PENGARUH KONSENTRASI ASAM PADA PROSES HIDROLISIS DAN WAKTU FERMENTASI TERHADAP PEMBUATAN BIOETANOL DARI *Gracilaria verrucosa*

SKRIPSI

Oleh:
IDHEA PERMEI
NIM. 17630060

PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2022

PENGARUH KONSENTRASI ASAM PADA PROSES HIDROLISIS DAN WAKTU FERMENTASI TERHADAP PEMBUATAN BIOETANOL DARI *Gracilaria verrucosa*

SKRIPSI

Oleh:
IDHEA PERMEI
NIM. 17630060

Diajukan Kepada:
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)

PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
202

PENGARUH KONSENTRASI ASAM PADA PROSES HIDROLISIS DAN WAKTU FERMENTASI TERHADAP PEMBUATAN BIOETANOL DARI *Gracilaria verrucosa*

SKRIPSI

Oleh:
IDHEA PERMEI
NIM.17630060

Telah Diperiksa dan Disetujui
untuk Diuji Tanggal: 25 Mei 2022

Pembimbing I	Pembimbing II
Rachmawati Ningsih, M.Si	A.Ghanaim Fasya, M.Si
NIP.19810811 200801 2 010	NIP.19820616 200604 1 002

Mengetahui,
Ketua Program Studi

Rachmawati Ningsih, M.Si
NIP.19810811 200801 2 010

PENGARUH KONSENTRASI ASAM PADA PROSES HIDROLISIS DAN WAKTU FERMENTASI TERHADAP PEMBUATAN BIOETANOL DARI *Gracilaria verrucosa*

SKRIPSI

Oleh:
IDHEA PERMEI
NIM.17630060

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 22 Juni 2022

Ketua Penguji	**: Suci Amalia, M.Sc** **NIP. 19821104 200901 2 007**	(.....)
Anggota Penguji I	**: Ahmad Hanapi, M.Sc** **NIDT. 19851225 20160801 1 069**	(.....)
Anggota Penguji II	**: Rachmawati Ningsih, M.Si** **NIP. 19810811 200801 2 010**	(.....)
Anggota Penguji III	**: A. Ghanaim Fasya, M.Si** **NIP. 19820616 200604 1 002**	(.....)

Mengetahui,
Ketua Program Studi

Rachmawati Ningsih, M.Si
NIP. 19810811 200801 2 010

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama	: Idhea Permei
NIM	:17630060
Program Studi	: Kimia
Fakultas	: Sains dan Teknologi
Judul Penelitian	:Pengaruh Konsentrasi Asam pada Proses Hidrolisis dan Waktu Fermentasi terhadap Pembuatan Bioetanol dari *Gracilaria verrucosa*

menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 30 Mei 2022
Yang membuat pernyataan,

Idhea Permei
NIM. 17630060

HALAMAN PERSEMBAHAN

Alhamdulillahi rabbil'alamin, segala puji syukur bagi Allah SWT saya panjatkan atas segala limpahan rahmat, karunia, dan ridho-Nya, sehingga saya dapat menyelesaikan tugas akhir saya yang masih jauh dari kata sempurna. Tak lupa lantunan sholawat serta salam selalu tercurahkan kepada Nabi Muhammad SAW, saya persembahkan karya sederhana ini kepada:

Kedua orang tua saya, Ibu Sulikah dan Bapak Slamet Santoso, yang selalu menengadah tangan untuk melangitkan doa terbaiknya demi kesuksesan putra-putri nya. Terimakasih atas dukungan, nasehat, dan pengorbanannya sebagai bentuk cinta kasih yang tulus, tak akan pernah ananda lupakan sampai akhir masa. Semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan kasih sayang-Nya sebagaimana bapak dan ibu mengasihi kami.

Kepada adik-adik kecilku tercinta, fira, david, arel, dan seluruh keluarga besar, terimakasih atas dukungan, bantuan, nasihat serta doanya.

Kepada seluruh dosen program studi Kimia UIN Malang, terutama Ibu Rachmawati Ningsih, M.Si selaku dosen pembimbing. Bapak A.Ghanaim Fasya, M.Si selaku wali dosen dan dosen pembimbing. Ibu Suci Amalia, M.Sc dan Bapak Ahmad Hanapi, M.Sc selaku dosen penguji. Terimakasih telah sabar membimbing saya selama proses penyusunan tugas akhir ini, terimakasih atas motivasi, nasihat, arahan serta dukungan yang bapak-ibu telah berikan untuk saya, agar saya dapat tumbuh dan berkembang untuk menjadi pribadi yang lebih baik.

Untuk orang-orang baik yang Allah SWT kirimkan untuk menemani perjuangan saya yakni teman seperjuangan dari masa aliyah hingga saat ini yang telah menemani saya berproses, Dekario Bagus Satria, Amd. Seluruh teman Neon 2017 khususnya arni, tintin, lutfi, faris, krista, tria, mita, bu Rachma squad'17 tanpa terkecuali, kakak tingkat 2015 dan 2016, dan teman-teman UAPM Inovasi, yang tak jarang saya repoti untuk meminta bantuan tenaga, fikiran, maupun materi. Terimakasih untuk setiap doa, semangat, motivasi, saran yang sangat berharga bagi saya.

Kepada diri sendiri, terimakasih sudah mau dan mampu diajak berjuang sekuat tenaga hingga berada di titik ini.

MOTTO

"Faith is my sword. Truth is my shield. Knowledge is my armor."

"Allah tidak membebani seseorang melainkan sesuai dengan kesanggupannya"

(QS. al Baqarah: 286)

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Wr. Wb.

Syukur alhamdulillah penulis hanturkan kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan Rahmat dan Hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi yang berjudul "Pengaruh Konsentrasi Asam pada Proses Hidrolisis dan Waktu Fermentasi terhadap Pembuatan Bioetanol dari *Gracilaria verrucosa*".

Selanjutnya penulis hanturkan ucapan terima kasih seiring do'a dan harapan jazakumullah ahsanal jaza' kepada semua pihak yang telah membantu menyelesaikan laporan penelitian ini dari awal hingga selesai. Ucapan terima kasih ini penulis sampaikan kepada:

1. Kedua orang tua yang selalu mendukung secara moril maupun materiil.
2. Prof. Dr. M. Zainuddin, M.A selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Dr. Sri Harini, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Rachmawati Ningsih, M.Si selaku Ketua Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang serta selaku dosen pembimbing skripsi yang telah memberikan bimbingan, pengarahan dan nasehat kepada penulis dalam menyelesaikan penyusunan skripsi.
5. Bapak Ahmad Ghanaim Fasya, M,Si selaku konsultan dan wali dosen yang telah memberikan bimbingan, pengarahan, dan nasehat kepada penulis dalam menyelesaikan penyusunan skripsi.
6. Ibu Suci Amalia, M.Sc dan bapak Ahmad Hanapi, M.Sc selaku penguji yang telah memberikan masukan, pengarahan, dan nasehat kepada penulis dalam menyelesaikan menyelesaikan penyusunan skripsi.
7. Seluruh dosen dan staf Program Studi Kimia UIN Malana Malik Ibrahim Malang yang telah mengalirkan ilmu, pengetahuan, pengalaman, wacana, dan wawasannya sebagai pedoman dan bekal bagi penulis guna menyelesaikan penyusunan skripsi.

8. Rekan-rekan seperjuangan, fikri, dean, ita, lutfi, zamrotin, vicky, arni yang telah membantu memberi pendapat maupun bantuan tenaga hingga karya tulis ini dapat terselesaikan
9. Semua pihak yang ikut membantu dalam menyelesaikan skripsi ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu.

Penulis menyadari bahwa dalam penysunan skripsi ini masih terdapat kekurangan, maka dari itu penulis mengharapkan saran yang bersifat membangun, baik dari segi isi maupun bentuk susunannya.

Penulis berharap semoga skripsi ini bisa memberikan manfaat dan menambah khasanah ilmu pengetahuan kepada pembaca juga bagi penulis secara pribadi. *Amin Ya Rabbal Alamin*.

Wassalamu'alaikum Wr. Wb.

Malang, 25 Mei 2022

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL ..... **i**
HALAMAN PERSETUJUAN ..... **ii**
HALAMAN PENGESAHAN ..... **iii**
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN ..... **iv**
HALAMAN PERSEMBAHAN ..... **v**
MOTTO ..... **vi**
KATA PENGANTAR ..... **vii**
DAFTAR ISI ..... **ix**
DAFTAR GAMBAR ..... **xi**
DAFTAR TABEL ..... **xii**
DAFTAR LAMPIRAN ..... **xiii**
ABSTRAK ..... **xiv**
ABSTRACT ..... **xv**
ملخص البحث ..... **xvi**

BAB I PENDAHULUAN
1.1 Latar Belakang 1
1.2 RumusanMasalah 4
1.3 Tujuan 5
1.4 Batasan Masalah 5
1.5 Manfaat Penelitian 5

BAB II TINJAUAN PUSTAKA
2.1 *Gracilaria verrucosa* 7
2.2 Delignifikasi 9
2.3 Sakarifikasi Rumput Laut *Gracilaria verrucosa* 13
2.4 Metode DNS 18
2.5 Fermentasi Menggunakan *Saccharomycess cereviciae* 19
2.6 Destilasi 26
2.7 Karakterisasi Produk Menggunakan KG-SM 27
2.8 Penelitian yang Relevan 29

BAB III METODE PENELITIAN
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian 33
3.2 Alat dan Bahan. 33
3.2.1 Alat 33
3.2.2 Bahan 33
3.3 Rancangan Penelitian. 33
3.4 Tahapan Penelitian. 34
3.5 Pelaksanaan Penelitian. 34
3.5.1 Preparasi Rumput Laut *Gracilaria verrucosa* 34
3.5.2 Analisis Lignin dan Selulosa 35
3.5.3 Proses *Pretreatment* (Delignifikasi) 35

3.5.4 Analisis Lignin dan Selulosa Hasil Delignifikasi 36
3.5.5 Sakarifikasi Tepung Rumput Laut *Gracilaria verrucosa*..... 37
3.5.6 Penentuan Kadar Glukosa..... 37
3.5.6.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum..... 37
3.5.6.2 Pembuatan Kurva Standar 37
3.5.6.3 Analisis Glukosa Hasil Hidrolisis 38
3.5.7 Pengaturan pH Hasil Sakarifikasi..... 38
3.5.8 Pembuatan Inokulum 38
3.5.9 Pembuatan Medium Fermentasi..... 39
3.5.10 Proses Fermentasi..... 39
3.5.11 Destilasi..... 39
3.5.12 Karakterisasi Menggunakan KGSM 40
3.5.13 Analisis Data..... 40

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Preparasi Rumput Laut *Gracilaria verrucosa*..... 41
4.2 Delignifikasi Rumput Laut *Gracilaria verrucosa*..... 42
4.3 Sakarifikasi Tepung Rumput Laut *Gracilaria verrucosa*..... 45
4.4 Analisis Kadar Glukosa Hasil Hidrolisis 47
4.5 Produksi Bioetanol 49
4.6 Pemurnian dan Analisis Kadar Bioetanol 51
4.7 Karakterisasi Bioetanol..... 55
4.8 Pemanfaatan Gracilaria verrucosa sebagai Bietanol dalam..... 60

BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan..... 65
5.2 Saran..... 65

DAFTAR PUSTAKA..... 66
LAMPIRAN 76

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 *Gracilaria verrucosa* 8
Gambar 2.2 Skema Tujuan Delignifikasi Biomassa 10
Gambar 2.3 Reaksi Pemutusan Ikatan Lignoselulosa dengan 12
Gambar 2.4 Mekanisme Reaksi Pemecahan Selulosa 14
Gambar 2.5 Mekanisme Reduksi Glukosa oleh Asam 3,5-dinitrosalisilat 19
Gambar 2.6 Mekanisme Reaksi Pemecahan Glukosa 22
Gambar 4.1 Sampel *Gracilaria verrucosa* 41
Gambar 4.2 Interpretasi Warna Larutan Sebelum dan Sesudah 46
Gambar 4.3 Kurva Kalibrasi Standar Glukosa 48
Gambar 4.4 Hubungan Konsentrasi HCl dan Glukosa 48
Gambar 4.5 pH Media Pasca Fermentasi 50
Gambar 4.6 Grafik Pengaruh Lama Waktu Fermentasi Terhadap 53
Gambar 4.7 Kromatogram Etanol p.a 55
Gambar 4.8 Spektrum Massa Etanol p.a 56
Gambar 4.9 Fragmentasi Etanol p.a 56
Gambar 4.10 Kromatogram Bioetanol 96 Jam 57
Gambar 4.11 Spektrum Massa Produk Bioetanol 58
Gambar 4.12 Fragmentasi Bioetanol 96 Jam 58
Gambar 4.13 Spektrum Massa Pengotor 59
Gambar 4.14 Fragmentasi Asetaldehida 60

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1 Perbandingan Kadar Lignoselulosa Sebelum dan Sesudah 43
Tabel 4.2 Perubahan Warna Hidrolisat Sebelum dan Sesudah 46
Tabel 4.3 Kadar Bioetanol Setelah Destilasi 53

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Rancangan Penelitian..... 76
Lampiran 2. Diagram Alir 77
Lampiran 3. Perhitungan..... 84
Lampiran 4. Data Karakterisasi KGSM..... 93
Lampiran 5. Dokumentasi Penelitian..... 97

ABSTRAK

Permei, Idhea. 2022. **Pengaruh Konsentrasi Asam pada Proses Hidrolisis dan Waktu Fermentasi Terhadap Pembuatan Bioetanol dari *Gracilaria verrucosa***

Pembimbing I: Rachmawati Ningsih, M.Si ; Pembimbing II: A Ghanaim Fasya, M.Si.

Gracilaria verrucosa merupakan spesies rumput laut eurihalin yang paling banyak dibudidaya di tambak oleh mayoritas petani di Indonesia. *Gracilaria verrucosa* mengandung lignoselulosa yang dapat berpotensi sebagai bahan baku pembuatan bioetanol dengan melalui tahapan hidrolisis menggunakan katalis asam. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh konsentrasi katalis asam dan waktu fermentasi yang dapat menghasilkan kadar etanol tertinggi .

Gracilaria verrucosa didelignifikasi dengan metode NaOH-sonikasi, hasil daripada proses delignifikasi kemudian dihidrolisis menggunakan HCl dengan variasi konsentrasi 0,5M; 1M; 1,5M dan 2M. Hasil gula reduksi tertinggi berdasarkan analisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis kemudian difermentasi menggunakan *yeast Saccharomyces cerevisiae* dengan variasi waktu 0 jam, 24 jam, 48 jam, 72 jam, 96 jam, dan 120 jam untuk menghasilkan bioetanol. Selanjutnya, bioetanol yang dihasilkan dimurnikan dengan destilasi dan dianalisis secara kuantitatif berdasarkan berat jenis. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan *Two Way Anova* dan dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) jika terdapat pengaruh yang signifikan. Bioetanol yang memiliki kadar tertinggi dikarakterisasi menggunakan spektrofotometer KG-SM.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa adanya kandungan selulosa yang terdapat pada rumput laut *Gracilaria verrucosa* setelah proses delignifikasi sebesar 10,7% dapat dilanjutkan untuk hidrolisis. Konsentrasi asam yang menghasilkan glukosa tertinggi yaitu HCl 1 M dengan kadar 383,6 ppm yang. Kadar bioetanol tertinggi dihasilkan dari lama waktu fermentasi 96 jam sebesar 8,85% yang menunjukkan adanya pengaruh yang berbeda nyata antara lama waktu fermentasi dengan kadar etanol yang dihasilkan. Karakterisasi produk bioetanol muncul dua puncak pada waktu rentesi yang berbeda. Senyawa dominan etanol muncul pada waktu retensi 1,374 menit.

Kata-kata kunci: *Gracilaria verrucosa*, delignifikasi, hidrolisis, fermentasi , KG-SM

ABSTRACT

Permei, Idhea. 2022. **Effect of Acid Concentration on Hydrolysis Process and Fermentation Time on Bioethanol Production from *Gracilaria verrucosa***

Supervisor I: Rachmawati Ningsih, M.Si ; Supervisor II: A Ghanaim Fasya, M.Si

Gracilaria verrucosa is the most widely cultivated euryhaline seaweed species in ponds by the majority of farmers in Indonesia. *Gracilaria verrucosa* contains lignocellulose which can potentially be used as raw material for bioethanol production by going through the hydrolysis step using an acid catalyst. The purpose of this study was to determine the effect of acid catalyst concentration and fermentation time to produce the highest ethanol content.

Gracilaria verrucosa delignified by NaOH-sonication method, the result of the delignification process was then hydrolyzed using HCl with a concentration variation of 0.5M; 1 M; 1.5M and 2M. The highest reducing sugar yields based on analysis using UV-Vis spectrophotometer then fermented using yeast *Saccharomyces cerevisiae* with time variations of 0 hours, 24 hours, 48 hours, 72 hours, 96 hours, and 120 hours to produce bioethanol. Furthermore, the resulting bioethanol is purified by distillation and analyzed quantitatively based on specific gravity. The data obtained were analyzed using Two Way Anova and continued with the Honest Significant Difference (HSD) test if there was a significant effect. Bioethanol with the highest concentration was characterized using a GC-MS spectrophotometer.

The results showed that the presence

of cellulose content in seaweed *Gracilaria verrucosa* after the delignification process of 10.7% can be continued for hydrolysis. The concentration of acid that produces the highest glucose is HCl 1 M with a concentration of 383.6 ppm. The highest bioethanol content was produced from the 96 hour fermentation time of 8.85% which showed a significantly different effect between the fermentation time and the resulting ethanol content. The characterization of bioethanol products showed two peaks at different retention times. The dominant compound of ethanol appeared at a retention time of 1,374 minutes.

Key words: *Gracilaria verrucosa*, delignification, hydrolysis, fermentation, GC-MS

ملخص البحث

بيرمي ، إيديا. ٢٢٠٢. **تأثير تركيز الحمض على عملية التحلل المائي ووقت التخمير على إنتاج الإيثانول الحيوي من غراسيلاريا فيروكوسا**

. المشرفة الأولى: رحمواتى ننجسيه, الماجيتيرفالعلوم؛ المستشار الثاني: أحمد غنائم فشا ، الماجيتيرفالعلوم

غراسيلاريا فيروكوسا هو نوع من الأعشاب البحرية التي يمكن أن تعيش في البحر وفي المياه معتدلة الملوحة. **غراسيلاريا فيروكوسا** تحتوي على مادة ليجنو سليلوز يمكن استخدامها كمواد خام لتصنيع الإيثانول الحيوي من خلال المرور بخطوة التحلل المائي باستخدام محفز حمضي. الغرض من هذه الدراسة هو تحديد تأثير تركيز الحفاز الحمضي ووقت التخمير لإنتاج أعلى محتوى من الإيثانول.

غراسيلاريا فيروكوسا تم إزالة اللجنين بواسطة طريقة صوتنة هيدروكسيد الصوديوم ، ثم تم تحلل نتيجة عملية إزالة اللجنين باستخدام حمض الهيدروكلوريك مع اختلاف تركيز قدره٥,٠ م ؛ ١ م ؛ ٥,١ م و, ٢ م. أعلى إنتاجية سكر مخفضة بناءً على التحليل باستخدام مقياس الطيف الضوئي **UV-Vis** ثم تخميرها باستخدام خميرة ***Saccharomyces cerevisiae*** مع تغيرات زمنية تبلغ ٠ ساعة و ٤٢ ساعة و ٨٤ ساعة و ٢٧ ساعة و ٦٩ ساعة و ٠٢١ ساعة لإنتاج الإيثانول الحيوي. علاوة على ذلك ، تمت تنقية الإيثانول الحيوي الناتج عن طريق التقطير وتحليله كميًا على أساس الثقل النوعي. تم تحليل البيانات التي تم الحصول عليها باستخدام **Two Way Anova** واستمرت باختبار الاختلاف الكبير الصادق (**BNJ**) إذا كان هناك تأثير كبير. تم تمييز الإيثانول الحيوي ذو التركيز الأعلى باستخدام مقياس الطيف الضوئي **KG-SM**.

أظهرت النتائج وجود محتوى السليلوز في الطحالب البحرية **غراسيلاريا فيروكوسا** بعد عملية إزالة اللجنين بنسبة ٧,٠١٪ يمكن أن تستمر في التحلل المائي. تركيز الحمض الذي ينتج أعلى نسبة جلوكوز هوHCL ١ م بتركيز ٦,٣٨٣ جزء في المليون. تم إنتاج أعلى محتوى من الإيثانول الحيوي من وقت التخمير البالغ ٦٩ ساعة والبالغ ٥٨,٨٪ والذي أظهر تأثيرًا مختلفًا بشكل كبير بين وقت التخمير ومحتوى الإيثانول الناتج. أظهر توصيف منتجات الإيثانول الحيوي ذروتين في أوقات الاحتفاظ المختلفة. ظهر المركب السائد للإيثانول في وقت احتجاز قدره ٤٧٣,١ دقيقة.

الكلمات المفتاحية: **غراسيلاريا فيروكوسا**، إزالة اللجنين، التحلل المائي، التخمير، KG-SM

BAB I
PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Bioetanol semakin pesat dikembangkan sebagai bahan bakar alternatif campuran bahan bakar minyak (Shidiq, 2015) karena etanol mampu meningkatkan angka oktan bensin (oktan *enchancer*) sebab etanol absolut memiliki angka oktan sebesar 117, sedangkan bensin premium memiliki angka oktan 87-88, sehingga apabila sebanyak 10% etanol dicampurkan dengan 90% bensin maka akan menghasilkan gasohol E-10 yang memiliki angka oktan sebesar 92 yang setara dengan angka oktan pertamax (Senam, 2009).

Bioetanol sebagai sumber alternatif perlu mendapat perhatian yang serius. Hal ini didukung oleh sumber bahan baku yang melimpah dan tersebar diberbagai daerah di Indonesia (Loupatty, 2014). Rumput laut yang melimpah di perairan Indonesia adalah bahan tumbuhan prospektif bagi kemandirian energi alternatif dari tumbuh-tumbuhan. Pemanfaatan rumput laut di Indonesia sampai saat ini terbatas sebagaibahan makanan dan belum dimanfaatkan lebih lanjut, apalagi untuk mengatasi masalah energi (Nofriya, 2015).

Optimalisasi pemanfaatan potensi sumber daya alam yang berasal dari laut telah termaktub dalam surah al Jatsiyah ayat 12, Allah SWT berfirman:

ٱللَّهُ ٱلَّذِى سَخَّرَ لَكُمُ ٱلْبَحْرَ لِتَجْرِىَ ٱلْفُلْكُ فِيهِ بِأَمْرِهِۦ وَلِتَبْتَغُوا مِن فَضْلِهِۦ وَلَعَلَّكُمْ تَشْكُرُونَ

Artinya : "*Allah-lah yang menundukkan lautan untukmu supaya kapal-kapal dapat berlayar padanya dengan seizin-Nya dan supaya kamu dapat mencari karunia -Nya danmudah-mudahan kamu bersyukur".*

Menurut tafsir kementerian agama RI kata سَخَّرَ لَكُمُ berarti Allah menciptakan laut hanyalah untuk manusia, sehingga ayat ini seakan-akan mendorong manusia berpikir dan berusaha semaksimal mungkin, dimana laut dan segala isinya dapat dimanfaatkan untuk berbagai keperluan seperti air laut, transportasi laut, bahan perhiasan yaitu mutiara dan marjan juga berbagai sumber penghidupan berupa bahan-bahan yang ada di dalam laut yang dapat dijadikan makanan seperti ikan dan rumput laut. Semua itu merupakan karunia Allah SWT yang dianugerahkan kepada manusia sebagai tanda kemurahan-Nya, sehingga manusia dapat bersyukur. Amat banyak lagi karunia Allah SWT yang belum diketahui manusia (Departemen Agama RI, 2002).

Rumput laut merupakan ganggang yang hidup di laut dan tergolong dalam divisi *thallophyta*. *Gracilaria verrucosa* merupakan jenis alga merah (*Rhodophyceae*) (Komarawidjaja & Kurniawan, 2008) yang memiliki kandungan lignin sebesar 3,84% dan selulosa sebesar 13,04% (Ahmad, 2014). Adanya selulosa di dalam rumput laut tersebut, dapat dijadikan sebagai bahan baku alternatif penghasil bioetanol. Untuk dapat dijadikan sebagai substrat dalam produksi bioetanol, selulosa yang terkandung dalam rumput laut *Gracilaria verrucosa* terlebih dahulu melalui tahapan sakarifikasi (Adini dkk, 2015)

Sebelum dilakukan sakarifikasi, terlebih dahulu rumput laut *Gracilaria verrucosa* dilakukan proses delignifikasi agar dapat meningkatakan hasil sakarifikasi. Delignifikasi dapat dilakukan dengan berbagai jenis perlakuan seperti delignifikasi fisika dengan berbagai metode seperti penggilingan, iradiasi, golombang ultrasonik; delignifikasin kimia dengan metode penggunaan pelarut asam dan basa; delignifikasi fisika-kimia dengan beberapa metode seperti *steam*

explosion dan *microwave-chemical*; dan delignifikasi biologi menggunakan bantuan mikroorganisme maupun enzim. Delignifikasi secara fisika diketahui sebagai salah satu cara yang paling efektif dengan menghasilkan rendemen gula pereduksi sebesar 56,1% hingga 100% namun, sebagian besar perlakuan fisika memerlukan banyak energi sehingga tidak layak secara ekonomi, selain itu pemecahan lignin dan xilan juga kurang optimal. Delignifikasi secara kimia dirasa kurang begitu menguntungkan karena beberapa pelarut asam dapat meningkatan pembentukan inhibitor, menyebabkan korosi pada peralatan dan dapat menyebabkan dekristalisasi parsial selulosa menggunakan pelarut basa (Hidayat, 2013) jika dilihat dari jumlah rendemen yang dihasilkan penggunaan pelarut asam menghasilkan gula pereduksi terbesar 41,3% (Yoon dkk, 2011) sedangkan pada pelarut basa sebesar 55% (Kumar dkk, 2009). Delignifikasi fisika-kimia merupakan penggabungan proses fisika dan kimia, sehingga kekurangan suatu metode dapat diatasi oleh metode lainnya, metode ini dapat mempercepat proses delignifikasi dan inhibitor yang dihasilkannya pun rendah (Hidayat, 2013) dengan menghasilkan rendemen gula pereduksi sebesar 77,96% (Nura'ini dan Putra, 2017) hingga 90% (Menon dan Rao, 2012).

Metode sakarifikasi dapat dilakukan dengan hidrolisis menggunakan katalis asam kuat atau enzim. Efisiensi dan efektifitas proses produksi bioetanol memerlukan beberapa teknik produksi agar dapat mengurangi biaya yang dikeluarkan untuk produksi dalam pemakaian medium dan energi (Adini dkk, 2015). Hidrolisis menggunakan enzim merupakan proses hidrolisis dengan menggunakan enzim selulase. Hidrolisa selulosa secara enzimatik memberi *yield* etanol sedikit lebih tinggi dibandingkan metode hidrolisa asam (Palmqvist dan Hahn-Hägerdal, 2000), mampu bekerja optimal pada suhu kurang dari 50ºC,

tidak menyebabkan dekomposisi monosakarida, namun hidrolisis enzimatik memerlukan waktu yang lebih lama dibandingkan dengan hidrolisis kimiawi dan kerja enzim dihambat oleh produk (Samsuri, 2007) selain itu membutuhkan biaya mahal untuk proses *recycle* dan *recovery* enzim (Osvaldo, 2012). Sedangkan hidrolisa selulosa secara asam umumnya menggunakan asam sulfat (H_2SO_4) atau dengan menggunakan asam klorida (HCl) dapat bekerja pada suhu ekstrim hingga 120 ºC (Samsuri, 2007), rentang waktu yang lama, menghasilkan banyak macam dan volume gula reduksi, dan memiliki efisiensi waktu yang lebih tepat untuk digunakan dalam produksi bioetanol (Adini dkk, 2015).

Setelah hidrolisis berjalan sempurna maka dilanjutkan dengan fermentasi dengan penambahan ragi roti (*Saccharomyces cerevisiae*), salah satu spesies ragi yang dikenal mempunyai daya konversi gula menjadi etanol, yang menghasilkan enzim zimase dan invertase. Banyaknya bioetanol yang dihasilkan tergantung dari waktu fermentasi, pada umunya diperlukan waktu 4-20 hari untuk memperoleh hasil fermentasi yang sempurna (Osvaldo, 2012).

Berdasarkan uraian tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui berapa konsentrasi optimum HCl pada proses hidrolisis dengan variasi konsentrasi 0,5 M; 1 M; 1,5 M; dan 2 M dan berapa waktu optimum proses fermentasi untuk dapat menghasilkan bioetanol terbaik secara kualitatif dan kuantitatif yang berbahan dasar dari rumput laut *Gracilaria verrucosa*

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian pada latar belakang, maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Berapa konsentrasi HCl pada hidrolisis selulosa dari rumput laut *Gracilaria verrucosa* untuk menghasilkan kadar glukosa tertinggi?

2. Berapa waktu fermentasi glukosa dari rumput laut *Gracilaria verrucosa* untuk menghasilkan kadar etanol tertinggi?
3. Bagaimana karakterisasi bioetanol yang dihasilkan dari konsentrasi dan waktu fermentasi terbaik?

1.3 Tujuan

Adapun tujuan yang ingin dicapai pada penelitian ini antara lain:

1. Mengetahui konsentrasi HCl pada hidrolisis selulosa dari rumput laut *Gracilaria verrucosa* untuk menghasilkan kadar glukosa tertinggi.
2. Mengetahui waktu fermentasi glukosa dari rumput laut *Gracilaria verrucosa* untuk menghasilkan kadar etanol tertinggi.
3. Mengetahui karakterisasi bioetanol yang dihasilkan.

1.4 Batasan Masalah

Adapun batasan masalah pada penelitian ini antara lain:

1. Asam yang digunakan sebagai katalis adalah HCl dengan konsentrasi 0,5 M; 1 M; 1,5 M dan 2 M.
2. Variasi waktu fermentasi yang digunakan adalah 0 jam, 24 jam, 48 jam, 72 jam, 96 jam, dan 120 jam.
3. Metode yang digunakan untuk menguji kadar glukosa adalah metode DNS.
4. Karakterisasi senyawa menggunakan Kromatografi Gas Spektroskopi Massa (KGSM).

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat yang ingin dicapai pada penelitian ini adalah:

1. Menambah wawasan dan pengetahuan bagi pembaca penelitian ini tentang pemanfaatan rumput laut *Gracilaria verrucosa* sebagai bahan baku prekursor bioetanol melalui proses hidrolisis kimiawi yang dapat digunakan sebagai energi alternatif.
2. Mendorong peneliti lain untuk mengembangkan metode produksi bioetanol dari biomassa berlignoselulosa

BAB II
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Gracilaria verrucosa*

Gracilaria verrucosa merupakan spesies rumput laut eurihalin yang tumbuh di daerah tropik dan subtropik perairan laut dangkal yang hidup pada bagian hidrosfir sampai batas kedalaman 200 meter yang masih memungkinkan tanaman air untuk hidup karena masih dapat dicapai cahaya matahari (Effendie, 1997). Umumnya *Gracilaria verrucosa* hidup sebagai fitobenthos yang melekat dan menancapkan thallus nya pada substrat padat seperti batuan, karang mati, kayu dan lain-lain (Soegiarto dkk, 1978). *Gracilaria verrucosa* hidup pada perairan yang tenang atau di tempat tergenang seperti kolam dan tambak, bersubstrat dasar lumpur pada kisaran salinitas 15-30 ppt, pH 6,0-9,0 dan suhu 27-31℃ (Ahda dkk, 2005).

Gracilaria verrucosa adalah rumput laut yang termasuk dalam golongan alga merah dengan morfologi memiliki batang dan daun semu sehingga termasuk golongan *Thallophyta* yaitu memiliki tumbuhan yang memiliki talus. Karakteristik talus yang dimiliki *Gracilaria verrucosa* memiliki warna merah ungu kehijau-hijauan, tersusun atas jaringan yang kuat, berbentuk tegak dan pipih atau silindris dengan panjang 7,5-30 cm, tipe percabangan yang tidak teratur membentuk rumpun dan pada pangkal percabangan berbentuk runcing (Pramesti dan Nirwani, 2007). Menurut Anggadiredja dkk, (2006) *Gracilaria verrucosa* mempunyai taksonomi sebagai berikut:

Gambar 2.1 *Gracilaria verrucosa*. (Mohanraju, 2012)

Divisi : Rhodophyta

Kelas : Rhodophyceae

Ordo : Gigartinales

Familia : Gracilariaceae

Genus : Gracilaria

Spesies : *Gracilaria verrucosa*

Gracilaria verrucosa mempunyai komposisi kimia dengan komponen utama adalah karbohidrat. *Gracilaria verrucosa* mengandung karbohidrat yang tinggi sebesar 83,5 gram dalam 100 gram berat kering dengan struktur polisakarida yang terdiri dari pati, glikogen, selulosa dan hemiselulosa (Suhartono, 2000; Winarno, 2004). Selulosa, hemiselulosa, dan lignin menjadi satu membentuk susunan senyawa organik yang dikenal sebagai lignoselulosa dengan proporsi selulosa (30-50% berat), hemiselulosa (15-35% berat) dan lignin (13-30% berat) (Wiratmaja, 2011).

Adanya berbagai macam komposisi kimia yang dimiliki oleh rumput laut *Gracilaria verrucosa* menjadi peringatan bagi manusia untuk memperhatikan penciptaan atas dirinya, al Quran dalam banyak ayatnya mendorong manusia

untuk meneliti alam dan melihat tanda-tanda Tuhan di dalamnya, Allah SWT berfirman:

وَالَّذِيْٓ اَخْرَجَ الْمَرْعٰىۖ فَجَعَلَهٗ غُثَاۤءً اَحْوٰىۗ

Artinya : *"Dan yang menumbuhkan rumput-rumputan, lalu dijadikan-Nya rumput-rumput itu kering kehitaman." (QS. al A'la: 4-5).*

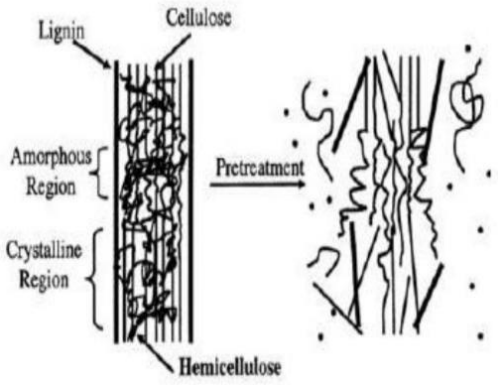
Menurut tafsir muyassar Allah SWT lah yang menciptakan segenap makhluk, teliti dan sempurna dalam ciptaan-Nya, yang menentukan semua dengan kadarnya masing-masing, yang memberi petunjuk semua makhluk kepada apa yang sesuai untuknya, dan menumbuhkan rerumputan hijau, kemudian setelah itu menjadikannya kering dan berubah menjadi kehitam-hitaman setelah sebelumnya hijau (Aidh, 2007). Pada ayat tersebut dapat diartikan bahwa rerumputan merupakan semua jenis tumbuh-tumbuhan dan tanaman, sehingga dalam hal ini, manusia dituntut untuk dapat mengambil hikmah dengan adanya berbagai senyawa yang ada pada rumput laut *Gracilaria verrucosa*, selain itu sebagai makhluk yang berakal dan berlogika, manusia harus mampu menggali lebih dalam potensi yang terdapat dalam senyawa tersebut agar dapat memberi manfaat untuk kehidupan sesama manusia.

Polisakarida dalam *Gracilaria verrucosa* dapat dihidrolisis menggunakan asam dengan memecah molekul glukosa. Melalui proses fermentasi glukosa (gula reduksi) dapat diubah menjadi etanol dengan bantuan mikroorganisme khamir jenis *Saccharomyces cerevisiae* sehingga dapat menghasilkan bioetanol.

2.2 Delignifikasi

Delignifikasi merupakan perlakuan pendahuluan (*pretreatment*) sebelum dilakukan hidrolisis terhadap bahan baku berlignoselulosa (Putri, 2014). Tujuan dari perlakuan delignifikasi adalah untuk membuka struktur lignoselulosa supaya

selulosa menjadi mudah di akses oleh katalis yang memecah polimer polisakarida menjadi monomer gula sehingga dapat meningkatkan luas permukaan dan kereaktifan dari katalisator untuk proses hidrolisis (Mardina, 2013). Jika lignoselulosa tidak didelignifikasi terlebih dahulu maka selulosa sulit untuk dihidrolisis menjadi glukosa, karena lignin sangat kuat melindungi selulosa (Novia dkk, 2011).



Gambar 2.2 Skema tujuan delignifikasi biomassa lignoselulosa (Kumar, 2009)

Pada proses delignifikasi, sejumlah lignin akan terlarutkan. Proses ini merupakan proses saponifikasi terhadap ikatan intermolekular ester yang mengelilingi xilan, hemiselulosa dan komponen-komponen lainnya, seperti lignin dan hemiselulosa lainnya. Proses delignifikasi menyebabkan kerusakan terhadap struktur lignin dan melepaskan senyawa karbohidrat (Zheng *et al.*, 2010).

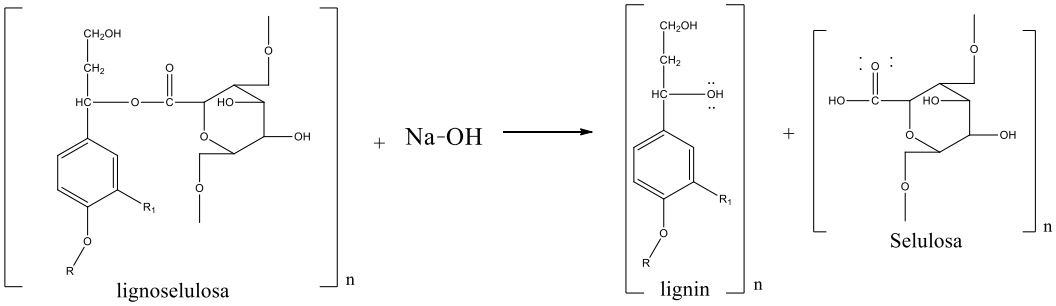
Menurut Hamelinck dkk, (2005) gula yang diperoleh tanpa delignifikasi kurang dari 20%, sedangkan dengan delignifikasi dapat meningkat menjadi 90% dari hasil teoritis. Kadar selulosa rumput laut *Gracilaria verrucosa* yang diperoleh tanpa delignifikasi hanya sebesar 19,7% (Sa'diyah dan Dycka, 2018), sedangkan melalui proses delignifikasi, dapat menghasilkan kadar selulosa rumput laut *Gracilaria verrucosa* dapat meningkat sebesar 53,33% menggunakan larutan

NaOH 6% pada suhu 95ºC selama 35 menit (Nurhayati et al., 2014; Alaydin dkk, 2020). Penelitian lain yang dilakukan oleh Martosuyono et al., (2015) dalam Alaydin dkk, (2020) memperoleh kadar selulosa rumput laut *Gracilaria* sp. lebih dari 80% pada proses delignifikasi menggunakan NaOH 4%, sehingga delignifikasi akan mampu meningkatkan efektivitas hidrolisis selulosa.

Delignifikasi dipengaruhi oleh beberapa hal seperti waktu pemanasan, konsentrasi larutan solvent dan suhu (Nura'Ini dan Putra, 2017). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Hasan dan Azis (2020) didapat waktu optimum sonikasi rumput laut *Eucheuma cottonii* pada waktu 35 menit yang terbukti dapat meningkatkan kadar selulosa dari 18,83% menjadi 34,79%, sedangkan suhu optimum untuk perlakuan awal sonikasi rumput laut adalah 50ºC menghasilkan kenaikan kadar selulosa dan hemiselulosa masing-masing sebesar 33,61%, dan 10% dan penurunan lignin sebesar 12,91%.

Pada penelitian ini proses delignifikasi menggunakan perlakuan secara alkali menggunakan NaOH yang dibantu dengan ultrasonik (sonikasi). Keunggulan metode ultrasonik-NaOH adalah dapat mempercepat proses pemecahan lignin, dapat memperkecil kadar zat inhibitor yang dihasilkan (Hidayat, 2013), meningkatkan persentase lignin yang akan dihilangkan, dan memperkecil konsentrasi larutan alkali yang digunakan (Nura'ini dan Putra, 2017). Hal ini dikarenakan saat sonikasi menggunakan gelombang ultrasonik jenis power ultrasonik (20-100 kHz) yang memiliki energi cukup untuk digunakan pada delignifikasi biomassa (Hasan dan Aziz, 2020) sehingga dapat mempercepat pemanasan biomassa dengan cara memanaskan secara selektif struktur lignoselulosa yang lebih polar, sedangkan pemakaian larutan alkali dan gelombang elektromagnetik yang dihasilkan akan mempercepat reaksi perusakan

struktur kristalin lignoselulosa (Tomas-Pejo *et al*., 2011). Penggunaan larutan NaOH didasarkan atas kemampuannya yang dapat merusak struktur lignin pada bagian kristalin dan amorf serta memisahkan sebagian hemiselulosa yang akan menyebabkan ikatan eter pada lignoselulosa terputus, ditandai dengan berubahnya warna pelarut menjadi hitam dan struktur sampel menjadi lebih lunak. Reaksi pemutusan ikatan lignoselulosa dengan NaOH ditunjukkan pada gambar 2.3.



Gambar 2.3 Reaksi pemutusan ikatan lignoselulosa dengan NaOH (Fengel dan Wegener, 1995)

Lignin yang larut ditandai dengan warna hitam pada larutan. Hal tersebut mengindikasikan bahwa komponen lignin dan hemiselulosa yang terikat pada selulosa telah terdegradasi, kemudian sampel dicuci menggunakan air agar membersihkan sisa larutan yang masih menempel pada sampel. Sampel yang sudah dicuci dikeringkan, kemudian diperoleh berkurangnya berat sampel yang disertai perubahan fisik dan warna sampel yang diduga kandungan lignin pada *Gracilaria verrucosa* telah hilang dan lepas (Nura'Ini dan Putra, 2017), sehingga komponen selulosa persentasenya akan meningkat dari total seluruh komponen pada sampel (Lestari dkk, 2018).

Penentuan persentase kandungan lignoselulosa pasca delignifikasi menggunakan metode *Chesson* yang didasarkan atas penurunan massa rendemen setiap langkah fraksinasi yang dapat menginterpretasikan fraksi lignoselulosa

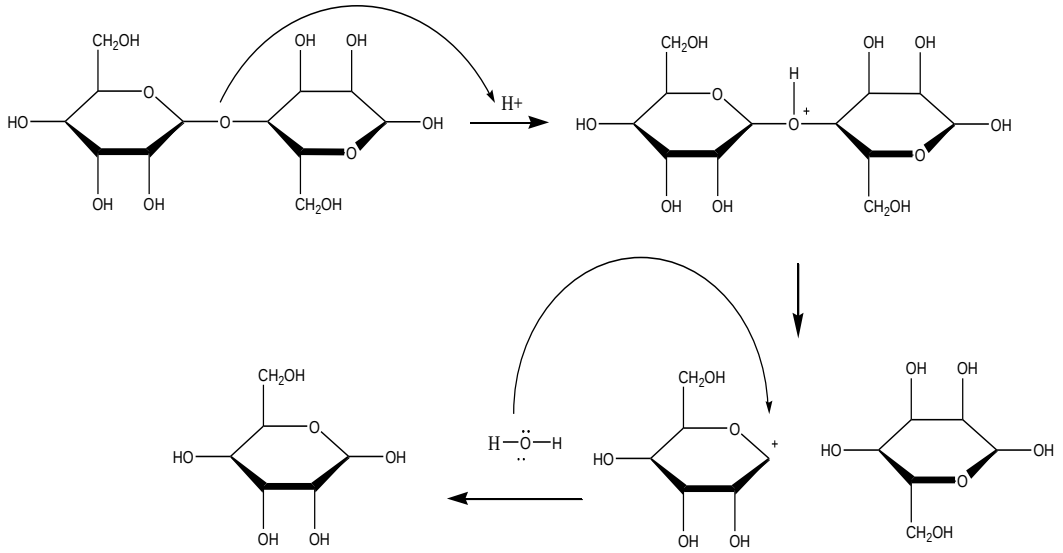
yang terkandung dalam sampel yang larut dalam air (Datta, 1981). Dasar pengujian metode ini didasarkan atas perbedaan kelarutan dari lignin, selulosa, dan hemiselulosa. Dimana hemiselulosa dapat larut pada asam encer yang ditetapkan sebagai senyawa pertama yang diukur, kemudian selulosa dapat larut dalam asam pekat menjadi senyawa kedua yang diukur, dan lignin merupakan senyawa yang diukur terakhir karena memanfaatkan sifat kimia lignin yang tidak larut dalam asam mineral (H_2SO_4) (Muslimah, 2017).

Peningkatan persentase selulosa dengan metode *microwave*-NaOH terbukti pada sampel eceng gondok (*Eichhornia crassipes*) yang telah diteliti oleh Elwin dkk (2014) dengan konsentrasi NaOH 2 M selama 30 menit dapat meningkatkan kandungan selulosa dari 56% menjadi 68,27%, sedangkan pada penelitian yang telah dilakukan oleh Sjahriza dkk (2012) pada sampel rumput laut Eucheuma cotonii menggunakan konsentrasi NaOH 0,5% dengan lama waktu ekstraksi 30 menit pada suhu 90ºC dengan daya 480 watt menghasilkan rendemen selulosa sebesar 26,29%, sedangkan kandungan selulosa pada rumput laut Eucheuma cotonii tanpa melalui proses delignifikasi hanya sebesar 19,18% (Rahmawati, 2018).

2.3 Sakarifikasi Rumput Laut *Gracilaria verrucosa*

Sakarifikasi bertujuan untuk memecah ikatan lignin dan hemiselulosa, merusak struktur kristal dari selulosa serta meningkatkan porositas bahan, dengan rusaknya struktur kristal selulosa akan mempermudah terurainya selulosa menjadi glukosa (Sun and Cheng, 2002). Selain itu hemiselulosa juga akan terurai menjadi senyawa gula sederhana seperti glukosa, galaktosa, manosa, heksosa, pentosa, xilosa, dan arabinosa yang nantinya akan difermentasi oleh mikroorganisme

menghasilkan etanol (Mosier *et al*., 2005). Proses hidrolisis pati mengikuti persamaan (Praputri, 2018):



Gambar 2.4 Mekanisme reaksi pemecahan selulosa (Handayani dkk, 2016)

Hidrolisis dalam suasana asam menghasilkan pemecahan ikatan glikosida dan berlangsung dalam tiga tahap. Tahap pertama proton yang berkelakuan sebagai katalisator asam berinteraksi cepat dengan oksigen glikosida yang menghubungkan dua unit gula, yang akan membentuk asam konjugat. Langkah ini akan diikuti dengan pemecahan yang lambat dari ikatan C-O, dalam kebanyakan hal menghasilkan zat antara kation karbonium siklis, sehingga membebaskan glukosa dan proton, kemudian proton yang terbentuk akan kembali berinteraksi secara cepat dengan ikatan glikosida oksigen pada dua unit glukosa yang lain yang berlangsung secara kontinyu hingga molekul selulosa terhidrolisis menjadi glukosa (Balat, 2008).

Proses sakarifikasi dipengaruhi oleh beberapa parameter antara lain suhu reaksi, waktu sakarifikasi, dan konsentrasi asam (Mastuti and Setyawardhani, 2010). Suhu akan berpengaruh terhadap kecepatan sakarifikasi karbohidrat mengikuti persamaan Arrhenius yaitu semakin tinggi suhu maka hidrolisat yang

dihasilkan semakin banyak, namun jika suhu terlalu tinggi maka juga dapat menyebabkan konversi selulosa menjadi glukosa yang dihasilkan akan menurun karena glukosa akan pecah mejadi arang, ditunjukkan dengan semakin tuanya warna hasil (Osvaldo, 2012). Oleh sebab itu diperlukan suhu moderat (<160ºC) untuk dapat menghidrolisa hemiselulosa dan menekan dekomposisi gula sederhana. Pada penelitian ini menggunakan suhu 120ºC karena suhu yang lebih tinggi akan mempermudah dekomposisi glukosa menjadi furfural dan hidroksimetilfurfural yang apabila terdekomposisi lanjut maka akan didapat asam levulinat dan asam formiat yang dapat menjadi inhibitor pada proses selanjutnya (Mustatto dan Roberto, 2004).

Parameter yang mempengaruhi proses sakarifikasi yang selanjutnya adalah waktu hidrolisis, dimana semakin lama pemanasan maka akan semakin keruh dan semakin besar glukosa yang dihasilkan. Waktu yang diperlukan untuk proses hidrolisa asam sekitar 1 hingga 3 jam (Osvaldo, 2012). Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Sjarif (2014) waktu optimal untuk proses hidrolisis serat sagu adalah 3 jam karena semakin lama waktu hidrolisis maka interaksi selulosa dengan katalis asam dapat meningkatkan kadar etanol dengan didapatkan hasil kadar gula tertinggi sebesar 12,10%, tetapi kadar gula mulai mengalami penurunan pada waktu hidrolisis selama 4 jam sebesar 4,92%, hal tersebut dikarenakan glukosa telah mengalami degradasi karena proses hidrolisis telah melewati titik optimumnya.

Berdasarkan jenis konsentrasi asam, sakarifikasi dapat dibedakan menjadi dua yaitu sakarifikasi menggunakan asam pekat dan sakarifikasi menggunakan asam encer. Sakarifikasi asam pekat dengan konsentrasi 30-70% dapat dilakukan pada suhu rendah dan mempercepat proses sakarifikasi, namun jumlah hasil gula

reduksi yang terbentuk akan sedikit, karena sifat dari glukosa yang mudah terurai menjadi hidroksi metil furfural dan furfural yang akan menyebabkan terbentuknya asam formiat (Taherzadeh dan Karimi, 2008).Selain itu penggunaan konsentrasi asam pekat akan mengakibatkan terikatnya material pengotor seperti SiO_2, fosfat, dan garam Ca, Mg, K, dan Na (Artati, 2012). Sakarifikasi asam encer dapat dilakukan pada rentang konsentrasi 2-5% (Osvaldo dkk, 2012), meskipun proses hidrolisis akan berlangsung lama namun dapat mengurangi penguraian glukosa oleh asam. Penggunaan katalis asam kuat konsentrasi rendah dapat meningkatkan kuantitas gula pada proses hidrolisis lignoselulosa karena ion H^+ pada asam kuat dapat memutus ikatan glikosida yang terdapat pada seluosa (Irawan dan Zainal, 2012).

Pada penelitian ini katalis yang digunakan adalah HCl karena garam yang dihasilkan pasca penetralan tidak berbahaya (Putri, 2014), selain itu katalis HCl akan menghasilkan glukosa lebih tinggi dibandingkan dengan H_2SO_4 hal ini terjadi karena H_2SO_4 bersifat membakar selulosa sedangkan HCl tidak (Siswati, 2009; Habibah, 2015). Selain itu katalis HCl proses hidrolisis nya lebih cepat dari pada H_2SO_4 karena HCl merupakan asam kuat yang bersifat monoprotik, dimana proses pembentukan H^+ terjadi dalam satu tahap, sehingga reaksi hidrolisis yang dikatalisnya berlangsung lebih cepat (Dewi dkk., 2018). Efektivitas jenis katalis HCl lebih tinggi menghasilkan glukosa pada suhu, konsentrasi, dan waktu yang sama dibanding dengan H_2SO_4 karena sifat HCl lebih kuat dengan reaktivitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan H_2SO_4 (Yuliana, 2011).

Keefektifan katalis HCl dibanding katalis asam yang lain terhadap proses sakarifikasi telah dilakukan oleh Dewi, dkk (2018) pada pati ubi talas (*Colocasia esculenta* L. Schott) didapat total gula tertinggi dengan menggunakan HCl pada

suhu 100 ºC yaitu 5,64%, sedangkan pada kondisi yang sama total gula yang diperoleh dari katalis HNO_3 dan H_2SO_4 lebih kecil, masing-masing 5,33% dan 5,10%. Artati, dkk (2012) telah melakukan penelitian pengaruh jenis dan konsentrasi asam terhadap kinetika reaksi hidrolisis pelepah pisang (*Musa Paradisiaca L*) mendapatkan berat glukosa hasil hidrolisis terbesar diperoleh dari katalis HCl 2N dengan waktu 2 jam sebesar 9 gram, sedangkan untuk katalis H_2SO_4 pada parameter yang sama menghasilkan berat glukosa hasil hidrolisis sebesar 8,2 gram. Penelitian yang dilakukan oleh Ulfana (2010) melakukan hidrolisis pada dua jenis rumput laut dan dua jenis katalis asam dengan variasi konsentrasi 0,5%; 1,0%; 1,5%; dan 2,0% pada variasi waktu 10, 15, dan 20 menit, didapat gula pereduksi hasil hidrolisis *Sargassum* sp. tertinggi diperoleh dari perlakuan asam klorida 1% dengan gula pereduksi 989,4 ppm pada waktu hidrolisis 10 menit, sedangkan pada *Gracillaria Salicornia* memiliki gula pereduksi tertinggi sebesar 6800 ppm dari perlakuan dengan 1% asam klorida pada waktu hidrolisis 10 menit.

Pembuatan bioetanol dari rumput laut *Eucheuma cottonii* kering dan basah menggunakan variasi konsentrasi HCl 0,5 M; 1 M; 1,5 M dan 2 M telah dilakukan oleh Rahmawati (2018) diperoleh persentase kadar glukosa tertinggi kedua jenis sampel pada variasi konsentrasi HCl 1 M untuk rumput laut kering sebesar 6,4% (b/b) dan 1,92% (b/b). Peningkatan kadar glukosa dimulai dari konsentrasi asam 0,5 M ke 1 M untuk rumput laut kering maupun rumput laut basah. Peningkatan tersebut terjadi karena katalis asam yang berkonsentrasi rendah dapat memutus ikatan glikosida yang terdapat pada selulosa. Sedangkan kadar glukosa mulai mengalami penurunan ketika konsentrasi asam ditingkatkan menjadi 1,5 M pada rumput laut kering maupun rumput laut basah dan kadar glukosa masing-masing

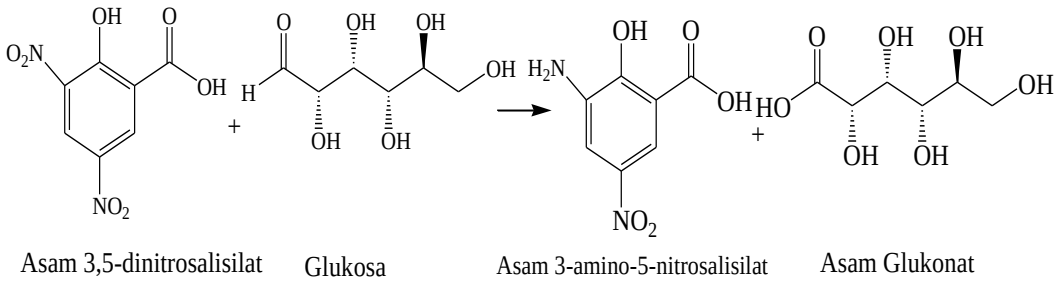
sampel kembali mengalami penurunan pada konsentrasi HCL 2 M. Penurunan kadar glukosa tersebut disebabkan karena meningkatnya konsentrasi yang mengakibatkan degradasi glukosa membentuk inhibitor berupa hidroxil metilfurfural dan furfural yang keduanya akan membentuk asam formiat.

2.4 Metode DNS

Metode DNS merupakan salah satu metode yang dapat digunakan untuk mengukur gula reduksi menggunakan pereaksi DNS (dinitrosalisilat), uji DNS dilakukan dengan maksud untuk mengetahui kadar glukosa yang terdapat pada masing-masing perlakuan sampel hasil hidrolisis. Metode ini paling sering digunakan karena memiliki ketelitian yang tinggi, sehingga dapat diaplikasikan pada gula dengan kadar yang sangat kecil, praktis dan mudah dilakukan untuk pengukuran sampel. DNS merupakan senyawa aromatis berwarna kuning jingga yang terdiri atas asam 3,5-dinitrosalisilat, Rochelle salt yang berfungsi untuk melindungi reagen dari hilangnya oksigen, fenol untuk menguatkan warna, bisulfit untuk menjaga warna tetap stabil, dan alkali untuk mereduksi glukosa (Miller, 1959). Waktu kestabilan reagen DNS dengan penambahan fenol dan sulfit dapat dilakukan penundaan pengukuran absorbansi pada selang 24 jam (Ramansyah, 2003; Ruswandi dkk, 2018).

Reaksi antara reagen DNS dengan gula pereduksi berlangsung pada suasana basa dan suhu 100ºC (Ruswandi dkk, 2018) yang akan membentuk senyawa asam 3-amino-5-nitrosalisilat yang menyerap radiasi gelombang elektromagnetik pada panjang gelombang maksimum 575 nm (Miller, 1959). Semakin tinggi kadar gula pereduksi yang terkandung di dalam sampel, maka absorbansi sampel juga akan semakin tinggi karena banyak molekul asam 3-

amino-5-nitrosalisilat yang terbentuk (Ruswandi dkk, 2018). Adapun reaksi yang terjadi adalah sebagai berikut (Habibah,2015):



Gambar 2.5 Mekanisme Reduksi Glukosa oleh asam 3,5-dinitrosalisilat

Reaksi yang terjadi antara gula pereduksi dengan reagen DNS merupakan reaksi reduksi-oksidasi (redoks) dimana perekasi DNS bertindak sebagai oksidator yang akan mengoksidasi gugus aldehid pada glukosa menjadi karboksil. Reaksi tersebut akan menyebabkan perubahan warna dari kuning menjadi jingga kemerahan yang menandakan terbentuknya senyawa asam 3-amino-5-nitrosalisilat sebagai hasil tereduksi nya DNS oleh gula pereduksi (Ruswandi dkk, 2018).

2.5 Fermentasi menggunakan *Saccharomyces cerevisiae*

Fermentasi merupakan proses lanjutan produksi bioetanol untuk mengetahui konfersi glukosa yang dihasilkan dari proses hidrolisis menjadi bioetanol. Fermentasi dilakukan dengan penambahan ragi roti *Saccharomyces cerevisiae* yang dikenal mempunyai kemampuan yang unggul untuk mengkonversi gula menjadi etanol (Habibah dkk, 2016). Penggunaan *Saccharomyces cerevisiae* didasarkan atas kemampuannya yang dapat menghasilkan alkohol dalam jumlah yang cukup tinggi dibandingkan dengan mikroorganisme lain karena menghasilkan enzim *zimase* dan *invertase*. Enzim *zimase* berfungsi sebagai pemecah sukrosa menjadi monosakarida (glukosa dan

fruktosa), sedangkan enzim *invertase* akan mengubah glukosa menjadi etanol (Habibah dkk, 2016), selain itu ketersediaan *S.cerevisiae* mudah ditemukan, tahan terhadap kadar alkohol dan gula yang tinggi (Yumas dan Rosniati, 2014).

Proses fermentasi menggunakan khamir *Saccharomyces cerevisiae* merupakan salah satu bentuk kesadaran atas kebesaran kuasa-Nya sekaligus sebagai rasa syukur atas nikmat penciptaan makhluk Allah SWT di bidang bioteknologi yang keberadaan nya dapat dimanfaatkan untuk keberlangsungan hidup manusia, Allah SWT berfirman dalam surah al Baqarah ayat 26

إِنَّ اللّٰهَ لَا يَسْتَحْيٖٓ اَنْ يَّضْرِبَ مَثَلًا مَّا بَعُوْضَةً فَمَا فَوْقَهَا ۗ فَاَمَّا الَّذِيْنَ اٰمَنُوْا فَيَعْلَمُوْنَ اَنَّهُ الْحَقُّ
مِنْ رَّبِّهِمْ ۚ وَاَمَّا الَّذِيْنَ كَفَرُوْا فَيَقُوْلُوْنَ مَاذَآ اَرَادَ اللّٰهُ بِهٰذَا مَثَلًا ۘ يُضِلُّ بِهٖ كَثِيْرًا ۙ وَّيَهْدِيْ بِهٖ كَثِيْرًا ۗ وَمَا
يُضِلُّ بِهٖٓ اِلَّا الْفٰسِقِيْنَ

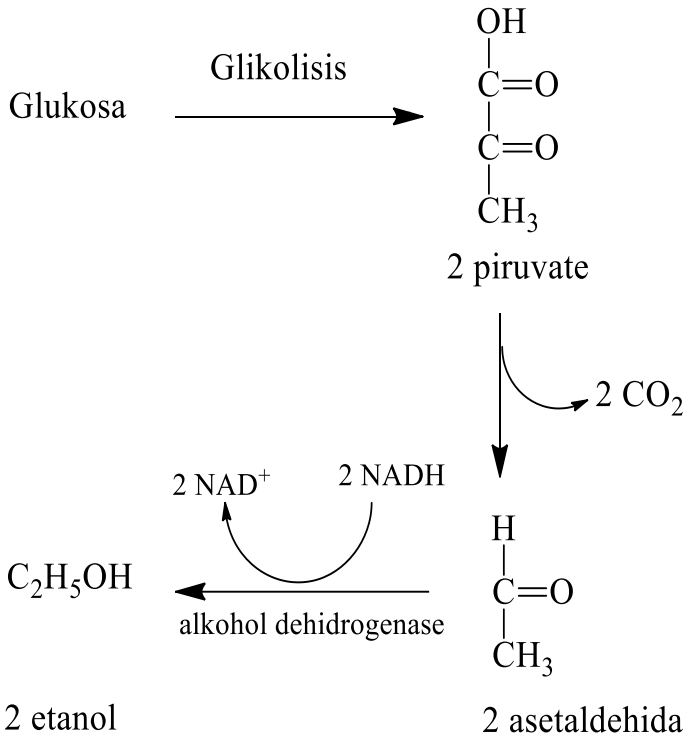
Artinya : *"Sesungguhnya Allah tidak segan membuat perumpamaan seekor nyamuk atau yang lebih kecil dari itu. Adapun orang-orang yang beriman, mereka tahu bahwa itu kebenaran dari Tuhan. Tetapi mereka yang kafir berkata, "Apa maksud Allah dengan perumpamaan ini?"dengan (perumpamaan) itu banyak orang yang dibiarkan-Nya sesat, dan dengan itu banyak (pula) orang yang diberi-Nya petunjuk. Tetapi tidak ada yang Dia sesatkan dengan (perumpamaan) itu selain orang-orang fasik." (QS. al Baqarah: 26)*

Menurut tafsir kementerian agama ayat diatas menjelaskan bahwa Allah SWT tidak segan untuk membuat contoh dan perumpamaan dalam penjelasan informasinya dengan seekor nyamuk atau bahkan lebih kecil, seperti lalat, ulat atau bahkan mikroorganisme yang berupa jamur dan bakteri yang sering manusia anggap keberadaannya tidak bermanfaat atau bahkan merugikan. Orang yang tidak menggunakan pikiran dan ilmu pengetahuan terhadap Allah SWT akan menghadapinya dengan angkuh sehingga mereka tidak mendapat petunjuk dan menjadi sesat karena kefasikannya. Akan tetapi orang yang beriman yakin akan kebenaran dan kebijaksanaan Allah SWT, bahwa mereka dapat menerima

petunjuk jika Allah SWT menciptakan makhluk-Nya sekecil apapun itu pasti mempunyai manfaat. Hal demikian itu sebagai bentuk kekuasaan, pengetahuan, dan seni yang dimiliki oleh sang pencipta sehingga dalam hati orang yang beriman akan senantiasa mempergunakan akal dan pikirannya, akan mendapat petunjuk dari perumpamaan itu (Departemen Agama RI, 2002).

Fermentasi glukosa oleh ragi berlangsung secara anaerob yaitu tidak memerlukan oksigen dalam proses nya karena oksigen dapat menyebabkan oksidasi etanol yang terbentuk menjadi asam asetat (Habibah dkk, 2016). Prinsipnya adalah ketika berada pada medium fermentasi, satu mol glukosa akan dikonsumsi oleh *Saccharomyces cerevisiae* hampir setengahnya setelah 24 jam untuk diubah menjadi dua mol etanol dan satu mol karbon dioksida yang secara visual ditandai dengan kekeruhan warna kultur yang meningkat. Keruhan ini dimungkinkan sebagai akibat dari perubahan fisiologis dalam sel dan/atau asimilasi substrat sekunder (sukrosa, fruktosa, dan lain-lain) (Scholz, Riley, dan Cuello, 2013) yang ditunjukkan pada persamaan reaksi berikut (Moede dkk, 2017):

$$\underset{\text{(Glukosa)}}{C_6H_{12}O_6\,(l)} \xrightarrow{\textit{Saccharomyces cerevisiae}} \underset{\text{(etanol)}}{2C_2H_5OH\,(l)} + \underset{\text{(karbon dioksida)}}{CO_2\,(g)}$$



Gambar 2.6 Mekanisme Reaksi Pemecahan Glukosa (Handayani dkk, 2016)

Proses metabolisme glukosa menjadi etanol pada proses fermentasi alkoholik berlangsung melalui dua tahap yaitu tahap glikolisis dan tahap fermentasi alkohol. Pada tahap pertama glukosa diubah menjadi gula sederhana melalui jalur *Embden Meyerhof Parnas* (EMP). Pertama-tama glukosa difosforilasi oleh ATP (Adenosin Trifosfat) menjadi D-glukosa-6-fosfat, kemudian mengalami isomerasi menjadi D-fruktosa-6-fosfat dan difosforilasi lagi oleh ATP menjadi D-fruktosa-1, 6 difosfat. Selanjutnya, D-fruktosa-1,6-difosfat dipecah menjadi satu molekul D-gliseraldehid-3-fosfat dan satu molekul aseton fosfat, lalu Dihidroksi aseton fosfat disederhanakan menjadi L-gliserol-3 fosfat oleh $NADH_2$ (Nikotinamida Adenina Dinukleotida) yaitu suatu koenzim yang dapat mengikat proton (H^+). Selanjutnya ATP melepaskan satu molekul fosfat yang diterima oleh gliseraldehid-3-fosfat yang kemudian menjadi D-1,3-difosfogliserat dan ADP (Adenosin Difosfat). Langkah selanjutnya D-1,3-

difosfogliserat melepaskan energi fosfat yang tinggi ke ADP untuk membentuk D-3-fosfogliserat dan ATP, kemudian D-3 fosfogliserat berada dalam keseimbangan dengan D-2-fosfogliserat sehingga D-2-fosfogliserat membebaskan air untuk menghasilkan fosfoenol piruvat, kemudian ATP menggeser rantai fosfat yang kaya energi dari fosfoenol piruvat untuk menghasilkan piruvat dan ATP. Tahap kedua yaitu fermentasi alkohol. Setelah piruvat terbentuk, piruvat akan didekarboksilasi menjadi asetaldehid oleh *piruvat dekarboksilase* dengan melibatkan tiamin pirofosfat dan melepaskan CO_2. Kemudian asetaldehid direduksi oleh *alkohol dehidrogenase* dan $NADH_2$ menjadi dua molekul etanol (Handayani dkk, 2016 dan Fibonacci, 2019).

Upaya optimasi lingkungan tumbuh mikroba selama fermentasi dapat dilakukan dengan cara mengkondisikan kultur pada kondisi optimum pertumbuhan mikroba selama fermentasi (Jayus, 2016), adapun faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* adalah media fermentasi, pH, nutrisi, volume starter, konsentrasi gula reduksi, suhu, dan waktu fermentasi. Media fermentasi pada penelitian ini di detoksifikasi terlebih dahulu agar dapat menekan dan mengurangi terbentuknya senyawa inhibitor hasil hidrolisis sehingga produksi bioetanol dapat berjalan optimal dan menghasilkan kadar etanol yang lebih tinggi (Andini dkk, 2015), tahapan detoksifikasi dilakukan dengan mengatur pH. Untuk mengatur pH dapat digunakan NaOH untuk menaikkan pH sedangkan untuk menurunkan pH dapat digunakan asam nitrat (Osvaldo, 20120. pH optimum *Saccharomyces cerevisiae* untuk tumbuh adalah pada kondisi pH 4-6. Agar dapat bertahan hidup dan berkembang biak mikroorganisme memerlukan nutrient yang mengandung karbon, sedangkan untuk sintesis protein mikroba memerlukan nitrogen yang berasal dari NPK dan urea

(Retno dan Nuri, 2011). Pada penelitian ini menggunakan NPK dan ammonium sulfat ($(NH_4)_2SO_4$) sebagai nutrisi khamir, ammonium sulfat dalam medium dapat meningkatkan konsentrasi ion ammonium yang digunakan untuk pembentukan asam nukleat, asam amino, dan protein sel yang berperan dalam sintesis enzim-enzim metabolik, selain itu adanya ammonium sulfat dapat menyebabkan kadar etanol yang dihasilkan lebih tinggi (Andini dkk, 2015).

Volume starter yang baik untuk fermentasi adalah 1/10 bagian dari volume substrat, hal ini dikarenakan volume starter yang terlalu sedikit akan mengakibatkan produktivitas menurun karena jika jumlah khamir terlalu rendah maka beban untuk konversi selulosa menjadi alkohol semakin berat akibatnya khamir tidak dapat bekerja secara optimum dan kadar etanol yang dihasilkan rendah (Retno dan Nuri, 2011). Namun demikian tidak berarti bahwa semakin tinggi konsentrasi starter yang ditambahkan semakin tinggi pula kadar etanol yang dihasilkan (Yumas dan Rosniati, 2014) karena volume starter yang berlebihan akan mengakibatkan hilangnya kemampuan bakteri untuk hidup dapat meningkatkan kematian bakteri (Retno dan Nuri, 2011). Selain itu konsentasi gula reduksi juga berpengaruh terhadap pertumbuhan dan perkembangan khamir, dimana konsentrasi glukosa yang optimum memiliki kadar yang tidak terlalu tinggi juga tidak terlalu rendah, jika konsentrasi glukosa terlalu rendah maka semakin sedikit bioetanol yang dihasilkan, sebaliknya jika terlalu tinggi maka akan menghasilkan hasil samping berupa asam asetat, asam piruvat, dan asam organik lainnya (Yumas dan Rosniati, 2014). Faktor selanjutnya adalah suhu, suhu memegang peranan penting bagi pertumbuhan dan aktivitas *Saccharomyces cerevisiae* karena nantinya akan berpengaruh terhadap kadar bioetanol yang dihasilkan. Suhu yang terlalu rendah akan menyebabkan proses fermentasi

berlangsung dengan lambat, sedangkan suhu yang terlalu tinggi akan menyebabkan khamir *Saccharomyces cerevisiae* akan mati sehingga proses fermentasi tidak dapat berlangsung (Moede dkk, 2017). Suhu optimum untuk khamir *Saccharomyces cerevisiae* adalah 25-35ºC (Retno dan Nuri, 2011).

Waktu fermentasi berpengaruh terhadap aktivitas khamir karena semakin lama waktu fermentasi maka etanol yang dihasilkan akan semakin banyak karena khamir akan memiliki waktu untuk menuju fase eksponensial dimana pada fase tersebut khamir akan mengalami pertumbuhan yang sangat cepat dan konversi glukosa menjadi etanol juga semakin cepat sehingga etanol yang dihasilkan semakin banyak (Yumas dan Rosniati, 2014). Pada penelitian ini menggunakan variasi waktu fermentasi 0 jam, 24 jam, 48 jam, 72 jam, 96 jam, dan 120 jam yang bertujuan untuk mengetahui waktu terbaik untuk menghasilkan kadar etanol terbanyak dari konsentrasi glukosa tertinggi. Andini dkk, (2015) melakukan fermentasi pada sampel *Gracilaria sp*. selama 5 hari memperoleh kadar etanol sebesar 5,50%. Penelitian variasi waktu fermentasi yang sama pada sampel ampas sagu telah dilakukan oleh Ahmad, dkk (2020). Konsentrasi bioetanol tertinggi didapatkan sebesar 55,25 gr/L atau 7% (v/v) dari hasil fermentasi selama 96 jam, sedangkan pada waktu fermentasi setelahnya yaitu 120 menit konsentrasi bioetanol menurun. Hal ini disebabkan semakin lama waktu fermentasi maka nutrisi pada medium mulai berkurang dan mengakibatkan kematian pada khamir. Kematian khamir menyebabkan konversi etanol menjadi asam laktat sehingga pembentukan zat samping tersebut akan menyebabkan penurunan kadar etanol.

2.6 Destilasi

Menurut Soerawidjaja (2007) dalam Marjoni (2014) Bioetanol yang diperoleh pada akhir proses fermentasi masih berupa campuran antara air dengan etanol sehingga campuran larutan tersebut harus dipisahkan dengan cara destilasi, karena mampu memisahkan dua atau lebih komponen berdasarkan perbedaan titik didihnya untuk mendapatkan etanol yang murni. Perbedaan titik didih antara air dan etanol yang cukup besar memungkinkan terjadinya pemisahan campuran etanol dan air, dimana etanol murni memiliki titik didih 78ºC dan air memiliki titik didih 100ºC (Marjoni, 2014). Dengan memanaskan larutan pada suhu 78-100 ºC akan menyebabkan sebagian etanol menguap dan akan menghasilkan etanol dengan konsentrasi 95% volume setelah terkondensasi (Batutah, 2017).

Jenis-jenis destilasi yang digunakan saat ini cukup beragam, diantaranya distilasi sederhana yaitu pipa destilasi berbentuk spiral (*feed stock system*) (Hasanuddin dkk, 2016; Arimba dkk, 2019). Jenis destilasi seperti ini memerlukan lebih banyak pipa destilasi, pembuatannya memerlukan ketelitian yang lebih tinggi, memerlukan biaya yang cukup besar sehingga destilasi sederhana kurang efektif untuk digunakan. Jenis destilasi selanjutnya adalah destilasi fraksional atau destilasi bertingkat, destilasi fraksional memiliki kondensor yang berbentuk lurus dan berkolom (Arimba dkk, 2019). Perbedaan antara destilasi sederhana dengan destilasi fraksional adalah proses kondensasi pada destilasi fraksional terjadi secara berulang-ulang atau proses penguapan dan pengembunan kompenen terjadi secara bertingkat sehingga etanol yang dihasilkan memiliki kemurnian yang lebih tinggi (Sumampouw dkk, 2015). Selain itu destilasi fraksional memiliki kolom fraksinasi dimana terdapat proses refluks atau penyulingan yang digunakan untuk memisahkan campuran bioetanol dan air dengan baik (Delly dkk, 2016).

Proses pemisahan campuran etanol dan air dengan cara destilasi sangat dipengaruhi oleh faktor suhu dan waktu destilasi yang berpengaruh terhadap kemurnian, efisiensi, rendemen, serta kadar etanol yang dihasilkan dimana semakin lama waktu destilasi dan semakin tinggi suhu destilasi akan menghasilkan rendemen bioetanol yang tinggi pula karena akan menyebabkan cairan yang dapat diuapkan. Pada penelitian ini dilakukan pengaturan suhu destilasi pada rentang 78-80ºC selama 3 jam. Merujuk pada penelitian yang telah dilakukan Rahmawati (2018) bahwa destilasi bioetanol dari rumput laut *Eucheuma cottonii* pada suhu 78-80ºC menghasilkan rendemen sebesar 86,80% (b/b). Wardani (2018) destilasi *Sargassum* sp. Pada suhu 78-80 ºC menghasilkan kadar etanol sebesar 24,67%. Sari, dkk (2014) melakukan destilasi pada suhu 80ºC selama 2 jam pada rumput laut *Sargassum duplicatum* mendapatkan kadar etanol sebesar 10,50 gram/L.

2.7 Karakterisasi Produk Bioetanol Menggunakan KG-SM

Karakterisasi destilat etanol diuji menggunakan instrumen KG-SM. Spektroskopi massa merupakan metode memisahkan ion-ion dalam fase gas dari suatu sampel bedasarkan massanya untuk menghitung rasio (m/z). Prinsip kerja spektroskopi massa yaitu menembak molekul – molekul organik dengan berkas elektron sehingga menjadi ion-ion bermuatan positif dengan energi tinggi menjadi ion-ion yang lebih kecil. Lepasnya elektron dari molekul menghasilkan radikal kation yang dinyatakan sebagai M^+. Ion molekuler M^+ terdiri sepasang pecahan /fragmen, yang dapat berupa ion atau radikal (Hartono. 2017).

KG-SM digunakan untuk menganalisis destilat sampel secara kuantitatif dan kualitatif. Untuk pengukuran kadar alkohol secara kuantitatif ditentukan dengan cara menghitung luas area puncak sampel dibandingkan dengan luas area

puncak standart dikalikan dengan konsentrasi standart. Standar yang digunakan adalah etanol 70%. Kadar alkohol secara kualitatif ditentukan oleh waktu retensi puncak standart (alkohol), dimana apabila waktu retensi puncak sampel mendekati waktu retensi puncak standart, maka sampel tersebut dapat diduga mengandung alkohol (Sudarma dan Parwata, 2017).

Sebelum digunakan untuk karakterisasi alat KG-SM dikondisikan dengan suhu kolom 170ºC, suhu injektor 170ºC, dan suhu detektor 200ºC karena suhu tersebut merupakan suhu analisis untuk alkohol dimana bila suhu terlalu tinggi menyebabkan pemisahan zat terlalu rapat, sedangkan bila suhu terlalu rendah menyebabkan pemisahan zat terlalu jauh. Kemudian sampel diletakkan pada tabung vial ependorf lalu dipipet dengan mikrosyringe 1µL dan disuntikkan pada lubang injeksi pada alat KG-SM. Pada proses injeksi, injektor akan menguapkan sampel hingga masuk ke dalam kolom dengan dorongan gas pembawa yaitu gas nitrogen sebagai fase gerak. Fase diam yang digunakan adalah kolom VF-5ms yang akan terjadi proses pemisahan komponen dari campurannya, komponen-komponen campuran yang telah terpisahkan satu persatu meninggalkan kolom menuju detektor. Penggunaan kolom VF-5ms dimaksudkan untuk mengurangi tailing pada sampel. Detektor yang digunakan adalah detektor ionisasi nyala (*Flame Ionization Detector*), dimana detektor ini digunakan untuk komponen-komponen sampel yang memiliki gugus alkil (C-H). Hasil pendeteksian oleh detektor direkam dengan rekorder dan dinamakan kromatogram yang terdiri dari beberapa peak. Jumlah peak yang dihasilkan menyatakan jumlah komponen (senyawa) yang terdapat dalam campuran. Sedangkan luas peak bergantung pada kuantitas (jumlah) suatu komponen dalam campuran (Sudarma dan Parwata, 2017).

Menurut Lestari (2017) bioetanol yang dihasilkan dari rumput laut *Gracilaria verrucosa* menggunakkan katalis HCl berdasarkan hasil kromatogram menunjukan bahwa hasil fermentasi glukosa dari hidrolisis asam selulosa limbah pengolahan agar menunjukan 1 komponen dominan. Senyawa dominan yang muncul untuk destilat hasil fermentasi pada waktu retensi 2,791 menit. Waktu retensi dari destilat tersebut menunjukan bahwa senyawa dominan yang muncul adalah etanol, karena waktu retensinya hampir sama dengan waktu retensi pada kromatogram etanol standar yaitu 2,729 menit

2.8 Penelitian yang Relevan

Penelitian yang dilakukan oleh Sandi dkk (2016) yang berjudul "Hidrolisis Rumput Laut (*Gracilaria* sp.) Menggunakan Katalis Enzim dan Asam Untuk Pembuatan Bioetanol" menjelaskan bahwa proses hidrolisis dilakukan dengan metode enzimatis menggunakan enzim selulase dengan variasi 200 unit/mL, 400 unit/mL, 600 unit/mL, dan 800 unit/mL (v/v) selama 1 jam dengan cara diaduk pada suhu 55ºC dan hidrolisis kimiawi menggunakan HCl dan H_2SO_4 masing-masing menggunakan variasi konsentrasi 1%, 3%, 5%, dan 7% (v/v) sampel diaduk dengan batang pengaduk selama 1 jam pada suhu 100ºC diperoleh hasil penelitian menunjukkan bahwa, konsentrasi gula reduksi tertinggi menggunakan hidrolisis enzimatis sebesar 48,25% (v/v) pada variasi 800 unit/mL, sedangkan hidrolisis asam didapatkan konsentrasi gula reduksi tertinggi sebesar 39,69% (v/v) pada variasi asam H_2SO_4 7% (v/v), kemudian dilakukan fermentasi dan didapat kadar etanol dengan variasi media fermentasi 5% dan 10% dengan waktu fermentasi 5 hari sebesar 5,07% dan 8,92%.

Penelitian yang dilakukan oleh Habibah dkk (2016) yang berjudul "Produksi Substrat Fermentasi Bioetanol dari Alga Merah *Gracilaria verrucosa*" menjelaskan dalam penelitian tersebut dilakukan proses delignifikasi sebagai tahap awal degradasi lignin terhadap selulosa secara maserasi 24 jam menggunakan NaOH 0,01 M yang dianalisis menggunakan metode *Chesson*. Diperoleh hasil bahwa proses delignifikasi mampu mengurangi lignin sebesar 0,84% sehingga diperoleh komposisi selulosa pasca delignifikasi sebesar 5,51%. Proses selanjutnya dilanjutkan dengan hidrolisis hasil delignifikasi serbuk *Gracilaria verrucosa* menggunakan HCl dengan variasi konsentrasi 10%, 20%, dan 30% yang dipanaskan pada labu leher tiga pada suhu 100ºC dengan variasi waktu hidrolisis 1 jam, 2 jam, dan 3 jam diperoleh kadar glukosa tertinggi yang dianalisis pada spektrofotometer UV-Vis sebesar 1493,33 ppm yang merupakan hasil variasi perlakuan HCl 30% dengan waktu refluks selama 3 jam. Hidrolisat tersebut selanjutnya difermentasi menggunakan Saccharomyces cereviseae pada pH 5 dan diinkubasi selama 7 hari pada suhu 27-30ºC, hasil fermentasi kemudian didestilasi pada suhu 80ºC lalu dianalisis menggunakan GC-MS menghasilkan produk mengandung etanol yang keluar pada waktu retensi 1,863 menit yang tidak terlalu jauh selisihnya dari waktu retensi etanol standar yaitu 1,972 menit.

Penelitian yang dilakukan oleh Lestari dkk (2017) yang berjudul "Optimasi Ekstraksi Selulosa dari Limbah Pengolahan Agar (*Gracilaria verrucosa)* sebagai Prekursor Bioetanol" menjelaskan, dalam penelitian tersebut limbah rumput laut didelignifikasi menggunakan 800 mL NaOH dengan variasi konsentrasi 15; 17,5; dan 20 (%) kemudian dipanaskan pada suhu 80 ºC selama 15, 35, 55, dan 75 menit yang diaduk dengan kecepatan 300 *rpm*. Diperoleh kondisi optimum delignifikasi selulosa menggunakan konsentrasi NaOH 20% selama 75

menit dengan kadar selulosa sebesar 17,62%. Selulosa hasil delignifikasi tersebut kemudian dihidrolisis secara kimiawi menggunakan 35 mL HCl 30% selama 3 jam pada suhu 100 ºC. Diperoleh hidrolisat dengan kadar 980 ppm yang kemudian difermentasi menggunakan *Saccharomyces cereviceae* pada suhu 80 ºC selama 168 jam untuk mengkonfersi glukosa menjadi etanol. Hasil dari proses fermentasi dianalisis menggunakan instrumentasi FTIR yang menunjukkan adanya kandungan etanol pada sampel dan KG-SM pada waktu retensi 2,791 menit yang hampir sama dengan waktu retensi kromatogram etanol standar yaitu 2,729 menit.

Penelitian yang dilakukan oleh Anggraeni (2017) yang berjudul "Perbedaan Hidrolisis Asam Sulfat (H_2SO_4) dan Asam Klorida (HCl) dalam Pembuatan Bioetanol Berbahan Baku Rumput Laut *Gracilaria* sp." menjelaskan, dalam penelitian tersebut bertujuan untuk mengetahui konsentrasi optimal H_2SO_4 maupun HCl yang memiliki pengaruh nyata terhadap kadar gula pereduksi produksi bioetanol. Langkah awal perlakuan serbuk rumput laut didelignifikasi menggunakan NaOH 10% dengan cara maserasi selama 24 jam untuk memisahkan lignin dengan selulosa, setelah itu sampel dihidrolisis menggunakan H_2SO_4 dan HCl dengan variasi konsentrasi 6%, 7%, dan 8% yang dipanaskan menggunakan autoclave pada suhu 121 ºC pada tekanan 1 atm selama 30 menit. Diperoleh hasil kadar glukosa tertinggi menggunakan H_2SO_4 7% sebesar 3153,3 ppm, kemudian masing-masing sampel dengan variasi jenis dan konsentrasi pelarut difermentasi menggunakan *Saccharomyces cereviceae* pada suhu 27-30 ºC selama 3-4 hari. Setelah proses fermentasi destilat hasil fermentasi dihitung volume dan rendemennya sedangkan kadar etanol diperoleh berdasarkan hasil analisis menggunakan KG-SM, didapat volume etanol tertinggi sebesar 137,3 mL yang didapat pada perlakuan H_2SO_4 7%, sedangkan untuk kadar etanol tertinggi

diperoleh dari perlakuan HCl 8% sebesar 3,28422% (v/v) hal ini dikarenakan kadar glukosa yang dihasilkan oleh HCl 8% tidak terlalu tinggi yaitu 3122,60000 ppm, rendahnya kadar glukosa justru tidak menghambat kerja *Saccharomyces cereviceae* dalam proses konversi glukosa menjadi etanol, sedangkan nilai rendemen tertinggi diperoleh dari perlakuan HCl 8% karena rendemen etanol dihitung berdasarkan kadar etanol. Semakin tinggi kadar etanol, semakin tinggi rendemennya yaitu sebesar 21,33362%.

BAB III
METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2021-Februari 2022 di Laboratorium Organik Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah neraca analitik, ayakan 50 dan 100 mesh, gelas arloji, spatula, batang pengaduk, bola hisap, Erlenmeyer 250 dan 500 mL, gelas beaker 100 dan 1000 mL, pipet ukur 1, 2, 10, dan 25 mL, pipet tetes, labu ukur 10, 50, 100, 500 mL, mortar dan alu, labu alas bulat 250 mL, refluks, crusible, piknometer 25 mL, gunting, plastik *wrap*, *magnetic stirrer*, oven, *aluminium foil*, sonikator, tisu, kertas saring, corong Buchner, pompa vakum, pH meter, vortex, autoclave, tabung reaksi, penjepit, rak tabung reaksi, *hot plate*, orbital *shaker*, seperangkat alat destilasi, spektrofotometer UV-Vis dan kromatografi gas.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah rumput laut *Gracilaria verrucosa*, NaOH 48%, H_2SO_4 98%, HCl 32%, glukosa standart, reagen DNS, NaOH p.a, Na_2SO_3, fenol, K-Na Tartrate, urea, ragi roti *S. cerevisiae*, KH_2PO_4, *yeast extract*, $MgSO_4.7H_2O$, $(NH_4)_2SO_4$, alkohol p.a, dan aquades.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksploratif laboratorik yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi HCl dan lama fermentasi pada produksi

bioetanol dari rumput laut *Gracilaria verrucosa* dengan penambahan *Saccharomyces cerevisiae*. Percobaan ini dilakukan dengan tiga kali ulangan.

3.4 Tahapan Penelitian

Tahapan-tahapan dari penelitian ini adalah:

1. Preparasi Rumput Laut *Gracilaria verrucosa*
2. Analisis Lignin dan Selulosa Sampel Rumput Laut *Gracilaria verrucosa*
3. Proses *Pretreatment* (Delignifikasi)
4. Analisis Lignin dan Selulosa Hasil Delignifikasi
5. Sakarifikasi Tepung Rumput Laut *Gracilaria verrucosa*
6. Penentuan Kadar Glukosa
7. Pengaturan pH Hasil Sakarifikasi
8. Pembuatan Inokulum
9. Pembuatan Medium Fermentasi
10. Proses Fermentasi
11. Destilasi
12. Karakterisasi Menggunakan KGSM
13. Analisis Data

3.5 Pelaksanaan Penelitian

3.5.1. Preparasi Rumput Laut *Gracilaria verrucosa* (Habibah, 2015).

Alga merah *Gracilaria verrucosa* dicuci bersih kemudian dikeringkan dengan sinar matahari. Sampel kering dipotong dengan ukuran 1-2 cm, sampel di preparasi di UPT Materia Medika Batu untuk digiling kemudian dihaluskan hingga berukuran 90 mesh.

3.5.2 Analisis Lignin dan Selulosa Sampel Rumput Laut *Gracilaria verrucosa* (Datta, 1981)

Analisis lignin dan seluosa dilakukan dengan metode *Chesson*. Sampel rumput laut *Gracilaria verrucosa* kering sebanyak 1 gram (a) ditambah 150 mL aquades, kemudian direfluks dengan water bath pada suhu 100ºC selama 1 jam lalu disaring. Residu dicuci dengan air panas (300 mL) kemudian dioven sampai berat konstan lalu ditimbang (b). Residu ditambahkan 150 mL H_2SO_4 1N, kemudian direfluks dengan water bath pada suhu 100ºC selama 1 jam lalu disaring dan dicuci dengan aquades (300 mL) hingga netral kemudian dioven sampai berat konstan lalu ditimbang (c). Residu kering ditambahkan 10 mL H_2SO_4 72% dan direndam pada suhu kamar selama 4 jam, Setelah itu ditambahkan 150 mL H_2SO_4 1N, kemudian direfluks dengan water bath selama 1 jam dengan pendingin balik. Residu disaring dan dicuci dengan aquades (400 mL) hingga netral kemudian dioven pada suhu 105ºC lalu ditimbang sampai berat konstan (d), selanjutnya residu diabukan pada suhu 500-600ºC dan ditimbang (e). Sehingga kadar selulosa dan ligninnya dapat dihitung dengan persamaan:

Kadar selulosa = $\frac{c-d}{a}$ x 100%

Kadar lignin = $\frac{d-e}{a}$ x 100%

Ket: a = Berat kering awal sampel
b = Berat kering residu sampel direfluk air panas
c = Berat residu sampel setelah direfluk H_2SO_4 1 N
d = Berat residu sampel setelah direndam H_2SO_4 72%
e = Berat abu

3.5.3 Proses Delignifikasi (Anggriani et al, (2011); Ramadhina, (2011); Siregar dkk, 2014; Pasanda dkk., 2019; Hasan dan Azis, 2020)

Proses *pretreatment* dilakukan dengan cara memodifikasi metode dari penelitian yang telah dilakukan, proses delignifikasi dilakukan dengan menggunakan 350 gram serbuk halus *Gracilaria verrucosa* ditambah NaOH 0,01 M hingga terendam semua. Setelah itu dilakukan pengukuran pH untuk

mengetahui pH larutan bahan sebelum di sonikasi, kemudian ditempatkan dalam ultrasonik *cleaning bath* frekuensi 20 kHz. Proses sonikasi dilakukan selama 35 menit pada suhu 50ºC. Setelah itu disaring menggunakan pompa vakum, residu dicuci dengan aquades panas hingga pH netral (pH 7) dan dikeringkan di oven pada suhu 105ºC. Residu kering digerus dalam cawan porselin kemudian diayak dengan ayakan 50 mesh.

3.5.4 Analisis Lignin dan Selulosa Hasil Delignifikasi (Datta, 1981)

Analisis lignin dan seluosa hasil delignifikasi dilakukan dengan metode *Chesson*. Sampel rumput laut *Gracilaria verrucosa*. Hasil delignifikasi sebanyak 1 gram (a) ditambah 150 mL aquades, kemudian direfluks dengan water bath pada suhu 100ºC selama 1 jam lalu disaring. Residu dicuci dengan air panas (300 mL) kemudian dioven sampai berat konstan lalu ditimbang (b). Residu ditambahkan 150 mL H_2SO_4 1N, kemudian direfluks dengan water bath pada suhu 100ºC selama 1 jam lalu disaring dan dicuci dengan aquades (300 mL) hingga netral kemudian dioven sampai berat konstan lalu ditimbang (c). Residu kering ditambahkan 10 mL H_2SO_4 72% dan direndam pada suhu kamar selama 4 jam, Setelah itu ditambahkan 150 mL H_2SO_4 1N, kemudian direfluks dengan water bath selama 1 jam dengan pendingin balik. Residu disaring dan dicuci dengan aquades (400 mL) hingga netral kemudian dioven pada suhu 105ºC lalu ditimbang sampai berat konstan (d), selanjutnya residu diabukan pada suhu 500-600ºC dan ditimbang (e). Sehingga kadar selulosa dan ligninnya dapat dihitung dengan persamaan:

Kadar selulosa = $\frac{c-d}{a}$ x 100%

Kadar lignin = $\frac{d-e}{a}$ x 100%

Ket: a = Berat kering awal sampel
b = Berat kering residu sampel direfluk air panas
c = Berat residu sampel setelah direfluk H_2SO_4 1 N
d = Berat residu sampel setelah direndam H_2SO_4 72%
e = Berat abu

3.5.5 Sakarifikasi Tepung Rumput Laut *Gracilaria verrucosa* (Rahmawati, 2018 dan Sjarif, 2014)

Sebanyak 25 gram tepung rumput laut *Gracilaria verrucosa* hasil delignifikasi dihidrolisis menggunakan 200 mL HCl dengan variasi 0,5M; 1M; 1,5M dan 2M dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL kemudian diukur pH nya untuk mengetahui pH awal larutan. Setelah itu dilakukan pemanasan dengan menggunakan *autoclave* pada suhu 121℃ selama 30 menit dan tekanan 1 atm, selanjutnya didinginkan pada suhu ruang. Campuran kemudian disaring dan filtrat masing-masing dianalisis kadar glukosanya.

3.5.6 Penentuan Kadar Glukosa dengan Metode DNS (Miller, 1959 dan Nisa', 2014)

3.5.6.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Panjang gelombang maksimum ditentukan dengan menggunakan 1 mL larutan standar glukosa 5 mg/mL yang direaksikan dengan 1 mL reagen DNS (0,1 g DNS, 0,1 g NaOH, 0,005 Na_2SO_3, dan 0,02 g fenol dilarutkan dalam 10 mL aquades, kemudian diaduk dengan *magnetic stirrer* hingga homogen, setelah itu disimpan dalam botol gelap pada suhu dingin) dalam tabung reaksi, divortex selama satu menit, kemudian tabung reaksi dimasukkan ke dalam air mendidih selama 15 menit ditunggu sampai terbentuknya kompleks warna, kemudian ditambahkan 1 mL K-Na-tartrat 4% dan ditutup menggunakan alumunium foil, setelah itu ditanda bataskan dalam labu ukur 10 mL dan di ukur absorbansinya pada panjang gelombang 500-550 nm.

3.5.6.2 Pembuatan Kurva Standart

Glukosa stock 5 mg/mL diencerkan dengan ke dalam 7 tabung reaksi yang berbeda dengan variasi konsentrasi 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 mg/mL, masing-masing konsentrasi dipipet sebanyak 1 mL kemudian ditambahkan 1 mL reagen DNS dan

ditutup menggunakan alumunium foil kemudian di vortex selama 1 menit. Tabung reaksi dimasukkan ke dalam air mendidih selama 15 menit hingga terbentuknya kompleks warna antara glukosa dengan reagen DNS. Setelah itu ditambahkan 1 mL K-Na- tartrat 40% dan ditambahkan aquades hingga tanda batas 10 mL. Masing-masing konsentrasi kurva standar di ukur absorbansinya pada panjang gelombang 510 nm.

3.5.6.3 Analisis Glukosa Hasil Hidrolisis

Sebanyak 3 mL sampel glukosa hasil hidrolisis variasi konsentrasi HCl dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian ditambahkan dengan 3 mL reagen DNS dan ditutup menggunakan alumunium foil kemudian di vortex selama 1 menit. Tabung reaksi dimasukkan ke dalam air mendidih selama 15 menit hingga terbentuknya kompleks warna antara glukosa dengan reagen DNS. Setelah itu ditambahkan 1 mL K-Na- tartrat 40% dan ditambahkan aquades hingga tanda batas 10 mL. Absorbansi tiap larutan diukur pada panjang gelombang 510 nm. Harga absorbansi yang diperoleh diplotkan pada kurva standar untuk mengetahui konsentrasi glukosa pada sampel.

3.5.7 Pengaturan pH Hasil Sakarifikasi (Anggraeni, 2017)

Sebelum dilakukan proses fermentasi, hidrolisat terlebih dahulu dikontrol pH nya dengan kisaran 4,5-5,5 untuk detoksifikasi agar substrat dapat menjadi media fermentasi ragi roti *S. cerevisiae* menggunakan larutan NaOH 4M pada sampel hasil hidrolisis terbaik menggunakan pH meter.

3.5.8 Pembuatan Inokulum (Andini dkk, 2015)

Saccharomyces cereviceae dari ragi konvensional diinokulasi dalam 100 mL medium (10 g/L glukosa, 1 g/L *yeast extract*, 0,1 g/L KH_2PO_4, 0,1 g/L $MgSO_4.7H_2O$ dan 0,1 g/L $(NH_4)_2SO_4$ dan aquades) dalam Erlenmeyer

250 mL. Media fermentasi disterilisasi dalam *autoclave* pada suhu 121℃ selama 15 menit, kemudian didinginkan sampai hingga suhu ruang. Setelah itu medium diinokulasikan *Saccharomyces cereviceae* sebanyak 8 g/L, lalu diaduk menggunakan orbital *shaker* dengan kecepatan 100 rpm selama 24 jam.

3.5.9. Pembuatan Media Fermentasi (Amalia dkk, 2014)

Media fermentasi yang digunakan adalah sebanyak 100 mL hidrolisat dengan kadar glukosa tertinggi yang telah didetoksifikasi dalam Erlenmeyer 250 mL untuk masing-masing variasi waktu fermentasi, kemudian ditambahkan 10% (v/v) nutrisi yang terdiri dari 1 g/L $(NH_4)_2SO_4$, 0,05 g/L $MgSO_4.7H_2O$, dan 2 g/L urea.

3.5.10 Proses Fermentasi (Andini dkk, 2015 dan Ahmad dkk, 2020)

Fermentasi dilakukan dengan menginokulasikan 10% (v/v) *Saccharomyces cereviceae* ke dalam 100 mL media fermentasi, diinkubasi pada orbital *shaker* dengan kecepatan 100 rpm dengan waktu fermentasi 0 jam, 24 jam, 48 jam, 72 jam, 96 jam, dan 120 jam pada suhu ruang, kemudian dilakukan pengukuran pH akhir fermentasi untuk masing-masing variasi waktu.

3.5.11 Destilasi (Rahmawati, 2018 dan Al-Muntazhor, 2020)

Hasil fermentasi disaring untuk dipisahkan dari mikroorganisme *S. cerevisiae*, nutrisi, dan larutan gula sisa, lalu filtratnya dimasukkan ke dalam alat destilasi, kemudian didestilasi dengan suhu 78-80ºC selama 3 jam (Rahmawati, 2018). Destilat yang telah didapat kemudian dimasukkan ke dalam piknometer 25 ml dan ditimbang. Bobot jenis relatif ditentukan dengan menggunakan rumus:

$$\text{BJR} = \frac{Berat\ Larutan\ Baku\ atau\ Sampel - Berat\ Piknometer}{Berat\ Aquades - Berat\ Piknometer}$$

Kadar etanol secara kuantitatif di cocokkan terhadap data berat jenis etanol pada buku *Association of Official Analytical Chemists Vol. 2* (AOAC, 1990).

3.5.12 Karakterisasi Menggunakan KGSM

Bioetanol yang memiliki konsentarsi tertinggi dianalisis secara kualitatif menggunakan alat instrument KG-SM. Sampel bioetanol yang telah pekat tersebut diambil 0,5 µL kemudian diinjeksikan pada suhu 200ºC ke dalam kolom VF–5ms (panjang kolom 30 m, diameter 0,25 mm) dengan gas pembawa Helium, dikondisikan dengan suhu awal kolom 60°C selama 2 menit. Suhu kedua dinaikkan dari 60°C ke 200°C dengan kelipatan kenaikan 20°C /menit. Suhu akhir 200°C / 2 menit. kemudian dianalisis pola kromatogramnya.

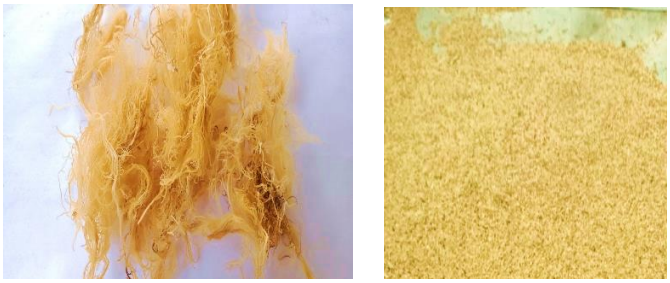
3.5.13 Analisis Data (Dahlan, 2008)

Data yang diperoleh berupa kadar etanol, dan kadar total gula. Analsis data yang berdistribusi normal dan memiliki kesamaan varians maka untuk mengetahui pengaruh konsentrasi HCl pada saat sakarifikasi dan lama waktu fermentasi dianalisis menggunakan *Analysis of Variances* (ANOVA). Apabila terjadi perbedaan yang signifikan.maka analisis dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) dengan taraf signifikasi 5%.

BAB IV
HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Preparasi Rumput Laut *Gracilaria verrucosa*

Bahan baku utama pada penelitian ini adalah ekstrak selulosa dari rumput laut *Gracilaria verrucosa* yang didapatkan dari hasil panen yang dilakukan di tambak Dusun Tanjungsari, Desa Jabon, Kecamatan Sidoarjo, Jawa Timur yang berupa biomassa basah. Rumput laut basah memiliki warna merah keunguan, berbau amis, dengan tekstur lunak dan padat seperti rumput laut pada umumnya dan setelah dicuci bersih dan dikeringkan dibawah sinar matahari selama beberapa hari rumput laut memiliki warna kuning kecoklatan, dengan bau amis yang sudah berkurang dan memiliki tekstur yang agak keras seperti jerami padi. *Gracilaria verrucosa* kering tersebut kemudian ditepungkan. Proses penepungan dilakukan dengan pencacahan rumput laut *Gracilaria verrucosa* dan diayak menggunakan mesin *grinding* berukuran 90 mesh. Adapun karakteristik tepung rumput laut yang diperoleh memiliki warna kuning pucat, bertekstur kasar seperti serbuk kayu dengan sisa sedikit bau amis yang tersisa. Proses penepungan bertujuan untuk memperluas permukaan dari *Gracilaria verrucosa* sehingga dapat mempermudah proses interaksi sampel dengan NaOH pada saat proses delignifikasi.



(a) (b)

Gambar 4.1 Sampel *Gracilaria verrucosa* (a) sampel *Gracilaria verrucosa* kering (b) tepung rumput laut *Gracilaria verrucosa*

4.2 Delignifikasi Rumput Laut *Gracilaria verrucosa*

Proses delignifikasi dilakukan sebelum proses sakarifikasi karena bertujuan untuk mengurangi kandungan lignin dan hemiselulosa, sehingga setelah proses delignifikasi selulosa akan lebih mudah dihidrolisis untuk dikonversi menjadi glukosa. Pada penelitian ini delignifikasi menggunakan NaOH dengan bantuan gelombang ultrasonik pada suhu rendah.

Proses degradasi senyawa lignin oleh NaOH dapat diamati secara visual melalui perubahan warna larutan dan struktur bahan yang lebih lunak. Proses ekstraksi selulosa menyebabkan perubahan warna dari kuning kecoklatan menjadi coklat tua, sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Lestari dkk, (2017) dan Zulferiyenni & Hidayati, (2016) bahwa lignin teroksidasi oleh NaOH yang terlarut dalam larutan pada pH tinggi sehingga mengubah warna larutan menjadi hitam yang disebut lindi hitam (*black liquor*) hal tersebut dapat terjadi karena disebabkan oleh terionisasinya gugus hidroksil fenolat pada lignin membentuk senyawa natrium fenolat yang larut dalam akuades.

Langkah selanjutnya setelah sonikasi adalah pemisahan antara rendemen dengan larutan NaOH dan penetralan pH. Tujuan dilakukannya penetralan pH adalah untuk memisahkan garam fenolat dari sampel dan mengkondisikan bahan agar memudahkan proses selanjutnya, yaitu mudah untuk diatur kondisi sampel sesuai dengan ketentuan prosedur analisis lanjutan, Untuk menetralkan pH sampel digunakan aquades panas karena aquades panas lebih cepat menguap dan cenderung dapat mempercepat penetralan pH larutan (Siregar dkk, 2014).

Setelah penentralan, dilakukan penimbangan sampel untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan berat sampel setelah ekstraksi. Didapatkan berat sampel *Gracilaria verrucosa* pasca ekstraksi mengalami penurunan dari 350 gram

menjadi 150 gram. Penurunan berat massa tersebut diakibatkan karena penurunan kadar lignin yang mengikat selulosa pada saat delignifikasi, untuk mengetahui berapa banyak lignin yang dapat dihilangkan, maka dilakukan analisis kandungan lignin, selulosa, dan hemiselulosa terhadap rumput laut *Gracilaria verrucosa* sebelum dan sesudah proses delignifikasi dengan metode *Chesson*. Hasil pengukuran perbedaan kandungan rata-rata lignoselulosa *Gracilaria verrucosa* sebelum dan setelah delignifikasi ditampilkan pada Tabel 4.1

Tabel 4.1 Perbandingan kadar hemiselulosa, selulosa, dan lignin sebelum dan setelah delignifikasi

Kandungan	Rata-Rata (% berat kering)	
	Sebelum Delignifikasi	Setelah Delignifikasi
Hemiselulosa	62,64%	39,99%
Selulosa	8,39%	10,7%
Lignin	0,75%	0,75%

Berdasarkan hasil uji diketahui hemiselulosa sampel non delignifikasi memiliki kandungan selulosa sebesar 62,64%. Setelah dilakukan proses delignifikasi kandungan hemiselulosanya turun menjadi 39,99%, sehingga penurunannya mencapai 36,15%. Adapun penurunan kandungan tersebut mengindikasikan bahwa delignifikasi pada penelitian ini, juga menyebabkan depolimerisasi hemiselulosa, hal ini disebabkan karena hemiselulosa memiliki derajat polimerisasi yang lebih rendah daripada selulosa, sehingga hemiselulosa sangat rentan terhadap pemanasan, pelarut asam, maupun basa yang dapat merusak struktur amorf hemiselulosa (Larasati, 2019). Adanya penurunan hemiselulosa ini menyebabkan peningkatan kandungan selulosa dan lignin dalam satu ikatan lignoselulosa, karena pada dasarnya saat proses ekstraksi, lignin belum terdegradasi, melainkan hanya mengalami pelunakan saja, sehingga menyebabkan ikatan hemiselulosa dengan lignin terdegradasi. Hal ini menyebabkan

hemiselulosa akan terbebas dan sebagian besar akan larut ke dalam NaOH. Sedangkan untuk lignin hanya akan ada sebagian kecil yang larut bersama NaOH atau bahkan tidak ada lignin yang larut dalam NaOH.

Berdasarkan hasil uji, diketahui bahwa sampel non delignifikasi memiliki kandungan selulosa sebesar 8,39%, sedangkan kandungan selulosa pada sampel pasca delignifikasi memiliki kandungan selulosa sebesar 10,7%, sehingga terjadi peningkatan kandungan selulosa sebesar 27,68%, nilai tersebut diperoleh berdasarkan perhitungan yang terdapat pada **Lampiran 3.7.2**. Adanya kenaikan kandungan selulosa tersebut mengindikasikan bahwa ion OH^- dari pelarut NaOH dapat mematahkan ikatan lignin dengan selulosa sehingga dapat membuka struktur lignin yang membungkus selulosa. Selulosa yang didapatkan tersebut digunakan untuk proses hidrolisis. Semakin banyak selulosa yang dapat terekstrak maka semakin tinggi kandungan glukosa pada saat proses hidrolisis, namun berdasarkan hasil penelitian kenaikan kandungan selulosa pasca delignifikasi kurang maksimal, hal ini dikarenakan perlu adanya penelitian lanjutan terkait variabel yang mempengaruhi efektivitas delignifikasi, seperti konsentrasi alkali, waktu delignifikasi, dan penambahan tekanan saat delignifikasi (Larasati dkk, 2019; Gunam dkk, 2011).

Berdasarkan hasil uji, diketahui bahwa kandungan lignin pada sampel delignifikasi dan non delignifikasi tidak mengalami perubahan kandungan lignin, masing-masing memiliki kadar sebesar 0,75%. Perolehan perhitungan data kadar lignin dapat dilihat pada **Lampiran 3.5 dan 3.6** dan Tidak adanya penurunan kandungan lignin setelah delignifikasi disebabkan karena lignin tidak terdegradasi, melainkan hanya mengalami pelunakan saja.

4.3 Sakarifikasi Tepung Rumput Laut *Gracilaria verrucosa*

Substrat rumput laut *Gracilaria verrucosa* dari hasil delignifikasi kemudian dilakukan proses sakarifikasi, dengan tujuan untuk mendapat glukosa. Pada penelitian ini hidrolisis dilakukan dengan menggunakan katalis asam klorida (HCl). Proses sakarifikasi dilakukan dengan parameter yaitu variasi konsentrasi HCl. Parameter ini dilakukan guna mengetahui konsentrasi asam terbaik dalam menghasilkan gula pereduksi yang optimal. Pada proses sakarifikasi, ketika larutan tepung dipanaskan pada suhu tinggi terjadi proses pengembangan granula pati, hemiselulosa dan selulosa pada struktur amorfnya sehingga mengakibatkan granula pati mengembang dengan cepat dan menyerap air sebanyak-banyaknya, sehingga memper mudah pemutusan ikatan hidrogen pada pati. Pemecahan granula pati juga dipercepat dengan adanya reaksi hidrolisis oleh katalis asam yang menyebabkan kerusakan pada bagian tengah (hilus) yang mana dapat menimbulkan keretakan dan lubang pada bagian tersebut, sehingga granula pati akan pecah (Fauziah, 2015). Mekanisme reaksi lengkap konversi selulosa menjadi glukosa telah dijelaskan pada **Gambar 2.4**.

Untuk mengetahui keefektifan proses hidrolisis dapat diamati secara kualitatif dengan membandingkan perubahan warna pada larutan sebelum sakarifikasi dengan warna larutan setelah sakarifikasi. Perubahan warna yang terjadi dari coklat menjadi merah tua menandakan bahwa sampel telah mengalami hidrolisis. Menurut Rusdianto (2010), hasil hidrolisis yang sempurna dapat dilihat jika warna merah tua pada hidrolisat merata pada seluruh larutan. Perubahan warna larutan hasil hidrolisis disajikan pada Tabel 4.2

Tabel 4.2 Perubahan warna hidrolisat sebelum dan setelah hidrolisis

Konsentrasi HCl	Warna Sebelum Hidrolisis	Warna Setelah Hidrolisis	Intensitas Warna	Intensitas Kekeruhan
0,5 M	Coklat muda	merah tua	+	++
1 M	Coklat muda	merah tua	+++	+++
1,5 M	Coklat muda	merah tua	+	+
2 M	Coklat muda	merah tua	++	++

Keterangan : (+) menandakan kepekatan warna; (+) terdapat partikel terlarut

(a) (b) (c) (d) (e)

Gambar 4.2 Interpretasi warna larutan (a) sebelum hidrolisis (b) HCl 0,5 M setelah hidrolisis (c) HCl 1 M setelah hidrolisis (d) HCl 1,5 M setelah hidrolisis (e) HCl 2 M setelah hidrolisis.

Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa terjadi penambahan intensitas warna dan kekeruhan hidrolisat dari konsentrasi HCl 0,5 M ke 1 M, menurut Earle (1982) kekeruhan pada larutan disebabkan adanya bahan cair yang tertinggal karena efek samping dari proses pemanasan cairan, dimana cairan dipanaskan pada kondisi sampai mencapai titik didihnya sehingga air akan menguap menjadi uap air dan menyebabkan bahan cair yang tertinggal akan menjadi lebih pekat sehingga kekeruhan bahan cair akan meningkat. Menurut Fitriani dkk (2018) adanya peningkatan kekeruhan tersebut mengindikasikan bahwa kejernihan glukosa yang diperoleh dari hasil hidrolisis juga meningkat, hal ini terjadi pada penelitian yang telah dilakukan pada hidrolisis pati umbi gadung menggunakan asam nitrat variasi konsentrasi 3%, 4%, dan 5% yang mana peningkatan kekeruhan bahan cair meningkat seiring dengan peningkatan kosentrasi asam. Adanya penurunan intensitas warna dan kekeruhan hidrolisat

pada konsentrasi asam yang lebih tinggi dikarenakan proses konversi polisakarida menjadi gula sederhana belum sempurna, pada kondisi yang demikian, diduga konsentrasi asam yang terlalu tinggi akan menyebabkan turunnya kemampuan untuk mendegradasi polisakarida kompleks menjadi polisakarida sederhana, sehingga hanya sedikit monosakarida yang dihasilkan.

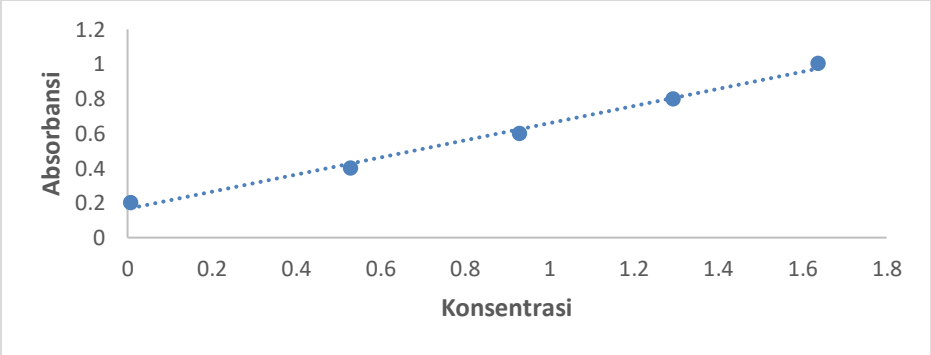
Menurut Tjokroadikoesoemo (1986), kejernihan dan kualitas warna dalam hidrolisat pati dipengaruhi oleh kandungan ISSP (*Insoluble Starch Particles*) dalam pati. ISSP yaitu partikel-partikel pati yang tersusun atas sebagian besar amilosa yang saling bergandengan membentuk rantai lurus (linear). Kandungan ISSP dipengaruhi oleh kandungan amilopektin pada tanaman, dimana semakin tinggi kandungan amilopektin maka nilai ISSP nya akan rendah, selain itu nilai ISSP juga dapat terbentuk jika campuran antara α-amilase dan pati mendapat perlakuan pemanasan secara bertahap.

Semakin keruh larutan menunjukan kemampuan asam dalam menghidrolisis polisakarida yang terdapat pada sampel bekerja dengan baik, sehingga menyebabkan kejernihan hidrolisat menurun karena banyaknya partikel polisakarida yang terlarut. Menurut Dewi dkk, (2018) tingkat kekeruhan hidrolisat berhubungan dengan nilai absorbansi yang akan dihasilkan oleh hidrolisat. Semakin rendah tingkat kejernihan hidrolisat maka nilai absorbansi yang dihasilkan akan semakin besar dan glukosa yang diperoleh semakin jernih sehingga menghasilkan gula pereduksi yang tinggi.

4.4 Analisis Kadar Glukosa Hasil Hidrolisis

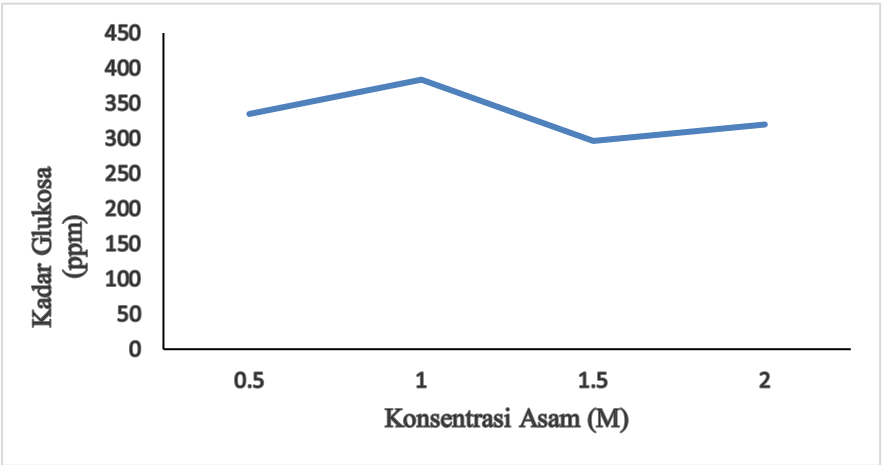
Kadar glukosa pada sampel hasil hidrolisis dianalisis menggunakan metode Miller dengan asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS). Tujuan penambahan DNS adalah untuk membentuk NO_2 tereduksi yang menyebabkan terbentuknya

kompleks warna merah bata yang dapat diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 510 nm. Data yang akan diperoleh dalam penelitian ini berupa kurva standar glukosa yang diplotkan pada nilai absorbansi sampel yang akan dikonversikan menjadi konsentrasi glukosa.



Gambar 4.3 Kurva kalibrasi larutan standar glukosa

Hasil kurva kalibrasi menghasilkan persamaan linier y = 2,01170x – 0,32697 dengan nilai regresi 0,992. Kemudian kurva kalibrasi tersebut digunakan untuk konversi kadar glukosa hasil sakarifikasi pada tiap variasi konsentrasi. Adapun nilai absorbansi sampel hasil sakarifikasi tersaji pada Gambar 4.4



Gambar 4.4 Hubungan konsentrasi HCl dan glukosa

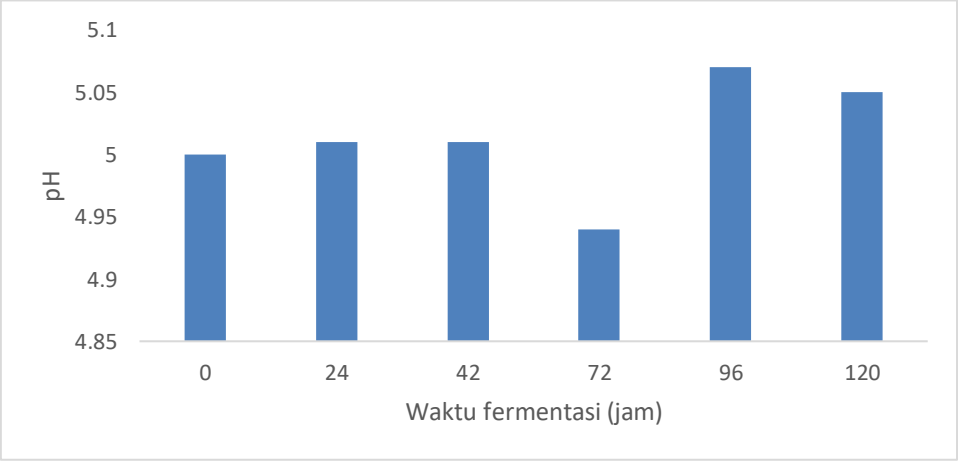
Berdasarkan data yang telah diperoleh diketahui bahwa glukosa tertinggi diperoleh dari hasil sakarifikasi HCl 1 M yaitu 383,6 ppm. Dapat diketahui bahwa variasi konsentrasi HCl tidak memberikan pengaruh yang linear seiring dengan peningkatan ion H^+ terhadap kadar glukosa yang dihasilkan. Pada konsentrasi asam 0,5 M dan 1 M mengalami peningkatan yaitu 335 ppm dan 383,6 ppm. Meningkatnya kadar glukosa disebabkan oleh katalis asam dengan konsentrasi rendah dapat memutuskan ikatan glikosida pada selulosa. Sedangkan glukosa yang dihasilkan pada konsentrasi asam 1,5 M dan 2 M mengalami penurunan masing-masing yaitu 296,4 ppm dan 319,4 ppm. Penurunan kadar glukosa disebabkan oleh peningkatan ion H^+ pada lingkungan seiring dengan bertambahnya konsentrasi asam. Gugus H^+ akan memecah ikatan glikosidik pada selulosa maupun hemiselulosa sehingga akan terbentuk monomer-monomer gula sederhana yang masih dalam bentuk karbonium siklis, tetapi dengan adanya ion OH^- dari air akan berikatan dengan karbonium siklis membentuk gugus glukosa. Semakin banyak air yang terkandung pada lingkungan, maka semakin banyak pula molekul yang dapat menstabilkan karbonium siklis sehingga glukosa yang terbentuk akan semakin banyak. Kurangnya air dalam lingkungan menyebabkan pembentukan glukosa menjadi terhambat sehingga glukosa akan terdegradasi membentuk hidroxil metilfurfural dan furfural yang akhirnya keduanya membentuk asam formiat dan asam levulinat (Taherzadeh dan Karimi,2008)

4.5 Produksi Bioetanol

Proses produksi bioetanol dari biomassa dilakukan dengan fermentasi menggunakan khamir *Saccharomyces cereviceae* dari ragi roti untuk mengkonversi glukosa hasil sakarifikasi menjadi bioetanol. Pada penelitian ini proses fermentasi diawali dengan detoksifikasi sampel sakarifikasi variasi asam

1 M yang mana memiliki kadar glukosa tertinggi. Detoksifikasi merupakan upaya optimasi tempat hidup mikroba dengan mengkondisikan pH larutan sampel, dimana pH optimum *S.cerevisiae* untuk tumbuh adalah pada kondisi pH 4-6 (Retno dan Nuri, 2011). Pada penelitian ini sampel pasca sakarifikasi memiliki pH 2,12 sehingga dilakukan penambahan NaOH hingga pH menjadi 5. Setelah detoksifikasi media fermentasi diinokulasi dengan inokulum dengan penambahan nutrisi untuk mempercepat pertumbuhan mikroba, kemudian difermentasi secara anaerob pada suhu ruang menggunakan orbital *shaker* agar kontak sel dengan substrat merata dan diharapkan mikroorganisme tidak mengendap.

Proses fermentasi dipengaruhi oleh waktu fermentasi, semakin lama waktu fermentasi maka khamir akan melakukan penguraian yang lebih banyak dan produksi bioetanol semakin meningkat. Adanya aktiftas khamir tersebut menyebabkan perubahan pH medium sehingga perlu dilakukan pengukuran pH akhir setelah fermentasi. Nilai pH media pasca fermentasi tersaji pada Gambar 4.5



Gambar 4.5 pH media pasca fermentasi

Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa pH pada waktu fermentasi 72 jam mengalami penurunan menjadi 4,94 karena pada fase ini *Saccharomyces cereviceae* berada pada fase penyesuaian terhadap lingkungan sekitarnya sehingga

menghasilkan enzim invertase yang dapat mengkonversi glukosa menjadi etanol, sedangkan pada waktu fermentasi 96 jam terjadi kenaikan pH menjadi 5,07. Hal ini disebabkan *Saccharomyces cereviceae* berada pada fase pertumbuhan, sehingga konversi glukosa menjadi etanol semakin cepat. Menurut Yumas dan Rosniati (2014), adanya kenaikan pH tersebut mengindikasikan bahwa terdapat peningkatan gugus OH akibat dari penguraian glukosa menjadi etanol, yang mana etanol mempunyai gugus OH yang bersifat basa maka gugus OH pada fermentasi 96 jam meningkat sehingga menyebabkan kenaikan pH lingkungan. Hal ini juga sejalan dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Gozan, dkk (2007), bahwa pada tahap fermentasi 3 hari, *yeast* belum berada pada fase penyesuaian diri dengan lingkungan agar dapat hidup.

Sedangkan pada fermentasi 120 jam mengalami penurunan pH fermentasi, dikarenakan *Saccharomyces cereviceae* menuju fase kematian sehingga selain menghasilkan etanol sebagai metabolit primer, khamir juga menghasilkan metabolit sekunder yang dihasilkan oleh proses metabolisme gula yang menghasilkan produk samping berupa gas CO_2 dan asam-asam organik seperti asam asetat, asam laktat, asam malat, dan asam propionate sebagai produk samping dalam bentuk bebas yang dapat terakumulasi di dalam sel dan berdifusi ke dalam sel khamir sehingga menyebabkan penurunan pH (Indral dkk, 2012; Anaawang dkk, 2017).

4.6 Pemurnian dan Analisis Kadar Bioetanol

Sampel yang telah difermentasi kemudian dimurnikan secara destilasi. Pada penelitian ini produk akhir masih berupa campuran antara etanol dengan air, sehingga diperlukan proses pemisahan antara etanol dengan air dan produk

pengotor yang lain. Sampel dimasukkan dalam labu destilasi, kemudian dipanaskan meggunakan hot plate pada suhu 78℃ yang merupakan titik didih etanol. Uap yang dihasilkan merupakan uap dari zat yang memiliki titik didih rendah, sehingga dalam hal ini etanol menguap terlebih dahulu, dan air akan terpisah dari campuran. Uap tersebut akan mengalami proses kondensasi yang kemudian akan tertampung sebagai etanol. Pada saat proses destilasi, destilat mengalami perubahan volume. Diketahui bahwa volume awal sampel fermentasi adalah 100 mL dan setelah pemurnian pada semua sampel variasi lama fermentasi, volume akhir destilat menjadi 75 mL. Setelah proses destilasi usai, maka sampel diukur kadar nya dengan metode berat jenis.

Metode konversi berat jenis merupakan metode penentuan kadar etanol berdasarkan hasil berat jenis destilat hasil fermentasi yang diukur dengan menggunakan piknometer 25 mL. Untuk menentukan massa jenis masing-masing dilakukan 3 kali ulangan, kemudian massa jenis yang diperoleh dikonversi dengan terhadap data berat jenis etanol pada buku *Association of Official Analytical Chemists Vol. 2* (AOAC, 1990) untuk mengetahui kadar etanol secara kuantitatif. Hasil destilat dan kadar etanol ditunjukkan pada Tabel 4.3

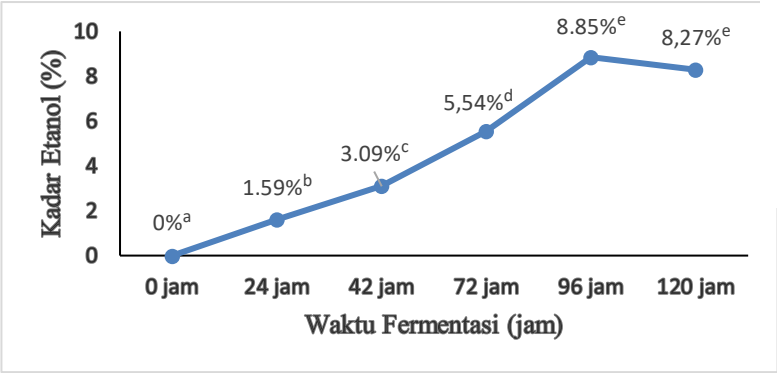
Tabel 4.3 Kadar bietanol setelah destilasi

Waktu Fermentasi (Jam)	Rata-Rata Berat Jenis (g/cm^3)	Rata-Rata Kadar Etanol (%)
0 Jam	1,0021	0,00
24 Jam	0,9976	1,59
42 Jam	0,9954	3,09
72 Jam	0,9920	5,54
96 Jam	0,9877	8,85
120 Jam	0,9884	8,27

Tabel 4.3 menunjukkan korelasi bahwa kadar etanol berbanding terbalik dengan berat jenis, semakin kecil berat jenis etanol maka semakin tinggi kadar

etanolnya, dan juga diketahui bahwa semakin lama waktu fermentasi maka kadar etanol yang dihasilkan bertambah banyak karena aktifitas mikrobia mengalami pertumbuhan dengan berkembang biak, sehingga alkohol yang dihasilkan semakin banyak. Kadar etanol tertinggi diperoleh dari lama waktu fermentasi 96 jam yaitu sebesar 8,85%. Selanjutnya untuk mengetahui adanya pengaruh lama fermentasi terhadap kadar etanol, maka dilakukan analisis statistik menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA).

Berdasarkan hasil uji statistik didapatkan nilai signifikansi lebih kecil dari 0,05 (P<0,05) yaitu 0,000 < 0,05 sehingga perlakuan variasi waktu fermentasi menunjukkan adanya pengaruh terhadap kadar etanol dari *Gracilaria verrucosa*. Selanjutnya untuk mengetahui perlakuan terbaik dari beberapa perlakuan yang diberikan, maka dilakukan uji lanjut yang dalam hal ini menggunakan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) dengan taraf 5%. Adapun hasil uji lanjut Beda Nyata Jujur (BNJ) sekaligus grafik pengaruh lama fermentasi terhadap kadar etanol dari *Gracilaria verrucosa* disajikan pada Gambar 4.7



Keterangan: Notasi huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata perlakuan yang diberikan

Gambar 4.6 Grafik pengaruh lama waktu fermentasi terhadap kadar etanol

Grafik menunjukkan bahwa perlakuan lama waktu fermentasi semakin lama waktu fermentasi, maka semakin tinggi nilai rerata kadar etanol. Nilai rerata

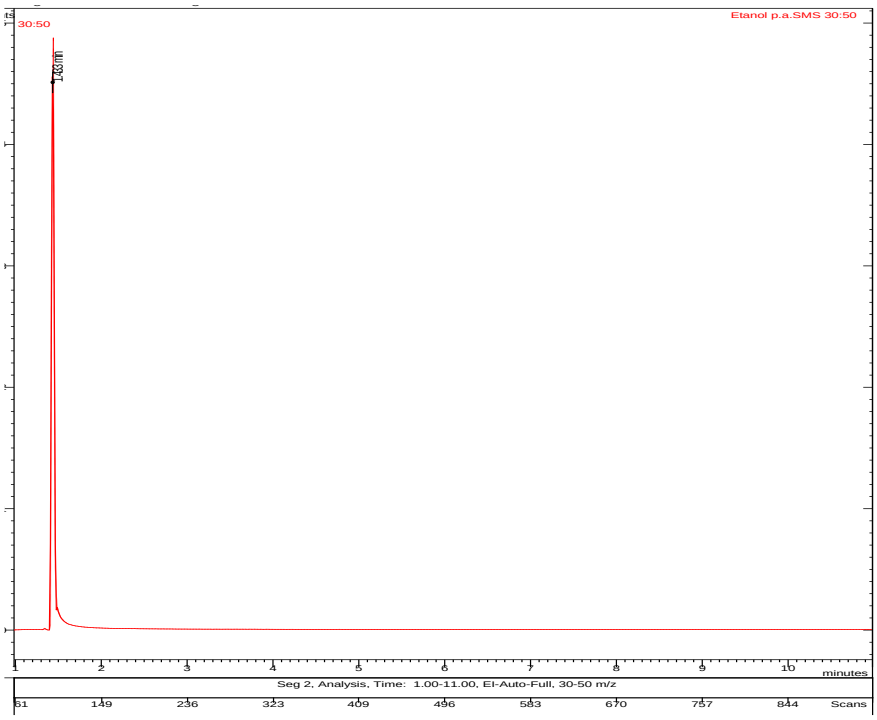
tertinggi yaitu 8,85% yang didapat pada perlakuan lama waktu fermentasi 96 jam, menunjukkan perbedaan nyata dengan perlakuan 0 jam, 24 jam, 42 jam, dan 72 jam, tetapi tidak berbeda nyata dengan lama waktu fermentasi 120 jam karena keduanya memiliki notasi huruf yang sama (e).

Gambar 4.6 menunjukkan bahwa pada lama fermentasi 0 jam kadar etanol yang dihasilkan sebesar 0%, yang berarti tidak ada kadar etanol yang terbentuk dalam sampel, karena *Saccharomyces cereviceae* tidak memiliki waktu untuk mengkonfersi glukosa menjadi etanol sehingga khamir belum sempat beradaptasi pada lingkungan baru. Pada waktu fermentasi 24 jam hingga 72 jam peningkatan kadar etanol yang dihasilkan oleh khamir *Saccharomyces cereviceae* masih rendah, karena berada pada tahap fase lag dan fase eksponensial. Tahap fase lag adalah tahap dimana mikroba beradaptasi terhadap lingkungan, sedangkan fase eksponensial merupakan tahap dimana mikroba mulai melakukan pertumbuhan. Dengan demikian aktivitas untuk pembentukan produk etanol belum optimal. Peningkatan kadar etanol tertinggi terlihat pada lama waktu fermentasi 96 jam yaitu sebesar 8,85%. Kemungkinan pada variasi lama waktu tersebut khamir berada pada fase stasioner yaitu fase dimana pertumbuhan mikroorganisme mencapai keadaan yang maksimum dan perbandingan antara mikroba yang aktif dengan yang mati seimbang karena sumber makanan dan nutrisi relatif sedikit sehingga tidak ada penambahan jumlah mikroba yang akan mengubah substrat menjadi etanol. Oleh sebab itu etanol yang terbentuk relatif konstan. Namun pada waktu fermentasi 120 jam kadar etanol menurun. Hal ini disebabkan karena konsentrasi glukosa semakin berkurang seiring bertambahnya waktu fermentasi, selain itu nutrisi yang diperlukan oleh mikroba juga semakin berkurang sehingga aktivitas mikroba menurun dan banyak juga yang mengalami fase kematian

sehingga *Saccharomyces cereviceae* mengubah bioetanol menjadi asam asetat yang juga turut menyebabkan penurunan kadar bioetanol (Ahmad dkk, 2020).

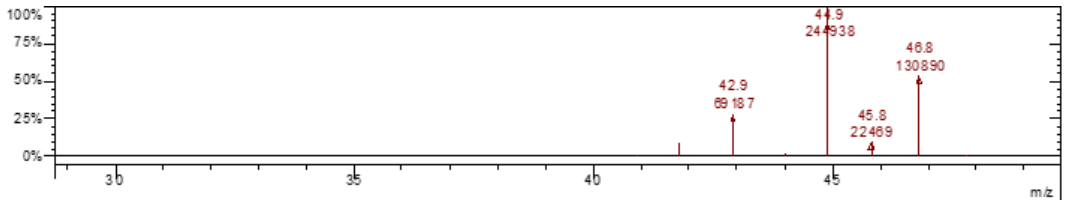
4.7 Karakterisasi Bioetanol

Pengujian ini bertujuan untuk memantapkan bahwa produk yang dihasilkan adalah bioetanol. Sampel dengan kadar etanol tertinggi yaitu destilat hasil fermentasi 96 jam, di uji secara kualitatif menggunakan spektrofotometer Kromatografi Gas – Spektrum Massa (KGSM). Latar belakang pemilihan sampel tersebut diharapkan dapat mewakili analisis etanol secara keseluruhan dengan cara membandingkan waktu retensi sampel terhadap waktu retensi etanol standar. Apabila waktu retensi puncak sampel mendekati waktu retensi puncak standar, maka sampel tersebut dapat diduga mengandung etanol. Adapun Kromatogram KGSM dari etanol p.a disajikan pada Gambar 4.7

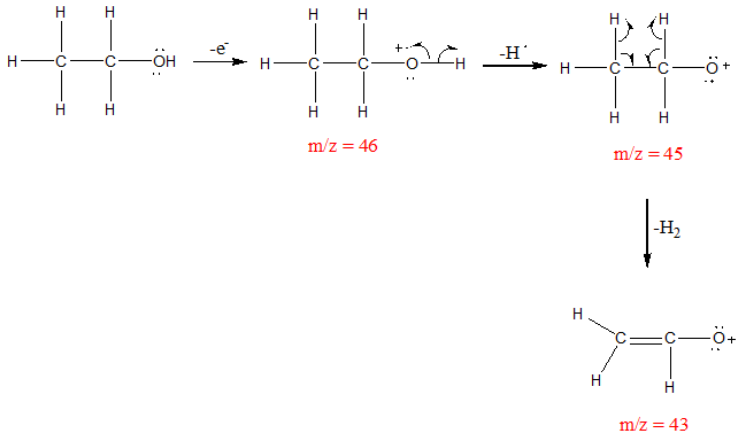


Gambar 4.7 Kromatogram etanol p.a

Hasil kromatogram etanol p.a memiliki satu komponen dengan kelimpahan 100% dengan waktu retensi 1,433 dan pembacaan pada spektrofotometer massa muncul Mr senyawa etanol yaitu 46,8 yang kemudian diasumsikan sebagai 46 dikarenakan Mr senyawa etanol p.a maupun produk bioetanol relatif mengalami pertambahan nilai Mr sebesar 0,8-1 pada pembacaan spektroskopi massa. Sehingga untuk pembacaan m/z setelahnya dikurangi 1 dari m/z yang muncul pada spektroskopi massa. Pendekatan fragmentasi senyawa etanol disajikan pada Gambar 4.9



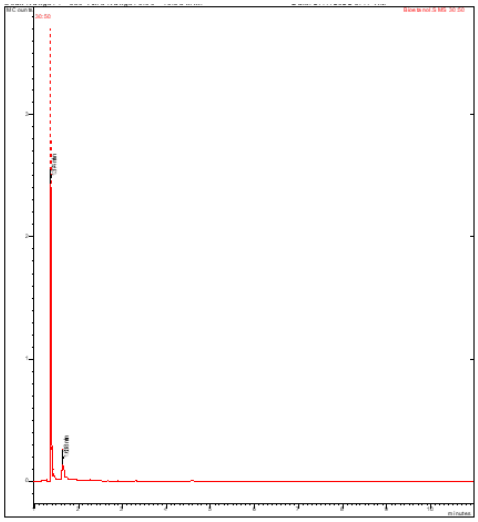
Gambar 4.8 Spektrum massa etanol p.a



Gambar 4.9 Fragmentasi etanol p.a

Untuk mendeteksi adanya etanol pada sampel fermentasi lama waktu 96 jam diperoleh dengan membandingkan waktu retensi standar dengan waktu retensi sampel. Setiap senyawa mempunyai waktu retensi yang khas pada kondisi atau parameter yang sama. Jika waktu retensi pada sampel sama dengan waktu retensi

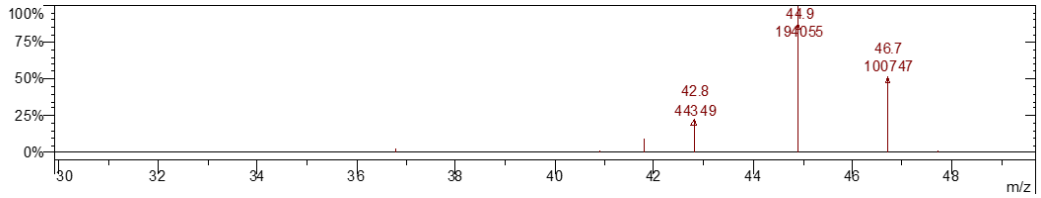
pada standar, maka sampel tersebut mengandung komponen yang sama dengan standar. Waktu retensi sampel bioetanol hasil fermentasi variasi lama waktu 96 jam disajikan pada Gambar 4.10



Gambar 4.10 Kromatogram bioetanol 96 jam

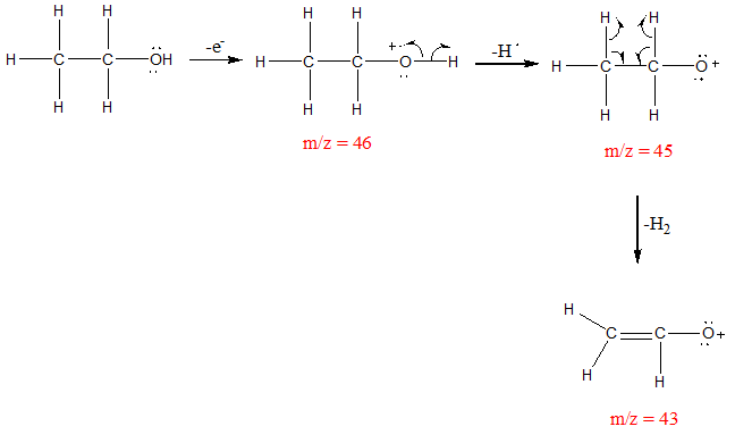
Hasil kromatogram KGSM menunjukkan bahwa hasil destilasi fermentasi glukosa 96 jam memiliki 2 komponen yaitu pada waktu retensi 1,374 dan 1,638. Komponen utama terdapat pada waktu retensi 1,374 dengan luas area sebesar 450714 dan komponen lain yang muncul pada waktu retensi 1,638 dengan luas area sebesar 173504 merupakan senyawa pengotor. Diduga kromatogram dari komponen utama tersebut merupakan etanol karena memiliki perbedaan waktu retensi yang tidak terlalu signifikan dengan waktu retensi etanol standar. Jika dibandingkan dengan waktu retensi yang diperoleh etanol standar, diketahui bahwa sampel bioetanol hasil fermentasi 96 jam memiliki waktu retensi yang lebih cepat dari pada standar etanol, yang mana produk bioetanol keluar dari kolom lebih awal 0,059 detik dari pada standar etanol. Namun analisis kualitatif pada kromatografi gas dengan waktu retensi tidak bisa dijadikan analisis kualitatif

yang baik, karena untuk mendapatkan waktu retensi yang sama untuk satu komponen saja sangat sulit. Oleh karena itu dibutuhkan metode lain sebagai dasar analisis kualitatif salah satunya menggunakan spektra massa yang ditunjukkan pada Gambar 4.11



Gambar 4.11 Spektra massa produk bioetanol

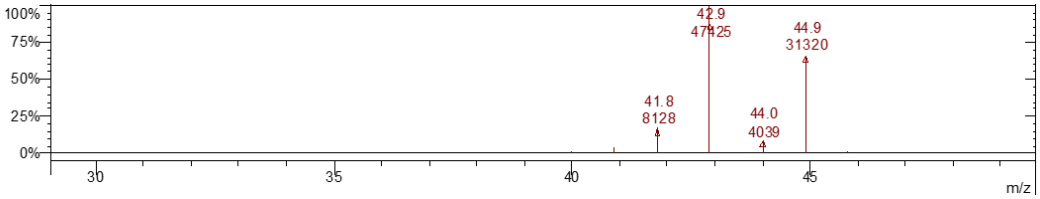
Pembacaan pada spektroskopi massa muncul Mr senyawa etanol yaitu 46. Berdasarkan spektra massa, senyawa produk hasil fermentasi diduga merupakan etanol karena berdasarkan data spektra massa produk yang dibandingkan dengan spektra massa etanol standar, keduanya memiliki hasil m/z yang mirip dengan pemecahan pada tiap fragmentasinya. Pendekatan fragmentasi senyawa produk bioetanol disajikan pada Gambar 4.12



Gambar 4.12 Fragmentasi bioetanol 96 jam

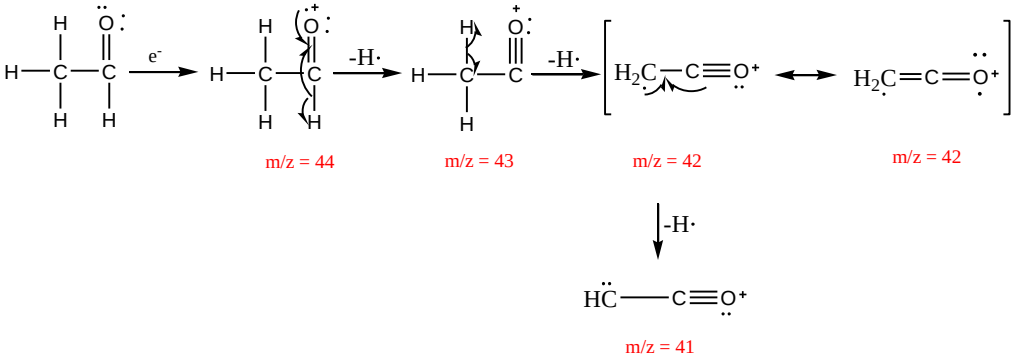
Berdasarkan hasil analisa terhadap kromatogram **(Gambar 4.10)**, terdapat dua *peak* yang muncul, *peak* yang memiliki waktu retensi 1,638 diduga sebagai

produk pengotor yang mempengaruhi adanya pergeseran waktu retensi senyawa produk bioetanol hasil fermentasi 96 jam. Untuk mengidentifikasi senyawa pengotor diperlukan data spekta massa yang ditunjukan pada Gambar 4.13.



Gambar 4.13 Spektra massa pengotor

Pembacaan pada spektroskopi massa muncul Mr senyawa pengotor yaitu 45. Berdasarkan telaah ulang alur proses produksi yang telah terjadi dan kecocokan dengan massa molekul relatif, senyawa pengotor tersebut diduga asetaldehida yang muncul puncak m/z 44. Adanya senyawa asetaldehida diduga saat fermentasi, proses reduksi oleh $NADH_2$ (dengan katalis alkohol dehidrogenase) tidak berjalan dengan baik sehingga menyebabkan etanol tidak terbentuk secara maksimal dan menyisakan asetaldehida. Menurut Kar dkk (2011) etanol maupun asetaldehida kerap menjadi pengotor satu sama lain karena keduanya memiliki puncak m/z pada rentang 41 hingga 45 selain itu asetaldehida juga merupakan produk oksidasi parsial etanol, sehingga sangat memungkinkan jika asetaldehida adalah pengotor yang terdeteksi pada spektrometri massa. Pendekatan fragmentasi asetaldehida ditunjukkan pada Gambar 4.14



Gambar 4.14 Fragmentasi asetaldehida

Terdeteksinya asetaldehida sebagai senyawa pengotor memperkuat dugaan bahwa asetaldehida merupakan penyebab waktu retensi pada senyawa produk lebih cepat dari pada etanol standar. Selain itu perbedaan waktu retensi juga dipengaruhi oleh perbedaan polaritas antara fase diam dengan senyawa produk. Kolom VF – 5 ms yang digunakan dalam penelitian ini memiliki sifat non polar, sedangkan untuk senyawa produk maupun pengotor cenderung bersifat polar. Perbedaan kepolaran inilah yang menyebabkan waktu retensi bioetanol lebih cepat terelusi dari kolom, dibandingkan asetaldehida yang tertahan sedikit lebih lama di dalam kolom. Hal ini diperkuat dengan nilai konstanta dielektrik dari masing-masing senyawa, dimana senyawa polar memiliki konstanta dielektrik yang besar, sedangkan non-polar memiliki konstanta dielektrik yang kecil. Etanol memiliki konstanta dielektrik lebih besar daripada asetaldehida yaitu 24,55 sedangkan asetaldehida memiliki nilai konstanta dielektrik 21,1 (Ping Di dan Daniel, 2013), sehingga dalam hal ini etanol lebih polar daripada asetaldehida.

4.8 Pemanfaatan Rumput Laut *Gracilaria verrucosa* sebagai Bioetanol dalam Perspektif Islam

Allah SWT telah memberikan bumi dan seisinya untuk digunakan manusia sebagai bentuk anugerah dan karunia-Nya yang sangat besar dan luas. Allah SWT

membagi bumi menjadi dua bagian yaitu daratan dan lautan, dimana pembagian lautan memiliki proporsi yang lebih besar daripada daratan, yaitu 70% bagian di bumi berupa daerah perairan dan 30% nya merupakan daratan yang kita tinggali. Diantara kenikmatan dan karunia Allah SWT yang ada di bumi berada pada lautan, sebagaimana firman Allah dalam QS. al Maidah: 96.

أُحِلَّ لَكُمْ صَيْدُ ٱلْبَحْرِ وَطَعَامُهُۥ مَتَٰعًا لَّكُمْ وَلِلسَّيَّارَةِ ۖ وَحُرِّمَ عَلَيْكُمْ صَيْدُ ٱلْبَرِّ مَا دُمْتُمْ حُرُمًا ۗ

وَٱتَّقُوا۟ ٱللَّهَ ٱلَّذِىٓ إِلَيْهِ تُحْشَرُونَ

Artinya : *"Dihalalkan bagimu hewan buruan laut dan makanan (yang berasal) dari laut sebagai makanan yang lezat bagimu, dan bagi orang-orang yang dalam perjalanan, dan diharamkan atasmu (menangkap) hewan darat, selama kamu sedang ihram. Dan bertakwalah kepada Allah yang kepada-Nya kamu akan dikumpulkan (kembali)." (QS. al Maidah: 96)*

Ayat di atas menjelaskan bahwa dihalalkan bagi manusia untuk memburu binatang buruan dari perairan, baik itu laut, sungai, danau, maupun tambak. Menurut Dr. Wahbah Az-Zuhaili (1998) dalam kitab nya yang berjudul Tafsir al-munir mengartikan **صَيْدُ الْبَحْرِ** adalah binatang yang biasanya hidup dan hanya dapat hidup di dalam laut dan tidak dapat hidup didarat walaupun telah mati dan mengapung. Hal ini tentunya berbeda dengan binatang yang hidup di dua alam, baik itu di laut maupun di darat. Selanjutnya, Wahbah mengartikan **طَعَامُه** sebagai makanan yang ditemukan di lautan, baik berupa binatang hidup maupun yang sudah mati dan mengapung merupakan makanan yang lezat bagi kamu, baik orang yang tinggal menetap maupun orang yang sedang berpergian (musafir), berdasarkan Hadis Nabi Muhammad saw, yang diriwayatkan dari Abu Hurairah:

عَنْ أَبِيْ هُرَيْرَةَ رَضِيَ اللهُ عَنْهُ قَالَ: قَالَ رَسُوْلُ اللهِ صَلَّى اللهُ عَلَيْهِ وَسَلَّمَ، فِي البَحْرِ: هُوَ الطَّهُوْرُ مَاؤُهُ، الْحِلُّ مَيْتَتُهُ تَارِيخُ الْحَدِيثِ أَبُو دَاوُدَ وَالتِّرْمِذِيُّ وَالنَّسَائِيُّ وَابْنُ مَاجَه وَابْنُ أَبِي شَيْبَةَ وَاللَّفْظُ لَهُ, وَصَحَّحَهُ ابْنُ خُزَيْمَةَ وَاَلتِّرْمِذِيُّ, وَرَوَاهُ مَالِكٌ وَالشَّافِعِيُّ وَأَحْمَدُ

Artinya : "*Dari Abu Hurairah radiyallahu'anhu ia berkata: Telah bersabda Rasulullah shallalahu'alaihi wa sallam tentang (hukum) air laut. "Air laut itu suci, (dan) halal bangkainya." [HR Abu Dawud, Tirmidzi, an-Nasa'I, Ibnu Majah, dan Ibnu Abi Syaibah, dan ini merupakan lafazhnya, dan telah dishahihkan oleh Ibnu Khuzaimah, dan Tirmidzi dan telah diriwayatkan pula oleh Malik, asy-Syafi'i, dan Ahmad]*.

Hadist tersebut menjelaskan bahwa laut itu suci airnya dan halal bangkainya. maupun berupa tumbuhan yang mengapung di permukaan air laut, ini semua dihalalkan oleh Allah SWT untuk dimanfaatkan oleh manusia. Dari hadis tersebut dapat diartikan bahwa selain hewan yang hidup di laut, terdapat pula kelompok tumbuhan yang hidup di laut yang dapat dimanfaat sebagai sumber bahan pangan karena memiliki nilai gizi dan dapat pula digali potensi lainnya yang mampu menghasilkan nilai ekonomi.

Salah satu tumbuhan laut yang telah diketahui memiliki manfaat adalah makro algae yang terdiri dari berbagai jenis, diantaranya adalah *Gracilaria verrucosa* Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Basmal dkk (2020), *Gracilaria verrucosa* memiliki kandungan makronutrien seperti nitrogen (N), natrium (Na), kalium (K) dan magnesium (Mg), juga memiliki kandungan mikronutrien seperti tembaga (Cu), Boron (B), Besi (Fe), Mangan (Mn), dan Zinc (Zn). Selain itu, kandungan utama daripada *Gracilaria verrucosa* adalah dinding sel yang terdiri dari 17,7% selulosa, 1,65% hemiselulosa, dan 1,12% lignin. Adanya kandungan selulosa pada rumput laut *Gracilaria verrucosa* dapat

digunakan sebagai bahan dasar untuk membuat energi terbarukan berupa bioetanol melalui proses konversi dari selulosa menjadi alkohol dengan bantuan mikroorganisme khamir.

Informasi mengenai potensi rumput laut sebagai salah satu sumber energi terbarukan telah termaktub dalam QS Yasin: 80, Allah SWT berfirman:

ٱلَّذِى جَعَلَ لَكُم مِّنَ ٱلشَّجَرِ ٱلْأَخْضَرِ نَارًا فَإِذَآ أَنتُم مِّنْهُ تُوقِدُونَ

Artinya *:"yaitu (Allah) yang menjadikan api untukmu dari kayu yang hijau, maka seketika itu kamu nyalakan (api) dari kayu itu." (QS. Yasin: 80)*

Menurut tafsir Al-Mishbah ayat diatas dapat diartikan bahwa Tuhan yang menciptakan api dari pohon hijau setelah mengalami pengeringan karena di dalamnya terdapat kekuatan surya yang berpindah ke dalam tumbuhan melalui proses asimilasi sinar. Sel tumbuhan mengandung zat hijau (klorofil) menghisap karbondioksida dari udara dan akan berinteraksi dengan air yang diserap dari tumbuhan sehingga dihasilkan karbohidrat berkat bantuan sinar matahari. Dari situ kemudian terbentuk kayu yang pada dasarnya terdiri atas karbon, hydrogen, dan oksigen. Dari kayu itu kemudian dapat dibuat arang sebagai bahan bakar. Daya yang tersimpan di dalam arang akan keluar ketika dibakar yang dapat dimanfaatkan sebagai sumber energi (Shihab, 2012)

Dari penjelasan tafsir di atas dapat ditarik hubungan kesamaan dengan sifat yang dimiliki rumput laut *Gracilaria verrucosa* yang mana rumput laut tersebut merupakan tumbuhan berkayu lunak yang juga memiliki kandungan karbohidrat berupa lignoselulosa yang dapat diubah menjadi bahan bakar dengan tahapan preparasi terlebih dahulu untuk dapat menghasilkan etanol yang digunakan sebagai energi terbarukan. Alam semesta, dengan elemen benda-benda

hidup dan tak hidupnya, merupakan tanda-tanda adanya penciptaan. Semua ciptaan itu ada hanya untuk memperlihatkan tanda-tanda kekuasaan-Nya sebagaimana firman Allah SWT dalam QS. Ali Imran: 190-191

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَاوَاتِ وَالْأَرْضِ وَاخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ لَآيَاتٍ لِأُولِي الْأَلْبَابِ ﴿١٩٠﴾ الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَامًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَاوَاتِ وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَٰذَا بَاطِلًا سُبْحَانَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ ﴿١٩١﴾

Artinya : *"Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, dan pergantian malam dan siang terdapat tanda-tanda (kebesaran Allah) bagi orang yang berakal (yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambal berdiri, duduk, atau dalam keadaan berbaring, dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata), "Ya Tuhan kami, tidaklah Engkau menciptakan semua ini sia-sia; Maha Suci Engkau, lindungilah kami dari azab neraka." (QS. Ali Imran: 190-191)*

Ayat diatas menjelaskan tentang tanda-tanda kekuasaan Allah SWT bagi ulul albab, menurut tafsir Al-Misbah ulul albab yaitu kaum intelektual beriman yang memiliki ciri khas bahwa mereka selalu merenungkan keagungan dan kebesaran Allah SWT dalam hati dimana pun mereka berada. Tidak ada satu waktu dan keadaan dibiarkan berlalu begitu saja, kecuali diisi dan digunakan untuk memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi, dan keunikan yang terkandung di dalamnya. Mereka diharapkan dapat menjelaskan secara akademik fenomena alam tersebut, sehingga setiap orang yang berakal akan mengambil kesimpulan dan berkata, "Tuhanku, tidak Engkau ciptakan jagat ini tanpa ada hikmah yang telah Engkau tentukan di balik itu". Ayat ini berisi ajakan agar umat islam dapat merenungi hikmah terhadap hakikat terciptanya alam semesta dan seisinya agar menambah keimanan seorang hamba setelah ia menyadari betapa hebat kuasa Allah SWT yang telah mengatur alam tempat ia berada.

BAB V
PENUTUP

5.1 Kesimpulan

1. Kadar glukosa tertinggi diperoleh dari konsentrasi HCl 1 M yaitu sebesar 383,6 ppm.
2. Waktu fermentasi yang menghasilkan kadar etanol tertinggi diperoleh dari variasi waktu 96 jam dengan kadar etanol sebesar 8,85%
3. Karakterisasi produk etanol yang dihasilkan muncul dua puncak. Puncak etanol dihasilkan pada waktu retensi 1,374 menit, sedangkan produk pengotor berupa asetal dehida muncul pada waktu retensi 1,638 menit.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap proses delignifikasi dalam menentukan konsentrasi pelarut yang digunakan, waktu delignifikasi, serta pembaharuan metode agar dapat mendegradasi lignin dan hemiselulosa dengan baik, sehingga selulosa dapat terekstaksi dengan maksimal dan memiliki nilai rendemen yang lebih tinggi. Selanjutnya, pada saat fermentasi dapat dilakukan variasi perbandingan jumlah ragi, nutrisi, dan inokulum dengan variasi waktu fermentasi yang lebih lama, dengan harapan dapat memperoleh etanol dengan kadar yang lebih tinggi dan murni.

DAFTAR PUSTAKA

Adini, S., Endang K., dan Anto B. 2015. Produksi Bioetanol dari Rumput Laut dan Limbah Agar *Gracilaria* sp. dengan Metode Sakarifikasi Yang Berbeda. Jurnal Bioma Vol. 16, No. 2, hlm.65-75. ISSN: 1410-8801.

Ahda, A., Surono A, dan Imam B. 2005. *Profil Rumput Laut Indonesia*. Jakarta: Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya Departemen Kelautan dan Perikanan.

Ahmad, A., Sri R.M., dan Rahani. 2020. Pengaruh Konsentrasi Asam Klorida (HCl) Pada Hidrolisis dan Waktu Fermentasi Terhadap Limbah Padat Sagu Menjadi Bioetanol. *Jurnal Teknik Kimia*. Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia "Kejuangan". ISSN: 1693-4393.

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*. Vol. 5, No. 2: 445-452.

Aidh, Al-Qarni. 2007. *Tafsir Muyassar*. Jakarta: Qisthi Press.

Alaydin, S., Bhayu G.B., Muammar Y. 2020. Literature Review: Perbandingan Kadar Selulosa dari Rumput Laut Merah *(Rhodophyta)*. *Jurnal Amina*. Vol. 2, No. 1: 33-37.

Al-Muntahzor, M.N. 2020. Pengaruh Variasi Jumlah Ragi Roti (*Saccharomyces cerevisiae*) dan Lama Fermentasi Kertas HVS Bekas Pakai Terhadap Kadar Etanol. *Skripsi*. Jurusan Biologi FST Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

Amalia, Y., Sri R.M, dan Chairul. 2014. Pembuatan Bioetanol dari Limbah Padat Sagu Menggunakan Enzim Selulase dan *Yeast Saccharomyces cerevisiae* dengan Proses *Simultaneous Sacharification and Fermentation* (SFF) dengan Variasi Konsentrasi Substrat dan Volume Inokulum. *Jurnal Online Mahasiswa*. Vol. 1, No. 1. ISSN: 2355-6870.

Anaawang, Y, Arpiwi N.L, dan Yenni C. 2017. Pembuatan Bioetanol dari Rumput Laut *Gracilaria* sp. Melalui Hidrolisis Menggunakan Selulase. *Jurnal Metamorfosa*. Vol. 4, No. 1: 94-101. ISSN: 2302-5697.

Anggadiredja, JT, Zatnika A, Purwanto H, Istini S. 2006. *Rumput laut: Pembudidayaan, Pengelolaan, dan Pemasaran Komoditas Perikanan Potensial*. Jakarta: Penebar Swadaya.

Anggraeni, L.Z. 2017. Perbedaan Hidrolisis Asam Sulfat (H_2SO_4) dan Asam Klorida (HCl) dalam Pembuatan Bioetanol Berbahan Baku Rumput Laut
Produk bioetanol