



PRODUKSI SUBSTRAT FERMENTASI BIOETANOL DARI ALGA MERAH *Gracilaria verrucosa*

Firstyarikha Habibah*), Samuel Budi Wardhana Kusuma dan Nanik Wijayati

Jurusan Kimia FMIPA Universitas Negeri Semarang

Gedung D6 Kampus Sekaran Gunungpati Telp. (024)8508112 Semarang 50229

Info Artikel

Sejarah Artikel:
Diterima Januari 2016
Disetujui Pebruari 2016
Dipublikasikan Mei 2016

Kata kunci:
substrat fermentasi
bioetanol
hidrolisis

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi HCl dan waktu pada proses hidrolisis untuk menghasilkan substrat fermentasi bioetanol dari *Gracilaria verrucosa* dengan kandungan gula reduksi tinggi serta karakterisasi substrat yang dihasilkan. Setelah mendapatkan substrat fermentasi bioetanol yang mengandung gula reduksi, substrat difermentasi dengan ragi roti selama 7 hari, kemudian diambil filtratnya untuk selanjutnya didistilasi. Distilat yang keluar dianalisis secara fisika dan kimia serta dianalisis menggunakan instrumen GC-MS. Dari hasil analisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis, hidrolisis yang paling optimum dilakukan dengan HCl 30% selama 3 jam dengan konsentrasi gula reduksi sebesar 1493,33 ppm. Hasil analisis distilat hasil fermentasi secara fisika dan kimia sama dengan hasil analisis etanol *pro analyst*, dan ketika dianalisis menggunakan GC-MS diketahui distilat mengandung senyawa etanol.

Abstract

This study aimed to determine the effect of HCl concentration and the time spent on the hydrolysis to produce fermentation substrate bioethanol from *Gracilaria verrucosa* with high grade of reducing sugar and characterization of the resulting substrate. After obtaining the fermentation substrate bioethanol containing a reducing sugar, substrate fermented with yeast bread for 7 days and then taken the filtrate to distilled. Distillates analyzed on the physical and chemical analysis and analyzed using GC-MS instruments in order to determine that the distillate containing ethanol compounds. According to the analysis by UV-Vis, the most optimal hydrolysis carried out at HCl concentration 30% for 3 hours with a concentration of reducing sugars is 1493.33 ppm. The results of the analysis physics and chemistry of the fermentation distillate as same as the analysis results of ethanol *pro analyst*, and when analyzed by GC-MS is known distillate containing ethanol compounds.

Pendahuluan

Dalam beberapa tahun terakhir ini Indonesia mengalami kelangkaan bahan bakar minyak (BBM) yang disebabkan oleh menipisnya persediaan minyak bumi dan harga minyak dunia yang tidak stabil. Hal ini sangat berlawanan dengan semakin tingginya kebutuhan masyarakat akan BBM. Untuk memenuhi kebutuhan dan konsumsi BBM harus dicari sumber energi alternatif yang terbarukan. Salah satunya dengan mengkonversi biomassa menjadi bioetanol.

Bioetanol merupakan salah satu jenis biofuel (bahan bakar cair dari pengolahan tumbuhan) disamping biodiesel. Bahan baku untuk proses produksi bioetanol diklasifikasikan menjadi tiga kelompok, yaitu gula, pati dan selulosa. Sumber gula yang 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 selulosa yang berasal dari kayu, limbah pertanian, limbah pabrik *pulp* dan kertas, semuanya harus dikonversi menjadi gula (Lin dan Tanaka; 2006).

Salah satu sumber selulosa yang dapat dikonversi menjadi gula dan kemudian difermentasi menjadi bioetanol adalah rumput laut jenis alga merah *Gracilaria verrucosa*. Alga merah ini mengandung selulosa sebesar 13,04%, lignin sebesar 3,84% dan ketika difermentasi dengan *Zymomonas mobilis* mampu menghasilkan bioetanol perkilogram alga merah sebesar 23,01% dengan kadar 29,60% (Ahmad; 2014).

Alga merah *Gracilaria verrucosa* yang merupakan biomassa berlignoselulosa ini dapat dimanfaatkan menjadi bioetanol karena akan menghasilkan gula ketika dihidrolisis dan jika dilanjutkan dengan fermentasi akan menghasilkan bioetanol. Hidrolisis yang paling sering digunakan untuk menghidrolisis selulosa adalah hidrolisis secara asam. Beberapa asam yang umum digunakan untuk hidrolisis asam antara lain adalah asam sulfat, asam perklorat, dan asam klorida. Hidrolisis asam dapat dikelompokkan menjadi hidrolisis asam pekat dan hidrolisis asam encer (Taherzadeh & Karimi; 2007). Penggunaan asam pekat pada proses hidrolisis selulosa dilakukan pada temperatur yang lebih rendah daripada asam encer. Konsentrasi asam yang digunakan adalah 10-30%. Temperatur reaksi adalah 100°C dan membutuhkan waktu reaksi antara 2-6 jam.

Temperatur yang lebih rendah meminimalisasi degradasi gula. Keuntungan dari penggunaan asam pekat ini adalah konversi gula yang dihasilkan tinggi, yaitu dapat mencapai konversi 90% (Badger; 2002).

Pada penelitian ini dilakukan hidrolisis menggunakan HCl. Berdasarkan penelitian Siswati *et al.* (2009), katalis HCl menghasilkan glukosa lebih tinggi dibandingkan H₂SO₄. Hal ini terjadi karena H₂SO₄ bersifat membakar selulosa sedangkan HCl tidak, sehingga glukosa yang dihasilkan lebih sedikit. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi HCl dan waktu pada proses hidrolisis kimiawi untuk menghasilkan substrat fermentasi bioetanol dengan kandungan gula reduksi tinggi serta karakterisasi substrat yang dihasilkan.

Setelah hidrolisis berjalan sempurna maka dilanjutkan dengan fermentasi. Proses fermentasi dilakukan untuk mengetahui bahwa substrat yang dihasilkan dari proses hidrolisis ketika difermentasi menghasilkan bioetanol. Fermentasi dilakukan dengan penambahan ragi roti (*Saccharomyces cerevisiae*), salah satu spesies ragi yang dikenal mempunyai daya konversi gula menjadi etanol, yang menghasilkan enzim *zimase* dan *invertase*. Enzim *zimase* berfungsi sebagai pemecah sukrosa menjadi monosakarida (glukosa dan fruktosa). Enzim *invertase* selanjutnya mengubah glukosa menjadi etanol (Judoamidjojo, *et al.*; 1992).

Metode Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah alga merah *Gracilaria verrucosa*, akuades, akuabides, HCl, NaOH, H₂SO₄, asam 3,5-dinitrosalisilat, *rochelle salt*, fenol, natrium bisulfit, glukosa, bufer fosfat, kalium kromat, etanol *pro analyst* buatan *Merck*, ammonium sulfat padat, dan urea. Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah spektrofotometer genesys 20, abbe-refraktometer, dan GC-MS QP-2010SE SHIMADZU.

Prosedur penelitian meliputi persiapan bahan baku dilakukan dengan alga merah *Gracilaria verrucosa* dicuci bersih kemudian dikeringkan dengan sinar matahari. Sampel kering dipotong dengan ukuran 1-2 cm, dihaluskan dengan blender hingga menjadi serbuk kasar dan dioven dengan suhu 60°C selama 4 jam. Serbuk kasar alga merah *Gracilaria verrucosa* yang telah kering diblender kembali hingga menjadi serbuk halus kemudian diayak menggunakan pengayak berukuran 100

mesh. Serbuk alga merah *Gracilaria verrucosa* yang lolos ayakan 100 *mesh* dipakai sebagai sampel untuk perlakuan selanjutnya.

Delignifikasi dilakukan dengan menggunakan 350 g serbuk alga merah *Gracilaria verrucosa* ditambah NaOH 0,01 M hingga terendam semua. Proses perendaman dilakukan selama 24 jam. Setelah 24 jam residu dicuci dengan air panas hingga netral dan dikeringkan di oven pada suhu 105°C. Residu kering digerus dalam cawan porselin kemudian diayak dengan ayakan 50 *mesh*. Residu hasil delignifikasi dengan ukuran 50 *mesh* siap digunakan untuk proses hidrolisis. Namun sebelum dihidrolisis, serbuk alga merah *Gracilaria verrucosa* dan serbuk alga merah hasil delignifikasi dianalisis kadar lignin dan selulosanya terlebih dahulu.

Proses hidrolisis dilakukan menggunakan 10 g serbuk *Gracilaria verrucosa* hasil delignifikasi ditambah dengan 100 mL HCl sesuai variasi konsentrasi (10, 20, dan 30%). Campuran ini dimasukkan dalam labu leher tiga dilengkapi pendingin balik dengan suhu 100°C selama waktu tertentu sesuai variasi (1, 2, dan 3 jam). Campuran kemudian disaring dan filtrat masing-masing dianalisis kadar glukosanya dengan spektrofotometer UV-Vis. Setelah mendapatkan substrat fermentasi bioetanol yang mengandung gula reduksi, substrat difermentasi.

Proses fermentasi dilakukan dengan mengambil 50 mL filtrat dari proses hidrolisis dimasukkan ke dalam erlenmeyer. Kemudian mengatur pH filtrat menjadi 5 lalu ditambah dengan 3 g ammonium sulfat dan 3 g urea sebagai nutrisi. Selanjutnya dilakukan pasteurisasi pada suhu 80°C selama 15 menit lalu didinginkan. Ditambahkan 3 g ragi roti (*Saccharomyces cerevisiae*). Selanjutnya diinkubasi dengan cara menutup rapat labu erlenmeyer pada suhu berkisar antara 27-30°C selama 7 hari. Kemudian disaring dan diambil filtratnya untuk proses distilasi.

Proses distilasi dilakukan dengan memasukkan hasil fermentasi dalam labu alas bulat dan labu distilat dipasang pada alat distilasi. Sampel didistilasi pada suhu 80°C hingga teruapkan semua atau tidak ada cairan yang menetes. Kemudian distilat dimasukkan dalam botol siap untuk dianalisis secara fisika dan kimia serta dianalisis menggunakan instrumen GC-MS.

Hasil dan Pembahasan

Alga merah *Gracilaria verrucosa* merupakan

biomassa berlignoselulosa yang mengandung lignin, selulosa dan hemiselulosa. Bahan yang mengandung selulosa ini dapat dimanfaatkan menjadi bioetanol. Namun, karena adanya lignin, selulosa dalam alga merah *Gracilaria verrucosa* diisolasi terlebih dahulu sebelum dihidrolisis dengan cara menghilangkan lignin (delignifikasi).

Serbuk alga merah *Gracilaria verrucosa* dianalisis lignin dan selulosanya terlebih dahulu sebelum didelignifikasi. Hal ini dilakukan untuk mengetahui efektivitas proses penghilangan lignin (delignifikasi) yang dilakukan. Analisis lignin dan selulosa dilakukan dengan metode Chesson (Datta; 1981). Analisis ini dilakukan di laboratorium *Chem-Mix Pratama* Yogyakarta dengan hasil tertera pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi kimia substrat selulosa alga merah *Gracilaria verrucosa*

| Komposisi kimia | Jumlah (%) |
|-----------------|------------|
| Lignin | 3,33 |
| Selulosa | 4,48 |

Delignifikasi adalah perlakuan pendahuluan (*pretreatment*) yang merupakan suatu proses pembebasan lignin dari suatu senyawa kompleks (Gunam, *et al.*; 2010). Proses ini penting dilakukan sebelum hidrolisis bahan selulosa karena adanya lignin ini dapat menghambat proses hidrolisis (Judoamidjojo, *et al.*; 1989).

Proses delignifikasi dilakukan secara kimia menggunakan larutan NaOH 0,01 M. Penggunaan larutan NaOH karena larutan ini dapat menyerang dan merusak struktur lignin, bagian kristalin dan *amorf*, melarutkan lignin dan hemiselulosa serta menyebabkan pengembangan struktur selulosa (Gunam, *et al.*; 2010). Proses delignifikasi ini menyebabkan perubahan warna dan berat serbuk alga merah *Gracilaria verrucosa*. Untuk warnanya, dari abu-abu berubah menjadi hijau muda kecoklatan, sedangkan beratnya mengalami penurunan dari 350 g menjadi 321,108 g.

Analisis lignin dan selulosa hasil delignifikasi dilakukan dengan metode Chesson (Datta; 1981). Analisis ini dilakukan di laboratorium *Chem-Mix Pratama* Yogyakarta dengan hasil tertera pada Tabel 2. Dari Tabel 2 diketahui bahwa proses delignifikasi yang dilakukan mampu mengurangi lignin sebesar 0,84% sehingga meningkatkan kadar selulosa dalam sampel. Selanjutnya sampel hasil delignifikasi ini digunakan untuk proses hidrolisis.

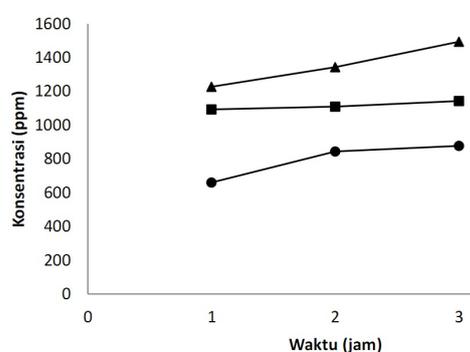
Proses hidrolisis pada penelitian ini dilakukan menggunakan HCl dengan variasi

konsentrasi (10-30%) dan variasi waktu (1-3 jam) dengan temperatur 100°C untuk mendapatkan kondisi optimum sehingga didapatkan glukosa dengan kadar tertinggi dari hidrolisis selulosa alga merah *Gracilaria verrucosa*. Glukosa ini digunakan sebagai substrat fermentasi untuk tahap selanjutnya dalam pembuatan bioetanol.

Tabel 2. Komposisi kimia substrat selulosa alga merah *Gracilaria verrucosa* hasil delignifikasi

| Komposisi kimia | Jumlah (%) |
|-----------------|------------|
| Lignin | 2,50 |
| Selulosa | 5,51 |

Hasil pengukuran sampel hasil hidrolisis alga merah *Gracilaria verrucosa* menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 585 nm ditunjukkan pada Gambar 1.



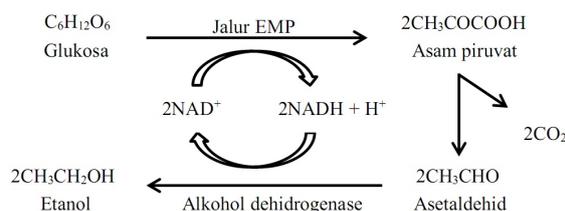
Gambar 1. Kadar glukosa (ppm) hasil hidrolisis kimiawi dengan perbedaan konsentrasi HCl: 10% (●), 20% (■), 30% (▲)

Gambar 1. menunjukkan kadar glukosa tertinggi yaitu sebesar 1493,33 ppm hasil hidrolisis alga merah *Gracilaria verrucosa* pada penggunaan HCl konsentrasi 30% dengan waktu refluks selama 3 jam. Dalam proses hidrolisis asam, gugus H⁺ dari HCl akan mengubah gugus selulosa dari alga merah *Gracilaria verrucosa* menjadi gugus radikal bebas. Gugus radikal bebas selulosa yang kemudian akan berikatan dengan OH dari air dan akan bereaksi menghasilkan glukosa (Hikmiyati dan Yanie; 2008). Dalam penelitian ini, semakin tinggi konsentrasi HCl yang digunakan dan waktu refluks semakin lama, semakin tinggi kadar glukosa yang dihasilkan. Hal ini terjadi karena gugus radikal bebas dari selulosa alga merah *Gracilaria verrucosa* yang dihasilkan semakin banyak, sehingga glukosa yang dihasilkan maksimal. Dengan demikian hidrolisis pada alga merah *Gracilaria verrucosa* dengan hasil optimum menggunakan HCl konsentrasi 30% selama 3 jam. Kemudian filtrat hasil hidrolisis ini akan difermentasi guna memastikan bahwa filtrat dapat digunakan sebagai substrat fermentasi yang ketika difermentasi dapat menghasilkan

etanol.

Proses fermentasi dilakukan untuk memastikan bahwa substrat dari hasil hidrolisis kimiawi yang mengandung gula pereduksi ketika difermentasi dengan ragi *Saccharomyces cerevisiae* dapat menghasilkan etanol. Penggunaan ragi ini karena *Saccharomyces cerevisiae* dikenal sebagai mikroorganisme unggul dalam proses fermentasi hingga menghasilkan alkohol. *Saccharomyces cerevisiae* memerlukan media dan lingkungan yang sesuai untuk pertumbuhan dan perkembangannya hingga kerjanya bisa optimal. Dalam penelitian ini menggunakan urea dan ammonium sulfat dengan pH 5 sebagai sumber nutrisi untuk mempercepat pertumbuhan mikroba.

Fermentasi glukosa oleh ragi berlangsung secara anaerob yaitu prosesnya tidak membutuhkan oksigen karena adanya oksigen dapat menyebabkan oksidasi etanol yang terbentuk menjadi asam asetat. Mikroba *Saccharomyces cerevisiae* memfermentasi glukosa menjadi etanol menggunakan jalur *Embden Meyerhoff Parnas* (EMP). Reaksi selengkapnya tertera seperti pada Gambar 2.



Gambar 2. Skema jalur fermentasi glukosa oleh ragi

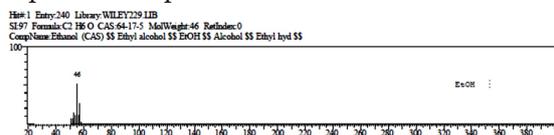
Proses distilasi hasil fermentasi bertujuan untuk memisahkan cairan dari campurannya berdasarkan titik didihnya. Dari hasil fermentasi ini senyawa yang menguap terlebih dahulu adalah etanol dengan titik didih 78,3°C dan air dengan titik didih 100°C, dibandingkan dengan senyawa-senyawa lain dalam campuran seperti glukosa dengan titik didih 146°C dan asam asetat dengan titik didih 118,1°C. Distilasi dihentikan jika sudah tidak ada distilat yang menetes dalam erlenmeyer. Selanjutnya distilat dimasukkan dalam botol sampel untuk kemudian dianalisis sifat fisik dan kimia bioetanol meliputi titik nyala, indeks bias dan reaksi terhadap kalium kromat serta dianalisis menggunakan instrumen GC-MS.

Proses distilasi memberikan data Tabel 3. yang memuat informasi perbandingan sifat fisik dan kimia antara bioetanol yang dihasilkan dari proses distilasi hasil hidrolisis dengan etanol *pro analyst*.

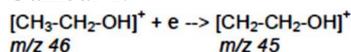
Tabel 3. Perbandingan sifat fisik, kimia dan analisis menggunakan GC-MS antara bioetanol hasil hidrolisis dengan etanol *pro analyst*

| No | Substrat | pH | Nyala api | Indeks bias | Reaksi dengan K ₂ CrO ₄ | Waktu retensi (menit) |
|----|----------------------|----|-----------|-------------|---|-----------------------|
| 1 | Hasil hidrolisis | 4 | Nyala | 1,360 | Larutan berwarna hijau | 1,863 4,428 |
| 2 | Kontrol (Etanol 99%) | 4 | Nyala | 1,361 | Larutan berwarna hijau | 1,972 |

Pada data Tabel 3. bioetanol hasil hidrolisis mempunyai indeks bias yang hampir mendekati etanol *pro analyst* dan ketika direaksikan dengan larutan K₂CrO₄ yang diasamkan dengan H₂SO₄ encer terjadi oksidasi yang ditandai dengan larutan jingga yang mengandung ion kromat direduksi menjadi larutan hijau yang mengandung ion-ion kromium. Hal ini berarti dalam hasil hidrolisis yang difermentasi terkandung etanol. Selanjutnya distilat diuji menggunakan instrumen GC-MS. Hasil analisis GC, distilat memiliki 2 komponen dominan dengan waktu retensi 1,863 dan 4,428. Waktu retensi pertama menunjukkan bahwa senyawa adalah etanol karena mendekati waktu retensi etanol *pro analyst* yaitu 1,972, sedangkan dari waktu retensi kedua belum diketahui jenis senyawa yang terkandung. Untuk memperjelas senyawa yang terkandung di dalam distilat fermentasi glukosa hasil hidrolisis, selanjutnya dilakukan analisis kromatogram MS. Hasil spektrum MS untuk komponen pertama diperlihatkan pada Gambar 3.

**Gambar 3.** Spektrum MS komponen pertama dari distilat fermentasi glukosa hasil hidrolisis kimiawi

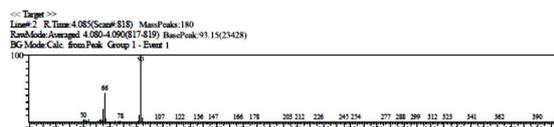
Kromatogram senyawa etanol muncul pada waktu retensi 1,863 dan pembacaan pada MS yang terlihat pada Gambar 3. muncul Mr senyawa etanol yaitu Mr = 46. Dalam spektrum MS ini etanol tidak terfragmentasi secara sempurna sehingga hanya muncul m/z = 46. Pola fragmentasi etanol yang disarankan terlihat pada Gambar 4.

**Gambar 4.** Fragmentasi etanol

Hasil spektrum MS untuk komponen kedua diperlihatkan pada Gambar 5. Pada komponen kedua dengan waktu retensi 4,428 ini muncul senyawa X. Hal ini dimungkinkan terjadi degradasi lanjut etanol menjadi polimer.

Dari spektrum MS pada Gambar 3. dan 5.

menunjukkan bahwa distilat hasil fermentasi glukosa dari hidrolisis kimiawi mengandung senyawa etanol, namun juga terdapat senyawa lain. Hal ini terjadi karena proses hidrolisis yang dilakukan untuk mengubah selulosa alga merah menjadi glukosa oleh HCl kurang sempurna, sehingga ketika dilakukan fermentasi muncul senyawa lain.

**Gambar 5.** Spektrum MS komponen kedua dari distilat fermentasi glukosa hasil hidrolisis secara kimiawi

Simpulan

Hidrolisis yang paling baik dilakukan dengan HCl 30% selama 3 jam dibanding HCl 10% dan 20% serta waktu refluks 1 jam dan 2 jam dengan konsentrasi gula reduksi sebesar 1493,33 ppm. Substrat yang dihasilkan dari proses hidrolisis ketika difermentasi menghasilkan bioetanol dibuktikan dengan hasil analisis distilat hasil fermentasi secara fisika dan kimia sama dengan hasil analisis etanol *pro analyst* dan hasil dianalisis menggunakan GC-MS diketahui distilat mengandung senyawa etanol.

Daftar Pustaka

- Ahmad, A. 2014. Bioethanol Production from Cellulose in Red Algae *Gracilaria verrucosa* by Separated Hydrolysis and Fermentation System Using *Trichoderma viride* and *Zymomonas mobilis*. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 5(2): (B) 445-452
- Badger, P.C. 2002. *Ethanol from Cellulose: A General Review*. In *Trend in New Crops and New Uses.*, J. Jannick and A. Whipkey (eds). Alexandria, VA: ASHS Press
- Gunam, I.B.W., K. Buda, I.M.Y.S. Guna. 2010. Pengaruh Perlakuan Delignifikasi dengan Larutan NaOH Konsentrasi Substrat Jerami Padi terhadap Produksi Enzim Selulase dari *Aspergillus niger* NRRL A-II, 264. *Jurnal Biologi XIV*: 55-61
- Hikmiyati, N. dan N.S. Yanie. 2008. *Pembuatan Bioetanol dari Limbah Kulit Singkong Melalui Proses Hidrolisa Asam dan Enzimatis*. Makalah. Undip. Semarang
- Judoamidjojo, R.M., E.G. Said dan L. Hartoto. 1989. *Biokonversi*. PAU Bioteknologi IPB, Bogor
- Judoamidjojo, M., A.D. Abdul, G.S. Endang. 1992. *Teknologi Fermentasi*. Rajawali Press. Jakarta
- Lin, Y., dan S. Tanaka. 2006. Ethanol Fermentation from Biomass Resources: Current State and Prospects. *Appl. Microbiol Biotechnol*, 69:627-642

- Siswati, N.D., M. Yatim, R. Hidayanto. 2011. Bioetanol dari Limbah Kulit Kopi dengan Proses Fermentasi Bioetanol dari Limbah Kulit Kopi dengan Proses Fermentasi. *Jurnal Teknik Kimia*, 2(5): 787-790
- Taherzadeh, M. dan K. Karimi, K. 2007. Acid-based Hydrolysis Processes for Ethanol from Lignocellulosic Material. *Bioresources*, 2(3): 472-499