4 dan secara enzimatik menggunakan enzim selulase dari *A. niger* terhadap penggunaan bahan baku rumput laut *Gracilaria* sp. dan limbah agar pada produksi bioetanol. Penelitian bertujuan untuk mengkaji penggunaan metode sakarifikasi bahan baku rumput laut dan limbah agar *Gracilaria* sp. untuk produksi bioetanol serta mengkaji produksi bioetanol dari rumput laut dan limbah agar *Gracilaria* sp. oleh *S. cerevisiae*.

BAHAN DAN METODE

1. Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Biokimia Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro dari bulan Maret-Juli tahun 2013.

2. Cara Kerja

a. Stock pembiakan dan peremajaan *A. niger*

A. niger diinokulasi pada medium PDA dan diinkubasi selama 5 hari pada suhu $30^{\circ}C$, selanjutnya ditumbuhkan pada medium PDB dan diinkubasi selama 5 hari pada suhu ruang menggunakan orbital shaker dengan kecepatan 120 rpm (Eshaq *et al.*, 2011)

b. Stock pembiakan dan peremajaan *S. cerevisiae*

S. cerevisiae dari stock diinokulasi pada 50 ml medium (glukosa 10 g/l; *Yeast extract* 1,0 g/l; KH_2PO_4 0,1 g/l; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1 g/l; dan $(NH_4)_2SO_4$, 0,1 g/l) dalam erlenmeyer, kemudian diinkubasi pada suhu $30^{\circ}C$ selama 24 jam menggunakan orbital shaker dengan kecepatan 100 rpm (Samsuri dkk., 2007).

c. Preparasi rumput laut dan limbah agar *Gracilaria* sp.

Preparasi rumput laut dan limbah agar *Gracilaria* sp. terdiri dari dua langkah yaitu pengeringan dan penggilingan, kemudian disaring menggunakan saringan ± 30 mesh sehingga

diperoleh tepung rumput laut dan limbah agar *Gracilaria* sp.

d. Sakarifikasi tepung rumput laut dan limbah agar *Gracilaria* sp.

Tahapan sakarifikasi pada tepung rumput laut dan limbah agar *Gracilaria* sp. bertujuan untuk menghidrolisis selulosa menjadi bentuk monosakarida seperti glukosa. Sakarifikasi dilakukan dengan dua perlakuan yang berbeda yaitu hidrolisis asam menggunakan H_2SO_4 1% (v/v) dan hidrolisis enzimatik menggunakan jamur *A. niger*.

Hidrolisis enzimatik dilakukan dengan cara sebagai berikut: 3 g tepung rumput laut atau limbah agar *Gracilaria* sp., urea 0,3 g/l, $(NH_4)_2SO_4$ 1,3 g/l, KH_2PO_4 2 g/l, $CaCl_2$ 0,3 g/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,3 g/l, *Protease peptone* 1,0 g/l, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 5mg/l, $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 1,6 mg/l, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 1,6 mg/ml, $CoCl_2$ 2 mg/l dan 100 ml akuades dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 ml. Medium disterilisasi menggunakan autoklaf, selanjutnya medium yang sudah steril tersebut diinokulasi dengan 10 ml *A. niger* dari medium PDB, diinkubasi pada suhu $30^{\circ}C$ selama ± 3 hari.

Setelah diinkubasi selama 3 hari dan sudah tercapai waktu optimal hidrolisis enzimatik, maka selanjutnya miselium *A. niger* yang ada di dalam medium dihilangkan secara aseptik, dan selanjutnya dilakukan penambahan nutrisi NPK 0,04% dan NH_2SO_4 0,15% digunakan untuk proses fermentasi (Eshaq *et al.*, 2011).

Hidrolisis asam dilakukan dengan cara sebagai berikut: 3 g tepung rumput laut atau limbah agar *Gracilaria* sp. dan 100 ml H_2SO_4 1% (v/v) dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 ml, kemudian diautoklaf. Medium tersebut selanjutnya didinginkan pada suhu ruang, selanjutnya hidrolisis didetoksifikasi menggunakan larutan NH_4OH hingga pH 10 dan selanjutnya pH diturunkan menjadi 5. Medium fermentasi tersebut dilakukan penambahan nutrisi NPK 0,04% dan NH_2SO_4 0,15% ke dalam medium, selanjutnya, medium dipanaskan pada suhu $105^{\circ}C$ selama 15 menit (Susmiati, 2011).

e. Pembuatan Medium Fermentasi

Medium fermentasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah 100 ml hidrolisis dalam erlenmeyer 250 ml untuk masing-masing perlakuan penelitian.

f. Pembuatan Starter

Langkah pertama pembuatan starter dilakukan dengan menginokulasikan kultur khamir *S. cerevisiae* hasil peremajaan dari kultur cair ke dalam 100 ml medium fermentasi, kemudian diinkubasi pada suhu kamar sampai terjadinya pertengahan fase logaritmik (Samsuri dkk., 2007).

g. Produksi Bioetanol

Produksi bioetanol dilakukan dengan menginokulasikan 10% (v/v) starter kultur *S. cerevisiae* ke dalam 100 ml medium fermentasi, diinkubasi pada suhu kamar selama 5 hari. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali. (Eshaq *et al.*, 2011).

h. Pengukuran pH

Pengukuran pH medium dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya perubahan pH medium. Perubahan pH yang terjadi mengindikasikan terjadinya aktivitas biologis yang dilakukan oleh bakteri. Nilai pH medium diukur dengan menggunakan pH meter (Atmodjo, 2006).

i. Penghitungan jumlah mikroba

Pertumbuhan populasi khamir di dalam medium fermentasi selama proses produksi bioetanol dihitung dengan menambahkan 0,1 ml sampel medium ke dalam grid hemositometer dan jumlah sel khamir dihitung dibawah mikroskop (Fawole and Oso, 2004).

j. Pengukuran gula reduksi

Pengukuran gula reduksi menggunakan metode *3,5-dinitrosalicylic acid* (DNS). Sampel sebanyak 1 ml ditambah 1 ml reagen DNS kemudian dicampur dan di panaskan pada suhu 100°C selama 10 menit. Pengukuran gula reduksi dilakukan dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 570 nm. Kandungan gula reduksi ditentukan berdasarkan kurva standar glukosa (Zakpaa *et al.*, 2009).

k. Pengukuran kadar etanol (penetapan berat jenis)

Pengukuran kadar etanol dilakukan secara tidak langsung melalui penetapan pengukuran berat jenis hasil destilasi. Hasil fermentasi masa inkubasi 120 jam dimasukkan ke dalam labu destilasi, selanjutnya dipanaskan pada suhu 78°C dan hasil destilasi ditampung dalam botol penampung. Hasil destilasi selanjutnya dimasukkan ke dalam piknometer 25 ml dan

ditimbang. Berat jenis destilat ditentukan menggunakan rumus :

$$A =$$

Keterangan:

A: Berat jenis destilat

D: Berat piknometer yang berisi destilat (gr)

P : Berat piknometer kosong (gr)

W: Berat piknometer yang berisi air suling (gr)

Kadar etanol ditentukan dengan cara mengkonversi berat jenis ke kadar etanol dengan bantuan tabel hubungan berat jenis dengan kadar etanol pada berbagai temperatur (Mardoni dan Yetti, 2009).

3. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian pada tahap fermentasi bioetanol menggunakan rancangan acak lengkap faktorial. Faktor pertama adalah variasi hidrolisis, sedangkan faktor kedua adalah variasi medium fermentasi. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali.

4. Analisis Data

Analisis data yang berdistribusi normal dan memiliki kesamaan varians maka untuk mengetahui pengaruh perlakuan yang diuji menggunakan *Analysis of Variances* (ANOVA) dengan uji lanjut *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) untuk semua variabel pada taraf signifikansi sebesar 5%. Data yang sudah dilakukan transformasi, namun tetap tidak berdistribusi normal dan tidak memiliki kesamaan varians maka dianalisis menggunakan uji *Kruskal-Wallis* (Dahlan, 2008).

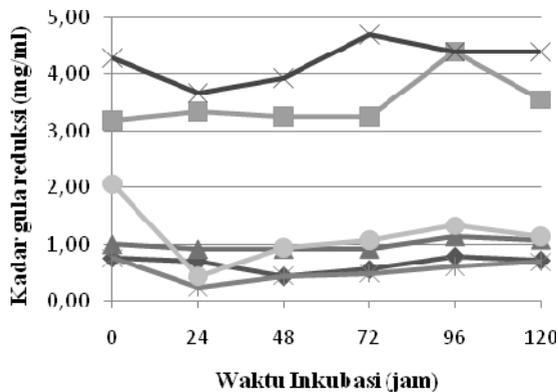
HASIL DAN PEMBAHASAN

Gula Reduksi Medium Produksi Bioetanol

Biomassa rumput laut dan limbah agar *Gracilaria* sp. dapat digunakan sebagai substrat untuk produksi bioetanol, karena biomassa tersebut memiliki banyak kandungan polisakarida jenis selulosa dan galaktan. Namun, selulosa dan galaktan ini harus melalui tahapan sakarifikasi

terlebih dahulu untuk dapat dijadikan sebagai substrat dalam produksi bioetanol. Metode sakarifikasi dapat dilakukan dengan hidrolisis, yaitu proses pemecahan molekul kompleks menjadi molekul sederhana pada media air dengan menggunakan katalis asam atau enzim. Hidrolisis secara kimiawi dengan menggunakan asam sulfat, sedangkan secara enzimatik dapat memanfaatkan enzim dari kapang *Aspergillus niger* (Kim et al., 2008).

Gula reduksi merupakan gula sederhana hasil hidrolisis karbohidrat kompleks. Ketersediaan gula reduksi dalam medium produksi bioetanol merupakan salah satu unsur penting bagi pertumbuhan *S. cerevisiae* karena berfungsi sebagai sumber karbon untuk pembentukan energi. Kadar gula reduksi yang tersedia dalam medium produksi bioetanol selama masa inkubasi 120 jam dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Ketersediaan gula reduksi dalam medium fermentasi selama produksi bioetanol

Keterangan:

- M₁H₀ : kontrol medium rumput laut *Gracilaria* sp.
- M₂H₀ : kontrol medium limbah agar *Gracilaria* sp.
- ▲— M₁H₁ : medium hidrolisis enzimatik rumput laut *Gracilaria* sp.
- ×— M₂H₁ : medium hidrolisis enzimatik limbah agar *Gracilaria* sp.
- *— M₁H₂ : medium hidrolisis asam rumput laut *Gracilaria* sp.
- M₂H₂ : medium hidrolisis asam limbah agar *Gracilaria* sp.

Berdasarkan hasil uji kruskal wallis menunjukkan bahwa kombinasi variabel medium dan hidrolisis yang berbeda berpengaruh terhadap kadar glukosa yang dihasilkan pada masa inkubasi 0 jam hingga 120 jam. Penggunaan jenis medium dan hidrolisis yang berbeda mampu menyebabkan terjadinya perbedaan terhadap kadar glukosa yang dihasilkan pada masing-masing perlakuan.

Kadar gula reduksi tertinggi diperoleh pada perlakuan M₂H₁, yang menggunakan hidrolisis secara enzimatik untuk memecah polisakarida yang ada pada limbah agar. Kapang *A. niger* mampu menghasilkan gula reduksi sebesar 4,27 mg/ml untuk limbah agar dan untuk rumput laut *Gracilaria* sp. sebesar 0,99 mg/ml. Hasil tersebut lebih besar dibandingkan hidrolisis selulosa oleh kapang *A. niger* pada serbuk gergaji, bagas dan pulp yaitu sebesar 0,38 mg/ml, 0,55 mg/ml dan 0,53 mg/ml (Chinedu et al., 2008).

Kadar gula reduksi yang dihasilkan pada perlakuan dengan menggunakan hidrolisis asam cenderung lebih rendah dibandingkan pada perlakuan yang menggunakan hidrolisis secara enzimatik. Kadar gula reduksi yang rendah tersebut tidak menjadi hambatan untuk laju pertumbuhan khamir *S. cerevisiae* pada perlakuan M₁H₂ dan M₂H₂ (Gambar .2.). Pada perlakuan tersebut khamir *S. cerevisiae* tetap dapat tumbuh dengan baik dan produk etanol yang dihasilkan juga maksimal. Ketersediaan gula reduksi dalam medium pertumbuhan merupakan salah satu unsur terpenting penunjang keberlangsungan kehidupan khamir, gula tersebut dapat dijadikan sebagai sumber karbon untuk membentuk energi bagi khamir *S. cerevisiae* selama fermentasi. Kadar gula reduksi yang berada diluar kisaran normal dapat mempengaruhi tekanan osmotik sel khamir dan dapat mengganggu aktivitas metabolismenya sehingga produk yang dihasilkan tidak dapat maksimal (Bekers et al., 2000).

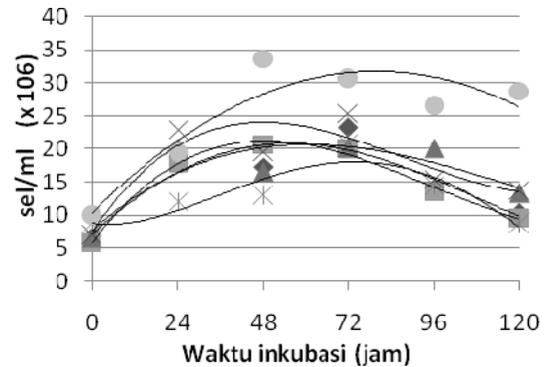
Kadar gula reduksi untuk medium rumput laut *Gracilaria* sp. menghasilkan jumlah yang lebih rendah dibandingkan dengan medium limbah agar. Hal tersebut diduga karena rumput laut *Gracilaria* sp. memiliki dinding sel yang di dalamnya masih terdapat berbagai jenis polisakarida kompleks seperti galaktan dan selulosa (Goh and Lee, 2010; Adams et al., 2011). Perbedaan jenis polisakarida tersebut dapat

mempengaruhi aktivitas hidrolisis. Semakin kompleks jenis polisakarida, maka akan semakin sulit katalis untuk melakukan degradasi.

Jenis polisakarida di rumput laut *Gracilaria* sp. berbeda dengan jenis polisakarida yang ada di limbah agar. Limbah agar merupakan produk samping dari aktivitas industri agar kertas. Proses industri agar kertas dilakukan melalui ekstraksi agar yaitu dengan perebusan *Gracilaria* sp. serta menggunakan bahan pembantu seperti kapur tohor, NaOH dan KCl (Murdinah dkk., 2012). Adanya proses perebusan pada ekstraksi agar tersebut dapat menyebabkan terjadinya degradasi kandungan polisakarida yang ada dirumput laut *Gracilaria* sp., sehingga limbah yang dihasilkan memiliki kandungan polisakarida dengan struktur yang lebih sederhana. Berdasarkan hasil analisa proksimat yang sudah dilakukan, kandungan karbohidrat total untuk limbah agar 72,17% sedangkan rumput laut *Gracilaria* sp. 52,87%. Hal tersebut diduga merupakan salah satu faktor yang menyebabkan Kadar gula medium rumput laut *Gracilaria* sp. menghasilkan jumlah yang lebih rendah dibandingkan dengan medium limbah agar

Pertumbuhan *S. cerevisiae* selama Produksi Bioetanol

Produksi bioetanol juga dipengaruhi oleh faktor pertumbuhan *S. cerevisiae*. Produksi bioetanol dapat dilakukan dengan proses fermentasi oleh *S. cerevisiae* untuk mengubah karbohidrat menjadi etanol melalui jalur metabolismenya. Pola pertumbuhan *S. cerevisiae* selama masa inkubasi pada produksi bioetanol dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Pertumbuhan *S. cerevisiae* selama produksi bioetanol

Keterangan:

- ◆ M₁H₀ : kontrol medium rumput laut *Gracilaria* sp.
- M₂H₀ : kontrol medium limbah agar *Gracilaria* sp.
- ▲ M₁H₁ : medium hidrolisis enzimatik rumput laut *Gracilaria* sp.
- △ M₂H₁ : medium hidrolisis enzimatik limbah agar *Gracilaria* sp.
- ✕ M₁H₂ : medium hidrolisis asam rumput laut *Gracilaria* sp.
- ✖ M₂H₂ : medium hidrolisis asam limbah agar *Gracilaria* sp.

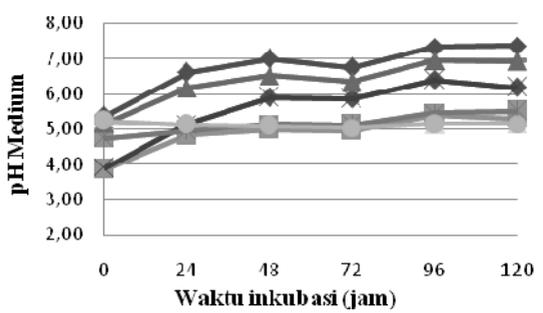
Masa inkubasi 0 jam merupakan pertumbuhan yang berasal dari starter dimana pada saat itu *S. cerevisiae* dalam kondisi aktif melakukan pembelahan. Pertumbuhan *S. cerevisiae* untuk keseluruhan perlakuan memiliki pola pertumbuhan yang sama. Masa inkubasi dari 0 jam hingga 72 jam *S. cerevisiae* mengalami peningkatan jumlah sel. Terjadinya peningkatan jumlah sel tersebut menandakan adanya aktivitas pertumbuhan yang dilakukan oleh *S. cerevisiae*. Aktivitas pertumbuhan oleh *S. cerevisiae* yaitu dengan melakukan pembelahan sehingga menyebabkan adanya peningkatan jumlah sel khamir.

Pertumbuhan *S. cerevisiae* mulai menurun pada masa inkubasi 72 jam hingga 120 jam. Terjadinya penurunan jumlah sel menunjukkan bahwa *S. cerevisiae* banyak yang mengalami kematian. Hal tersebut diduga karena pada masa inkubasi tersebut, ketersediaan nutrisi dalam

medium sudah mulai habis dan kondisi medium yang sudah mulai toksik akibat akumulasi hasil metabolisme *S. cerevisiae* seperti etanol. Menurut Wiyanti dan Novita (2001), Akumulasi etanol hasil metabolisme dapat menghambat aktivitas pembelahan sel. Semakin lama waktu inkubasi untuk proses fermentasi pembentukan etanol, maka nutrisi dalam medium semakin berkurang karena adanya peningkatan jumlah sel dan menyebabkan kompetisi dan pada akhirnya akan mengalami kematian. Hasil uji anova memperlihatkan adanya pengaruh interaksi antara penggunaan jenis medium dan jenis hidrolisis yang berbeda terhadap pertumbuhan *S. cerevisiae* masa inkubasi 48 jam dan 120 jam. Interaksi variabel jenis medium dengan jenis hidrolisis tidak memberikan pengaruh nyata terhadap pertumbuhan *S. cerevisiae* masa inkubasi 0 jam, 24 jam, 72 jam dan 96 jam, sehingga secara umum dapat dikatakan bahwa pola pertumbuhan *S. cerevisiae* pada berbagai perlakuan memiliki pola pertumbuhan yang sama.

Kondisi pH Medium selama Produksi Bioetanol

Faktor lainnya yang dapat mempengaruhi pertumbuhan *S. cerevisiae* adalah pH medium, karena berpengaruh terhadap aktivitas protein pembatas membran plasma termasuk aktivitas enzim dan transport protein. *S. cerevisiae* merupakan organisme acidophilic yang baik jika hidup dalam lingkungan asam. Kisaran pH optimal bagi pertumbuhan *S. cerevisiae* yaitu dalam kisaran variasi pH 4-6 (Narendranath and Power, 2005). Produksi bioetanol melalui fermentasi dapat menyebabkan terjadinya perubahan pH medium. Perubahan pH medium selama proses fermentasi produksi bioetanol dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Perubahan pH medium selama produksi bioetanol

Keterangan:

- ◆ M₁H₀ : kontrol medium rumput laut *Gracilaria* sp.
- M₂H₀ : kontrol medium limbah agar *Gracilaria* sp.
- ▲ M₁H₁ : medium hidrolisis enzimatik rumput laut *Gracilaria* sp.
- ✕ M₂H₁ : medium hidrolisis enzimatik limbah agar *Gracilaria* sp.
- ✱ M₁H₂ : medium hidrolisis asam rumput laut *Gracilaria* sp.
- M₂H₂ : medium hidrolisis asam limbah agar *Gracilaria* sp.

Berdasarkan hasil uji kruskal wallis menunjukkan bahwa kombinasi variabel medium dan hidrolisis yang berbeda tidak berpengaruh terhadap pH medium produksi bioetanol pada masa inkubasi 0 jam, tetapi berpengaruh terhadap pH medium produksi bioetanol pada masa inkubasi 24 jam hingga 120 jam. Masa inkubasi 0 jam merupakan masa awal dimulainya proses fermentasi, oleh karena itu pH medium diatur agar berada dalam kondisi yang optimal untuk pertumbuhan *S. cerevisiae* yaitu berada pada kisaran pH 4 hingga 6 (Narendranath and Power, 2005).

Perlakuan M1H2 selama fermentasi pH medium produksi berada pada kisaran pH 4,75 hingga 5,52; sedangkan medium perlakuan M2H2 berada pada kisaran pH 5,05 hingga 5,24. Menurut Narendranath and Power (2005), kondisi pH medium perlakuan M1H2 dan M2H2 tersebut berada pada pH optimal, karena berada pada kisaran pH medium 4 hingga 6. Kondisi pH yang optimal tersebut diduga dapat menyebabkan *S. cerevisiae* dapat tumbuh baik dan mampu menghasilkan kadar etanol yang lebih tinggi dibandingkan kadar etanol yang dihasilkan pada perlakuan M1H0, M2H0, M1H1, M2H1 (Gambar 4.).

Kestabilan pH intraseluler sangat penting bagi pertumbuhan khamir, karena terdapat banyak enzim fungsional selama proses pertumbuhan dan metabolisme sel khamir. Enzim-enzim tersebut dapat bekerja maksimal jika berada pada kisaran pH yang optimal. Sel khamir akan memerlukan banyak energi pada saat terjadi penyimpangan pH dari kisaran yang optimal. Energi tersebut digunakan untuk memompa ion hidrogen baik ke dalam maupun keluar sel agar kondisi pH

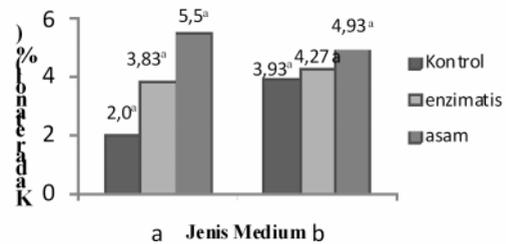
intraseluler tetap dalam kondisi yang stabil (Narendranath, Thomas and Ingledew, 2001; Thomas, Hynes and Ingledew, 2002).

Sel khamir akan mengalami kesulitan dalam menjaga kestabilan pH medium, jika penyimpangan pH yang terjadi terlalu besar dari kisaran optimal. Penyimpangan tersebut dapat menyebabkan enzim tidak dapat berfungsi secara normal. Enzim yang mengalami deaktivasi, karena tidak dapat berfungsi secara normal akan menyebabkan sel khamir tidak mampu tumbuh dan membentuk etanol dengan efisien karena terganggunya proses metabolisme sel (Narendranath and Power, 2005). Medium perlakuan M1H0 dan M1H1 pada masa inkubasi 120 jam memiliki kisaran pH medium 7,37 dan 6,93; pH medium tersebut berada diluar dari kisaran pH optimal untuk produksi bioetanol. Penyimpangan pH medium pada perlakuan M1H0 dan M1H1 menyebabkan produksi etanol khamir pada perlakuan tersebut tidak efisien, sehingga produk etanolnya rendah.

Kadar Bioetanol

Rumput laut dan limbah agar *Gracilaria* sp. dapat digunakan sebagai bahan baku produksi bioetanol, karena banyak mengandung karbohidrat jenis polisakarida yang tersusun oleh banyak monomer gula sederhana. Monomer-monomer gula sederhana tersebut merupakan prekursor utama yang dimanfaatkan oleh *S. cerevisiae* untuk diubah menjadi etanol dibawah kondisi lingkungan yang sesuai.

Gambar 4. menunjukkan kadar etanol yang diproduksi oleh *S. cerevisiae*. Produksi etanol tertinggi sebesar 5,50% diperoleh pada perlakuan yang menggunakan medium rumput laut *Gracilaria* sp. dengan hidrolisis asam, sedangkan produksi etanol terendah terdapat pada perlakuan kontrol dengan medium rumput laut *Gracilaria* sp. sebesar 2%.



Gambar 4. Produksi bioetanol oleh *S. cerevisiae* pada medium rumput laut dan limbah agar
Keterangan : a : rumput laut *Gracilaria* sp.
b : limbah agar *Gracilaria* sp.

Hasil uji anova menunjukkan tidak terdapat pengaruh langsung antara variabel jenis medium dan jenis hidrolisis terhadap kadar etanol destilat fermentasi yang dilakukan selama masa inkubasi 120 jam. Hasil interaksi variabel jenis medium dengan jenis hidrolisis juga tidak memberikan pengaruh nyata terhadap kadar etanol yang dihasilkan. Hal tersebut menunjukkan bahwa medium rumput laut dan limbah agar *Gracilaria* sp. memiliki kualitas yang sama baiknya untuk dijadikan bahan baku produksi bioetanol baik hidrolisis secara enzimatis maupun secara asam.

Penggunaan medium rumput laut *Gracilaria* sp. menghasilkan kadar etanol tertinggi sebesar 5,50%; sedangkan untuk limbah agar kadar etanol tertinggi sebesar 4,93%. Berdasarkan hasil uji anova, kadar etanol yang dihasilkan oleh medium limbah agar tersebut tidak berbeda nyata dengan yang dihasilkan oleh rumput laut *Gracilaria* sp.. Hal ini mengindikasikan bahwa penggunaan bahan baku limbah agar lebih menguntungkan untuk produksi bioetanol. Bahan baku tersebut merupakan limbah dari industri pengolahan agar, sehingga diharapkan dapat mengurangi biaya industri.

Pemecahan glukosa menjadi etanol secara teoritis yaitu satu mol glukosa menghasilkan dua mol etanol dan dua mol karbondioksida, atau dengan perbandingan bobot tiap 100 gram glukosa hanya akan menghasilkan 50 gram etanol. Adanya kondisi tersebut memerlukan suatu upaya untuk menggunakan bahan baku yang murah agar dapat mengurangi biaya produksi bioetanol. Pengurangan biaya industri tersebut diharapkan

mampu menghasilkan produk bioetanol dengan harga yang lebih murah dan mampu bersaing dengan bahan bakar fosil yang ada dipasaran saat ini (Broto dan Richana, 2006). Kadar glukosa yang dihasilkan pada proses hidrolisis yang menggunakan asam sulfat 1% lebih rendah dibandingkan pada penggunaan hidrolisis secara enzimatis menggunakan kapang *A. niger* (Gambar 1.), meskipun demikian perlakuan yang menggunakan hidrolisis asam mampu menghasilkan kadar etanol tertinggi baik pada medium rumput laut maupun limbah agar.

Kadar etanol pada perlakuan yang menggunakan hidrolisis asam tidak berbeda nyata dengan hidrolisis enzimatis, akan tetapi jika dilihat dari efisiensi waktu dapat dikatakan bahwa hidrolisis asam lebih tepat untuk digunakan dalam produksi bioetanol. Produksi bioetanol dengan hidrolisis asam membutuhkan waktu produksi yang relatif cepat dibandingkan hidrolisis enzimatis. Pada penelitian ini, untuk metode sakarifikasi yang menggunakan hidrolisis secara asam membutuhkan waktu 15-20 menit untuk proses pemecahan polisakarida menjadi monomer-monomernya, sedangkan hidrolisis secara enzimatis menggunakan *A. niger* membutuhkan waktu selama 72 jam untuk proses pemecahannya.

Hidrolisis asam juga menghasilkan senyawa-senyawa inhibitor yang dapat mengganggu proses fermentasi. Pembentukan senyawa inhibitor tersebut dapat dikurangi dan ditekan dengan proses detoksifikasi menggunakan larutan amonium hidrosilat. Proses detoksifikasi juga memberikan keuntungan lain yaitu dapat menambah nutrisi bagi khamir. Amonium dapat bereaksi dengan asam sulfat membentuk amonium sulfat yang dapat dijadikan sebagai sumber nitrogen bagi pertumbuhan khamir *S. cerevisiae* (Alriksson *et al.*, 2005; Susmiati, 2011). Proses detoksifikasi yang dilakukan pada penelitian ini diduga dapat menekan dan mengurangi terbentuknya senyawa-senyawa inhibitor, sehingga produksi bioetanol berjalan optimal dan menghasilkan kadar etanol yang lebih tinggi dibandingkan perlakuan hidrolisis enzimatis.

Amonium sulfat yang terbentuk karena adanya reaksi antara amonium hidrosilat dengan asam sulfat, dapat dimanfaatkan oleh khamir *S. cerevisiae* sebagai sumber nitrogen untuk

aktifitas hidupnya. Keberadaan amonium sulfat dalam medium mengakibatkan peningkatan konsentrasi ion amonium dalam medium fermentasi. Selanjutnya ion amonium digunakan sebagai sumber nitrogen oleh khamir *S. cerevisiae* untuk pembentukan asam nukleat, asam-asam amino dan protein sel, yang selanjutnya berperan dalam sintesis enzim-enzim metabolik (Widayanti dkk.,2013). Adanya tambahan sumber nitrogen dalam bentuk amonium sulfat pada perlakuan yang menggunakan hidrolisis asam, merupakan satu faktor yang menyebabkan kadar etanol yang dihasilkan pada perlakuan tersebut lebih tinggi dibandingkan perlakuan hidrolisis enzimatis.

Produksi bioetanol tertinggi pada penelitian ini sebesar 5.50% didapatkan dari perlakuan yang menggunakan kombinasi bahan baku *Gracilaria* sp. dengan hidrolisis asam sulfat 1%. Hasil tersebut lebih tinggi dibandingkan dengan penelitian terdahulu oleh Sari dkk. (2010) dengan bahan baku *Gracilaria* sp. menghasilkan kadar etanol 3,77%. Penelitian lain yang menggunakan rumput laut antara lain menghasilkan kadar etanol sebesar 4,1 % dari produksi rumput laut *Gelidium amansii* (Kim, 2008) dan hasil penelitian Devis (2008) yang memproduksi bioetanol dari bahan limbah karaginan *Euचेuma cottonii* dihasilkan etanol berkadar 3,28 %.

KESIMPULAN

a. Simpulan

Berdasarkan dari hasil penelitian produksi etanol yang sudah dilakukan dapat ditarik simpulan sebagai berikut :

1. Metode sakarifikasi untuk hidrolisis secara enzimatis oleh *Aspergillus niger* menghasilkan kadar gula reduksi yang lebih tinggi, dibandingkan dengan hidrolisis secara asam menggunakan H_2SO_4 1%.
2. Medium rumput laut dan limbah agar *Gracilaria* sp. memiliki kualitas yang sama baiknya untuk dijadikan bahan baku produksi bioetanol baik hidrolisis secara enzimatis maupun secara asam.

b. Saran

Berdasarkan penelitian yang sudah dilakukan, disarankan agar dilakukan penelitian lanjutan yang mengkaji aspek berikut:

1. Penggunaan kultur gabungan antara berbagai jenis kapang dalam hidrolisis enzimatis, misal kapang *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger*
2. Peningkatan konsentrasi tepung rumput laut dan limbah agar *Gracilaria* sp. dalam hidrolisis asam sulfat 1%.

DAFTAR PUSTAKA

- Adams, J.M., Toop, T.A., Gallagher, J.M., and Donnison, I.S.. 2011. Seasonal variation in *Laminaria digitata* and its impact on biochemical conversion routes to biofuels. *Bioresour. Technol.* 102, 9976–9984.
- Alriksson, B., Hovarth IS., Sjode A., Nilvebrant N.O., and Jonsson L.J.. 2005. Ammonium hydroxide Detoxification of Spruce Acid Hydrolysates. *J. Appl Biotechnol.* 121-124.
- Atmodjo, P.K. 2006. Pengaruh Variasi Beras Ketan (*Oryza sativa* var *glutinosa* L.) dan Suhu Fermentasi terhadap Produksi Alkohol. *Biota* Vol.XI (3): 152-158
- Bekers, M., Ventina, E., Karsakevich, A., Vina, I., Rapoport, A., Upite, D., Kaminska, E. and Linde, R. 1999. Attachment of Yeast to Modified Stainless Steel Wire Spheres, Growth of Cells and Ethanol Production. *Process Biochemistry.* 35: 523-530.
- Broto, W. dan Richana, N.. 2006. Inovasi Teknologi Proses Industri Bioetanol dari Ubi Kayu Skala Perdesaan. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian.
- Chinedu, S.N., Yah, S.C., Nwinyi, O.C., Okochi, V.I., Okafor, U.A. and Onyegeme-Okerenta, B.M. 2008. Plant Waste Hydrolysis by Extracellular Enzymes of *Aspergillus niger* dan *Penicillium chrysogenum*: Effect of Ammonia Pretreatment. *Nigerian Journal of Biochemistry and Molecular Biology.* 23(1): 1-7, 2008. ISSN 0189-4547.
- Devis, F.H. 2008. Bioetanol Berbahan Dasar Ampas Rumput Laut *Kappaphycus alvarezii*. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor.
- Eshaq, F.S., Mir, N.A. and Mahzharuddin, K.M. 2011. Production of Bioethanol from next generation feed-stock alga *Spirgyra* species. *International Journal of Engineering Science and Technology*. Vol. 3 No. 2 Feb 2011.
- Fahriani, D., Rodiah, N., dan Bakti, B.S. 2007. Ekstraksi Selulosa dari Limbah Pembuatan Karaginan. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan.* 2(2).91-97.
- Fawole, H.J. and Oso, B.A. 2004. Laboratory Manual of Microbiology. Spectrum Books Limited Spectrum. *Nigeria*, pp: 1-48.
- Goh, C.S. and Lee, K.T. 2010. A visionary and conceptual macroalgae-based third-generation bioethanol (TGB) biorefinery in Sabah, Malaysia as an underlay for renewable and sustainable development. *Renewable Sustainable Energy Rev.*14: 842–848.
- Kim, G.S., Myung, K.S., Kim Y.J., Oh, K.K., Kim, J.S., Ryu, H.J. and Kim, K.H. 2010. Methode of Producing Biofuel Using Sea Algae. World Intellectual Property Organization. Seoul.
- Mardoni, M.M. dan Yetty, T. 2009. Perbandingan Metode Kromatografi Gas Dan Berat Jenis Pada Penetapan Kadar Etanol Dalam Minuman Anggur. *Jurnal Fakultas Farmasi USD*, 162-172, 2009.
- Murdinah, Siti, N.K.A., Nurhayati, dan Subaryono. 2012. Membuat Agar dari Rumput laut *Gracilaria* sp. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Narendranath, N. V., Thomas, K. C. and Ingledew, W. M. 2001. Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 26:171–177.
- Narendranath, N.V. and Power, R.. 2005. Relationship between pH and Medium Dissolved Solids in Terms of Growth and Metabolism of *Lactobacilli* and *Saccharomyces cerevisiae* during Ethanol Production. *Applied and Environmental Microbiology* p. 2239–2243 Vol. 71, No. 5.
- Samsuri, M., Gozan, M., Mardias, R., Baiquni, M., Hermansyah, H., Wijanarko, A., Prasetya, B. dan Nasikin, M. 2007. Pemanfaatan Selulosa Bagas untuk Produksi Ethanol melalui Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak dengan Enzim Xylanase. *Makara,*

- Teknologi*, Vol. 11, NO. 1, April 2007: 17-24
- Sanglap, R. 2012. Seaweed to Ethanol Breakthrough. [http:// au. ibtimes. com/ articles/288304/20120127/seaweed-ethanol-breakthrough. htm](http://au.ibtimes.com/articles/288304/20120127/seaweed-ethanol-breakthrough.htm). [11 desember 2012].
- Sari, A. P., Ahyar, A. dan Hanapi, U. 2011. Produksi Bioetanol dari Selulosa Alga Merah dengan Sistem Fermentasi Simultan Menggunakan Bakteri *Clostridium acetobutylicum*. <http://pasca.unhas.ac.id/jurnal/files/1b9aacc5b052ef856c3f830813fc84ce.pdf>. [17 November 2012].
- Susilawati, R. 2012. Bisnis Etanol Medco Tersandung Mahalnya Singkong. http://www.beritajatim.com/detailnews.php/1/Ekonomi/2012-04-2/133684Bisnis_Bio_EtanolMedco_Tersandung_Mahalnya_Singkong. [11 desember 2012].
- Susmiyati, Y. 2011. Detoksifikasi Hidrolisat Asam dari Ubi Kayu untuk Produksi Bioetanol. *Agrointek* Vol 5 No 1.
- Thomas, K. C., Hynes, S. H. and Ingledew, W. M. 2002. Influence of medium buffering capacity on inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth by acetic and lactic acids. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1616-1623.
- Widayanti, N.P., Rita, W.S. dan Ciawi, Y. 2013. Pengaruh Konsentrasi Ammonium Sulfat (NH₄)₂SO₄ sebagai Sumber Nitrogen terhadap Produksi Bioetanol Berbahan Baku *Gracilaria* sp. *Jurnal Kimia* 7(1): 1-10.
- Widiyantoro, A. 2011. Petani Harus Kreatif Mengolah Hasil Pertanian. http://www.jatengprov.go.id/?mid=wartadara&listStyle=webzine&document_srl=21829&page=10&category=4172&sort_index=readed_count&order_type=asc. [31 Januari 2012].
- Wignyanto, S. dan Novita. 2001. Pengaruh Konsentrasi Gula Reduksi Sari Hati Nanas dan Inokulum *Saccharomyces cerevisiae* pada Fermentasi Etanol. *Jurnal Teknologi Pertanian* 2(1): 68-77.
- Zakpaa, H.D., Mensah, E.E.M. and Johnson, F.S. 2009. Production of bio-ethanol from corncobs using *Aspergillus niger* dan *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous saccharification and fermentation. *Afr. J. Biotechnol.* Vol. 8 (13), pp. 3018-3022.