

## OPTIMASI WAKTU PROSES HIDROLISIS DAN FERMENTASI DALAM PRODUKSI BIOETANOL DARI LIMBAH PENGOLAHAN AGAR (*Gracilaria* sp.) INDUSTRI

### *Optimization of Hydrolysis and Fermentation in The Bioethanol Production from Waste of Industrial Agar (*Gracilaria* sp.) Processing*

Rodiah Nurbaya Sari<sup>1\*</sup>, Sugiyono<sup>1</sup>, dan Luthfi Assadad<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pengolahan Produk dan Bioetknologi Kelautan dan Perikanan, KKP.  
Jl. K.S. Tubun Petamburan VI, Jakarta Pusat 10260

<sup>2</sup> Loka Penelitian dan Pengembangan Mekanisasi Pengolahan Hasil Perikanan, KKP.  
Jl. Imogiri Barat KM 11.5 Jetis, Bantul–DI. Yogyakarta 55781

\*Korespondensi Penulis: rodiah\_ns@kkp.go.id/rodiah\_ns@yahoo.com

Diterima: 24 Februari 2012; Disetujui 12 November 2013

#### ABSTRAK

Produksi bioetanol sebagai sumber energi dari biomassa lignoselulosa merupakan salah satu alternatif untuk mengurangi penggunaan bahan bakar fosil dan kerusakan lingkungan. Tujuan dari penelitian ini adalah mendapatkan waktu hidrolisis dan fermentasi yang optimal untuk memproduksi bioetanol dari limbah pengolahan agar (*Gracilaria* sp.) industri dengan menggunakan kapang *Trichoderma viride* dan khamir *Saccharomyces cerevisiae*. Penelitian yang dilakukan terdiri dari beberapa tahap yaitu karakterisasi limbah agar industri, hidrolisis enzimatis menggunakan kapang *Trichoderma viride* penghasil selulase, dan fermentasi dengan khamir *Saccharomyces cerevisiae*. Hasilnya menunjukkan bahwa waktu optimal untuk hidrolisis enzimatis adalah 4 hari pada suhu 28 °C dan pH 3,91; aktivitas CMC<sub>50</sub> 210,48 IU/ml dan menghasilkan total gula pereduksi 6,74 mg/ml. Sedangkan untuk waktu fermentasi yang optimal adalah 2 hari pada suhu 32 °C dan pH 4,66 dengan nilai OD 600 nm 0,0181 menghasilkan etanol kasar dengan kadar 0,47% (b/b).

**KATAKUNCI:** bioetanol, limbah pengolahan agar (*Gracilaria* sp.), *Trichoderma viride*, selulase, *Saccharomyces cerevisiae*

#### ABSTRACT

*Production of bioethanol as a source of energy from lignocellulosic biomass has become one alternative for reducing fossil fuel usage and environmental damage. The purpose of this study was to find out optimum time of hydrolysis and fermentation process to produce bioethanol from solid waste of industrial agar (*Gracilaria* sp.) processing using *Trichoderma viride* fungus and *Saccharomyces cerevisiae* yeast. The research consisted of several stages, i.e. the characterization of industrial agar waste, enzymatic hydrolysis using cellulase producing *Trichoderma viride* and the fermentation using *Saccharomyces cerevisiae*. The results showed that the optimum time of enzymatic hydrolysis was 4 days at the temperature of 28 °C, pH of 3.91, and CMC<sub>50</sub> activity of 210.48 IU/ml resulting in total reducing sugar of 6.74 mg/ml. While the optimum time of fermentation was 2 days at the temperature of 32 °C and pH of 4.66 with OD 600 nm value of 0.0181, resulting crude ethanol with concentration of 0.47% (w/w).*

**KEYWORDS:** bioethanol, industrial agar (*Gracilaria* sp.) processing waste, *Trichoderma viride*, cellulase, *Saccharomyces cerevisiae*

#### PENDAHULUAN

Minyak bumi Indonesia saat ini diperkirakan hanya tersedia untuk jangka waktu sekitar 15 tahun dengan asumsi tingkat pertumbuhan konsumsi berada pada kisaran 5-6% setahun (Anon., 2009). Untuk mengatasi

kebutuhan akan energi, diperlukan energi alternatif. Salah satu upaya adalah dengan mengkonversi biomassa menjadi bioetanol. Di sisi lain, kekayaan Indonesia yang berlimpah akan sumber daya hayati termasuk mikroorganisme, sangat memungkinkan untuk pemanfaatan biomasa/lignoselulosa menjadi

bioetanol, yang sampai saat ini belum dikembangkan secara optimal (Anindyawati, 2009).

Lignoselulosa adalah komponen organik di alam yang melimpah dan terdiri dari tiga tipe polimer, yaitu selulosa, hemiselulosa, dan lignin. Lignoselulosa bisa diperoleh dari bahan kayu, jerami, rumput-rumputan, limbah pertanian/hutan, limbah industri (kayu, kertas), dan bahan berserat lainnya. Kandungan dari ketiga komponen lignoselulosa bervariasi tergantung dari jenis bahannya (Anindyawati, 2009). Teknologi yang mengkonversi biomasa/lignoselulosa menjadi bioetanol merupakan teknologi yang mempunyai nilai ekonomi tinggi karena dapat memanfaatkan bahan limbah sebagai bahan baku. Melalui penerapan bioteknologi, dengan penggunaan mikroba sebagai penghasil enzim, diharapkan dapat diperoleh teknologi yang ramah lingkungan dibandingkan dengan proses kimiawi yang selama ini banyak dilakukan (Anindyawati, 2009).

Bahan baku untuk proses produksi bioetanol diklasifikasikan menjadi tiga kelompok, yaitu gula, pati, dan selulosa (Ge *et al.*, 2011). Sumber gula berasal dari gula tebu, gula bit, molase dan buah-buahan, dapat langsung dikonversi menjadi etanol. Sumber dari bahan berpati seperti jagung, singkong, kentang dan akar tanaman harus dihidrolisis terlebih dahulu menjadi gula. Sumber lainnya yaitu selulosa berasal dari kayu, limbah pertanian, limbah pabrik pulp dan kertas, semuanya harus dikonversi menjadi gula. Namun sumber gula dan bahan berpati dapat menimbulkan permasalahan baru jika dikonversi terus menerus menjadi bioetanol karena bahan-bahan tersebut berpotensi juga sebagai bahan pangan (Lin *et al.*, 2006).

Limbah agar (*Gracilaria sp.*) industri berpotensi untuk dijadikan bahan baku produksi bioetanol dikarenakan dua alasan yaitu kandungan selulosa yang cukup tinggi mencapai 16,00-59,69% (Harvey, 2008; Sedayu *et al.*, 2008, Triwisari, 2010) dan jumlah limbah industri agar yang tinggi merupakan potensi besar dalam menjamin ketersediaan bahan baku. Menurut Kim (2007) perusahaan pengolah rumput laut menghasilkan limbah padat sebanyak 65-75% dari bahan baku setiap harinya dan jika suatu pabrik besar pengolah agar memiliki kapasitas produksi sebesar 80 ton per bulan maka menghasilkan limbah berselulosa sebanyak 56 ton (Ujjani, 2007).

Penelitian pembuatan bioetanol telah lama dilakukan, namun pemanfaatan limbah pengolahan agar (*Gracilaria sp.*) industri sebagai bahan baku produksi bioetanol masih belum banyak dilakukan. Salah satu penelitian yang mengkaji produksi bioetanol dari *Sargassum sp.*, Sari (2010) menyatakan hasil bioetanol yang diperoleh masih sangat rendah

yaitu 0,045 % (b/b). Kesulitan yang dialami adalah karena adanya beberapa faktor yang sangat mempengaruhi proses produksi bioetanol di setiap tahapan yang harus dilewati. Tahapan proses tersebut yaitu proses hidrolisis (secara asam dan enzimatis) dan fermentasi. Faktor-faktor yang berpengaruh pada proses hidrolisis adalah kandungan karbohidrat bahan baku, waktu, pH, dan suhu (Osvaldo *et al.*, 2012). Sedangkan pada proses fermentasi adalah jenis mikroorganisme, kadar gula yang dihasilkan dari proses hidrolisis, waktu, pH, dan suhu (Azizah *et al.*, 2012; Osvaldo *et al.*, 2012).

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan waktu optimum hidrolisis enzimatis dan fermentasi untuk memproduksi bioetanol dari limbah pengolahan agar (*Gracilaria sp.*) industri dengan menggunakan kapang *Trichoderma viride* dan khamir *Saccharomyces cerevisiae*.

## BAHAN DAN METODE

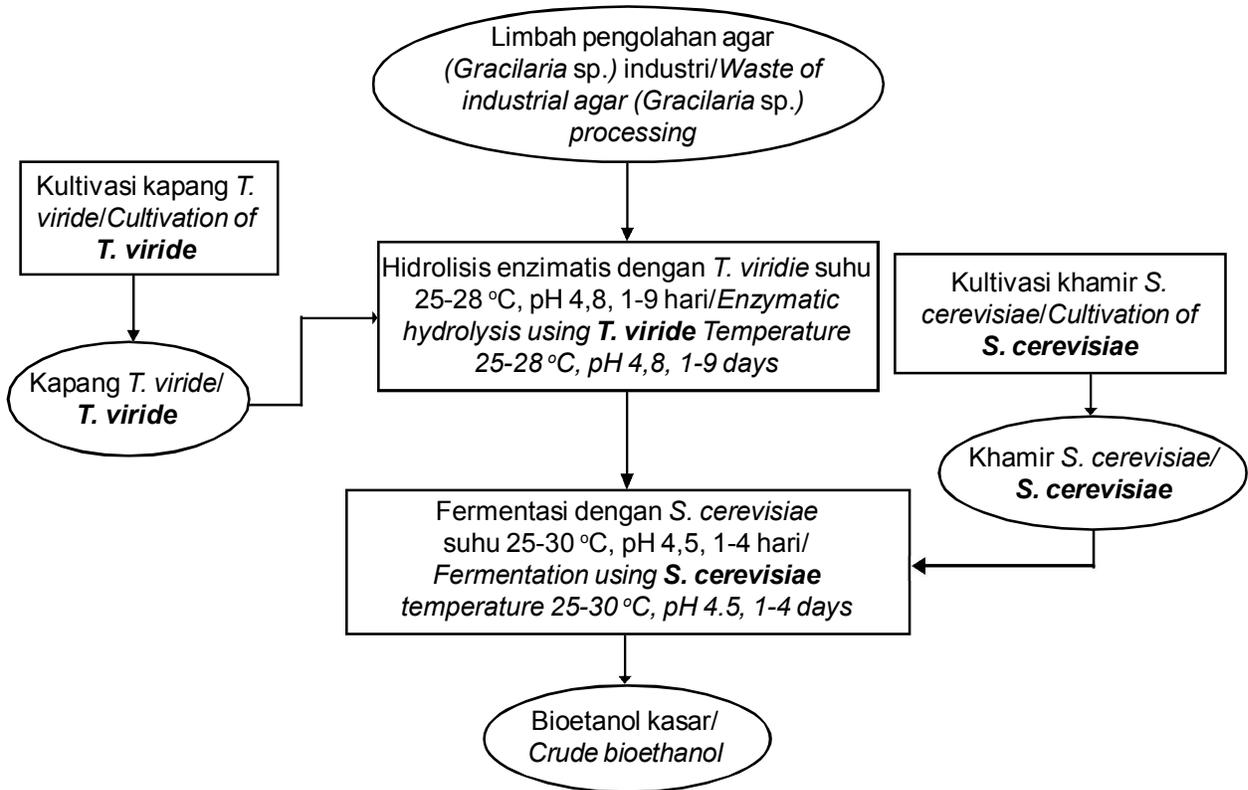
### Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah limbah padat yang dikumpulkan dari industri pengolahan agar (*Gracilaria sp.*) PT. Agarindo Bogatama. Limbah tersebut merupakan hasil penyaringan pada tahap akhir proses pengolahan. Limbah dikeringkan dengan sinar matahari sampai kadar air mencapai sekitar 10%. Bahan lain yang digunakan adalah kapang *T. viride* dan khamir *S. cerevisiae* dari Laboratorium Mikrobiologi, ITP, IPB; PDB (*potato dextrose broth*), YGMP (*yeast extract, glucose, malt extract, dan pepton*), media Andreotti, pepton, tween 80, dan *yeast extract*. Bahan kimia yang digunakan untuk analisis adalah glukosa standard dan asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS).

Alat yang digunakan meliputi: bioreaktor *batch stainless steel* sistem *double jacket* hasil rakitan Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan dengan kapasitas 5 liter dilengkapi dengan pengaduk dan *heater*. Alat lain yang digunakan adalah pH meter. Sedangkan alat-alat analisa: *Spectrophotometer UV/VIS* (Perkin Elmer *lambda 25*) dan *Gas Chromatography* (Agilent).

### Metode

Tahapan penelitian produksi bioetanol dari limbah pengolahan agar (*Gracilaria sp.*) industri dapat dilihat pada Gambar 1. Penelitian ini diawali dengan melakukan karakterisasi limbah yaitu kadar air (AOAC, 2005) dan kadar selulosa dengan metode TAPPI T17 wd-70 (Irawati, 2006) yang dilakukan di Laboratorium Kimia Hasil Hutan-THH, IPB.



Gambar 1. Produksi bioetanol dari limbah pengolahan agar industri.  
Figure 1. Bioethanol production from waste of industrial agar processing.

### Hidrolisis enzimatik dengan *T. viridie*

Hidrolisis enzimatik dimaksudkan untuk mengubah selulosa menjadi gula pereduksi dengan bantuan *T. viridie* sebagai penghasil selulase. Dalam tahap ini akan ditentukan waktu optimal (1-9 hari) untuk menghasilkan gula pereduksi tertinggi. Berdasarkan aktivitas enzim yang tertinggi.

Sebelum proses hidrolisis enzimatik dimulai, dilakukan lebih dahulu proses kultivasi kapang *T. viridie* dengan media PDB pada suhu 25-28 °C (Arnata, 2009) selama empat belas hari. Setelah itu dilakukan persiapan substrat dengan memasukkan limbah agar sebanyak 375 g dalam ke bioreaktor dan ditambahkan 3 liter akuades sambil diaduk sampai menjadi bentuk bubuk.

Ke dalam substrat ditambahkan media Andreotti (Subekti, 2006), pepton 2%, dan tween 80 0,1% dengan tetap dilakukan pengadukan. Derajat keasaman (pH) diatur menjadi 4,8 (Irawati, 2006; Arnata, 2009) dengan penambahan HCl 3 N atau NaOH 3 N. Penggunaan normalitas yang tinggi ini dimaksudkan agar saat mengatur pH tidak terjadi penambahan volume substrat yang banyak. Selanjutnya pH dijaga dengan penambahan buffer sitrat 0,2 M dan substrat disterilisasi dengan pemanasan

pada 100 °C selama 30 menit (Hogg, 2005). Setelah itu substrat didinginkan hingga suhu 25-28 °C (Irawati, 2006; Arnata, 2009). Substrat yang telah disiapkan kemudian ditambahkan suspensi *T. viridie* sebanyak 10% (v/v) dari substrat.

Waktu terbaik hidrolisis enzimatik ditentukan berdasarkan aktivitas enzim CMCase dan total gula pereduksi tertinggi. Berdasarkan waktu hidrolisis terbaik tersebut kemudian dilanjutkan tahap fermentasi.

### Fermentasi dengan *S. cerevisiae*

Fermentasi dimaksudkan untuk mengubah gula pereduksi menjadi etanol. Pada awal proses terjadi penguraian glukosa yang ditandai dengan menurunnya kadar gula pereduksi sehingga besarnya total gula pereduksi yang hilang menjadi indikator besarnya kadar etanol yang diperoleh. Dalam tahap ini akan ditentukan waktu optimal (1-4 hari) untuk menghasilkan kadar etanol kasar tertinggi.

Fermentasi diawali dengan melakukan kultivasi *S. cerevisiae* pada media YGMP selama dua hari. Substrat awal disiapkan kembali dan dilakukan proses hidrolisis enzimatik berdasarkan waktu terbaik. Untuk proses inaktivasi *T. viridie*, substrat dipanaskan pada

suhu 65 °C selama 30 menit (Prihatini, 2008). Selanjutnya substrat didinginkan hingga suhu 25-30 °C. Pada substrat ditambahkan juga pepton 2% dan *yeast extract* 1% dengan tetap dilakukan pengadukan. Nilai pH diatur menjadi 4,5 (Elevri & Putra, 2006) dengan penambahan HCl 3 N atau NaOH 3 N (Horn, 2000). Kemudian pH substrat dijaga dengan penambahan buffer sitrat 0,2 M dan substrat disterilisasi dengan pemanasan pada 100 °C selama 30 menit (Hogg, 2005). Setelah itu substrat didinginkan hingga suhu 25-30 °C (Elevri & Putra, 2006). Substrat yang telah disiapkan kemudian ditambahkan suspensi *S. cerevisiae* sebanyak 10% (v/v) dari substrat. Selama proses fermentasi berlangsung dilakukan pengadukan secara kontinyu dengan kecepatan 12 rpm (Irawati, 2006; Subekti, 2006; dan Amata, 2009).

Waktu terbaik fermentasi ditentukan berdasarkan hasil analisis etanol kasar tertinggi. Berdasarkan waktu terbaik hidrolisis enzimatis dan fermentasi dilanjutkan dengan produksi bioetanol.

#### Produksi bioetanol

Produksi bioetanol secara keseluruhan dilakukan berdasarkan waktu terbaik hidrolisis enzimatis dan fermentasi. Setiap tahap proses dilakukan dengan dua kali ulangan.

#### Analisis dan Pengamatan

##### Hidrolisis enzimatis dengan *T. viride*

Selama hidrolisis enzimatis berlangsung sembilan hari dilakukan pengambilan sampel setiap 1 hari dengan ulangan sebanyak dua kali. Analisis yang dilakukan adalah: aktivitas *CMCase* (*Endo- $\beta$ -glukanase*) dengan metode Mandels *et al.* (1976) dan total gula pereduksi dengan metode DNS (Miller, 1959) serta dilakukan pengamatan suhu dan pengukuran pH. Hasil analisis total gula pereduksi dinyatakan dalam mg/ml.

##### Fermentasi dengan *S. cerevisiae*

Selama fermentasi berlangsung empat hari dilakukan pengambilan sampel setiap hari dengan ulangan sebanyak dua kali untuk dianalisis tingkat pertumbuhan khamir dengan menentukan *Optical Density* pada panjang gelombang 600 nm menggunakan *Spectrophotometer* (Bergman, 2001; Ly *et al.*, 2005) dan kadar etanol kasar menggunakan alat *Gas Chromatography* di Laboratorium Forensik-Mabes Polri, Jakarta. Hasil analisis kadar etanol kasar dinyatakan dalam % terhadap bobot bahan baku limbah (b/b). Selama proses juga dilakukan pengamatan suhu dan pengukuran pH.

## HASIL DAN BAHASAN

### Karakterisasi limbah pengolahan agar (*Gracilaria sp.*) industri

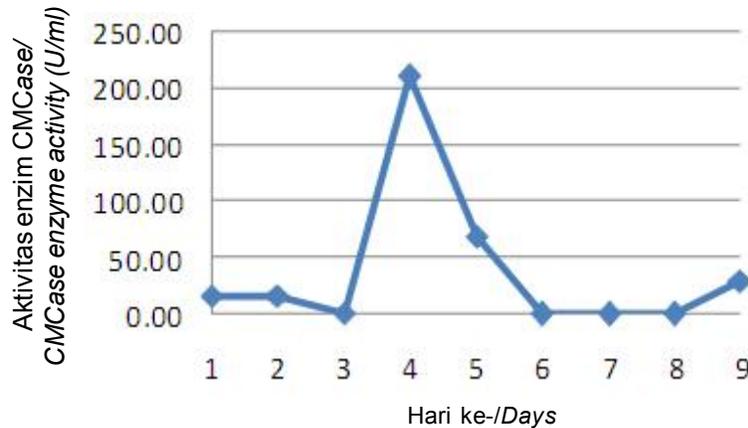
Karakterisasi limbah pengolahan agar (*Gracilaria sp.*) industri sebagai bahan baku meliputi kadar air dan selulosa. Limbah pengolahan agar (*Gracilaria sp.*) PT. Agarindo Bogatama memiliki kadar air awal  $19,63 \pm 1,60\%$  (bb). Setelah dilakukan pengeringan dengan sinar matahari kadar air limbah  $10,04 \pm 0,19\%$  (bb). Kadar air ini disesuaikan dengan kondisi bahan baku pada penelitian produksi bioetanol berbahan baku selulosa yang telah dilakukan sebelumnya yaitu berkisar antara 7,04-11,16% (Subekti, 2006; Shofiyanto, 2008; Borines *et al.*, 2013). Kadar air bahan baku dijaga untuk tidak tinggi agar tidak terjadi penurunan porositas dan laju difusi oksigen yang dapat menyebabkan perpindahan panas dan massa berlangsung kurang baik sehingga menghambat pertumbuhan miselium kapang (Loebis, 2008).

Kadar selulosa limbah pengolahan agar (*Gracilaria sp.*) sebesar  $20,17 \pm 0,03\%$ . Kadar selulosa limbah agar tersebut berada pada kisaran kadar selulosa limbah pengolahan agar dari beberapa hasil penelitian sebelumnya yaitu antara 16,00-59,69% (Harvey, 2008; Sedayu *et al.*, 2008; Triwisari, 2010; Borines, Leon & Cuello, 2013) sehingga limbah agar (*Gracilaria sp.*) PT. Agarindo Bogatama ini berpotensi sebagai bahan baku untuk produksi bioetanol.

### Proses hidrolisis enzimatis

#### Aktivitas *CMCase* (IU/ml)

Hasil analisis aktivitas *CMCase* dapat dilihat pada Gambar 2. Aktivitas *CMCase* mencapai maksimum pada hari ke-4 yaitu 210,48 IU/ml substrat. Aktivitas *CMCase* yang dihasilkan dari penelitian ini lebih tinggi dibandingkan hasil penelitian Zhou *et al.* (2008), Arnata (2009), dan Nethu *et al.* (2012). Hal ini diduga kondisi optimum *T. viride* memproduksi *CMCase* dengan media limbah agar (*Gracilaria sp.*) industri sudah tercapai yaitu pada suhu  $28 \pm 1$  °C dan pH  $3,91 \pm 0,02$ . Namun perbedaan jenis substrat juga mempengaruhi aktivitas *CMCase* dari *T. viride* ini. Penelitian Zhou *et al.* (2008) menggunakan *T. viride strain* T 100-14 dengan media cair yang ditambahkan 1% *Avicel* (sebagai sumber karbon) menghasilkan aktivitas *CMCase* maksimum pada hari ke-4 sebesar 13,83 IU/ml substrat. Penelitian Arnata (2009) dengan bahan baku ubi kayu menghasilkan aktivitas *CMCase* maksimum pada hari ke-7 yaitu 5,05 IU/ml substrat dengan kondisi suhu 25-28 °C dan pH 3,28. Sedangkan penelitian Neethu *et al.* (2012) dengan bahan baku *Basal Mineral Salt Medium* (BSM) yang ditambahkan



Gambar 2. Aktivitas enzim CMCase dari *T. viride*  
Figure 2. CMCase enzyme activity of *T. viride*

CMC 1,25% menghasilkan aktivitas selulase mencapai 173 IU/ml pada hari ke-6 dengan kondisi optimum pada suhu 28 °C dan pH 4. Dibandingkan hasil penelitian tersebut, penggunaan substrat limbah agar (*Gracilaria* sp.) industri yang difermentasi dengan *T. viride* ini dapat menghasilkan aktivitas CMCase yang lebih tinggi dengan waktu yang lebih pendek.

Kesesuaian substrat dan kondisi yang optimum dapat mendukung kapang memproduksi enzim endo- $\beta$ -glukanase yang mendegradasi fraksi selulosa dalam media menjadi glukosa dan selo-oligosakarida. Fraksi selulosa berperan sebagai penginduksi selulase yang menjadi sumber karbon dan energi untuk pertumbuhan kapang. Selulase tersebut merupakan suatu kompleks enzim yang terdiri dari beberapa enzim yang bekerja bertahap atau bersama-sama menguraikan selulosa menjadi glukosa dengan cara menghidrolisis ikatan  $\alpha$ -1,4 pada selulosa (Gunam, Aryanta & Darma, 2011).

Menurunnya aktivitas CMCase pada hari ke-5 sampai hari ke-8 diduga karena kadar glukosa berlebih telah menghambat aktivitas selulase dengan cara membentuk kompleks dengan selulase. Menurut Holtzapple *et al.* (1990) selulase dari *T. viride* dapat dihambat oleh glukosa,  $\alpha$ -glukonolakton, selebiosia, dan pelarut organik seperti etanol, butanol, dan aseton. Menurut Izzati *et al.* (2010), jika kadar glukosa berlebih maka pembentukan glukosa juga akan berkurang (*feedback inhibition*).

Pada hari ke-5 sampai hari ke-8 juga terjadi kecenderungan penurunan nilai pH. Hal ini diduga karena terjadi akumulasi produk berupa gula reduksi sederhana yang dihasilkan dari hidrolisis selulosa secara acak pada ikatan 1,4-D-glycosidic. Perubahan pH tersebut dapat mempengaruhi kerja enzim karena terjadi perubahan pada daerah katalitik dan konformasi sifat ionik dari gugus karboksil dan gugus amino enzim

tersebut (Pelczar & Chan, 1986). Dick, Cheng & Wang (2000) juga menyatakan jika perubahan pH dapat menyebabkan terjadinya proses denaturasi sehingga menurunkan aktivitas enzim.

#### Total gula pereduksi

Total gula pereduksi yang dihasilkan selama hidrolisis enzimatis dapat dilihat pada Gambar 3 dengan kisaran 4,65-10,77 mg/ml. Hasil ini lebih rendah dibandingkan dengan hasil penelitian Saparianti, Dewanti & Dhoni (2012) yaitu 13,44 mg/ml. Penelitian Saparianti *et al.* (2012) menggunakan ampas tebu sebanyak 8% dengan kadar selulosa 47,59%. Perbedaan hasil tersebut diduga karena ada perbedaan kadar selulosa dari bahan baku yang digunakan. Bahan baku pada penelitian ini adalah limbah pengolahan agar (*Gracilaria* sp.) industri yang memiliki kadar selulosa sebesar 20,17% dan digunakan sebanyak 12,5%. Menurut Saparianti *et al.* (2012) semakin banyak substrat selulosa yang bisa dihidrolisis oleh selulase menjadi monomernya maka semakin meningkat kadar glukosanya. Namun jika dilihat dari jumlah selulosa yang digunakan, penelitian ini menggunakan selulosa yang lebih sedikit yaitu 2,52% dibandingkan penelitian Saparianti *et al.* (2012) yaitu 3,81%. Dengan penggunaan selulosa yang lebih sedikit, total gula pereduksi yang dihasilkan pun akan lebih rendah.

Dari Gambar 3 tampak bahwa total gula pereduksi tertinggi dihasilkan pada hari ke tiga. Peningkatan nilai ini diduga disebabkan adanya aktivitas selulase secara sinergis antara endo- $\beta$ -glukanase (CMCase), ekso- $\beta$ -glukanase, dan  $\beta$ -glukosidase (Belitz *et al.*, 2008). Tingginya kadar glukosa pada hari ke-3, ke-5, dan ke-7 diduga telah menghambat aktivitas selulase sehingga pembentukan glukosa menjadi terhambat. Hal tersebut diduga telah terjadi *feedback inhibition*



Gambar 3. Total gula pereduksi yang dihasilkan dari proses hidrolisis enzimatis.  
 Figure 3. Total sugar reducing resulted from enzymatic hydrolysis process.

pada hari ke-4, ke-6, ke-8 sampai ke sembilan yang mengakibatkan menurunnya nilai total gula pereduksi. Pada hidrolisis enzimatis ini terjadi penghambatan reversibel kompetitif. Kadar glukosa yang berlebih menghambat aktivitas selulase dengan cara membentuk kompleks dengan enzim tersebut sehingga terjadi persaingan antara glukosa dan substrat untuk membentuk kompleks dengan selulase. Jika kadar glukosa berlebih maka pembentukan glukosa juga menjadi berkurang (Izzati *et al.*, 2010).

Waktu hidrolisis enzimatis terbaik pada limbah pengolahan agar (*Gracilaria* sp.) PT. Agarindo Bogatama menggunakan *T. viride* adalah selama empat hari dengan aktivitas enzim CMC<sub>ase</sub> 210,48 IU/ml menghasilkan total gula pereduksi 6,74±0,29 mg/ml pada suhu 28±1 °C dan pH 3,91±0,02.

**Fermentasi dengan *S. cerevisiae***

Fermentasi dilakukan menggunakan *S. cerevisiae* yang memanfaatkan gula pereduksi yang dihasilkan

dari hidrolisis enzimatis menggunakan *T. viride* selama 4 hari yang besarnya 6,74±0,29 mg/ml.

**Nilai OD 600 nm *S. cerevisiae***

Nilai OD 600 nm *S. cerevisiae* selama empat hari inkubasi dapat dilihat pada Gambar 4. Nilai OD 600 nm *S. cerevisiae* tertinggi yaitu 0,0181 dicapai pada hari ke-2. Nilai ini lebih rendah dibandingkan hasil penelitian Ly *et al.* (2005) dengan media *yeast peptone dextrose* (YPD) pada suhu 30 °C yaitu 1,5-1,7. Hal ini diduga karena glukosa yang dihasilkan pada hidrolisis enzimatis ini sedikit sehingga mempengaruhi pertumbuhan *S. cerevisiae*. Selama fermentasi terjadi konsumsi glukosa oleh *S. cerevisiae* sehingga kemungkinan kadar glukosa berkurang sesuai dengan bertambahnya waktu fermentasi. Akibat bertambahnya waktu fermentasi maka aktivitas *S. cerevisiae* menurun sesuai dengan berkurangnya substrat dan nutrisi yang tersedia.



Gambar 4. Tingkat pertumbuhan (nilai OD 600 nm) *S. cerevisiae*.  
 Figure 4. Growth rate (OD 600 nm value) of *S. cerevisiae*

Menurut Belloch *et al.* (2008) khamir memerlukan substrat dan lingkungan yang sesuai untuk pertumbuhan dan perkembangbiakannya. Salah satu unsur dasar yang dibutuhkan dalam substrat adalah karbon dan karbon tersebut berasal dari gula pereduksi. Wignyanto *et al.* (2001) juga menyatakan konsentrasi gula pereduksi 10% merupakan media yang paling sesuai bagi *S. cerevisiae* untuk tumbuh.

Tingginya nilai OD-600 nm *S. cerevisiae* pada hari ke-2 diduga karena kondisi substrat telah optimum untuk mendukung khamir memanfaatkan gula pereduksi sebagai nutrisi untuk tumbuh. Tercatat pH dan suhu pada hari ke-2 masing-masing adalah  $4,66 \pm 0,16$  dan  $32 \pm 4$  °C. Menurut Arroyo-López *et al.* (2009) *S. cerevisiae* dapat melakukan fermentasi lebih cepat pada suhu kisaran 34,1 °C dan pH 4,76. Sedangkan pada hari ke-3 dan ke-4 nilai OD-600 nm *S. cerevisiae* mengalami penurunan. Hal ini diduga karena gula reduksi sebagai sumber unsur karbon sudah tidak mencukupi untuk menunjang pertumbuhan *S. cerevisiae*.

### Kadar etanol kasar

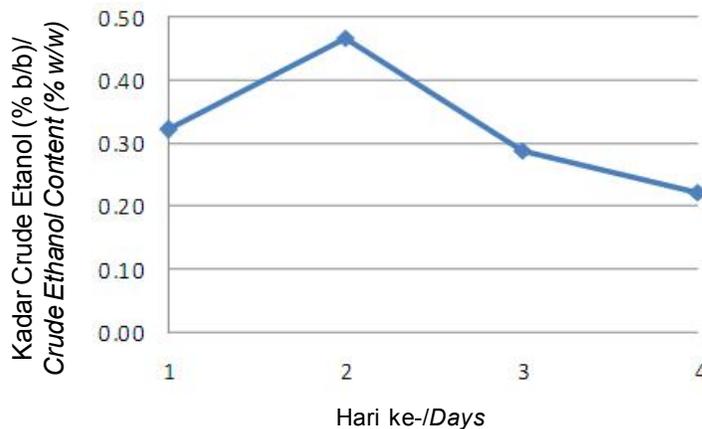
Kadar etanol kasar yang dihasilkan dari fermentasi oleh *S. cerevisiae* dapat dilihat pada Gambar 5. Kadar etanol kasar berkisar antara 0,22-0,47% (b/b). Kondisi tersebut dihasilkan dengan substrat gula reduksi sebanyak  $6,74 \pm 0,29$  mg/ml. Kadar tertinggi dicapai pada hari ke-2. Hasil ini lebih rendah dibandingkan dengan hasil penelitian Azizah, Al-Baari & Mulyani (2012) yaitu kadar etanol berkisar 1,21-2,25% dengan lama fermentasi selama 60 jam. Pada penelitian Azizah *et al.* (2012) digunakan substrat kulit nanas. Rendahnya kadar etanol kasar yang dihasilkan pada penelitian ini diduga karena pertumbuhan *S. cerevisiae* yang rendah akibat gula reduksi dalam substrat tidak tersedia dalam jumlah yang cukup. Kemungkinan lain

yang dapat terjadi adalah karena terjadinya pembentukan senyawa lain selain etanol yang menyebabkan efisiensi produksi etanol rendah (Gokarn *et al.*, 1997).

Menurunnya kadar etanol kasar pada hari ke-2 dan ke-3 diduga karena pertumbuhan *S. cerevisiae* telah mengalami penurunan dan kondisi substrat yang tidak optimum mendukung khamir menghasilkan etanol. Nilai pH dan suhu yang tercatat pada hari ke tiga dan ke empat berturut-turut adalah  $4,76 \pm 0,09$ ;  $4,79 \pm 0,05$ ;  $30 \pm 0$  °C; dan  $30 \pm 0$  °C. Kenaikan pH substrat diduga terjadi karena penurunan aktivitas *S. cerevisiae* sehingga mengurangi jumlah asam organik yang terbentuk sebagai hasil samping dalam pembuatan bioetanol. Menurut Reibstein *et al.* (1986) nilai pH awal media fermentasi sangat mempengaruhi kadar etanol yang dihasilkan. Hal ini disebabkan proton-proton mempengaruhi kinerja enzim-enzim dalam jalur *Emden Meyerhof Parnas* (EMP). Dengan pH substrat mengarah ke kondisi alkali, terdapat perubahan komposisi produk. Glukosa akan diubah menjadi gliserol, etanol, asetat, dan CO<sub>2</sub>. Sedangkan asetaldehid akan dioksidasi menjadi asetat dan NADH. NADH dipakai untuk mereduksi asetaldehid lainnya menjadi etanol. NADH hasil oksidasi glukosa menjadi 2 asetaldehid digunakan untuk mereduksi dihidroksiaseton fosfat menjadi gliserol fosfat kemudian menjadi gliserol.

Dari hasil fermentasi di atas maka penggunaan bioreaktor sistem *batch* pada penelitian ini belum tepat. Pada fermentasi hari ke-2 apabila ditambahkan gula reduksi dengan konsentrasi yang sesuai untuk mendukung pertumbuhan *S. cerevisiae* maka kadar etanol kasar dapat ditingkatkan.

Berdasarkan kadar etanol kasar yang diperoleh maka waktu terbaik fermentasi limbah pengolahan agar (*Gracilaria* sp.) industri ini adalah 2 hari dengan nilai OD-600 nm *S. cerevisiae* 0,018 dan



Gambar 5. Kadar etanol kasar yang dihasilkan selama proses fermentasi.  
Figure 5. Crude ethanol content resulted during fermentation process.

menghasilkan etanol kasar dengan kadar  $0,47 \pm 0,08\%$  (b/b) pada suhu  $32 \pm 4$  °C dan pH  $4,66 \pm 0,16$ . Menurut Sebayang (2006) kadar etanol tertinggi diperoleh sebesar 12,94% dengan waktu inkubasi *S. cerevisiae* selama 36 jam pada substrat molase. Sedangkan Sari et al. (2008) menyatakan lama fermentasi untuk memproduksi etanol paling tinggi sebesar 0,77% adalah 3 hari menggunakan substrat jerami padi dengan *T. viride* dan *S. cerevisiae*.

## KESIMPULAN

Produksi bioetanol dari limbah pengolahan agar (*Gracilaria sp.*) industri menghasilkan kadar etanol kasar tertinggi dengan waktu optimum sebagai berikut:

1. Hidrolisis enzimatis menggunakan *T. viride* adalah selama empat hari yang menghasilkan total gula pereduksi 6,74 mg/ml dengan aktivitas CMC<sub>50</sub> 210,48 IU/ml pada suhu 28 °C dan pH 3,91;
2. Fermentasi menggunakan *S. cerevisiae* adalah selama dua hari dengan tingkat pertumbuhan (OD 600 nm) 0,0181 dan menghasilkan kadar etanol kasar 0,47% (b/b) pada suhu 32 °C dan pH 4,66.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anon. 2009. Sisa Cadangan Minyak Indonesia 15 Tahun. <http://www.indomigas.com/sisa-cadangan-minyak-indonesia-15-tahun/>. Diakses pada tanggal 22 Februari 2013.
- Anindyawati, T. 2009. *Prospek Enzim dan Limbah Lignoselulosa untuk Produksi Bioetanol*. BS 44(1): 49- 56.
- AOAC. 2005. *Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemist*. Washington.
- Arnata, I. W. 2009. *Pengembangan Alternatif Teknologi Bioproses Pembuatan Bioetanol dari Ubi Kayu Menggunakan Trichoderma viride, Aspergillus niger dan Saccharomyces cerevisiae*. Tesis. Bogor: Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Arroyo-López, F. N., Orlic, S., Querol, A., and Barrio, E. 2009. Effects of Temperature, pH and Sugar Concentration on the Growth Parameters of *Saccharomyces cerevisiae*, *S. kudriavzevii* and Their Interspecific Hybrid. *International Journal of Food Microbiology*. 131: 120–127.
- Azizah, N., Al-Baari, A. N., Mulyani, S. 2012. Pengaruh Lama Fermentasi terhadap Kadar Alkohol, pH, dan Produksi Gas pada Proses Fermentasi Bioetanol dari Whey dengan Substitusi Kulit Nanas. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*. 1(2): 72-77.
- Belitz, H. D., Grosch, W., and Schieberle, P. 2008. *Food Chemistry*, 4<sup>th</sup> ed. Berlin: Springer-Verlag. p. 327-337.
- Belloch, C., Orlic, S., Barrio, E., and Querol, A. 2008. Fermentative stress adaptation of hybrids within the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *International Journal of Food Microbiology*. 122: 188-195.
- Bergman, L. W. 2001. *Growth and Maintenance of Yeast*. Methods in Molecular Biology Vol. 177. Two-Hybrid Systems: Methods and Protocols Edited by: P. N. MacDonald © Humana Press Inc., Totowa, NJ. 9-14.
- Borines, M.G., Leon, R.L.D, and Cuello, J.L. 2013. Bioethanol production from the macroalgae *Sargassum spp.* *Bioresource Technology*. 138: 22-29.
- Dick, W. A., L. Cheng and P. Wang. 2000. Soil acid and alkaline phosphatase activity as pH adjustment indicators. *Journal of Soil Biology & Biochemistry* 32: 1915-1919.
- Elevri, P.A. and Putra, S.R. 2006. Produksi etanol menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* yang diamobilisasi dengan agar batang. *Akta Kimia Indonesia*. 1(2): 105-114.
- Ge, L., Peng, W., and Haijin, M. 2011. Study on *Saccharification* techniques of seaweed wastes for the transformation of ethanol. *Renewable Energy*. 36: 84-89.
- Gokarn, R.R., Eitman, M.A., and Sridhar, J. 1997. Production of succinate by anaerobic microorganisms in fuels and chemicals from biomass. In B.C. Saha and J. Woodward (eds.). *American Chemical Society. Washington-DC*. p. 237-263.
- Gunam, I. B. W., Aryanta, W. R., dan Darma, I. B. N. S. 2011. Produksi Selulase Kasar dari Kapang *Trichoderma viride* dengan Perlakuan Konsentrasi Substrat Ampas Tebu dan Lama Fermentasi. *Jurnal Biologi XV*(2): 29 – 33.
- Harvey, F. 2008. *Bioetanol Berbahan Dasar Ampas Rumput Laut*. Under Graduate. [Thesis]. Bogor Agricultural University.
- Hogg, S. 2005. *Essential Microbiology*. John Wiley & Sons Ltd: England. 454pp.
- Holtzapfel, M., Cognata, M., Shu, Y., and Hendrickson, C. 1990. Inhibition of *Trichoderma reesei* Cellulase by Sugars and Solvents. *Biotechnology and Bioengineering*. 36: 275-287.
- Horn, S.J. 2000. Bioenergy from Brown Seaweeds. [Thesis]. Department of Biootechnology. Norwegian University of Science and Technology. 18 September 2008. [http://www.diva-portal.org/diva/getDocument?urn\\_nbn\\_no\\_ntnu\\_diva-547-1\\_\\_fulltext.pdf](http://www.diva-portal.org/diva/getDocument?urn_nbn_no_ntnu_diva-547-1__fulltext.pdf). Diakses pada tanggal 14 Januari 2009.
- Irawati, D. 2006. *Pemanfaatan Serbuk Kayu untuk Produksi Etanol* [Tesis]. Bogor: Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Izzati, N., Yusnidar, R., Rahmawati F. D., dan Hidayat, F. 2010. Pengaruh Perlakuan Awal Autoklaf dan Autoklaf-Impregnasi terhadap Pensen Sakarifikasi Ampas Tebu secara Enzimatis menjadi Bioetanol sebagai Bahan Bakar Alternatif. *Program Kreativitas Mahasiswa*. Universitas Negeri Malang. Malang.
- Kim, G. S., Myung, K. S., Kim, Y. J., Oh, K. K., Kim, J. S., Ryu, H. J., and Kim, K. H. 2007. *Methods of Producing Biofuel Using Sea Algae*. Seoul: World Intellectual Property Organization.

- Lin, Yan, and S. Tanaka. 2006. Ethanol Fermentation from Biomass Resources: Current State and Prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69: 627-642.
- Loebis, E. H. 2008. *Optimasi Proses Hidrolisis Kimiawi dan Enzimatis Tandan Kosong Kelapa sawit menjadi Glukosa untuk Produksi Etanol* [Tesis]. Bogor: Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Ly, D. Yu, D., Girten, B., and Cohen J. 2005. Testing of *Saccharomyces cerevisiae* Morphological Fixatives and Fixed Samples Stored at Ambient Temperature. *Gravitational and Space Biology.* 18(2): 105-106.
- Mandels, M., Andreotti, R., and Roche, C. 1976. Measurement of Saccharifying Cellulase. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 6: 21-23.
- Miller, G. L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* 31(3): 426-428.
- Neethu, K., Rubeena, M., Sajith, S., Sreededi, S., Priji, P., Unni, K. N., Sarath Josh, M. K., Jisha, V. N. Pradeep, S., and Benjamin, S. 2012. A Novel Strain of *Trichoderma viride* Shows Complete Lignocellulolytic Activities. *Advances in Bioscience and Biotechnology.* 3: 1160-1166.
- Osvaldo, Z. S., Putra, S. P., dan Faizal, M. 2012. Pengaruh Konsentrasi Asam dan Waktu pada Proses Hidrolisis dan Fermentasi Pembuatan Bioetanol dari Alang-Alang. *Jurnal Teknik Kimia.* 2(18): 52-62.
- Pelczar, M. J. and E. C. S. Chan. 1986. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Penerjemah: Hadi, R. S. Jakarta: UI Press. 443 pp.
- Prihatini, R. I. 2008. Analisa Kecukupan Panas pada Proses Pasteurisasi Santan [Skripsi]. Bogor: Departemen Teknologi Industri Pertanian. Fakultas Teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor.
- Reibstein, D., Hollander, J. A., Pilkis, S. J. and Shulman, R. G. 1986. Studies on The Regulation of Yeast *Phosphofructo-1-kinase*: Its Role in Aerobic and Anaerobic Glycolysis. *Biochemistry.* 25: 219-227.
- Saparianti, E., Dewanti, T., dan Dhoni, S. K. 2012. Hidrolisis Ampas Tebu menjadi Glukosa Cair oleh Kapang *Trichoderma viride* (Kajian Konsentrasi Ampas Tebu (*Saccharum officinarum*) dan Lama Fermentasi). *J. Tek. Pert.* 5(1): 1 – 10.
- Sari, I. M., Noverita dan Yulneriwarni. 2008. Pemanfaatan Jerami Padi dan Alang-alang dalam Fermentasi Etanol Menggunakan kapang *Trichoderma viride* dan Khamir *Saccharomyces cerevisiae*. *Vis. Vitalis.* 5(2): 55-62.
- Sari, R. N. 2010. Kajian Proses Produksi Bioetanol dari Rumput Laut Coklat (*Sargassum duplicatum*). [Tesis]. Bogor: Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Sebayang, F. 2006. Pembuatan Etanol dari Molase secara fermentasi Menggunakan Sel *Saccharomyces cerevisiae* yang Terimobilisasi pada Kalsium Alginat. *Jurnal Teknologi Proses.* 5(2): 68-74.
- Sedayu, B. B., Widiyanto, T. N., Basmal, J., dan Utomo, B. S. B. 2008. Pemanfaatan Limbah Padat Pengolahan Rumput Laut *Gracilaria* sp. untuk Pembuatan Papan partikel. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan.* 3(1): 1-9.
- Shofiyanto, M. E. 2008. Hidrolisis Tongkol Jagung oleh Bakteri Selulolitik untuk Produksi Bioetanol dalam Kultur Campuran [Skripsi]. Bogor: Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
- Subekti, H. 2006. Produksi Etanol dari Hidrolisat Fraksi Selulosa Tongkol Jagung oleh *Saccharomyces cerevisiae* [Skripsi]. Bogor: Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
- Triwisari, D. A. 2010. *Fraksinasi Polisakarida beberapa Jenis Rumput Laut*. [skripsi]. IPB.
- Ujiani, N. 2007. *Pengaruh Konsentrasi Polypropylene dan Ukuran Partikel Limbah Padat Agar-agar Terhadap Kualitas Papan Partikel*. [skripsi]. Bogor: Departemen THH, IPB.
- Wignyanto, Suharjono, dan Novita. 2001. Pengaruh Konsentrasi Gula Reduksi Sari Hati Nanas dan Inokulum *Saccharomyces cerevisiae* pada Fermentasi Etanol. *Jurnal Teknologi Pertanian.* 2(1): 68-77.
- Zhou, J., Y. H. Wang, J. Chu, Y. P. Zhuang, S. L. Zhang, and P. Yin. 2008. Identification and Purification of the Main Components of Cellulases from a Mutant Strain of *Trichoderma viride* T 100-14. *Bioresour. Technol.* 99: 6826-6833.