

**PENGARUH PENAMBAHAN VARIASI JUMLAH RAGI ROTI
Saccharomyces cerevisiae DAN LAMA FERMENTASI TERHADAP
KADAR ETANOL DARI ALGA HIJAU *Spirogyra* sp.**

SKRIPSI

Oleh:

**MOCHAMAD MARDIANTO
NIM. 17620003**



**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2023**

**PENGARUH PENAMBAHAN VARIASI JUMLAH RAGI ROTI
Sacharomyces cerevisiae DAN LAMA FERMENTASI TERHADAP
KADAR ETANOL DARI ALGA HIJAU *Spirogyra* sp.**

SKRIPSI

Oleh:

**MOCHAMAD MARDIANTO
NIM. 17620003**

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

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG**

**PENGARUH PENAMBAHAN VARIASI JUMLAH RAGI ROTI
Sacharomyces cerevisiae DAN LAMA FERMENTASI TERHADAP KADAR
ETANOL DARI ALGA HIJAU *Spirogyra* sp.**

SKRIPSI

Oleh:

MOCHAMAD MARDIANTO

NIM. 17620003

telah diperiksa dan disetujui untuk diuji

tanggal: 17 Januari 2023

Pembimbing I



Ir. Liliek Harianic AR, M.P.
NIP.19620901199803 2001

Pembimbing II



Oky Bagas Prasetyo, M.PdI
NIP 19890113 20180201 1 244

Mengetahui,

Program Studi Biologi



Dr. Evy S. S. Savitri, M.P.

NIP.1970101019800312 2 002

**PENGARUH PENAMBAHAN VARIASI JUMLAH RAGI ROTI
Sacharomyces cerevisiae DAN LAMA FERMENTASI TERHADAP
KADAR ETANOL DARI ALGA HIJAU *Spirogyra* sp.**

SKRIPSI

Oleh:

MOCHAMAD MARDIANTO

NIM. 17620003

**telah dipertahankan di depan Dewan Penguji Skripsi dan dinyatakan
diterima sebagai salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar**

Sarjana Sains (S.Si)



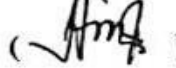

Tanggal: 17 Januari 2023

**Ketua Penguji : Prof. Dr. Ulfah Utami, M.Si
NIP. 19650509 199903 2 002**

**Anggota Penguji I : Prilya Dewi Fitriasari, M.Sc
NIP. 19900428 2016080 1 2062**

**Anggota Penguji II : Ir. Liliek Harianie AR, M.P
NIP. 19620901 199803 2 001**

**Anggota Penguji III : Oky Bagas Prasetyo, M.PdI
NIP. 19890113 20180201 1 244**

()
()
()
()

**Mengesahkan,
Program Studi Biologi**



**Sandi Savitri, M.P.
19741018 200312 2 002**

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Mochamad Mardianto

Nim : 17620003

Program Studi : Biologi

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Penelitian : Pengaruh Penambahan Variasi Jumlah Ragi Roti *Saccharomyces Cerevisiae* dan Lama Fermentasi Terhadap Kadar Etanol dari Alga Hijau *Spirogyra* sp.

Saya menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar hasil karya saya sendiri, bukan sumber informasi, tulisan atau pemikiran orang lain, yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pemikiran saya sendiri, kecuali dengan mengutip daftar pustaka dari sumber ekstrak. Apabila di kemudian hari terbukti karya ini adalah hasil jiplakan, saya siap menerima sanksi ilmiah dan hukum atas perbuatan tersebut.

Malang, 4 Januari 2023

Yang membuat/pernyataan



Mochamad Mardianto
17620003

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak akan dipublikasikan, tetapi tersedia untuk umum selama hak cipta masih menjadi milik penulis. Daftar pustaka dapat dipertahankan, tetapi sitasi hanya dapat dilakukan atas izin penulis dan harus disertai dengan metode ilmiah sitasi.

Pengaruh Penambahan Variasi Jumlah Ragi Roti *Saccharomyces cerevisiae* dan Lama Fermentasi Terhadap Kadar Etanol dari Alga Hijau *Spirogyra* sp.

Mochamad Mardianto, Liliek Harianie, Oky Bagas Prasetyo

Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri
Maulana Malik Ibrahim Malang

ABSTRAK

Penggunaan energi minyak bumi terus mengalami peningkatan sedangkan produksi dalam negeri tidak sebanding dengan permintaan, sehingga mendorong diberlakukan kebijakan impor yang tentunya membebani perekonomian negara. Hal ini sangat berdampak terhadap pembangunan, dilain sisi efek samping yang ditimbulkan dari penggunaannya mempengaruhi kualitas lingkungan. Usaha eksplorasi sumber energi alternatif harus terus dilakukan guna menurunkan masalah yang sudah ditimbulkan dengan menggunakan sumber lain dari alam yang tentunya berkelanjutan. Bioetanol dapat dipertimbangkan sebagai solusi bagi masalah tersebut, dihasilkan dengan proses fermentasi biomassa yang mengandung gula seperti alga hijau *Spirogyra* sp.. Tujuan dilakukannya penelitian kali ini adalah untuk mengetahui pengaruh dari setiap perlakuan yang diberikan yaitu jumlah ragi 0,5, 1, dan 2 % serta lama fermentasi 5, 7, dan 9 hari terhadap kadar etanol yang dihasilkan setelah proses fermentasi alga *Spirogyra* sp. oleh *Saccharomyces cerevisiae*. Penelitian kali ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan dua faktor yaitu jumlah ragi *Saccharomyces cerevisiae* dan lama fermentasi dan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali. Data hasil percobaan kemudian dianalisis menggunakan Anava dua jalur dan untuk mengetahui pengaruh nyata dari setiap perlakuan maka digunakan uji DMRT (5%). Hasil didapatkan bahwa penambahan variasi jumlah ragi *Saccharomyces cerevisiae* dan lama fermentasi berpengaruh nyata terhadap kadar etanol. Nilai tertinggi adalah pada penambahan 2% ragi dan lama fermentasi selama tujuh hari yaitu sebesar 10,10%, sedangkan nilai terendah pada penambahan 0,5% ragi dan lama fermentasi selama lima hari sebesar 1,26%.

Kata kunci : *Spirogyra* sp, jumlah ragi *Saccharomyces cerevisiae*, lama fermentasi, kadar etanol

Effects of Adding Variations in The Number of Breads *Saccharomyces cerevisiae* and Long Fermentation to Ethanol Levels of The *Spirogyra* sp. Green Algae

Mochamad Mardianto, Liliek Harianie, Oky Bagas Prasetyo

Biology Study Program, Faculty of Science and Technology, Islamic State University Maulana Malik Ibrahim Malang

ABSTRACT

Oil energy use has been continuing to increase while domestic production is not comparable to demand, prompting the implementation of an import policies that are certainly demanding for the economy. This has significantly affected development, on the other side of the effects of its use affecting the quality of the environment. The exploration of alternative energy sources must continue to reduce the already posed problems by using other natural sources that are certainly sustainable. Bioethanol could be considered a solution to the problem by the process of biomass fermentation containing sugars such as green algae *Spirogyra* sp. by *Saccharomyces cerevisiae*. The purpose of this new study is to identify the impact of each treatment of 0,5, 1 and 2% of yeast and the length of 5, 7 and 9 days fermentation of ethanol produced after the fermentation of the *Spirogyra* sp.. The research uses a random design complete with two factors: *Saccharomyces cerevisiae* yeast and old fermentation and repeated repetition of three times. The test results were then analyzed using Two Way Anova and to know the effects of any treatment used DMRT 5% test. The result was that the increased variation in the number of *Saccharomyces cerevisiae* and the duration of fermentation had a definite effect on the ethanol level. The highest would be the 2.2 percent increase in leaven and the 7-day duration of fermentation by 10,10%, with the lowest value of 0,5% increase in leaven and the length of 5 days of fermentation by 1,26%.

Keyword: *Spirogyra* sp. the amount of yeast *Saccharomyces cerevisiae*, fermentation time, ethanol level.

تأثير إضائة الختالينات ني عدد خميرة الخبز *Saccharomyces cerevisiae* ومدة التخمر على
مستويات الإيثانول من طحالب خضراء *Spirogyra* sp.

محمد مردينطو، لك هاربي، الكى بحس نرسط

البحث الجامعي، قسم علم الحياء، كلية العلوم والتكنولوجيا، جامعة مولانا مالك إبراهيم
الإسلامية الكويتية

ةالتجر يد

والمستعمل استخدام الأداة في الددياد في البن ال يمكن مقارنة الإنزيم المحلي بال لب نيا سواسيات الاستيراد
التي هي بقل نالكيد م البية لالتصناد. وود رثر كلك بل شغل كدير على الإنموية على الاجازب امخر من نار استخدام على
جودة البية. يجب ان يستعمل مصادر ال اداة البديلة في الحد من المل الك الم رواله بال عل باستخدام مصادر
طبيعة رخرى من المؤكد رزها مستدامة. ويمكن اختيار الإيثانول الحبول الالك للكملة من خالل عملية تخمر الكفاءة
الجوية التي تحول على المستخرجات مثل ال حالب الخضراء. الغرض من هاه الدراسات الجديدة هو تحديد تأثير كل
معالجته من 0,5,1 و 2 ٪ من التخمر من 5,7 و 9 رينام إلى محتوى الإيثانول المرنج بتتد عمليته تخمر
ال *Spirogyra* sp عن طريق *Saccharomyces cerevisiae*. يستخدم البحث تصميما عل نيا كالم م
عاملين: خميرة السترايا والتخمير والتفرار المتكرر ثالث مرات. ثم تم تحليل نتائج الاختيار باستخدام مستشارين
رونوا (Anova) وتحديد ثار كل علم، ولك باستخدام اختبار (DMRT) اختيار المسئاة الجذوة بنسبة 5 ٪.
وكاننت النتيجة رن ديادة التباين في عدد السيتوكاروميسيات المخيخة ومدة التخمر اادا تأثير واضلل على مستوى
الإيثانول. ظهرت النتائج رن إضائة الختالينات في كمية خميرة خميرة *Saccharomyces cerevisiae* ووزت
التخمير كان لها تأثير م غول على محتوى الإيثانول. رعلى يؤمة كاننت إضائة 2 ٪ خميرة ومدة التخمر لمدة 7 ريام
10.10 ٪ بينم رؤل يؤمة كاننت إضائة 0.5 ٪ خميرة ومدة التخمر لمدة 5 ريام 1.26 ٪.

كلمات البحث: سبيروجيرا سب. عدد الخماسي الساقورسي سبيري سي، وعجرة طوية، مستويات الإيثانول

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah hirabbil alamiin, puja dan puji syukur selalu dipanjatkan kehadirat tuhan yang maha esa Dialah Allah SWT yang maha pengasih lagi maha penyayang. Atas berkah, rahmat, dan karunia yang telah diberikan, sehingga tugas akhir yang berjudul “Pengaruh Penambahan Jumlah Ragi Roti (*Saccharomyces cerevisiae* dan Lama Fermentasi Terhadap Kadar Etanol Dari Alga Hijau *Spirogyra* sp.”, dapat diselesaikan dengan baik. Sholawat serta salam tak lupa dihaturkan kepada baginda Sayyidina Muhammad SAW yang telah membawa kita dari jaman kegelapan menuju jaman yang terang-benderang dengan agama islam. Pada kesempatan ini izinkanlah menyampaikan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. H. M. Zainuddin, M.A selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
2. Dr. Sri Harini, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
3. Dr. Evika Sandi Savitri selaku Ketua Program Studi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi atas arahan dan fasilitas yang telah diberikan kepada penulis
4. Dr. Dwi Suheriyanto, M.P selaku dosen wali yang telah membimbing dan memberikan masukan terhadap penulis untuk menyelesaikan skripsi dengan baik
5. Ir. Liliek Harianie AR, M.P selaku dosen pembimbing biologi dan Bapak Oky Bagas Prasetyo M.PdI selaku dosen pembimbing agama yang telah memberikan arahan, motivasi, kritik dan saran dalam menyelesaikan tugas akhir skripsi ini.

6. Seluruh dosen dan laboran Program Studi Biologi yang telah mendidik dan memberikan ilmu yang berlimpah kepada penulis selama menuntut ilmu
7. Para laboran yang ikut membantu dalam proses perkuliahan serta penyelesaian penelitian yang tidak bisa penulis sebutkan satu persatu
8. (Almh) Ibu Aida, Bapak Abdul Adim Kosim, kakak, dan keluarga besar atas bantuan baik itu do'a maupun materi, kasih sayang, pengertian, motivasi, dan dukungan yang diberikan kepada penulis.
9. Seluruh teman-teman Program Studi Biologi yang telah menemani, membantu, memberi doa, dan dukungan selama masa perkuliahan.

Penulis berharap semoga hasil dari penelitian ini dapat bermanfaat bagi banyak pihak, dan memberikan sumbangan pemikiran bagi pengembangan ilmu pengetahuan.

Malang, Januari 2023

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman Persetujuan	ii
Halaman Pengesahan	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	iii
HALAMAN PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI	iv
ABSTRAK	vi
KATA PENGANTAR	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah.....	9
1.3. Tujuan Penelitian	9
1.4. Hipotesis	9
1.5. Manfaat penelitian	10
1.6. Batasan Masalah	10
BAB II. KAJIAN PUSTAKA	12
2.1. Deskripsi Bioetanol	12
2.2. Lignoselulosa	13
2.3. Selulosa	13
2.4. <i>Spirogyra</i> sp	14
2.5. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
2.6. Hidrolisis.....	19
2.7. Fermentasi Etanol	21
2.8. Destilasi.....	25
BAB III. METODE PENELITIAN	26
3.1. Rancangan Penelitian.....	26
3.2. Waktu dan Tempat	26
3.3. Variabel Penelitian	27
3.4. Alat dan Bahan.....	27
3.4.1. Alat.....	27
3.4.2. Bahan	28
3.5. Prosedur Penelitian	28
3.5.1. Persiapan Bahan.....	28
3.5.2. <i>Pretreatment</i> Bahan.....	28
3.6. Hidrolisis Enzimatis Alga Hijau <i>Spirogyra</i> sp	29
3.7. Penentuan Nilai Gula Pereduksi.....	29
3.8. Fermentasi Glukosa Hasil Hidrolisis Enzimatis Alga <i>Spirogyra</i> sp.....	31
3.9. Destilasi Larutan Hasil Fermentasi	31
3.10. Penentuan Kadar Bioetanol Berdasarkan Nilai Gravitasi Jenis.....	32
3.10.1. Pembuatan Kurva Standart Etanol.....	32
3.10.2. Pengukuran Kadar Bioetanol Sampel Hasil Fermentasi	33
3.11. Analisis Data Menggunakan Anava.....	33
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	35
4.1. Pengaruh Kombinasi Perlakuan Penambahan Jumlah Ragi Roti <i>Saccharomyces cerevisiae</i> dan Lama Fermentasi Terhadap Kadar Etanol ...	35
4.2. Pengaruh Penambahan Variasi Jumlah Ragi <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Terhadap Kadar Etanol.....	44

4.3. Pengaruh Lama Fermentasi Terhadap Kadar Etanol.....	48
BAB V. PENUTUP.....	54
5.1. Kesimpulan.....	54
5.2. Saran.....	54
DAFTAR PUSTAKA.....	56

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. Kandungan Karbohidrat Dari Beberapa Alga	17
Tabel 4.1. Kadar Glukosa Hasil Hidolisis Alga Hijau <i>Spirogyra</i> sp	37
Tabel L1.1. Nilai Absorbansi Glukosa Standar	61
Tabel L1.2. Hasil Analisis Kadar Gula Media Sebelum Fermentasi	62
Tabel L1.3. Hasil Analisis Kadar Gula Media Setelah Fermentasi.....	63
Tabel L1.4. Hasil Analisis Kadar Gula Terpakai Pada Proses Fermentasi ...	63
Tabel L1.5. Hasil Perhitungan Kurva Standar Etanol	63
Tabel L1.6. Nilai Berat Jenis Seluruh Sampel (<i>Specific Gravity</i>)	65
Tabel L1.7. Kadar Bioetanol	65

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Struktur Kimia Rantai Selulosa.....	14
Gambar 2.2. Morfologi Makroskopis dan Mikroskopis Alga Hijau <i>Spirogyra</i> sp.....	15
Gambar 2.3. Kurva Pertumbuhan <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
Gambar 2.4. Skema Hidrolisis Selulosa Oleh Enzim Selulase	21
Gambar 2.5. Skema Alur Fermentasi Etanol.....	23
Gambar 4.1. Kurva Standard Glukosa	36
Gambar 4.2. Pengaruh Interaksi Penambahan Jumlah Ragi <i>Saccharomyces cerevisiae</i> dan lama Fermentasi Terhadap Kadar Etanol	39
Gambar 4.3. Pengaruh Penambahan Jumlah Ragi Roti <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	45
Gambar 4.4. Skema Metabolisme Glukosa Menjadi Etanol Oleh <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	47
Gambar 4.5. Diagram Pengaruh Lama Fermentasi Terhadap Kadar Etanol	48
Gambar 11.1, Kurva Standar Glukosa	61
Gambar 11. 2. Kurva Standar Etanol.....	64

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.1. Analisis Kadar Gula Menggunakan Metode Fenol-Sulfat	61
Lampiran 1.2. Hasil Analisis Kadar Bioetanol Sampel Berdasarkan Nilai Berat Jenis (<i>Specific Gravity</i>/SG).....	63
Lampiran 1. 3. Data Hasil Analisis Statistik	66
Lampiran 1. 4.Dokumentasi Penelitian.....	67

BAB I PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Meningkatnya sektor industri dan sektor ekonomi yang bersamaan dengan meningkatnya jumlah penduduk, menyebabkan kebutuhan akan pemenuhan energi terus mengalami kenaikan. Sumber energi yang terus mengalami kenaikan salah satunya adalah penggunaan bahan bakar minyak. Menurut data dari kementerian ESDM kebutuhan bahan bakar minyak terus mengalami lonjakan setiap tahun dengan rata-rata kenaikan sebesar 1,76%. Pada tahun 2017 kebutuhan energi ini mencapai 1,420 juta kiloliter (52,58%) dari total penggunaan energi (Sa'adah dkk., 2017).

Sumber bahan baku penghasil energi fosil terus mengalami penurunan, pada tahun 2009 total produksi minyak bumi di Indonesia sekitar 340 juta barrel kemudian terus menurun hingga pada tahun 2019 hanya mencapai 280 juta barrel. Kondisi tersebut mendorong Indonesia untuk melakukan impor minyak, dan jika dibiarkan maka dapat menimbulkan krisis energi serta berdampak pada perekonomian. Menurut (Anugrah dkk., 2020), kebutuhan energi saat ini masih banyak berasal dari fosil yang mana jumlahnya terbatas, hal ini jika terus berlanjut maka dapat menimbulkan krisis energi yang mempengaruhi perekonomian negara. Oleh karena itu, perlu melakukan upaya agar mengurangi ketergantungan dengan melakukan eksplorasi, pembuatan dan penggunaan bahan bakar dari alam.

Bahan bakar fosil juga telah memberi dampak buruk terhadap kualitas lingkungan seperti polusi udara, pencemaran (air dan tanah), dan hujan asam. Beberapa peneliti telah memperingatkan tentang bahaya mulai menipisnya sumber bahan bakar ini tanpa mengembangkan energi alternatif dan berkelanjutan,

sedangkan pencemaran serta emisi yang dihasilkan dari pembuatan dan penggunaan bahan bakar ini adalah permasalahan lain yang belum ditangani di berbagai negara. Pembakaran bahan bakar fosil menyebabkan suhu bumi menjadi meningkat dikarenakan pembakarannya menghasilkan gas karbondioksida yang telah menumpuk di atmosfer (Khaira dkk., 2008). Menurut (Oludaisi *et al.*, 2018), pembakaran yang berasal dari bahan bakar fosil merupakan sumber utama dari emisi karbon dan masalahnya dapat berlanjut jika tidak ada upaya untuk melakukan pembaruan energi yang berkelanjutan di negara yang masih berkembang.

Allah telah berfirman dalam surah Ar-Rum ayat ke-41, mengenai kerusakan yang timbul di muka bumi akibat ulah manusia, bunyi surahnya sebagai berikut:

“ظَهَرَ الْفَسَادُ الْبَرِّ وَالْبَحْرِ بِمَا كَفَرُوا فِيهَا وَالْحَرْبُ بَيْنَ أَلْمِثَالِ لَأُولَئِكَ عَذَابٌ أَلِيمٌ”

Artinya : *Telah tampak kerusakan di darat dan di laut disebabkan perbuatan tangan manusia. (Melalui hal itu) Allah membuat mereka merasakan sebagian dari (akibat) perbuatan mereka agar mereka kembali (ke jalan yang benar).* (Q.S.Ar-Rum: 41).

Berdasarkan ayat tersebut maka dapat diketahui bahwa telah terjadi kerusakan (*al-fasād*) di muka bumi baik itu di daratan maupun di lautan. Kerusakan ini dapat timbul karena ulah manusia yang kurang berhati-hati dalam mengelola dan menjaga lingkungan, sehingga Allah menurunkan azab bagi mereka yang berbuat kerusakan agar mereka sadar dan kemudian kembali menuju jalan yang benar. Maksud dari *Al-fasād* mempunyai makna “perusakan”. Perusakan ini dapat berupa pencemaran lingkungan, rusaknya flora dan fauna serta biota laut atau bahkan kemusnahan alam sehingga tidak layak lagi ditinggali. Hal tersebut bisa disebabkan karena sifat buruk yang dimiliki manusia seperti serakah, iri, dengki, sehingga mereka melanggar hukum Allah SWT dengan melakukan eksploitasi alam secara berlebihan, perampokan, perompakan dan peperangan (Tafsir Kemenag,

2017), Ibnu Abbas RA mengemukakan pendapat bahwa “makna *al-fasad* maksudnya tanaman yang sedikit, berkurangnya hasil laut karena dosa-dosa manusia serta hilangnya keberkahan, kurangnya berkah pada pekerjaan hamba, agar mereka bertobat”.

Allah SWT menegaskan bahwa sebagian akibat buruk dari perusakan alam akan diterima manusia dan sebagiannya lagi sudah diatasi dengan menyediakan sistem yang bisa memulihkan maupun menetralsir. Manusia yang menyanggah tugas sebagai pengganti (khalifah) Allah SWT di muka bumi, maka seharusnya mampu dalam menjalankan amanah ini dengan baik dan tidak berperilaku yang menimbulkan kerusakan. Maka dari itu, manusia harus berhati-hati dalam mengolah dan memanfaatkan sumber daya yang ada agar kehidupan di bumi tetap lestari.

Penelitian-penelitian mengenai bahan bakar terbarukan saat ini terus dikembangkan dalam upaya untuk mengurangi ketergantungan terhadap bahan bakar fosil disamping mengatasi masalah yang timbul akibat penggunaan bahan bakar tersebut. Bahan bakar nabati (*biofuels*) merupakan salah satu sumber energi terbarukan yang bisa dimanfaatkan manusia karena bahan baku di alam cukup banyak dan tidak semuanya termanfaatkan dengan baik. Sasana & Ghazali (2017) menyatakan bahwa energi terbarukan harus didapatkan dari sumber daya yang mudah didapatkan, berkelanjutan dan harus mampu dikelola dengan baik. Adapun menurut Jaelani (2017) menyatakan, penggunaan energi yang sifatnya berkelanjutan dapat membantu dalam mengurangi masalah lingkungan. Bahan bakar nabati yang dapat digunakan sebagai alternatif sumber energi dan

mengurangi ketergantungan terhadap bahan bakar fosil salah satunya adalah bioetanol.

Bioetanol ini bisa dicampurkan dengan bensin (*gasoline*) sebagai bahan bakar alternatif yang sering dikenal dengan gasohol maupun tidak dicampur (Azhar *et al.*, 2017), dapat dibuat dengan cara memfermentasikan bagian dari suatu bahan nabati yang mengandung biomassa berupa komponen gula, baik itu dalam bentuk pati maupun selulosa (Shah & Sen, 2011). Belakangan ini pemanfaatan bioetanol masih bersumber dari bahan alami yang terkandung gula atau pati tinggi serta umumnya dihasilkan dari bahan pangan hasil pertanian seperti singkong, tebu, jagung, dan umbi-umbian. Hal tersebut tentunya telah menimbulkan masalah baru yang mana terjadi persaingan antara sumber pangan dengan sumber energi dan juga membutuhkan lahan yang luas untuk membudidayakan tanaman tersebut.

Kementrian Energi dan Sumber Daya Mineral (KESDM) telah beberapa kali mengeluarkan peraturan mengenai penggunaan bioetanol sebagai campuran bahan bakar. Salah satu peraturannya adalah Permen ESDM nomor 12 tahun 2015 yang menyatakan bahwa pada tahun 2020 diwajibkan penggunaan bioetanol E5 (5% etanol dan 95% bensin) yang kemudian meningkat menjadi E20 pada tahun 2025. Akan tetapi dalam perjalannya terjadi beberapa kendala seperti terbatasnya jumlah bahan baku serta ongkos produksi yang tinggi sehingga peraturan tersebut direvisi dengan menurunkannya menjadi etanol 2%, tetapi hal tersebut masih juga belum terlaksana. Maka dari itu, perlu dilakukan upaya-upaya lain seperti eksplorasi bahan baku lain yang berpotensi menghasilkan etanol terbaik agar dapat mengatasi dilema tersebut.

Bahan baku potensial yang dapat dimanfaatkan dalam produksi bioetanol adalah alga. Menurut Chaudhary *et al.* (2014) di dalam alga terdapat kandungan karbohidrat yang cukup tinggi, kandungan lignin yang sedikit atau tidak ada sama sekali serta organisme ini mampu tumbuh dengan mudah dan cepat. Indonesia merupakan negara dengan perairan yang luas, tentunya terdapat banyak keanekaragaman jenis-jenis alga yang tumbuh di perairan tersebut. Akan tetapi pemanfaatannya hanya sebatas industri makanan serta bahan baku komoditas ekspor. Pertumbuhan industrialisasi yang mengarah pada pemanfaatan alga menjadi produk-produk lain masih tertinggal dari beberapa negara. Maka dari itu, perlu dilakukan tindakan kedepan untuk mengeksplorasi dan meneliti mengenai pemanfaatan alga secara berkesinambungan sebagai produk yang dapat bermanfaat, dalam hal ini yaitu pembuatan bioetanol.

Salah satu alga atau ganggang yang dapat dimanfaatkan untuk hal tersebut adalah *Spirogyra* sp. Alga ini termasuk kelompok ganggang hijau (*Chlorophyts*) yang mengandung biomasa karbohidrat tertinggi daripada alga lain yaitu sebesar 33% (Jaya dkk., 2018), sehingga dapat dipertimbangkan sebagai bahan bakar bio generasi ketiga. Selain itu kandungan ligninnya sangat sedikit sehingga dalam metode *pretreatment* pembuatan etanol tidak perlu menambahkan senyawa asam atau basa. Menurut Eshaq *et al.*, (2010); Singh *et al.*, (2013) kadar etanol lebih tinggi dihasilkan pada perlakuan tanpa penambahan asam atau basa.

Spirogyra sp. dapat ditemukan di perairan air tawar terutama yang menggenang seperti kolam atau danau. Salah satu tempat yang bisa ditemukan organisme ini dalam jumlah yang melimpah adalah di sumber mata air Desa Umbulan Kabupaten Pasuruan. Tempat tersebut merupakan sumber mata air

dengan debit air yang cukup besar 4600 liter per detik. Air yang akan dialirkan ke beberapa kota di Jawa Timur tersebut ditampung terlebih dahulu di suatu penampungan yang kemudian menjadi kolam dan waduk. Sejauh ini pemanfaatan alga tersebut ditempat ini masih belum dilakukan dimana keberadaanya dapat mempengaruhi kualitas dari air. Berdasarkan penelitian dari Eshaq *et al.*(2010) *Spirogyra* sp. dalam keadaan kering mengandung selulosa sebanyak 19%. Senyawa tersebut merupakan komponen yang berguna dalam proses pembuatan bioetanol dengan dihidrolisis terlebih dahulu menjadi glukosa (Ungureanu *et al.*,2020).

Hidrolisis secara enzimatis selulosa dapat dilakukan dengan penambahan enzim selulase. Proses hidrolisis menggunakan enzim diketahui lebih efisien daripada menggunakan senyawa asam. Menurut Musatto (2004) pada hidolisis asam dengan temperatur tinggi dihasilkan produk samping yang bersifat racun dan dapat menghambat proses fermentasi pembentukan bioetanol. Pada penelitian Wibowo *et al.*, (2013) yang melakukan hidrolisis *Spirogyra* sp. menggunakan asam diketahui menghasilkan kadar gula yang rendah daripada penelitian Sulfahri *et al.* (2016) yang melakukannya menggunakan enzim.

Proses fermentasi dilakukan oleh mikroorganisme yang menggunakan komponen gula untuk proses respirasinya. Salah satu mikroorganisme yang paling banyak digunakan dalam proses fermentasi adalah ragi roti *Saccharomyces cerevisiae*. Menurut Zabed *et al.* (2014) *Saccharomyces cerevisiae* yang terkandung dalam ragi roti sudah terseleksi dan mengalami hibridisasi sehingga mampu tumbuh dalam medium fermentasi lebih cepat dan merubah gula menjadi etanol lebih efisien. Penggunaan ragi ini juga dapat mempercepat dalam proses pembuatan bioetanol karena langsung dapat digunakan sebagai starter fermentasi.

Menurut Salsabilla (2013) ragi roti sudah mengandung *Saccharomyces cerevisiae* sehingga dapat digunakan sebagai inokulum secara langsung tanpa perlu menyiapkan secara khusus.

Selama proses fermentasi berlangsung, mikroba dalam hal ini *Saccharomyces cerevisiae* membutuhkan sejumlah substrat gula dan nutrisi lain yang mencukupi. Semakin banyak jumlah substrat dan nutrisi maka semakin mendukung pertumbuhan mikroba fermentasi. Menurut Riza (2016) nutrisi yang dapat ditambahkan ke dalam proses fermentasi didapatkan dari unsur nitrogen (N) yang dapat diambil dari senyawa urea dan NPK. Komposisi antara substrat, nutrisi, dan jumlah ragi perlu diperhatikan dalam proses fermentasi agar supaya produk hasilnya dapat maksimal. Komposisi tersebut dapat dinyatakan dalam persen agar sesuai dengan volume filtrat yang digunakan.

Jumlah *Saccharomyces cerevisiae* yang diberikan selama proses fermentasi dapat mempengaruhi kadar bioetanol yang dihasilkan. Semakin banyak jumlah ragi yang digunakan maka kadar bioetanol semakin tinggi, dibuktikan dengan hasil penelitian yaitu jumlah ragi tertinggi sebanyak 20% dengan proses fermentasi selama tujuh hari pada substrat bahan baku alga *Codium gappiorum* menghasilkan kadar etanol tertinggi yaitu sebesar 28,93% (Karta dkk., 2015), dan juga pada penelitian dari Yuniarti *et al.* (2018) dengan menggunakan variasi perlakuan 1, 3, dan 5 gr, didapatkan kandungan etanol tertinggi pada perlakuan pemberian ragi sebesar 5 gr dengan waktu fermentasi selama tujuh hari yaitu dengan kadar etanol sebesar 4,91%.

Kondisi penurunan ini juga disebabkan karena pengaruh waktu fermentasi yang diberikan. Waktu fermentasi memberikan kesempatan kepada mikroba untuk

merubah substrat gula dalam hal ini hasil hidrolisis *Spirogyra* sp. menjadi etanol. Pertumbuhan populasi mikroba terdiri dari beberapa fase yaitu fase adaptasi (lag), fase perkembangbiakan (eksponensial), fase pertumbuhan melambat (stasioner), dan fase kematian. Etanol yang telah dihasilkan dapat menjadi penghambat proses fermentasi bahkan menyebabkan kematian mikroba karena terjadi proses oksidasi senyawa bioetanol menjadi senyawa asam organik dan CO₂ (Ahmad, 2010). Menurut Stanley *et al.* (2010), keberadaan etanol mempengaruhi struktur dan fungsi dari membran sel khamir *Saccharomyces cerevisiae* serta menghambat proses endositosis.

Beberapa penelitian mengenai lama fermentasi sudah dilakukan akan tetapi penambahan jumlah ragi yang digunakan masih belum dilakukan. Penelitian dari Eshaq *et al.* (2010) melaporkan bahwa kadar etanol tertinggi dihasilkan pada fermentasi substrat glukosa hasil hidrolisis *Spirogyra* sp. selama 6 hari. Menurut penelitian dari Sulfahri dkk. (2016), proses fermentasi etanol dari alga hijau *Spirogyra* sp. selama 4 hari menghasilkan kadar etanol lebih dari 10% sebanyak 1000 mililiter bioetanol dari alga seberat 1300 gr. Dilain sisi, semakin banyak jumlah ragi yang digunakan semakin cepat dalam menghasilkan kadar etanol. Oleh karena itu penelitian kali ini dilakukan penambahan jumlah ragi sebanyak 0,5, 1, dan 2% dari volume filtrat yang digunakan serta dilakukan pada lama fermentasi 5,7 dan 9 hari. Penambahan tersebut bertujuan untuk mengetahui pengaruh kombinasi penambahan kedua variabel terhadap kadar etanol yang dihasilkan agar diketahui perlakuan mana yang menghasilkan kadar etanol yang maksimal.

1.2. Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang dapat dibuat berdasarkan latar belakang penelitian kali ini adalah.

1. Bagaimana pengaruh kombinasi perlakuan penambahan jumlah ragi roti *Saccharomyces cerevisiae* dan lama fermentasi terhadap kadar etanol dari alga *Spirogyra* sp. yang dihidrolisis secara enzimatis?.
2. Bagaimana pengaruh penambahan variasi jumlah ragi roti *Saccharomyces cerevisiae* terhadap kadar etanol dari alga *Spirogyra* sp. yang dihidrolisis secara enzimatis?.
3. Bagaimana pengaruh penambahan variasi lama fermentasi terhadap kadar etanol dari alga *Spirogyra* sp. yang dihidrolisis secara enzimatis?.

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukannya penelitian kali ini adalah sebagai berikut:

1. Untuk mengetahui pengaruh kombinasi perlakuan penambahan variasi jumlah ragi roti *Saccharomyces cerevisiae* dan lama fermentasi terhadap kadar etanol dari alga *Spirogyra* sp. yang dihidrolisis secara enzimatis
2. Untuk mengetahui pengaruh penambahan variasi jumlah ragi roti *Saccharomyces cerevisiae* terhadap kadar etanol dari alga *Spirogyra* sp. yang dihidrolisis secara enzimatis.
3. Untuk mengetahui pengaruh penambahan variasi lama fermentasi terhadap kadar etanol dari alga *Spirogyra* sp. yang dihidrolisis secara enzimatis.

1.4. Hipotesis

Hipotesis yang dapat dibuat pada penelitian kali ini adalah.

1. Kombinasi perlakuan jumlah ragi roti *Saccharomyces cerevisiae* dan lama fermentasi berpengaruh terhadap kadar etanol yang dihasilkan setelah proses fermentasi glukosa dari hasil hidrolisis enzimatis alga *Spirogyra* sp..
2. Penambahan variasi jumlah ragi roti *Saccharomyces cerevisiae* berpengaruh terhadap kadar etanol yang dihasilkan setelah proses fermentasi glukosa dari hasil hidrolisis enzimatis alga *Spirogyra* sp..
3. Lama fermentasi berpengaruh terhadap kadar etanol yang dihasilkan setelah proses fermentasi glukosa dari hasil hidrolisis enzimatis alga *Spirogyra* sp..

1.5. Manfaat penelitian

Penelitian kali ini diharapkan akan mendapat manfaat sebagai berikut.

1. Menjadi contoh pemanfaatan jenis *Spirogyra* sp. menjadi sumber energi alternatif yaitu bioetanol, agar dapat mengurangi ketergantungan terhadap bahan bakar fosil.
2. Mampu menaikkan nilai ekonomi dari alga jenis *Spirogyra* sp.
3. Mampu mengurangi permasalahan lingkungan seperti emisi gas hidrokarbon dan pemanasan global akibat penggunaan bahan bakar fosil.
4. Dapat dikembangkan secara besar sehingga menjadi solusi alternatif dalam mengatasi masalah krisis energi dan mendukung ketahanan energi nasional di masa depan.
5. Dapat menjadi solusi jika terjadi kenaikan harga minyak dunia.
6. Mendukung pemerintah dalam upaya kemandirian energi.

1.6. Batasan Masalah

Batasan masalah yang diambil dalam melakukan penelitian kali ini adalah.

1. Bahan untuk pembuatan etanol berupa alga hijau *Spirogyra sp.* didapatkan dari perairan air tawar di desa Umbulan, kecamatan Winongan, kabupaten Pasuruan.
2. Substrat yang digunakan adalah hasil hidrolisis alga *Spirogyra sp.* menggunakan enzim selulase komersial merk *Novozyme*.
3. Ragi roti *saccharomyces cerevisiae* digunakan untuk proses fermentasi adalah ragi roti komersial bermerk fermipan dengan variasi jumlah 0,5, 1, dan 2% dari volume filtrat.
4. Lama fermentasi yang digunakan adalah 5, 7, dan 9 hari.
5. Pengukuran kadar etanol menggunakan alat piknometer.

BAB II **KAJIAN PUSTAKA**

2.1. Deskripsi Bioetanol

Bioetanol merupakan salah satu jenis bahan bakar nabati (BBN) yang dapat dihasilkan melalui proses fermentasi oleh mikroorganisme, dengan mengubah kandungan karbohidrat menjadi senyawa etanol (Shah & Sen, 2011). Senyawa ini bisa dicampurkan dengan bensin (*gasoline*) dikenal dengan gasohol maupun tidak dicampur (Anugrah dkk., 2020). Bahan bakar bio ini memiliki keunggulan seperti lebih ramah lingkungan, bahan baku yang berlimpah, biaya produksi yang murah, dan dapat diproduksi secara berkelanjutan (Kristina dkk., 2012). Pada umumnya dihasilkan dari material bahan baku pertanian yang mengandung gula. Material ini dapat digolongkan sebagai material generasi pertama (glukosa) dan material generasi kedua (lignoselulosa dan pati) (Vohra *et al.*, 2014). Selain itu dapat juga memanfaatkan bahan-bahan lain yang tentu jumlahnya melimpah di alam dan kandungan gula yang banyak, salah satunya adalah organisme alga. Bioetanol berbahan baku alga merupakan jenis bioetanol tipe generasi ketiga (Chaudhary *et al.*, 2014).

Sehubungan dengan kimia organik, etanol merupakan senyawa organik (mengandung atom C,H,O) turunan hidrokarbon, terdapat gugus hidroksil (OH) terikat pada atom C ke-2 yang mana menentukan sifat fisis maupun sifat kimianya... Sifat kimia dari etanol diantaranya berat molekulnya 46,07, mempunyai berat jenis kurang dari air, tidak larut dalam air, mudah menguap dan terbakar (Endah dkk., 2007). Bioetanol mempunyai rumus bangun $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$ dan rumus molekul $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ namun kebanyakan ditulis dengan EtOH atau disebut etil alkohol. Etanol ini adalah senyawa yang banyak dimanfaatkan oleh manusia sebagai bahan bakar

alternatif, saat ini etanol telah banyak dikembangkan untuk pembuatannya dari berbagai bahan baku berupa tumbuh-tumbuhan yang disebut dengan bioetanol (Anugrah dkk., 2020).

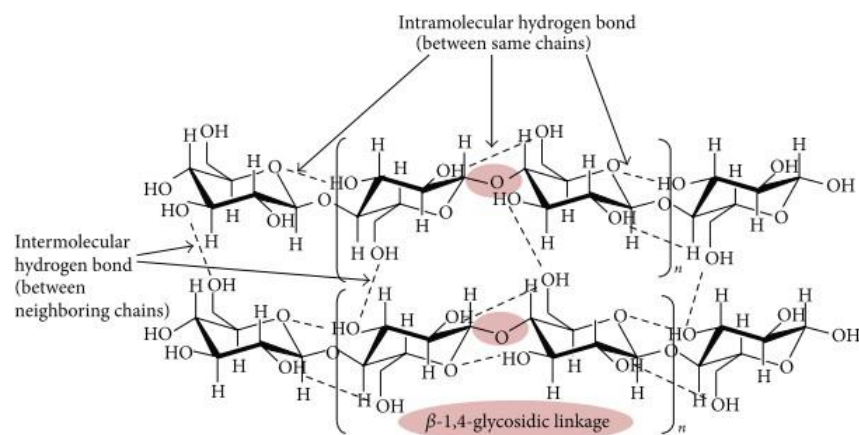
2.2. Lignoselulosa

Lignoselulosa merupakan penyusun terbesar pada tubuh organisme makhluk hidup yang dapat menyusun makanan sendiri. Biomassa ini telah menjadi kontributor yang signifikan dalam mencapai tujuan pembangunan berkelanjutan. Selama beberapa dekade terakhir, para peneliti telah mempraktikkan secara menyeluruh berbagai teknik untuk menghasilkan energi dari biomassa dan bahan terkaitnya. Pencapaian ini dapat dikaitkan dengan alasan utama seperti biaya rendah dan kelimpahan sumbernya. Biomassa lignoselulosa mengacu pada bahan kering tanaman terutama terdiri dari 25–30% hemiselulosa, 40–50% selulosa, 15–20% lignin, dan jejak pektin, senyawa nitrogen, dan bahan anorganik (Tayyab *et al.*, 2017). Komponen yang dapat digunakan sebagai pembuatan bioetanol adalah selulosa.

2.3. Selulosa

Selulosa merupakan polisakarida tunggal (homopolisakarida) yang terbentuk dari susunan rantai linier unit β -D-glukosa yang dihubungkan oleh β -1,4 glikosida. Ikatan hidrogen yang kuat menghubungkan rantai-rantai ini dan membentuk rantai selulosa menjadi mikrofibril, sehingga menjadikannya berbentuk kristal. Mikrofibril ini dibundel bersama untuk membentuk serat selulosa (Rathore *et al.*, 2014). Selulosa terdiri dari daerah kristal (teratur) yang tahan terhadap degradasi menggunakan pelarut polar maupun nonpolar dan daerah amorf (tidak teratur) yang mudah terdegradasi. Selulosa dapat didegradasi menjadi bentuk yang lebih kecil

seperti glukosa melalui proses hidrolisis dengan bantuan senyawa asam maupun enzim sehingga dapat digunakan untuk substrat fermentasi dalam produksi bioetanol. Selulosa ini dapat ditemukan pada dinding sel tanaman tingkat tinggi maupun protista mirip tumbuhan seperti alga (Kumar *et al.*, 2016). Sumber bahan baku pembuatan bioetanol ini tidak akan pernah habis dengan dihasilkan melalui proses fotosintesis organisme tersebut. Struktur rantai selulosa dapat dilihat pada (gambar 2.1.)



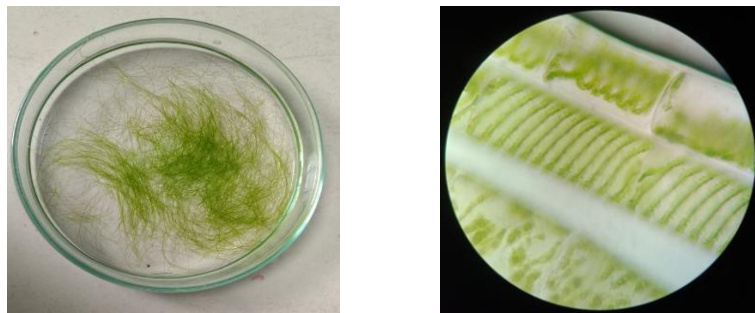
Gambar 2.1. Struktur kimia rantai selulosa (Lee et al., 2014)

2.4. *Spirogyra* sp.

Spirogyra sp. merupakan salah satu jenis mikroalga dalam filum *Chlorophyta* berwarna hijau karena terdapatnya klorofil sehingga dapat melakukan fotosintesis, hidup dalam bentuk koloni dan menghuni perairan air tawar maupun payau. Organisme ini memiliki masa pertumbuhan yang cepat dan mendominasi suatu perairan sehingga sering dianggap sebagai gulma. Cahaya dan nutrisi yang tinggi dapat meningkatkan perkembangan dari alga *Spirogyra* sp. ini (Pratiwi dkk., 2015). Organisme ini mempunyai efektifitas fotosintesis yang tinggi dengan nilai rata-rata 6-8% dibandingkan dengan organisme perairan yang lain (Pimpimol *et al.*, 2020).

Ganggang ini termasuk dalam ordo Zygnematales yang ditandai dengan tumbuh dalam bentuk filamen-filamen panjang tidak bercabang. Filamen-filamen ini menjadi lapisan bawah bagi spesies mikroskopis dan menjadi habitat bagi organisme air. Alga ini merupakan jenis yang paling mudah dibedakan pada kelas Zygnemaceae karena genus *Spirogyra* terdapat bentukan spiral pada kloroplasnya. *Spirogyra* sp. merupakan organisme penghuni habitat yang memiliki beraneka ragam kandungan nitrogen total dan fosfor total, konduktivitas air, dan alkalitas (Wongsawad & Peerapornpisal, 2015).

Berdasarkan identifikasi secara mikroskopis, alga hijau ini dalam jurnal penelitian menjelaskan bahwa ciri yang membedakan spesies alga *Spirogyra* sp. dengan jenis alga lain adalah adanya pita yang melingkar membentuk spiral pada kloroplasnya serta mengandung pirenoid. Dinding selnya berwarna hijau pada bagian tepi serta selnya berbentuk batang agak sedikit melengkung. (Ningrum dkk., 2016; Syaifuddin dkk., 2018). Alga hijau *Spirogyra* sp. dapat dilihat dalam (gambar 2.2.).



Gambar 2.2. Morfologi makroskopis dan mikroskopis alga hijau *Spirogyra* sp. (dokumentasi pribadi)

Taksonomi berdasarkan pertumbuhan vegetative dari alga ini dapat dibedakan berdasarkan tiga karakteristik yaitu: tipe dinding persilangan (replikasi atau semireplikasi), luas sel, dan banyaknya kloroplas (Wongsawad & Peerapornpisal,

2015). Genus ini tersebar luas di habitat air tawar termasuk air yang mengalir, kolam yang permanen atau kolam sementara. Reproduksi seksual golongan alga zygnematophyceae seperti *Spirogyra* sp. yaitu dengan konjugasi (pelekatan dua individu yang tidak sejenis) sehingga aplanogametes (gamet tanpa flagella) dialihkan di antara individu, dua gametangia dari perkawinan yang berbeda jenis bersatu membentuk sebuah tabung konjugasi, protoplasma satu berpindah ke protoplasma pasangan, terjadi plasmogami diikuti dengan kariogami. Reproduksi aseksual dilakukan dengan cara pemutusan talus yang kemudian akan tumbuh menjadi individu baru (Takano *et al.*, 2019).

Klasifikasi *Spirogyra* sp. menurut (Chalotra, 2013).

Filum: Chlorophyta

Kelas: Chlorophyceae

Ordo: Zygnemetales

Keluarga: Zygnemetaceae

Marga: *Spirogyra*

Jenis: *Spirogyra* sp.

Kandungan yang dapat ditemukan pada alga adalah senyawa organik seperti karbohidrat, senyawa bioaktif, mineral, vitamin, dan hormon (Sulfahri dkk., 2011). Secara teoritis, pembuatan bioetanol dari alga bisa jadi pemecahan yang tepat untuk mengganti bahan bakar minyak. Perihal ini disebabkan kandungan karbohidrat dari alga yang lumayan besar serta pertumbuhannya cepat (Banati, 2009). Alga *Spirogyra* sp. yang menurut (Jaya dkk, 2018) memiliki kandungan karbohidrat lebih tinggi daripada jenis alga lain yaitu dengan nilai 33%, sedangkan menurut (Eshaq *et al.*, 2010) kandungan selulosa dalam alga kerimng mencapai 19%.

Kandungan beberapa senyawa organik penyusun *Spirogyra* sp. dapat dilihat di bawah ini.

Tabel 2. 1. Kandungan karbohidrat dari beberapa alga

No Mikroalga	Karbohidrat (%)	Protein (%)	Lipid (%)
1. <i>Prymnesium parvum</i>	25-23	28-45	22-39
2. <i>Spirogyra</i> sp.	33-64	49	11-21
3. <i>Dunaliella salina</i>	32	57	6
4. <i>Tetraselmis macuculata</i>	15	52	3
5. <i>Spirulina maxima</i>	13-16	60-71	6-7
6. <i>Anabaena cylindrica</i>	25-30	43-56	4-7
7. <i>Scenedesmus oblicus</i>	10-17	50-56	12-14

(Hadiyanto dan Maulana Azim, 2012).

2.5. *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae merupakan salah satu jenis *yeast* atau khamir uniseluler yang berukuran mikroskopis (Puspita dkk., 2020). Ciri-ciri morfologi dari khamir ini adalah sel berukuran sekitar (5–20 μ m x 1–10 μ m, berbentuk kokus, oval, hifa bersekat, berwarna putih dengan permukaan yang mengkilap (Talaro, 2012). Genus *Saccharomyces* digunakan dalam proses fermentasi karena diketahui sangat efektif mengubah gula yang kompleks menjadi etanol dan zat sejenis. Para biologis menyatakan bahwa di antara banyak jenis ragi, *Saccharomyces cerevisiae* paling efisien dalam berbagai eksperimen. (Hossain *et al.*, 2017).

Berikut klasifikasi *Saccharomyces cerevisiae* menurut Rehm dan Reed (1983).

Kingdom: Fungi

Division: Eumicotina

Class: Hemiaseomycetes

Order: Endomycetales

Family: Saccharomycetaceae

Genus: *Saccharomyces*

Species: *Saccharomyces cerevisiae*

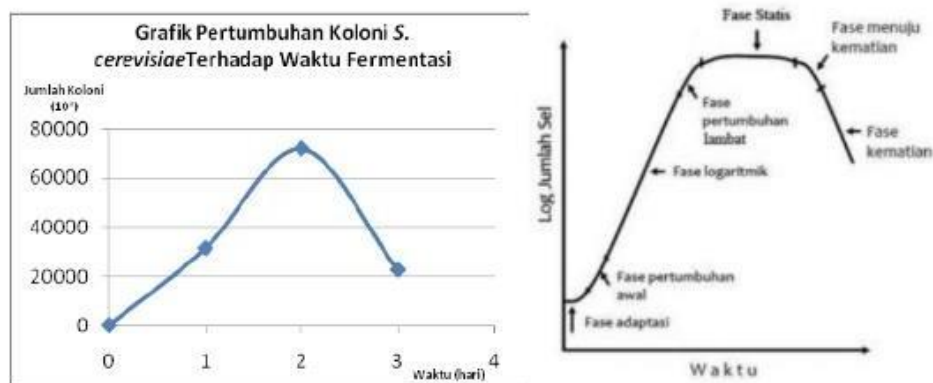
Ragi (*Yeast*) berupa mikroorganisme multiseluler atau eukariotik yang diklasifikasikan di bawah kerajaan fungi. Berbagai jenis ragi tersedia di pasaran seluruh dunia. Biasanya ragi digunakan dalam proses fermentasi tradisional sejak zaman dahulu untuk menghasilkan berbagai jenis alkohol (Zabed *et al.*, 2014). Selama proses fermentasi anaerob, ragi dapat merubah substrat gula dengan sangat cepat menjadi bioetanol (Mukti & Aryani, 2013). Ragi yang dapat digunakan dalam proses tersebut seperti ragi dari jenis *Saccharomyces cereviae* mempunyai kemampuan toleransi yang besar terhadap etanol sehingga galur ini sering digunakan untuk proses fermentasi. *Yeast* ini bisa memfermentasi gula dalam kondisi anaerob menjadi etanol pada pH 4,0-5,0, dengan keadaan tersebut sebanyak 50% bioetanol dapat dihasilkan selama proses respirasi gula tersebut (Moede *et al.*, 2017).

Dinding sel *S. cerevisiae* terbuat dari sekitar 85% polisakarida dan 15% protein. Fungsi utama dari dinding sel adalah menstabilkan tekanan homeostasis, melindungi sel-sel dari kerusakan fisik, mempertahankan bentuk sel dan bertindak sebagai penopang untuk glikoprotein: Target utama stres etanol adalah membran plasma ragi dan protein hidrofilik dan hidrofobik: Sewaktu khamir dipaparan pada etanol, fluiditas membran sel lunak meningkat dan stabilitas membran balik menurun. Konsentrasi etanol 2-6% menghambat endositosis di seluruh selaput plasma. Paparan etanol pada sel ragi mempengaruhi pertumbuhan protein membran Pma1, H-ATPase, yang diperlukan untuk mempertahankan potensi pH dan

membran yang tidak dapat ditembus (Stanley *et al.*, 2010). Jadi keberadaan etanol dapat mempengaruhi pertumbuhan dari *Saccharomyces cerevisiae* bahkan jika konsentrasinya terlalu tinggi dapat menyebabkan kematian pada sel *Yeast* tersebut.

Pertumbuhan mikroorganisme dalam hal ini *Saccharomyces cerevisiae* terdiri dari beberapa fase. Proses metabolisme untuk menghasilkan energi agar menopang kehidupan selnya ATP dapat bersumber dari glukosa. Setiap molekul glukosa tersebut diuraikan menjadi ATP dan menghasilkan metabolit primer berupa etanol.

Fase pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* terdiri dari fase penyesuaian (*lag phase*), pertumbuhan awal, pertumbuhan eksponensial (*log phase*), pertumbuhan lambat, statis, pertumbuhan melambat, dan fase kematian (*death phase*). Kurva pertumbuhan mikroba dapat dilihat pada (**Gambar 2.3**). (Wahono *et al.*, 2011).



Gambar 2.3. Kurva pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* (Wahono *et al.*, 2011).

2.6. Hidrolisis

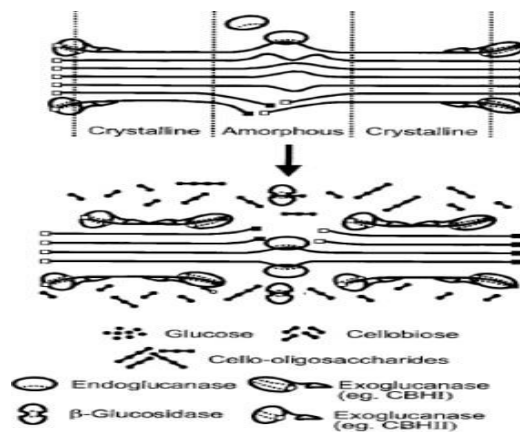
Hidrolisis adalah proses penguraian suatu senyawa yang lebih kompleks menjadi senyawa turunan yang tentu lebih sederhana karena pengaruh keberadaan air. Hidrolisis karbohidrat merupakan proses untuk mengkonversi polimer karbohidrat yang masih kompleks (selulosa, amilosa, atau hemiselulosa) menjadi monomer glukosa dalam hal ini pembuatan bioetanol. Proses ini dapat dibantu dengan penggunaan senyawa asam atau dengan tambahan enzim (Anugrah dkk.,

2020). Proses hidrolisis asam dengan memakai asam sulfat (H_2SO_4) ataupun dengan memakai asam klorida (HCl). Asam tersebut tergolong ke dalam asam kuat sehingga mampu menghidrolisis selulosa dengan kristalinitas tinggi..

Hidrolisis enzimatik merupakan dekomposisi katalitik dari biomassa selulosa menjadi gula yang dapat terjadi dengan penambahan enzim tertentu (Cannella *et al.*, 2012). Kompleks enzim atau enzim yang terlibat dalam proses hidrolisis selulosa dikenal dengan nama selulase. Umumnya, tiga jenis utama dari kompleks enzim selulolitik ini diantaranya adalah: *endo- β -1,4-glucanase*, *exo-1,4-glucanase* dan *β -glucosidase*, dan *cellobiohidroliase* (Rathore *et al.*, 2014). Dengan demikian, selulosa yang ada dalam biomassa lignoselulosa diubah menjadi glukosa dengan menambahkan enzim selulase (Otieno & Ogutu, 2020). Keuntungan dari hidrolisis dengan enzim adalah bisa mengurangi pemakaian asam sehingga bisa mengurangi dampak negatif terhadap lingkungan (Dompeipen & Dewa, 2015). Selain itu kerja enzim dalam melakukan proses hidrolisis bersifat spesifik, tidak mendegradasikan gula hasil, serta tidak terjadi reaksi samping (Harismah dkk., 2015).

Proses sederhana hidrolisis enzimatik dari selulosa adalah dihidrolisis bagian internal amorf (mudah didegradasi) rantai β -1,4-glukosidik selulosa secara acak oleh *endoglucanase*, yang memperlihatkan aktivitas hidrolisis rendah terhadap bagian kristalin. Hasil yang didapat dalam proses tersebut adalah terbentuknya oligosakarida dengan panjang ikatan rantai yang berbeda dan ujung rantai baru. Tahap selanjutnya yaitu ujung rantai baru tersebut kemudian diubah menjadi unit terkecil dari selulosa (selobiosa), dilakukan dengan menghilangkan ujung nonreduksi dari selo-oligosakarida dan kristalin, amorpis dan asam atau alkali dari perlakuan selulosa oleh *exoglucanase*. Tahap terakhir adalah penguraian selobiosa

(disakarida) menjadi molekul glukosa (monosakarida) oleh β -glukosidase (Rathore *et al.*, 2014). Proses hidrolisis enzimatis dari selulosa menjadi monomer glukosa dapat dilihat pada (gambar 2.4.)



Gambar 2. 4. Skema hidrolisis selulosa oleh enzim selulase

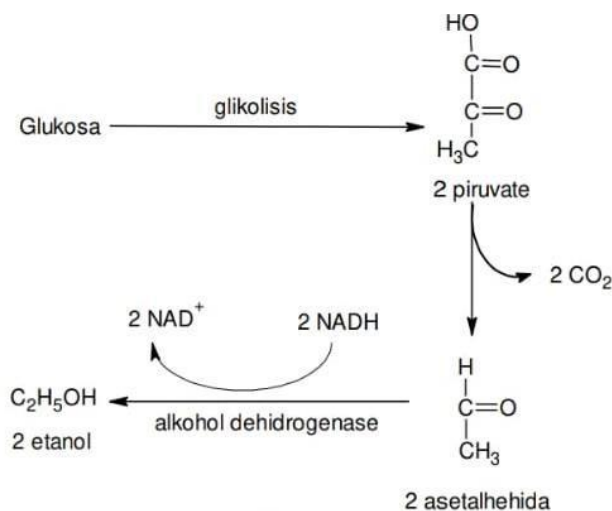
Faktor utama yang mempengaruhi hidrolisis enzimatis adalah faktor-faktor yang terkait substrat dan yang berhubungan dengan enzim (Otieno & Ogutu, 2020). Faktor spesifik substrat yang mempengaruhi hidrolisis selulosa adalah porositas, serat selulosa, kristal lignin dan kandungan hemiselulosa (Kang *et al.*, 2014). Faktor-faktor yang terkait dengan enzim adalah optimalisasi hormon dari berbagai jenis enzim, dosis enzim yang diperlukan untuk mencapai hasil gula yang optimal dan hambatan produk akhir dari aktivitas selulosa (Tayyab *et al.*, 2017). Beberapa metode telah dikembangkan untuk mencegah hambatan, termasuk penggunaan enzim dengan konsentrasi tinggi, suplementasi beta-glukosidase selama hidrolisis dan hilangnya zat gula selama hidrolisis oleh ultrafiltrasi atau proses fermentasi secara serentak (SSF) (Semenčenko *et al.*, 2011).

2.7. Fermentasi Etanol

Fermentasi merupakan proses katabolisme bahan organik oleh mikroorganisme yang bertujuan untuk menghasilkan energi di dalam sel tanpa

menggunakan oksigen (respirasi anaerobik) (Bahri dkk., 2019). Proses fermentasi secara biologis adalah dengan cara mengubah kadar gula menjadi etanol dan juga hasil samping berupa karbon dioksida melalui penggunaan mikroorganisme yang luas. Jenis heksosa lainnya seperti fruktosa dan galaktosa, dapat juga diubah menjadi etanol dengan cara yang sama (Ndegwa *et al.*, 2011). Mikroba lain yang digunakan dalam proses fermentasi menghasilkan produk metabolit baik primer maupun sekunder berbeda-beda sesuai kemampuan yang dimiliki oleh tiap mikroba. Fermentasi glukosa menjadi etanol dapat memanfaatkan mikroba khamir *Saccharomyces cerevisiae*.

Fermentasi alkohol diawali dengan proses penguraian glukosa menjadi asam piruvat atau lebih dikenal dengan proses glikolisis. Setiap molekul glukosa yang mempunyai enam atom karbon ($C_6H_{12}O_6$) akan diubah menjadi 2 molekul asam piruvat beratom karbon 3 (CH_3COCOO^-) dan 2 NADH (hasil reduksi NAD^+). Selain itu terjadi reaksi fosforilasi 2 molekul ADP menjadi 2 ATP sebagai energi mikroba *Saccharomyces* sp. dan juga terbentuk 2 molekul H_2O . Tahap selanjutnya yaitu pembentukan etanol melalui dua proses, proses pertama adalah dekarboksilasi asam piruvat oleh piruvat dekarboksilase dengan bantuan tiamin pirofosfat menjadi asetaldehid, kemudian asetaldehid yang terbentuk kemudian direduksi oleh alkohol dehidrogenase dengan $NADH_2$ menjadi alkohol. Proses fermentasi glukosa menjadi etanol dapat dilihat pada (**gambar 2. 5.**) (Handayani, 2016).



Gambar 2. 5. Skema alur fermentasi etanol

Proses ini dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti suhu, konsentrasi substrat, jumlah mikroba, waktu yang diberikan sehingga penelitian beberapa kondisi fisik mengenai proses fermentasi bioetanol juga terus diselidiki. Secara khusus suhu reaksi, waktu inkubasi, dan pH dipelajari untuk menentukan efeknya pada fermentasi biomassa selulosa menjadi etanol (Adaganti *et al.*, 2014). Suhu yang diberikan selama proses fermentasi berpengaruh pada pertumbuhan mikroorganisme. Rata-rata temperatur yang dapat diberikan pada proses ini antara 20°C hingga 30°C. Kebanyakan sel dari jamur *Saccharomyces cerevisiae* mempunyai suhu optimal mendekati 30°C. Enzim pengatur aktivitas mikroba dan proses fermentasi sangat sensitif terhadap suhu tinggi karena dapat mengubah sifat struktur tersier serta menonaktifkan enzim tersebut. Oleh karena itu, suhu diatur dengan hati-hati selama proses fermentasi (Azhar *et al.*, 2017).

Substrat dalam hal ini gula sebagai bahan baku menghasilkan energi bagi kehidupan mikroba. Kadar gula yang diberikan dalam proses fermentasi memiliki ambang batas minimum sehingga harus terjaga keberadaannya. Peningkatan konsentrasi dapat meningkatkan hasil metabolit primer yaitu etanol, akan tetapi jika

terlalu banyak gula yang diberikan maka fermentasi akan berjalan konstan. Hal tersebut karena kapasitas mikroba dalam melakukan fermentasi sudah melebihi kemampuannya. Umumnya, tingkat produksi etanol maksimum adalah dicapai saat menggunakan gula pada konsentrasi 150g/L. Lama waktu yang diberikan memberikan kesempatan bagi mikroba dalam memfermentasikan substrat. Jika waktu yang diberikan sangat pendek maka tidak memadai pertumbuhan mikroba sehingga fermentasi berjalan lambat. Waktu fermentasi lebih lama juga memberikan pengaruh karena hasil metabolit berupa etanol bersifat toksik pada pertumbuhan mikroorganisme terutama pada metode batch (Azhar et al., 2017). Waktu fermentasi yang biasa dicoba 3-14 hari (Bahri dkk., 2019).

Aerasi merupakan salah satu faktor penting yang harus diperhatikan selama proses fermentasi karena berpengaruh terhadap bioetanol yang dihasilkan. Menurut Zhou *et al.* (2018) aerasi tidak hanya memasok oksigen yang diperlukan untuk pertumbuhan sel, tetapi juga menghilangkan gas buang yang dihasilkan selama proses fermentasi. Akan tetapi, tingkat aerasi yang lebih tinggi mengakibatkan pengurangan dalam volume fermentasi. Persediaan oksigen diperlukan untuk pertumbuhan mikroorganisme dalam fermentasi aerobik, tetapi beberapa mikroorganisme mungkin terpengaruh oleh kadar oksigen yang tinggi pada konsentrasi oksigen yang berlebihan.

Nutrien sangat dibutuhkan dalam proses fermentasi karena merupakan sumber makanan dari mikroba. Mikroorganisme memerlukan nutrisi untuk mendukung proses pertumbuhannya. Nutrien dapat dibedakan menjadi dua yaitu makronutrien dan mikronutrien. Menurut Tasgin (2017) makronutrien adalah protein, lemak, karbohidrat dan air sedangkan mikronutrien adalah benda-benda

yang terdapat dalam jumlah kecil dalam menu makanan, seperti vitamin, mineral, dan unsur-unsur penunjang (zat besi, fluorin).

2.8. Destilasi

Destilasi merupakan sesuatu prosedur pemisahan larutan menurut perbandingan titik didih yang ada di dalam campuran larutan. Proses ini dilakukan dengan mendidihkan campuran yang berbeda jenis. Zat yang mempunyai titik didih lebih rendah akan menguap lebih dahulu (Seftian dkk., 2012). Peralatan penyulingan diatur dengan tepat, kemudian suhu dijaga pada 78°C yang merupakan titik didih dari etanol sedangkan air mendidih jika suhu mencapai 100°C . Menurut Anderson & Pattanathu (2018) destilasi digunakan untuk menghasilkan etanol hidrat menggunakan serangkaian kolom distilasi dan perbaikan yang beroperasi di bawah tekanan atmosfer. Ini adalah teknik yang paling dikenal dari pemurnian etanol. Prinsip dasar dari alat penyulingan ini adalah pemisahan berdasarkan perbedaan titik didih atau pencairan setiap konstituen dari campuran homogen (Masturi dkk., 2017).

BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Rancangan Penelitian

Penelitian kali ini merupakan eksperimental laboratorium dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) sebagai rancangan penelitian, menggunakan 2 faktor sebagai pola faktorialnya. Faktor pertama adalah variasi jumlah *yeast* di dalam ragi yang digunakan, terdiri dari 3 taraf yaitu 0,5, 1, dan 2% dari volume filtrat. Faktor kedua yaitu lama fermentasi yang dibutuhkan, terdiri dari 3 taraf yaitu 5, 7, dan 9 hari. Berdasarkan rancangan tersebut maka dapat diperoleh 9 variasi perlakuan dan dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali.

Jumlah ragi 0,5% (S1) dan waktu fermentasi 5 hari (H1)= S1H1

Jumlah ragi 0,5% (S1) dan waktu fermentasi 7 hari (H2)= S1H2

Jumlah ragi 0,5% (S1) dan waktu fermentasi 9 hari (H3)= S1H3

Jumlah ragi 1% (S2) dan waktu fermentasi 5 hari (H1)= S2H1

Jumlah ragi 1% (S2) dan waktu fermentasi 7 hari (H2)= S2H2

Jumlah ragi 1% (S2) dan waktu fermentasi 9 hari (H3)= S2H3

Jumlah ragi 2% (S3) dan waktu fermentasi 5 hari (H1)= S3H1

Jumlah ragi 2% (S3) dan waktu fermentasi 7 hari (H2)= S3H2

Jumlah ragi 2% (S3) dan waktu fermentasi 9 hari (H3)= S3H3

3.2. Waktu dan Tempat

Penelitian dengan judul “Pengaruh Penambahan Variasi Jumlah Ragi Roti *Saccharomyces cerevisiae* dan Lama Fermentasi Terhadap Kadar Etanol dari Alga *Spirogyra* sp.” dilakukan dari bulan Februari hingga bulan Agustus 2022 berupa pengumpulan alat dan bahan, identifikasi alga, pengujian sampel, sedangkan untuk analisis dan pengolahan data pada bulan Oktober 2022. Penelitian kali ini bertempat

di Laboratorium Mikrobiologi yaitu pada proses identifikasi alga, hidrolisis, serta fermentasi. Laboratorium Biologi Molekuler untuk perhitungan kadar gula pereduksi. Laboratorium Kimia Organik pada proses destilasi serta Laboratorium Analitik untuk proses analisis kadar etanol. Laboratorium tersebut ada di Program Studi Biologi dan Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.3. Variabel Penelitian

Penelitian kali ini menggunakan variabel independen berupa jumlah ragi *Saccharomyces cerevisiae* dan juga lama waktu fermentasi. Jumlah ragi *Saccharomyces cerevisiae* yang digunakan yaitu: 0,5, 1, dan 2% dari volume filtrat. Lama waktu yang digunakan dalam proses fermentasi yaitu: 5, 7, dan 9 hari. Variabel kontrol yang digunakan adalah suhu fermentasi (30^0), pH fermentasi (4,5) (Dompeipen & Dewa, 2015), nutrisi (kadar urea $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$) dan kalium fosfat (KH_2PO_4) (Jaya,2018), dan jumlah substrat. Variabel dependen yang diamati dalam penelitian ini adalah kadar etanol yang dihasilkan setelah proses fermentasi alga *Spirogyra* sp.

3.4. Alat dan Bahan

3.4.1. Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian kali ini sesuai dalam Febriana (2020) diantaranya: jaring net, mikroskop binokuler, oven, blender, neraca analitik, erlenmeyer, batang pengaduk, gelas beaker, kaca arloji, *shaker*, inkubator, *centrifuge*, *autoclave*, mikropipet, ayakan 60 mesh, gelas ukur, *magnetic stirrer*, pipet tetes, pipet volume, spatula, karet penghisap, bunsen, botol kaca, *stopwatch*, termometer, pH meter, statif, corong, spektrofotometer, destilator, piknometer.

3.4.2. Bahan

Bahan-bahan yang dibutuhkan dalam melaksanakan penelitian kali ini adalah: alga hijau *Spirogyra* sp., enzim selulase *Novozyme*, *buffer acetate* (pH 5,5), plastisin, selang, kertas saring, tisu, aquades, H₂SO₄ 2%, fenol 5% etanol 100%, ragi roti (fermipan), nutrisi (kadar urea (NH₂)₂CO) dan kalium fosfat (KH₂PO₄).

3.5. Prosedur Penelitian

Langkah-langkah yang dilakukan dalam melaksanakan penelitian kali ini adalah.

3.5.1. Persiapan Bahan

Alga *Spirogyra* sp. dikumpulkan dari perairan air tawar di Desa Umbulan Kabupaten Pasuruan menggunakan alat bantu jaring net, kemudian diidentifikasi secara makroskopis maupun mikroskopis di Laboratorium Optik. Identifikasi mikroskopis alga *Spirogyra* sp. dilakukan menggunakan mikroskop binokuler perbesaran 100x (Ningrum *et al.*, 2016). Alga yang sudah berhasil diidentifikasi selanjutnya dihilangkan kandungan air dengan cara dijemur di bawah sinar matahari.

3.5.2. Pretreatment Bahan

Proses *pretreatment* alga *Spirogyra* sp. dilakukan berdasarkan pada (Sulfahri *et al.*, 2019) dengan sedikit modifikasi dilakukan dengan cara, biomassa *Spirogyra* sp. dikeringkan terlebih dahulu secara manual dibawah sinar matahari agar tidak terlalu membebani kerja oven, kemudian dioven pada suhu 60°C sampai kering. Alga yang sudah kering kemudian dihaluskan menggunakan mesin blender sampai hancur dan lumpang hingga berbentuk serbuk. Selanjutnya disaring

menggunakan ayakan 60 mesh. Total dari 150 gr *Spirogyra* sp. yang melewati 60 mesh ayakan kemudian siap dilakukan tahap hidrolisis.

3.6. Hidrolisis Enzimatis Alga Hijau *Spirogyra* sp.

Proses hidrolisis secara enzimatis ini dilakukan berdasarkan penelitian Buntoro *et al.*, (2015) dan juga penelitian dari Padil *et al.* (2017) dengan sedikit modifikasi, yaitu alga hijau *Spirogyra* sp. hasil dari proses pretreatment sebanyak 5 g/L dimasukkan ke dalam botol kaca 100 ml, kemudian agar proses hidrolisis dipertahankan pada pH 5,5 maka ditambahkan senyawa *buffer sodium asetat* yang telah dibuat sebanyak 100 ml, kemudian dihomogenkan. Campuran tersebut kemudian dipanaskan menggunakan *Waterbath shaker* sampai mencapai suhu 40°C. Setelah mencapai suhu yang diinginkan ditambahkan enzim selulase sebanyak 0,15 gr (perbandingan 1 gr substrat dengan 0,03 gr enzim) untuk dihidrolisis dengan proses pengadukan selama 24 jam dan suhu 40°C. Proses hidrolisis alga pada penelitian kali ini dilakukan dengan bantuan enzim selulase merk *Novozyme* berwujud cairan dengan kelarutan 1,25 g/ml dan aktifitas 700 U/g. Hidrolisis ini bertujuan untuk memecah molekul kompleks selulosa menjadi monomer sederhana yaitu glukosa. Hasil hidrolisis kemudian disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 9000 rpm untuk memisahkan padatan dan larutan. Larutan dipanaskan dengan *Waterbath* pada suhu 90°C selama 15 menit agar merusak aktifitas enzim, setelah dingin larutan glukosa hasil hidrolisis disimpan di dalam *freezer*.

3.7. Penentuan Nilai Gula Pereduksi

Agar mengetahui kadar gula yang terkandung dalam larutan hasil hidrolisis maka dapat menggunakan metode Fenol-Sulfat dengan bantuan alat

Spektrofotometer. Langkah pertama yang harus dilakukan dalam proses ini sesuai dalam penelitian Wiyantoko (2017), yaitu dibuat terlebih dahulu larutan glukosa standart dengan konsentrasi 0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, dan 0,5 mg/L dari larutan induk glukosa 10 mg dalam 100 ml aquades. Diambil larutan standart glukosa sebanyak 1 ml ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan larutan fenol 5% dan dihomogenkan dengan alat vortex agar tercampur, kemudian dituangkan dengan cepat larutan H₂SO₄ pekat sebanyak 5 ml ke dalam campuran. Dilakukan proses ini pada semua deret larutan glukosa standar sambil didiamkan campuran tersebut selama 10 menit, dihomogenkan dan diletakkan ke dalam *waterbatch* selama 15 menit. Dibuat kurva standar absorbansi dengan cara diukur nilai absorbansi dari setiap deret larutan standart glukosa menggunakan alat *Spektrofotometer Uv-vis* dengan panjang gelombang 560 nm dan kemudian didapatkan persamaannya.

Pengukuran kandungan glukosa dalam suatu sampel dapat dilakukan dengan cara mengambil sebanyak 1 ml dari setiap sampel dan diletakkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan dengan larutan fenol 5% dan dihomogenkan menggunakan alat vortex, ditambahkan larutan H₂SO₄ pekat sebanyak 5 ml ke dalam campuran secara cepat dan tegak lurus, didiamkan campuran larutan tersebut selama 10 menit. Dihomogenkan dengan alat vortex dan diletakkan ke dalam *Waterbatch* selama 15 menit. Dianalisis kandungan gula yang terdapat pada sampel menggunakan alat *Spektrofotometer Uv-vis* dengan panjang gelombang 560 nm. Hasil dari analisis kemudian dihitung kadar glukosa dengan cara diplotkan nilai absorbansi dari setiap sampel dengan persamaan dari kurva larutan standar glukosa (Wiyantoko,2017).

3.8. Fermentasi Glukosa Hasil Hidrolisis Enzimatis Alga *Spirogyra* sp.

Proses fermentasi dilakukan sesuai dengan penelitian Jaya (2018) yaitu dengan cara dimasukkan hasil hidrolisis yang sudah diukur kadar gula pereduksinya sebanyak 70 ml ke dalam botol kaca 100 ml, ditambahkan urea 1 gr (2% w/v), serta NPK 1 gr (2% w/v) sebagai nutrisi dan dihomogenkan. Selanjutnya, campuran kemudian disterilkan dari kontaminan dengan *autoclave* dengan suhu 121⁰C selama 15 menit, dan kemudian didiamkan sampai dingin. Setelah itu, ditambahkan ragi roti sebanyak sesuai dengan desain penelitian yaitu 0,5, 1, dan 2% dari volume substrat dan kemudian difermentasikan dengan variasi waktu 5, 7, dan 9 hari pada masing-masing jumlah ragi, dengan temperatur (30⁰C). Setiap perlakuan dihindarkan dari kontaminan seperti mikroba lain dengan cara menutup setiap botol kaca menggunakan karet penutup. Penutup karet dilengkapi dengan selang yang diteruskan pada wadah berisi air sebagai saluran pengeluaran gas CO₂ hasil fermentasi. Setelah proses fermentasi berakhir kemudian dilakukan sentrifugasi filtrat untuk memisahkan *Saccharomyces cerevisiae* dengan sisa substrat dan kemudian disimpan dalam *Freezer*. Hasil fermentasi kemudian dihitung penurunan kadar glukosa sebelum dipisahkan kandungan etanolnya melalui proses destilasi.

3.9. Destilasi Larutan Hasil Fermentasi

Metode yang digunakan dalam proses destilasi sesuai dalam (Bahri *et al.*, 2019), yaitu larutan campuran dari fermentasi dimasukkan ke dalam destilator. Selanjutnya larutan dipanaskan dengan temperatur suhu 79⁰ C, larutan tersebut kemudian terpisah menjadi etanol dan air karena etanol menguap terlebih dahulu, sedangkan air masih tertinggal di dalam alat tersebut. Berikutnya uap berupa etanol

tersebut kemudian diembunkan dengan cara dialirkan ke dalam kondensor dan kemudian cairan tersebut ditampung menggunakan Erlenmeyer.

3.10. Penentuan Kadar Bioetanol Berdasarkan Nilai Gravitasi Jenis

3.10.1. Pembuatan Kurva Standart Etanol

Penentuan nilai kadar bioetanol berdasarkan nilai gravitasi jenis didapatkan dengan membuat kurva standart etanol terlebih dahulu. Pembuatan kurva standart etanol diawali dengan membuat larutan standart etanol dengan variasi konsentrasi sebesar 0%, 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100% dari larutan stok etanol absolut. Rumus pengenceran digunakan untuk menentukan variasi konsentrasi larutan standar. Kurva standart etanol dapat dibuat dengan cara dihitung kadar etanol dari setiap larutan standarnya menggunakan bantuan alat piknometer. Cara menggunakan alat ini yaitu ditimbang piknometer yang masih kosong dan harus dalam keadaan kering, kemudian ditimbang. Aquades ditambahkan hingga penuh dan dikeringkan permukaan alat, kemudian ditimbang dan dicatat beratnya. Setiap deret larutan standart dilakukan hal yang sama dan pada akhirnya akan dibuat suatu kurva standar dengan memplotkan berat jenis terhadap konsentrasi masing-masing etanol (Ronald, 2014). Metode berat jenis ini dapat dihitung dengan rumus :

$$\text{Berat jenis larutan standart etanol} = \frac{\text{Berat larutan baku etanol} - \text{berat piknometer kosong}}{\text{Berat aquades} - \text{berat piknometer kosong}}$$

Berat jenis dari setiap larutan standart etanol kemudian digunakan untuk membuat kurva standart etanol dengan menghubungkan setiap konsentrasi etanol dengan nilai berat jenis dari setiap konsentrasi tersebut. Kemudian dapat dibuat persamaan linear $Y = ax + b$ dengan Y adalah nilai berat jenis dan x kadar etanol sampel

3.10.2. Pengukuran Kadar Bioetanol Sampel Hasil Fermentasi

Penentuan kadar etanol dapat menggunakan alat piknometer dengan melihat nilai massa jenis dari suatu cairan dalam hal ini bioetanol. Dilakukan dengan cara ditimbang terlebih dahulu piknometer yang masih belum terisi dan harus dalam keadaan kering menggunakan neraca analitik, hasil dari timbangan piknometer kosong disebut dengan berat awal (W_1). Langkah berikutnya yaitu diisi alat dengan aquades dan kemudian ditimbang, hasil timbangan disebut dengan berat kedua (W_2), kemudian dihitung berat aquades dengan cara dikurangkan berat kedua dengan berat awal ($W_2 - W_1$). Selanjutnya adalah larutan etanol dimasukkan ke dalam piknometer dan dikeringkan permukaan luar dari alat tersebut. Ditimbang alat dan etanol untuk diketahui beratnya dan hasil yang didapat disebut dengan berat ketiga (W_3). Berat etanol kemudian didapat dengan cara mengurangkan berat ketiga dengan berat pertama ($W_3 - W_1$). Nilai gravitasi jenis etanol (*Specific gravitasi/SG*) dapat dihitung dengan rumus :

$$SG = \frac{\text{Berat larutan baku etanol } (W_3 - W_1) - \text{berat piknometer kosong } (W_1)}{\text{Berat aquades } (W_2 - W_1) - \text{berat piknometer kosong } (W_1)}$$

Nilai gravitasi jenis yang sudah didapatkan kemudian digunakan untuk mengetahui kadar dari etanol dengan mencocokkan dengan tabel yang ada di AOAC (*Analysis of Association of Official Analytical Chemists*) dan selanjutnya persentase etanol dihitung (Rahmana et al., 2016).

3.11. Analisis Data Menggunakan Anava

Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial dengan dua variabel independent yaitu jumlah ragi *Saccharomyces cerevisiae* dan lama fermentasi digunakan sebagai rancangan penelitian kali ini. Data hasil perlakuan kemudian dianalisis secara statistik dengan ANOVA (*Analysis of Variance*) menggunakan

program spss 25. Kemudian *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) ($\alpha=5\%$) digunakan sebagai uji lanjut, bertujuan agar mengetahui bagaimana pengaruh nyata dari setiap perlakuan terhadap parameter yang diujikan.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Pengaruh Kombinasi Perlakuan Penambahan Jumlah Ragi Roti *Saccharomyces cerevisiae* dan Lama Fermentasi Terhadap Kadar Etanol

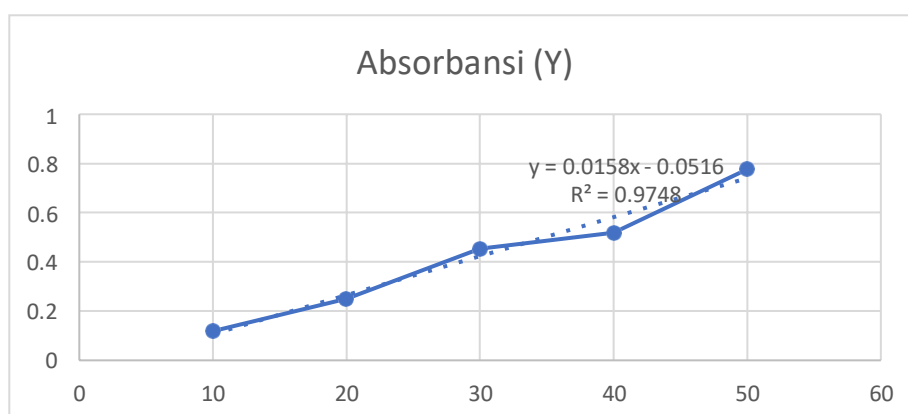
Penelitian ini menggunakan alga hijau *Spirogyra* sp. sebagai substrat fermentasi etanol. Secara umum, semua alga termasuk mikroalga jenis *Spirogyra* sp. dinding selnya sebagian besar tersusun atas serat selulosa. Penelitian Eshaq *et al.*(2010) melaporkan bahwa biomassa *Spirogyra* sp. mengandung 19% serat selulosa dalam keadaan kering. Selulosa (C₆H₁₀O₅)_n yang terkandung dalam mikroalga ini tersusun atas beberapa monomer glukosa (homopolisakarida), bersatu membentuk rantai linear dengan ikatan β-1,4 glikosida (Narendhirakannan *et al.*, 2014). Untuk mendapatkan etanol dari serat selulosa maka perlu dilakukan penguraian terlebih dahulu, karena substrat yang akan digunakan sebagai fermentasi adalah glukosa.

Selulosa tidak mudah larut dalam pelarut baik polar maupun nonpolar sehingga diperlukan senyawa lain yang mampu mendegradasinya. Proses menguraikan polisakarida selulosa menjadi glukosa dengan adanya suatu air disebut dengan hidrolisis. Tujuan dilakukannya hidrolisis ini yaitu untuk mendapatkan glukosa yang mana akan digunakan sebagai sumber karbon (C) oleh *Saccharomyces cerevisiae* dalam pertumbuhan dan perkembangannya. Penelitian kali ini menggunakan enzim selulase merk *Novozyme* dengan nilai aktivitas 700 U/gram.

Dalam melakukan hidrolisis harus memperhatikan beberapa hal yang dapat mempengaruhi hasil dari proses tersebut diantaranya jumlah enzim dan substrat, suhu, serta pH. Menurut Harismah dkk. (2015) pH optimum yang dibutuhkan dalam proses hidrolisis selulosa menggunakan enzim selulase adalah rentang 5-6. Enzim

yang ditambahkan dalam proses ini adalah sebanyak 0,15 gr, hal tersebut sesuai dalam penelitian Padil dkk. (2017) yang melakukan hidrolisis dengan perbandingan 0,03 gr enzim dalam 1 gr substrat. Suhu yang dibutuhkan dalam proses ini adalah dalam rentang 38-40⁰C dan dilakukan pengadukan selama 24 jam. Hasil yang didapatkan pada proses ini dapat dilihat pada (**Tabel 4.1**).

Hasil tersebut didapatkan setelah dihitung kadar glukosa terbentuk menggunakan metode fenol-sulfat yang dihitung berdasarkan kurva standar glukosa sesuai dalam Wibowo dkk. (2013). Kurva standar (**gambar 4.1.**) yang telah didapatkan memiliki tingkat linearitas tinggi, yang mana berarti bahwa nilai absorbansi berbanding lurus dengan kadar glukosa. Hal tersebut dikarenakan nilai koefisien korelasi (R^2) yang hampir mendekati satu yaitu sebesar 0,9748 (Pratama, 2020). Untuk menentukan kadar gula total hasil hidrolisis maka dibuatlah persamaan linear. Berdasarkan kurva standar glukosa didapatkan persamaan linear yaitu $y = 0.0158x - 0.0516$. Kadar glukosa diketahui berdasarkan hasil perhitungan dalam rumus persamaan linear dengan nilai x adalah kadar glukosa dan nilai y adalah nilai absorbansi sampel.



Gambar 4.1. Kurva standar glukosa

Tabel 4. 1. Glukosa hasil hidolisis alga hijau *Spirogyra* sp.

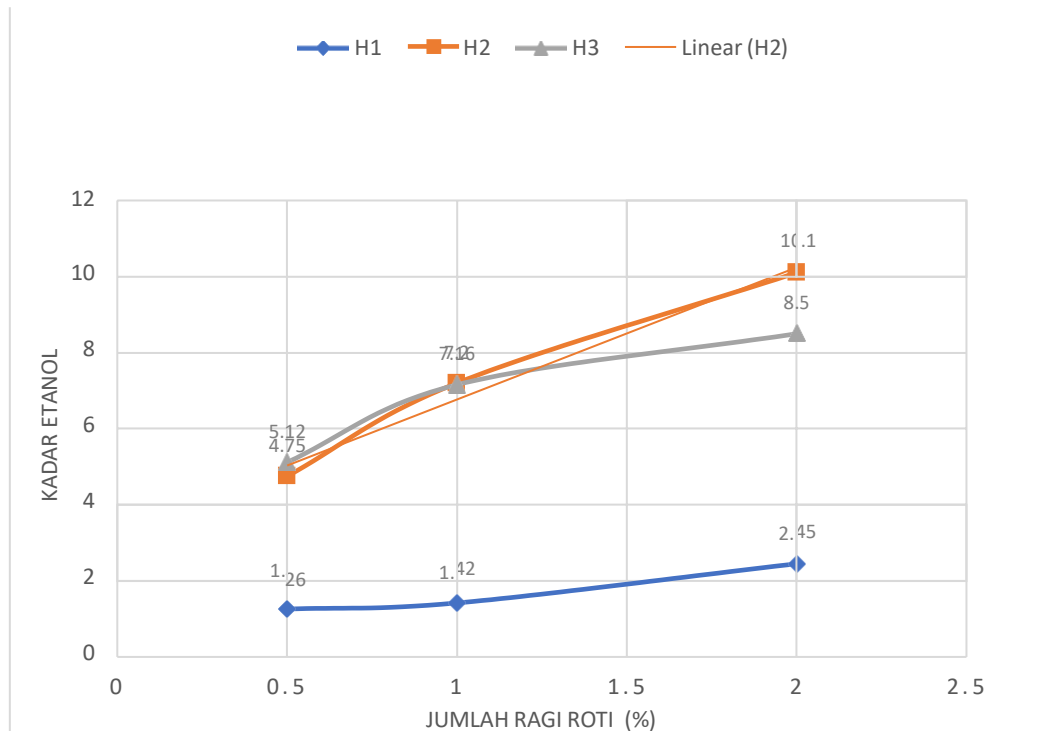
Perlakuan	Ulangan			Rata-rata
	1	2	3	
S1H1	32.32	32.94	34.27	33.18
S2H1	34.84	33.59	32.27	33.57
S3H1	33.62	31.36	33.59	32.86
S1H2	32.59	32.82	33.99	33.13
S2H2	34.17	32.53	33.60	33.43
S3H2	34.44	33.99	34.43	34.29
S1H3	33.02	31.64	32.62	32.43
S2H3	33.92	36.91	33.59	34.81
S3H3	33.64	33.89	34.34	33.96

Enzim selulase mempunyai kemampuan dalam memecah ikatan rantai Beta 1,4 glikosidik dari polimer selulosa dalam hal ini alga *Spirogyra* sp. karena selulase merupakan suatu sistem enzim selulolitik yang memiliki tiga kelompok utama enzim yaitu endo-beta-1,4 glukonase, selobiohidrolase (exo-beta-1,4 glukonase), dan beta-glukosidase. Menurut Narendhirakannan *et al.*(2014). proses sederhana hidrolisis enzimatik dari selulosa adalah pemutusan ikatan rantai β -1,4-glikosidik secara acak oleh *endoglucanase* pada bagian internal serat amorf, hasil yang didapat dalam proses tersebut adalah terbentuknya oligosakarida dengan panjang ikatan rantai yang berbeda dan ujung rantai baru. Tahap selanjutnya yaitu ujung rantai baru tersebut kemudian diubah menjadi unit terkecil dari selulosa (selobiosa), dilakukan dengan menghilangkan ujung nonreduksi dari selo-oligosakarida dan kristalin, amorfus dan asam atau alkali dari perlakuan selulosa oleh *exoglucanase*. Tahap terakhir adalah penguraian selobiosa (disakarida) menjadi molekul glukosa (monosakarida) oleh *β -glukosidase*.

Glukosa hasil hidrolisis enzimatik kemudian digunakan sebagai substrat dalam proses fermentasi etanol menggunakan bantuan *Saccharomyces cerevisiae*

yang berasal dari ragi roti. Proses ini dilakukan secara anaerob dengan tujuan menghasilkan etanol serta dilakukan pada suhu ruang (27-30⁰C). Menurut Zabed *et al.* (2014) temperatur ideal dalam proses fermentasi etanol adalah dari rentang 20-35⁰C dan akan optimal jika mendekati suhu 30⁰C.

Berdasarkan (**tabel 4.2**) dapat diketahui nilai kadar etanol hasil fermentasi dari setiap kombinasi perlakuan. Kemudian data tersebut dilakukan pengujian analisis statistik menggunakan *Two way Anova*. Uji ini dilakukan setelah mengetahui bahwa data berdistribusi normal berdasarkan uji normalitas dan juga data homogen. Hasil analisis didapatkan data bahwa kombinasi perlakuan penambahan jumlah ragi roti *Saccharomyces cerevisiae* berpengaruh nyata terhadap kadar etanol. Hal tersebut berdasarkan nilai signifikansi yang didapatkan yaitu $0,00 < 0,05$ ($p < 0,005$) sehingga H_0 ditolak dan hipotesis diterima. Kemudian dilakukan uji lanjut *Duncan Multiple Range Test* jika terdapat pengaruh dari perlakuan, untuk mengetahui perlakuan mana yang menghasilkan kadar etanol yang optimal. Data hasil uji statistik dapat dilihat dalam (**gambar 4.2.**)



Gambar 4.2. Pengaruh interaksi penambahan jumlah ragi *Saccharomyces cerevisiae* dan lama fermentasi terhadap kadar etanol

Keterangan :

S1= jumlah ragi 0,5%, S2= jumlah ragi 1%, S3= jumlah ragi 2%

H1= lama fermentasi 5 hari, H2 lama fermentasi 7 hari, H3= lama fermentasi 9 hari

Tabel 4. 2. Kadar etanol hasil fermentasi dari beberapa perlakuan

Perlakuan	Kadar Etanol
S1H1	1.26% a ± 0,06
S2H1	1.42% a ± 0,10
S3H1	2.45% b ± 0,07
S1H2	4.75% c ± 0,12
S2H2	7.20% e ± 0,06
S3H2	10.10 % g* ± 0,20
S1H3	5.12% d ± 0,06
S2H3	7.16% e ± 0,10
S3H3	8.50% f ± 0,10

Berdasarkan data hasil uji analisis varian (Anava) dua jalur (**Lampiran L1.3.1.**) dapat diketahui bahwa interaksi penambahan variasi jumlah ragi roti (*Saccharomyces cerevisiae*) dan lama fermentasi berpengaruh terhadap kadar etanol yang dihasilkan, hal ini karena nilai signifikansi yang didapatkan yaitu

$0,00 < 0,05$ ($p < 0,005$) sehingga H_0 ditolak. Menurut Aqil (2015) menyatakan bahwa nilai Sig (p-value) yang lebih kecil dari 0,05 dapat diasumsikan bahwa perlakuan berpengaruh terhadap variabel yang diamati. Sehingga kemudian dapat dilakukan uji lanjut menggunakan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) dengan level kepercayaan 5% ($\alpha = 0,05$). Berdasarkan hasil uji lanjut DMRT yang telah dilakukan, diketahui notasi huruf dari beberapa perlakuan banyak ditemukan perbedaan, hal tersebut menandakan perbedaan yang nyata terhadap hasilnya. Setiawan (2019) menyatakan dalam menganalisa data *Post Hoc* perlu melihat tanda (*) pada kolom *mean difference*. Perlakuan optimal dalam menghasilkan etanol adalah penambahan ragi roti (*Saccharomyces cerevisiae*) sebanyak 2% dari volume filtrat dan lama fermentasi selama tujuh hari (S3H2) yaitu dengan kadar etanol sebesar 10,10%. Hasil terendah didapatkan pada perlakuan penambahan jumlah ragi 0,5% dan lama fermentasi lima hari (S1H1) sebesar 1,26%. Standar deviasi dari data statistik deskriptif cukup kecil, sehingga dapat disimpulkan bahwa penambahan variasi jumlah ragi roti (*Saccharomyces cerevisiae*) dan lama fermentasi berpengaruh nyata terhadap kadar etanol yang dihasilkan.

Berdasarkan data hasil penelitian (**Gambar 4. 2.**) dapat diketahui nilai kadar etanol dari setiap perlakuan. Dari data tersebut dapat diketahui bahwa semakin banyak jumlah ragi yang diberikan maka kadar etanol yang dihasilkan semakin besar, sedangkan lama fermentasi mulai mengalami penurunan pada hari ke-9. Kadar etanol yang dihasilkan cenderung menurun pada perlakuan penambahan ragi roti 2% lama fermentasi 9 hari (S3H3) yaitu 8,50%. Selain itu pada lama fermentasi seminggu (hari ke-7), penambahan jumlah ragi roti 1% (S2H2) berdasarkan uji

DMRT diketahui notasi huruf yang sama dengan penambahan 1% (S2H3) ragi, maka perlakuan tersebut tidak berbeda nyata.

Mikroba seperti khamir *Saccharomyces cerevisiae* mempunyai fase pertumbuhan dan perkembangan. Glukosa digunakan sebagai sumber energi yang kemudian akan dihasilkan etanol sebagai hasil metabolismenya (**gambar 4.4.**). Pada lama fermentasi hingga hari ke-5 antara jumlah ragi 0,5 dengan 1% menghasilkan kadar etanol yang rendah serta tidak berbeda nyata yaitu sebesar 1,26 dan 1,42%, dapat terlihat pada penurunan kadar gula yang digunakan pada saat fermentasi dengan nilai terendah yaitu 5,34 dan 6,00 % . Hal ini dapat disebabkan karena mikroba *Saccharomyces cerevisiae* masih baru selesai dari fase adaptasi dan tahap ini terjadi proses aktivasi ragi sehingga enzim yang ada dapat berfungsi. Pada penambahan 2% ragi sudah mulai terjadi pertumbuhan, ditandai dengan perbedaan nyata dari kadar etanol yang dihasilkan dengan nilai 2,45% dan kadar glukosa yang digunakan selama fermentasi sebesar 8,87%.

Kadar etanol kemudian terus mengalami kenaikan secara signifikan setelah melewati lama fermentasi lima hari menuju tujuh hari. Pada setiap perlakuan penambahan jumlah ragi, kadar etanol terus mengalami kenaikan seiring dengan meningkatnya jumlah ragi yang diberikan. Kenaikan tersebut dapat disebabkan karena masa pertumbuhan mikroba sudah mencapai pada tahap eksponensial. Mikroba seperti *Saccharomyces cerevisiae* menggunakan glukosa sebagai sumber energi untuk pertumbuhannya. Menurut Rahmana *et al.*(2016) metabolisme glukosa yang dilakukan secara anaerob oleh *Saccharomyces cerevisiae* menghasilkan metabolit primer berupa etanol. Hal ini dapat dilihat pada kadar gula

yang terpakai pada perlakuan kali ini lebih tinggi daripada perlakuan lama fermentasi 5 hari.

Memasuki lama fermentasi diatas seminggu, kadar etanol masih mengalami kenaikan pada perlakuan 0,5% ragi dan lama fermentasi 9 hari (S1H3) yaitu dengan nilai 5,12%. Namun pada perlakuan penambahan 1%, ragi kadar etanol tidak berbeda nyata yaitu 7,16%. Hal tersebut dapat disebabkan karena mikroba dalam hal ini *Saccharomyces cerevisiae* telah mengalami masa pertumbuhan stasioner. Menurut Puspita *et al.* (2020) fase pertumbuhan stasioner terjadi ketika laju pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* sama dengan laju kematiannya sehingga jumlah populasi organisme akan tetap. Kesetimbangan tersebut dapat terjadi karena adanya pengurangan derajat pembelahan sel yang bisa disebabkan karena adanya produk yang bersifat racun terhadap mikroba. Etanol yang telah dihasilkan dapat menjadi penghambat proses fermentasi bahkan menyebabkan kematian mikroba karena terjadi proses oksidasi senyawa bioetanol menjadi senyawa asam organik. Pada perlakuan penambahan ragi 2% kadar etanol mengalami penurunan, hal tersebut dapat disebabkan karena mikroba yang mengalami proses fermentasi telah mengalami fase kematian.

Penelitian kali ini sesuai dengan Febriana (2020) yang melaporkan bahwa penambahan jumlah ragi dapat meningkatkan kadar etanol, akan tetapi akan mulai menurun jika telah melewati masa stasioner. Pada penelitiannya menggunakan selulosa dari limbah kopi menyatakan bahwa variasi penambahan jumlah ragi sebanyak 3, 9, dan 15 gr dan lama fermentasi 1,3, dan 5 hari menghasilkan kadar etanol tertinggi pada perlakuan 15 gr ragi dalam waktu fermentasi selama sehari

dengan kadar etanol 2,20% dan mengalami penurunan setelah waktu mencapai lima hari.

Mushlihah dkk. (2011) melakukan fermentasi etanol dengan bantuan *Saccharomyces cerevisiae*. menggunakan substrat alga hijau *Spirogyra* sp. hasil hidrolisis menggunakan variasi konsentrasi enzim amilase Dari hasil penelitiannya ini didapatkan kadar etanol optimum sebesar 9,25% setelah dilakukan fermentasi selama 10 hari. Selanjutnya ada penelitian dari Ningrum (2016) yang menggunakan substrat glukosa *Spirogyra* sp. hasil hidrolisis menggunakan variasi asam, diperoleh kadar etanol sebesar 7,54% setelah dilakukan fermentasi selama 10 hari. Berdasarkan hal tersebut dapat diketahui bahwa perlakuan yang diberikan pada penelitian kali ini lebih optimal sehingga dapat menghasilkan kadar etanol yang lebih tinggi yaitu sebesar 10,10% pada perlakuan penambahan jumlah ragi 2% dengan lama fermentasi 7 hari.

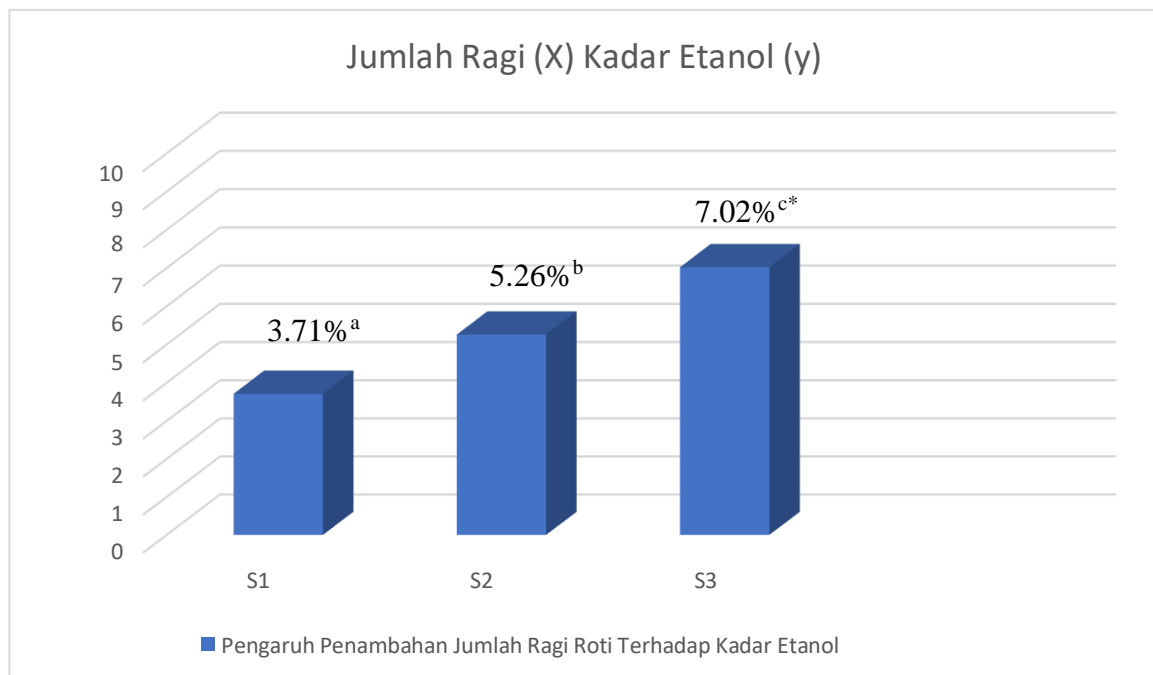
Bioetanol pada penelitian kali ini didapatkan melalui proses pemisahan menggunakan alat destilator terlebih dahulu. Pemisahan ini sering disebut dengan proses destilasi yang prinsipnya berdasarkan perbedaan titik didih dari campuran. Campuran yang terbentuk pada proses fermentasi kali ini dapat berupa asam karboksilat, etanol, air, dan juga sisa glukosa. Menurut pemisahan antara etanol dengan senyawa asam karboksilat dapat dilakukan karena memiliki selisih titik didih yang tinggi yaitu 78⁰C dan 116⁰C. Setelah dilakukan proses ini maka kemudian dapat menghitung kadar etanol melalui perhitungan berdasarkan berat jenis menggunakan alat piknometer.

Nilai kadar etanol yang dihasilkan pada penelitian kali ini masih rendah untuk digunakan sebagai bahan bakar bioetanol. Menurut Susilo (2017) kadar

etanol yang harus digunakan sebagai campuran bahan bakar harus lebih besar dari 99,5% atau sering disebut *fuel grade ethanol* (FGE), karena jika tidak maka dapat menyebabkan korosi pada mesin kendaraan. Rendahnya nilai kadar etanol tersebut dapat disebabkan karena adanya kondisi dimana etanol dan air dalam campuran mencapai titik azeotrop menyebabkan etanol dan air sulit dipisahkan melalui destilasi. Krell (2002) menyebutkan suatu campuran azeotrop memiliki titik didih konstan sehingga ketika dididihkan, titik didih fasa uap campuran tersebut sama dengan fasa cairnya. Etanol dan air mendidih pada 78,4 dan 100°C, sedangkan titik azeotrop antara campuran air dan etanol adalah pada 78,2°C sehingga pada suhu tersebut larutan etanol dan air dapat mendidih secara bersamaan pada tekanan atmosfer yang menyebabkan campuran etanol dan air sulit dipisahkan sehingga hasil destilasi tidak dapat diperoleh etanol murni 100%.

4.2. Pengaruh Penambahan Variasi Jumlah Ragi *Saccharomyces cerevisiae* Terhadap Kadar Etanol

Data hasil fermentasi etanol kemudian diuji menggunakan analisis varian (Anava) dua jalur, hasil analisis dapat dilihat pada (**Lampiran L1.3.1.**). Tujuan dilakukan uji ini adalah untuk mengetahui pengaruh dari variabel perlakuan dalam hal ini jumlah ragi terhadap kadar etanol. Jumlah ragi yang diberikan adalah sebanyak 0,5, 1, dan 2% dari volume filtrat fermentasi. Kemudian apabila perlakuan berpengaruh nyata maka dilanjutkan dengan uji *Duncan Multiple Range Test* yang bertujuan untuk mengetahui perlakuan mana yang optimal dalam menghasilkan kadar etanol. Data uji tersebut dapat dilihat pada (**Gambar 4.3.**)



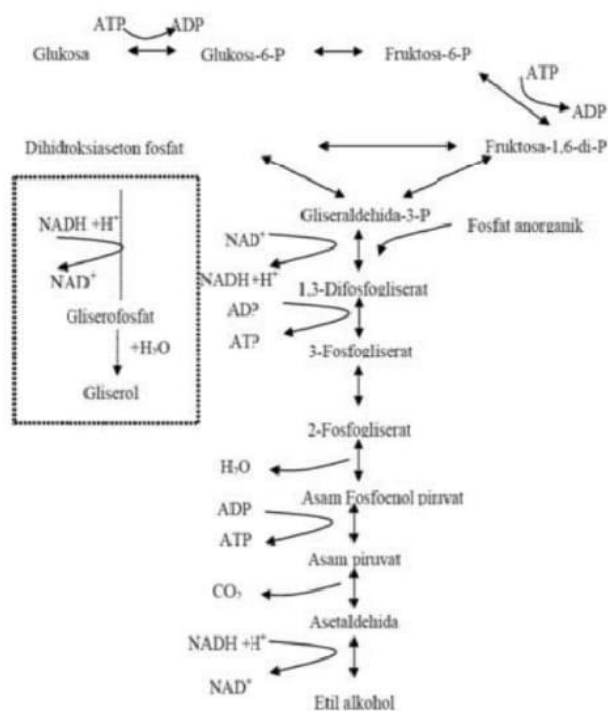
Gambar 4. 3. Pengaruh penambahan jumlah ragi *Saccharomyces cerevisiae*

Berdasarkan hasil uji *Analisis of Varians* (Anova) dua jalur dapat diketahui bahwa variabel dependen berupa jumlah ragi roti *Saccharomyces cerevisiae* berpengaruh nyata terhadap variabel yang diamati dalam hal ini kadar etanol (%). Hal ini didasarkan pada nilai signifikansi yang didapatkan kurang dari nilai α ($\text{sig} < 0,05$) yaitu hanya 0,00 sehingga data kemudian dapat dilakukan uji lanjut menggunakan *Duncan Multiple Range Test* ($\alpha = 0,05$). Berdasarkan uji lanjut DMRT dalam bentuk diagram batang diatas dapat diketahui bahwa semakin banyak jumlah ragi yang digunakan pada penelitian kali ini maka kadar etanol yang dihasilkan semakin besar. Perlakuan penambahan jumlah ragi berpengaruh signifikan terhadap kadar etanol dari glukosa hasil hidrolisis alga hijau *Spirogyra* sp.. Hal ini ditandai dengan notasi huruf yang berbeda nyata dari setiap perlakuan. Pada penambahan jumlah ragi 0,5% dari volume filtrat rata-rata kadar etanol yang didapatkan adalah sebesar 3,71%, kemudian mengalami kenaikan pada penambahan 1% yaitu sebesar 5,26%, dan terus mengalami kenaikan pada penambahan 2% yaitu sebesar 7,02%.

Hasil penelitian kali ini sesuai dalam Karta, Puspawati dan Ciawi (2015) yang melakukan fermentasi dari substrat alga *Codium gappiorum* menyatakan bahwa semakin banyak jumlah ragi yang digunakan dalam hal ini sebanyak 50, 75, dan 100 gr maka kadar etanol yang dihasilkan semakin meningkat. *Saccharomyces cerevisiae* mampu merubah gula menjadi etanol karena reaksinya dibantu oleh enzim zimase dan invertase yang dihasilkan di dalam selnya. Enzim invertase akan menghidrolisis disakarida menjadi monosakarida (glukosa dan fruktosa). Selanjutnya glukosa yang terbentuk kemudian dirubah menjadi etanol oleh enzim zymase.

Proses fermentasi agar menghasilkan etanol maka dapat dilakukan secara anaerobik dalam suhu ruang. Glukosa yang didapatkan setelah proses hidrolisis kemudian akan digunakan sebagai sumber karbon bagi *Saccharomyces cerevisiae* dalam proses metabolisme (**gambar 4.4.**). Setiap molekul glukosa ($C_6H_{12}O_6$) akan dipecah menjadi dua molekul etanol (CH_3CH_2OH) dan dua molekul karbondioksida (CO_2). Proses pemecahan glukosa akan menghasilkan energi dalam bentuk ATP untuk pertumbuhan selnya. Pembentukan etanol diawali dengan proses penguraian glukosa menjadi asam piruvat atau lebih dikenal dengan proses glikolisis melalui jalur *Embden Meyerhof Parnas* (EMP) Setiap molekul glukosa yang mempunyai enam atom karbon ($C_6H_{12}O_6$) akan diubah menjadi 2 molekul asam piruvat berat atom karbon 3 (CH_3COCOO^-) dan 2 NADH (hasil reduksi NAD^+). Selain itu terjadi reaksi fosforilasi 2 molekul ADP menjadi 2 ATP sebagai energi mikroba *Saccharomyces* sp. dan juga terbentuk 2 molekul H_2O . NADH (Nikotinamida Adenina Dinukleotida Hidrogen) adalah elektron berenergi tinggi karena sebagai koenzim pengikat elektron hidrogen (H), begitu juga ATP (Adenosin Trifosfat)

yang mana setiap pelepasan fosfatnya menghasilkan energi. Tahap selanjutnya yaitu pembentukan etanol melalui dua proses, proses pertama adalah dekarboksilasi asam piruvat oleh piruvat dekarboksilase dengan bantuan tiamin pirofosfat menjadi asetaldehid, kemudian asetaldehid yang terbentuk kemudian direduksi oleh alkohol dehidrogenase dengan NADH_2 menjadi etanol.

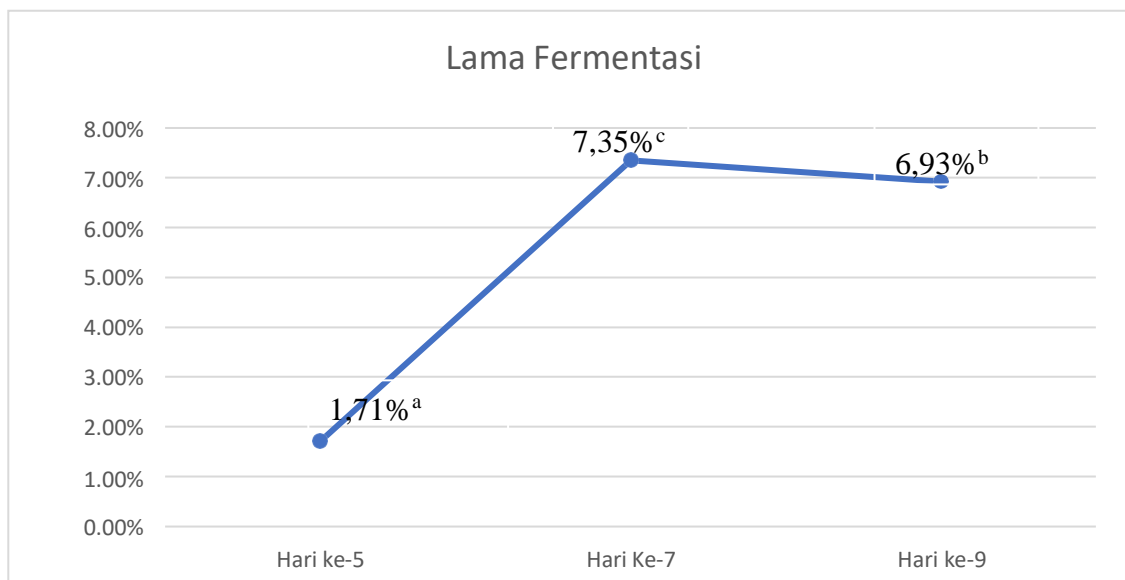


Gambar 4. 4. Skema metabolisme glukosa menjadi etanol oleh *Saccharomyces cerevisiae*

Menurut Hossain *et al.* (2017), menyatakan bahwa diantara banyak jenis ragi, tampaknya *Saccharomyces cerevisiae* yang paling efisien dalam beberapa penelitian karena diketahui sangat efektif dalam mengubah gula menjadi etanol. Pendapat lain adalah Moede *et al.* (2017). *Saccharomyces cerevisiae* mempunyai kemampuan toleransi yang besar terhadap etanol sehingga galur ini sering digunakan untuk proses fermentasi. Ragi komersil seperti ragi roti mudah didapatkan karena tersedia dalam jumlah yang banyak dan sudah digunakan sejak zaman dahulu untuk proses fermentasi.

4.3. Pengaruh Lama Fermentasi Terhadap Kadar Etanol

Kadar etanol yang dihasilkan dari beberapa perlakuan kemudian dianalisis secara statistik menggunakan *Two way Analisis of Varians (Anova)* untuk mengetahui pengaruh variasi lama fermentasi yang diberikan terhadap kadar etanol yang terbentuk. Lama waktu fermentasi yang digunakan adalah 5, 7, dan 9 hari dan hasil Anava dua jalur dapat dilihat dalam bentuk diagram pada (**gambar 4.5.**). Kemudian jika berbeda nyata maka akan dilanjutkan dengan *Dnucan Multiple Range Test* dengan menggunakan taraf kepercayaan ($\alpha=5\%$) untuk mengetahui perlakuan mana yang terbaik dari parameter yang diamati.



Gambar 4. 5. Diagram pengaruh lama fermentasi terhadap kadar etanol

Berdasarkan hasil uji anava dapat diketahui bahwa ada pengaruh variasi lama fermentasi terhadap kadar etanol yang terbentuk. Hal ini berdasarkan pada nilai signifikansi yang didapatkan yaitu $0,00 < 0,05$ ($\text{sig} < \alpha$). Kadar etanol tertinggi yang didapatkan adalah perlakuan lama fermentasi selama 7 hari dengan kadar etanol yang dihasilkan yaitu 7,35%, sedangkan kadar etanol terendah adalah pada perlakuan lama fermentasi 5 hari dengan nilai 1,71%. Kadar etanol yang dihasilkan

semakin meningkat seiring dengan meningkatnya lama fermentasi yang diberikan. Hasil penelitian ini sesuai dengan Permei (2022) menggunakan alga merah *Gracilaria verrucosa* sebagai substrat dengan variasi waktu fermentasi 0 jam, 24 jam, 48 jam, 72 jam, 96 jam, dan 120 jam. Kandungan bioetanol tertinggi dihasilkan dari lama waktu fermentasi 96 jam sebesar 8,85% yang menunjukkan kuatnya pengaruh yang berbeda nyata antara lama waktu fermentasi dengan kadar etanol yang dihasilkan. Hasil uji DMRT menunjukkan terjadi penurunan setelah lama fermentasi tujuh hari yaitu sebesar 7,35% menjadi 6,93% pada lama fermentasi sembilan hari

Berdasarkan hasil tersebut dapat diketahui pada hari ke-5 proses fermentasi kadar etanol yang dihasilkan masih belum optimal. Hal ini dikarenakan mikroba masih ada dalam fase adaptasi dengan kondisi lingkungan barunya. Menurut Gandjar (2006) awal pertumbuhan dari mikroorganisme adalah fase penyesuaian (lag fase) terlebih dahulu. Mikroba menyesuaikan diri dengan lingkungan dalam hal ini medium fermentasi serta akan membentuk enzim untuk keperluan metabolismenya, setelah itu menjadi aktif dan mulai melakukan pembelahan. Kemudian sel mikroorganisme membelah dengan cepat sehingga jumlahnya menjadi banyak atau disebut dengan fase pembelahan (eksponensial).

Pembelahan *Saccharomyces cerevisiae* menghasilkan metabolit primer berupa etanol sehingga pada pertumbuha dihasilkan dalam jumlah yang banyak. Pada penelitian kali ini fase pertumbuhan terbaik mikroba adalah pada hari ke-7 dengan menghasilkan kadar etanol mencapai 7,35%. Kemudian mengalami penurunan pada hari ke-9 dengan nilai rata-rata 6,93% karena jumlah nutrisi dan gula pada media sudah mulai menurun serta keberadaan etanol dapat

mempengaruhi *Saccharomyces cerevisiae* sehingga pertumbuhan melambat dan mikroba mulai memasuki masa kematian. Menurut Ahmad (2010) selama proses fermentasi berlangsung terjadi proses oksidasi etanol menjadi senyawa asam organik yang dapat menghambat proses fermentasi bahkan menyebabkan kematian mikroba.

Allah SWT telah menciptakan semua yang ada di alam ini sebagai rahmat bagi manusia selama mereka menggunakan akalunya. Firman Allah SWT dalam surah Al-Jatsiyah ayat 13 menerangkan tentang tanda-tanda kebesaran Allah di setiap ciptaan-Nya bagi mereka yang menggunakan akalunya untuk berfikir.

بِهَا تُدْعَىٰ رُؤُوسَ وُجُوهِكُمْ يَوْمَ الْقِيَامِ وَأَنْتُمْ كَاذِبُونَ
 وَإِنَّ فِي آيَاتِنَا لَلْآيَاتِ لَعَلَّكُمْ تَعْقِلُونَ
 وَإِنَّ فِي آيَاتِنَا لَعَلَّكُمْ تَعْقِلُونَ
 وَإِنَّ فِي آيَاتِنَا لَعَلَّكُمْ تَعْقِلُونَ
 وَإِنَّ فِي آيَاتِنَا لَعَلَّكُمْ تَعْقِلُونَ
 وَإِنَّ فِي آيَاتِنَا لَعَلَّكُمْ تَعْقِلُونَ
 وَإِنَّ فِي آيَاتِنَا لَعَلَّكُمْ تَعْقِلُونَ
 وَإِنَّ فِي آيَاتِنَا لَعَلَّكُمْ تَعْقِلُونَ
 وَإِنَّ فِي آيَاتِنَا لَعَلَّكُمْ تَعْقِلُونَ
 وَإِنَّ فِي آيَاتِنَا لَعَلَّكُمْ تَعْقِلُونَ

Artinya: Dan Dia menundukkan untukmu apa yang ada di langit dan apa yang ada di bumi semuanya, (sebagai rahmat) dari pada-Nya. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda-tanda (kekuasaan Allah) bagi kaum yang berfikir (Q.S. Aljatsiyah (45):13).

Berdasarkan Shihab (2012) dijelaskan bahwa hanya Allah saja yang mampu menundukkan semua ciptaan-Nya baik yang ada di langit maupun di bumi. Seluruh ciptaan Allah SWT adalah berkah bagi manusia asalkan mereka menggunakan akal dan menjalankan ajaran yang sesuai. Manusia telah dianugerahi oleh Allah SWT dua potensi penting, yaitu potensi fitriyah (di dalam manusia) dan potensi sumber daya alam (di luar manusia). Selain itu, Al-Qur'an memberikan petunjuk praktis kepada manusia berupa langkah-langkah penting untuk memahami alam untuk kemaslahatan yang sebesar-besarnya. Tafsir Ibnu Katsir (2005) menerangkan semua ciptaan seperti bintang-bintang, bumi, gunung-gunung lautan, adalah karunia Allah dan tiada sekutu bagi-Nya. Tidak hanya ciptaan yang begitu besar saja tetapi keagungan Allah juga dapat dilihat dari ciptaan yang sangat kecil juga.

Surah Al-Baqarah (1) ayat 26 menerangkan salah satu ciptaan yang tidak boleh dilihat sebelah mata.

اِنَّ كَمَآءٍ مِّنْ عَرَبٍ رَّوٰى نَحْمُ قُيُوٰى وَنَمَامٍ نَّبٰىذٍ لَّا اَآءَ وَاَمَّا مَن اٰمَنَ فَاِنَّهٗ لَآ يَسْمَعُ
 اَنَّهٗ يَدْعٰى سِوَا رَبِّهٖ اِنَّهٗ لَآ يَسْمَعُ اَنَّهٗ يَدْعٰى سِوَا رَبِّهٖ اِنَّهٗ لَآ يَسْمَعُ اَنَّهٗ يَدْعٰى سِوَا رَبِّهٖ اِنَّهٗ لَآ يَسْمَعُ

نَّبِيٍّ مِّنْ دُوْنِ رَبِّهٖ اِنَّهٗ لَآ يَسْمَعُ اَنَّهٗ يَدْعٰى سِوَا رَبِّهٖ اِنَّهٗ لَآ يَسْمَعُ اَنَّهٗ يَدْعٰى سِوَا رَبِّهٖ اِنَّهٗ لَآ يَسْمَعُ
 اِنَّهٗ لَآ يَسْمَعُ اَنَّهٗ يَدْعٰى سِوَا رَبِّهٖ اِنَّهٗ لَآ يَسْمَعُ اَنَّهٗ يَدْعٰى سِوَا رَبِّهٖ اِنَّهٗ لَآ يَسْمَعُ
 اِنَّهٗ لَآ يَسْمَعُ اَنَّهٗ يَدْعٰى سِوَا رَبِّهٖ اِنَّهٗ لَآ يَسْمَعُ اَنَّهٗ يَدْعٰى سِوَا رَبِّهٖ اِنَّهٗ لَآ يَسْمَعُ

Artinya : *Sesungguhnya Allah tiada segan membuat perumpamaan seekor nyamuk atau yang lebih kecil dari itu. Adapun orang-orang yang beriman, maka mereka tahu bahwa itu kebenaran dari Tuhan. Tetapi mereka yang kafir berkata, “Apakah maksud Allah dengan perumpamaan ini?” Dengan (perumpamaan) itu banyak orang yang disesatkanNya, 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(1):26).*

Ayat tersebut adalah salah satu ayat tamtsil dalam Al-Quran, berisi perumpamaan dalam hal ini Allah ingin menyampaikan pesan tersirat agar dapat dijadikan pelajaran oleh manusia. Tafsir Jalalain (2010) menyebutkan bahwa Allah tidak malu mengangkat nyamuk sebagai perumpamaan, atau bahkan yang lebih kecil dari nyamuk. Fachr al-Razi mengatakan bahwa penggunaan nyamuk sebagai metafora adalah kemampuan Tuhan untuk menanggapi kritik, yaitu tanggapan berupa “al-tibaq” yang sangat berkesan bagi pendengarnya.

Dalam kalimat “ اِنَّهٗ لَآ يَسْمَعُ اَنَّهٗ يَدْعٰى سِوَا رَبِّهٖ ” ditinjau dari arti kata (mufrod) sesuatu “ما

yang lebih kecil dari nyamuk dapat diartikan sesuatu yang tidak tampak langsung oleh mata seperti kuman yang hanya mampu dilihat melalui bantuan mikroskop berdasarkan pendapat dari Al-Maraghi. Menurut Sayyid Qutub perumpamaan dalam ayat tersebut dapat diartikan sebagai alat untuk membuka pandangan. Manusia akan diuji dengan perumpamaan tersebut terhadap hati dan jiwa mereka, karena hal tersebut banyak orang yang disesatkan dan banyak juga yang diberi petunjuk. Dalam ayat terakhir menyatakan tidak ada yang disesatkan kecuali orang

fasik.

Sesuatu ciptaan Allah SWT yang kecil tersebut seperti mikroba *Saccharomyces cerevisiae* dan alga hijau *Spirogyra* sp. ternyata menyimpan suatu manfaat yang jika terus digali akan membuka tanda kebesaran-Nya. Dari sini dapat diambil pelajaran bahwa sesuatu yang rendah sekalipun memiliki hikmah yaitu dapat dimanfaatkan sebagai pembuatan bioetanol untuk membantu kehidupan manusia. Sesuatu tanda kebesaran tersebut hanya menyertai orang-orang yang berakal. Dalam surah Ali-Imran (3) ayat ke 190-191 menerangkan mengenai hal ini dan menunjukkan siapa orang yang menggunakan akal tersebut.

وَأَن نَّبِيٌّ خَلَقَ آلَ سَاءُ	وَأَخَذَ مِنَ الثَّمَرَاتِ وَأَنزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَسَلَوا بِهِ نَضِيبًا لَّيْلًا	وَأَن يَذُوقُوا وَعَذَابًا أَلِيمًا	وَأَن يَذُوقُوا وَعَذَابًا أَلِيمًا	وَأَن يَذُوقُوا وَعَذَابًا أَلِيمًا	وَأَن يَذُوقُوا وَعَذَابًا أَلِيمًا
وَأَن يَذُوقُوا وَعَذَابًا أَلِيمًا	وَأَن يَذُوقُوا وَعَذَابًا أَلِيمًا	وَأَن يَذُوقُوا وَعَذَابًا أَلِيمًا	وَأَن يَذُوقُوا وَعَذَابًا أَلِيمًا	وَأَن يَذُوقُوا وَعَذَابًا أَلِيمًا	وَأَن يَذُوقُوا وَعَذَابًا أَلِيمًا
وَأَن يَذُوقُوا وَعَذَابًا أَلِيمًا	وَأَن يَذُوقُوا وَعَذَابًا أَلِيمًا	وَأَن يَذُوقُوا وَعَذَابًا أَلِيمًا	وَأَن يَذُوقُوا وَعَذَابًا أَلِيمًا	وَأَن يَذُوقُوا وَعَذَابًا أَلِيمًا	وَأَن يَذُوقُوا وَعَذَابًا أَلِيمًا
وَأَن يَذُوقُوا وَعَذَابًا أَلِيمًا	وَأَن يَذُوقُوا وَعَذَابًا أَلِيمًا	وَأَن يَذُوقُوا وَعَذَابًا أَلِيمًا	وَأَن يَذُوقُوا وَعَذَابًا أَلِيمًا	وَأَن يَذُوقُوا وَعَذَابًا أَلِيمًا	وَأَن يَذُوقُوا وَعَذَابًا أَلِيمًا

Artinya: *Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, dan pergantian malam dan siang terdapat tanda-tanda (kebesaran Allah) bagi orang yang berakal (190). (Yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil 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; Mahasuci Engkau, lindungilah kami dari azab neraka (QS: Ali-Imran (3): 190-191)*

Ayat diatas menyebutkan kata “وَأَن يَذُوقُوا وَعَذَابًا أَلِيمًا” yaitu mereka yang selalu memikirkan segala fenomena yang ada dibumi dalam setiap aktifitasnya. Hal tersebut dapat menambah keimanan serta kecintaan mereka kepada zat yang menciptakan. Demikian tersebut merupakan orang yang mampu menggunakan akal mereka (ulul albab). Maka dari itu, pemahaman akan suatu konsep dalam hal apa saja sangat penting guna mendapatkan ilmu yang benar. Sehingga timbul kecintaan

terhadap ilmu yang dipahami tersebut. Dalam ayat ini, kita bisa mengambil kesimpulan bahwa kemenangan dan keberuntungan hanyalah dengan mengingat kebesaran Allah serta memikirkan segala makhluk.

Semua aspek kehidupan manusia tidak akan bisa terlepas dari pemenuhan kebutuhan energi. Bioetanol merupakan sumber alternatif yang dapat dimanfaatkan

untuk mengurangi ketergantungan terhadap energi dari fosil. Bahan baku untuk pembuatan bioetanol berasal dari gula yang tersimpan di dalam organisme berklorofil baik itu dalam bentuk pati maupun selulosa dalam hal ini mikroalga *Spirogyra* sp. Senyawa tersebut didapatkan dari proses fotosintesis yang mana dapat dilihat dalam surah Al An'am 99 menerangkan mengenai proses tersebut.

خَرَزًا مَّزَّةً جَ ۖ وَكُنُوزًا ۚ أَجْمَعِينَ ۗ
 ذُرًّا مِّنْ رَّيْحٍ ۚ وَنَضْرًا ۚ وَالزُّرِّيَّةَ مِن نَّوْمٍ ۚ وَالتُّرْبَةَ الَّتِي كَانَتْ أَجْمَعِينَ ۗ
 وَالتُّرْبَةَ الَّتِي كَانَتْ أَجْمَعِينَ ۗ

Menurut Ibnu Al-Jawzi kata khadhira dapat diartikan sebagai “tanaman yang hijau”, sedangkan Al-Baidhawi mengartikannya “sesuatu yang berwarna hijau”. Pada QS. al-Hajj (22): 63, zat hijau daun (klorofil) yang ada pada tumbuhan berfungsi dalam menyusun gula dari bahan baku air dan CO₂ dengan bantuan energi yang berasal dari sinar matahari. Pada akhirnya energi tersebut tersimpan di dalam tumbuh-tumbuhan. Dengan kata lain proses fotosintesis dapat menyimpan energi matahari pada setiap sel organisme yang kemudian dapat dimanfaatkan sebagai sumber bahan bakar.

Alga hijau *Spirogyra* sp. dapat melakukan fotosintesis karena terdapat klorofil pada selnya. Organisme ini memiliki masa pertumbuhan yang cepat dan mendominasi suatu perairan sehingga sering dianggap sebagai gulma. Berdasarkan dari beberapa penelitian dapat diketahui bahwa cahaya dan nutrisi yang tinggi dapat meningkatkan pertumbuhan dan perkembangan dari alga *Spirogyra* sp.. Wilayah perairan di Indonesia cukup luas dan termasuk negara tropis dengan matahari bersinar sepanjang tahun maka cocok untuk habitat organisme ini. Oleh karena itu pemanfaatan *Spirogyra* sp. menjadi produk lain dalam hal ini pembuatan bioetanol dapat dipertimbangkan.

BAB V PENUTUP

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan maka kesimpulan yang dapat diambil adalah.

1. Kombinasi perlakuan penambahan variasi jumlah ragi roti *Saccharomyces cerevisiae* dan lama fermentasi berpengaruh nyata terhadap kadar etanol yang dihasilkan. Hasil tertinggi yang mampu dihasilkan yaitu pada perlakuan penambahan 2% ragi dan lama fermentasi tujuh hari (S3H2) yaitu dengan kadar etanol sebesar 10,10%. Kadar etanol terendah yang dihasilkan yaitu pada perlakuan penambahan ragi roti 0,5% dan lama fermentasi lima hari (S1H1) dengan nilai 1,26%.
2. Jumlah ragi roti *Saccharomyces cerevisiae* yang diberikan berpengaruh nyata terhadap kadar etanol yaitu semakin banyak jumlah ragi maka kadar etanol yang dihasilkan semakin meningkat. Kadar etanol tertinggi yang mampu dihasilkan yaitu pada penambahan jumlah ragi 2% dari volume filtrat dengan nilai 7,02%
3. Lama fermentasi yang diberikan berpengaruh nyata terhadap kadar etanol yang dihasilkan yaitu terjadi kenaikan secara signifikan dari hari ke-5 menuju hari ke-7 dengan nilai kadar etanol 1,71% menuju 7,35%, akan tetapi kemudian terjadi penurunan pada hari ke 9 fermentasi yaitu dengan nilai 6,92%.

5.2. Saran

Saran yang dapat dibuat pada penelitian kali ini adalah

1. Penambahan variasi jumlah ragi roti *Saccharomyces cerevisiae* yang digunakan pada penelitian kali ini perlu ditingkatkan lagi.
2. Penggunaan jenis mikroba fermentasi yang lain perlu dilakukan untuk mengetahui kadar etanol yang mampu dihasilkan
3. Perlu dilakukan metode lain dari pemisahan etanol dari filtrat
4. Perlu dilakukan metode pemisahan lanjutan guna memisahkan larutan azeotrop etanol-air agar dihasilkan kadar etanol yang lebih murni

DAFTAR PUSTAKA

- Adaganti, S. Y., Yaliwal, V. S., Kulkarni, B. M., Desai, G. P., & Banapurmath, N. R. 2014. Factors affecting bioethanol production from lignocellulosic biomass (*Calliandra calothyrsus*). *Waste and Biomass Valorization*. 5(6):963–971.
- Ahmad, T. dan A. 2010. *Pembuatan Bioetanol dari Kulit Nanas*. Universitas Sebelas Maret Press.
- Anderson, S., & Rahman, P. K. S. M. 2018. *Bioprocessing Requirements for Bioethanol*. 48–56.
- Anugrah, R., Mardawati, E., Putr, S. H., & Yuliani, T. 2020. Karakterisasi bioetanol tandan kosong kelapa sawit dengan metode pemurnian adsorpsi (menggunakan adsorben berupa zeolit). *Jurnal Industri Pertanian*. 2(1):113–123.
- Azhar, S. H. M., Abdulla, R., Jambo, S. A., Marbawi, H., Gansau, J. A., Faik, A. A. M., & Rodrigues, K. F. 2017. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 10(February):52–61.
- Azzahra, N., Amri, A., & Utami, S. P. 2015. Hidrolisis mikroalga *Tetraselmis Chuii* menjadi glukosa menggunakan enzim selulase. *JOM FTEKNIK*. 3(57):29–39.
- Bahri, S., Aji, A., & Yani, F. 2019. Pembuatan bioetanol dari kulit pisang kepok dengan cara fermentasi menggunakan ragi roti. *Jurnal Teknologi Kimia Unimal*. 7(2):85.
- Banati, F. S. E. Z. dan T. N. 2009. Pengaruh penambahan enzim α -amilase pada fermentasi karbohidrat ekstrak *Ulva fasciata* dari balekambang, malang menggunakan ragi roti fermipan. *Angewandte Chemie International Edition*. 1(7):1–7.
- Cannella, D., Hsieh, C. W. C., Felby, C., & Jørgensen, H. 2012. Production and effect of aldonic acids during enzymatic hydrolysis of lignocellulose at high dry matter content. *Biotechnology for Biofuels*. 5:1–10.
- Chaudhary, L., Pradhan, P., Soni, N., Singh, P., & Tiwari, A. 2014. Algae as a feedstock for bioethanol production: New entrance in biofuel world. *International Journal of ChemTech Research*. 6(2):1381–1389.
- Dompeipen, E. J., & Dewa, R. P. 2015. Pengaruh waktu dan pH fermentasi dalam produksi bioetanol dari rumput laut *Eucheuma cottonii* menggunakan asosiasi mikroba (*Sacchromyces cerevisiae*, *Aspergillus Niger* dan *Zymomonas Mobilis*). *Jurnal Ilmiah Terakreditasi KEMENRISTEKDIKTI*. 11(2):63–75.
- E. Krell. 2002. *Handbook of Laboratory Destillation*. Elsevier.
- Endah, D. S., Nur, A., & Paryanto. 2007. Pengaruh kondisi fermentasi terhadap yield etanol pada pembuatan bioetanol dari pati garut. *Gema Teknik Majalah Ilmiah Teknik*. 10(2):83-88–88.
- Eshaq, F. S., Ali, M. N., & Mohd, M. K. 2010. *Spirogyra* biomass a renewable source for biofuel (bioethanol) production. *International Journal of Engineering Science and Technology*. 2(12):7045–7054.
- Febriana. 2020. *Pengaruh variasi massa ragi Saccharomyces cerevisiae dan waktu fermentasi terhadap kadar bioetanol berbahan dasar limbah kulit kopi arabika (Coffea arabica L.)* (hal. 103). Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Ar-Raniry Banda Aceh.
- Gandjar, I. 2006. *Mikologi Dasar dan Terapan*. IKAPI.
- Hadiyanto dan Maulana Azim. 2012. *Mikroalga Sumber Pangan dan Energi Masa Depan*.

- Handayani, S. S. S. H. dan H. P. 2016. Fermentasi glukosa hasil hidrolisis buah kumbi untuk bahan baku bioetanol. *Pijar MIPA*. XI(1):28–33.
- Harismah, K., Setiawan, A., & Fuadi, A. M. 2015. Pengaruh suhu dan pH terhadap banyaknya yield (kadar glukosa) yang dihasilkan pada proses hidrolisis enzimatis dari limbah kertas. *Simposium Nasional RAPI XIV*179–185.
- Hossain, N., Zaini, J. H., & Mahlia, T. M. I. 2017. A review of bioethanol production from plant-based waste biomass by yeast fermentation. *International Journal of Technology*. 8(1):5–18.
- Jaelani, A. 2017. Kebijakan energi baru terbarukan di Indonesia: Isyarat ilmiah Al-Qur'an dan implementasinya dalam ekonomi Islam. *Munich Personal RePEc Archive*833141–19. https://mpra.ub.uni-muenchen.de/83314/1/MPRA_paper_83314.pdf
- Jalaludin, I. 2010. *Tafsir Jalalain Edisi Indonesia*. Pustaka ELBA.
- Jaya, D., Setiyaningtyas, R., & Prasetyo, S. 2018. Pembuatan bioetanol dari alga hijau *Spirogyra* sp. *Eksergi*. 15(1):16–19.
- Kang, Q., Appels, L., Tan, T., & Dewil, R. 2014. Bioethanol from lignocellulosic biomass: Current findings determine research priorities. *Scientific World Journal*. 2014(February 2015):
- Karta, I. W., Puspawati, N. M., & Ciawi, Y. 2015. Pembuatan bioetanol dari alga *Codium geppiorum* dan pemanfaatan batu kapur nusa penida teraktifasi untuk meningkatkan kualitas bioetanol. *Cakra Kimia (Indonesian E-Journal of Applied Chemistry)*. 3(2):23–31.
- Katsir, I. 2005. *Tafsir Ibnu Katsir Jilid 8*. Pustaka Imam Asy-Syafi'i.
- Khaira, Z. F., Yenie, E., & Muria, S. R. 2008. Pembuatan bioetanol dari limbah tongkol jagung menggunakan proses. *Jom Fteknik*. 2(2):1–8.
- Kristina, Sari, E. R., & Novia. 2012. Alkaline pretreatment dan proses simultan sakarifikasi – fermentasi untuk produksi etanol dari tandan kosong kelapa sawit. *Jurnal Teknik Kimia*. 18(3):34–43.
- Kumar, A., Gautam, A., & Dutt, D. 2016. Biotechnological transformation of lignocellulosic biomass in to industrial products: an overview. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 07(03):149–168.
- Lee, H. V., Hamid, S. B. A., & Zain, S. K. 2014. Conversion of lignocellulosic biomass to nanocellulose: Structure and chemical process. *Scientific World Journal*. 2014(August 2014):1–20.
- Masturi, Cristina, A., Istiana, N., Sunarno, & Dwijananti, P. 2017. Ethanol production from fermentation of arum manis mango seeds (*Mangifera indica* L.) using *Saccharomyces Cerevisiaea*. *Jurnal Bahan Alam Terbarukan*. 6(1):56–60.
- Moede, F. H., Gonggo, S. T., & Ratman, R. 2017. Pengaruh lama waktu fermentasi terhadap kadar bioetanol dari pati ubi jalar kuning (*Ipomea batata* L). *Jurnal Akademika Kimia*. 6(2):86.
- Mukti, N. L., & Aryani, W. 2013. Pengaruh waktu fermentasi dan jumlah ragi terhadap persentase hasil dalam pembuatan bioetanol dari buah talok (kersen) menggunakan ragi tape dan ragi roti (*Saccharomyces cerevisiae*). *Journal of Chemical Information and Modeling*. 53(9):1689–1699.
- Musatto, illes S. 2004. *Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review*. . 93(1):1–10.

- Narendhirakannan, R. T., Mannivannan, A., & Rathore, S. S. 2014. Screening of cellulase producing microorganisms from lake area containing water Hyacinth for enzymatic hydrolysis of cellulose. *Journal of Advanced Scientific Research*. 5(3):23–30. <http://www.sciensage.info/jasr>
- Ndegwa, G., Moraa, V., & Iiyama, M. 2011. *Potential for biofuel feedstock in Kenya* (Nomor March).
- Ningrum, A. S. W., Lian, V., & Widyasti, A. R. 2016. Pengaruh variasi asam alam fermentasi biomassa berbahan baku alga Spirogyra sp. terhadap kadar etanol. *PELITA*. 11(2):21–32.
- Oludaisi, A., Kayode, A., & Ayodeji, O. 2018. Bridging environmental impact of fossil fuel energy: the contributing role of alternative energy. *Journal of Engineering Studies and Research*. 23(2):21–27.
- Otieno, J. O., & Ogutu, F. O. 2020. A Review of potential of lignocellulosic biomass for bioethanol production in Kenya. *Asian Journal of Chemical Sciences*. 8(2):34–54.
- Padil, P., Syamsiah, S., Hidayat, M., & Kasiamdari, R. S. 2017. Kinerja enzim ganda pada pretreatment mikroalga Untuk produksi bioetanol. *Jurnal Bahan Alam Terbarukan*. 5(2):92–100.
- Permei, I. 2022. *Pengaruh konsentrasi asam pada proses hidrolisis dan waktu fermentasi terhadap pembuatan bioetanol dari Gracilaria verrucosa*.
- Pratama, S. A. 2020. *Pengaruh penambahan yeast extract dan lama fermentasi terhadap produksi bioetanol dari limbah air kelapa yang ditambahkan tetes tebu menggunakan khamir Saccharomyces cerevisiae* (Vol. 68, Nomor 1, hal. 1–12).
- Pratiwi, N. T. M., Krisanti, M., Ayu, I. P., Iswantari, A., & Apriadi, T. 2015. Serapan kalsium dan nutrien oleh alga berfilamen Spirogyra sp. pada lama penyinaran berbeda. *Limnotek*. 22(1):96–105.
- Priyanka Chalotra, P. C. 2013. Morpho-Taxonomic studies on the genus spirogyra link (chlorophyta) pccuring in Fresh Water Bodies of Jammu, Jammu And Kashmir. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science*. 2(5):1–10.
- Puspita, D., Nadia, E., Immanuela, E., & Titania, M. 2020. Isolasi, identifikasi dan uji produksi yeast yang diisolasi dari nira kelapa. *Biosfer : Jurnal Biologi dan Pendidikan Biologi*. 5(1):1–5.
- Rahmana, S. F., Nurhatika, S., & Muhibuddin, A. 2016. Uji potensi fermentasi etanol beberapa yang diisolasi dari daerah Malang, Jawa Timur dengan Metode SDN (Soil Drive Nutrient). *Jurnal Sains dan Seni ITS*. 5(2):47–52.
- Rathore, S. S., Mannivannan A., R. T., & Narendhirakannan. 2014. Screening of cellulase producing microorganisms from lake area containing water Hyacinth for enzymatic hydrolysis of cellulose. *Journal of Advanced Scientific Research*. 5(3):23–30.
- Riza, M. 2016. Pemanfaatan limbah kulit kayu (Manihot utilissima) dan kulit nanas (Ananas comosus) pada produksi bioetanol menggunakan Aspergillus Niger. *The 3rd Universty Research Colloquium*604–614.
- Ronald, M. 2014. Pengaruh variasi konsentrasi bekatul pada proses produksi etanol menggunakan singkong karet (Manihot glaziovii) dengan metode fermentasi menggunakan Saccharomyces Cerevisiae. *Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan*. 134(2):429–441.
- Sa'adah, A. F., Fauzi, A., & Juanda, B. 2017. Peramalan penyediaan dan konsumsi

- bahan bakar minyak indonesia dengan model sistem dinamik. *Jurnal Ekonomi dan Pembangunan Indonesia*. 17(2):118–137.
- Sasana, H., & Ghozali, I. 2017. The impact of fossil and renewable energy consumption on the economic growth in Brazil, Russia, India, China and South Africa. *International Journal of Energy Economics and Policy*. 7(3):194–200.
- Seftian, D., Antonius, F., & Faizal, M. 2012. Pembuatan etanol dari kulit pisang menggunakan metode hidrolisis enzimatik dan fermentasi. *Jurnal Teknik Kimia*. 18(1):10–16.
- Semenčenko, V. V., Mojović, L. V., Petrović, S. D., & Očić, O. J. 2011. Novi trendovi u proizvodnji bioetanol. *Hemijska Industrija*. 65(2):103–114.
- Shah, Y. R., & Sen, D. J. 2011. Bioalcohol as green energy - A review. *International Journal of Current Science Research*. 1(2):57–62.
- Shihab, Q. 2012. *Tafsir Al-Misbah Vol. 10*. Lentera Hati.
- Stanley, D., Bandara, A., Fraser, S., Chambers, P. J., & Stanley, G. A. 2010. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Microbiology*. 109(1):13–24.
- Sulfahri, Amin, M., Sumitro, S. B., & Saptasari, M. 2016. Bioethanol production from algae *Spirogyra hyalina* using *Zymomonas mobilis*. *Biofuels*. 7(6):621–626.
- Sulfahri, Husain, D. R., Kasbawati, Tassakka, A. C. M., Tassakka, A. C. M., Wulandari, D. P., & Taufan, W. L. 2019. Bioethanol production from algae *Spirogyra peipingensis* using *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kudriavzevii* and *Kluyveromyces thermotolerans*. *Journal of Physics: Conference Series*. 1341(2):.
- Sulfahri, Mushlihah, S., Utami, R. S., & Sunarto, E. 2011. Pemanfaatan *Spirogyra* sp. sebagai bahan baku bioetanol dengan penambahan enzim α -amilase. *Jurnal Purifikasi*. 12(1):9–16.
- Susilo, B. S. H. S. dan D. F. N. 2017. Pemurnian Bioetanol Menggunakan Proses Distilasi Dan Adsorpsi Dengan Penambahan Asam Sulfat (H₂SO₄) Pada Aktivasi Zeolit Alam Sebagai Adsorben. *Jurnal Keteknik Pertanian Tropis dan Biosistem*. 5(1):19–26.
- Syaifuddin, A. T., Umasya'tiyan, & Melisa, A. O. 2018. Identifikasi Mikroalga Pada Air Sumur Di Daerah Kecamatan Kota Kabupaten Kudus. *Jurnal Pendidikan Biologi*. 1(6):11–21.
- Takano, T., Higuchi, S., Ikegaya, H., Matsuzaki, R., Kawachi, M., Takahashi, F., & Nozaki, H. 2019. Identification of 13 *Spirogyra* species (Zygnemataceae) by traits of sexual reproduction induced under laboratory culture conditions. *Scientific Reports*. 9(1):1–11.
- Talaro, C. 2012. *Foundation in Microbiology* (2 ed.).
- Tasgin, E. 2017. Macronutrients and Micronutrients in Nutrition. *International Journal of Innovative Research and Reviews*. 1(1):10–15.
- Tayyab, M., Noman, A., Islam, W., Waheed, S., Arafat, Y., Ali, F., Zainab, M., Lin, S., Zhang, H., & Lin, W. 2017. Bioethanol production from lignocellulosic biomass by environment-friendly pretreatment methods. *Applied Ecology and Environmental Research* December.
- Tipsukhon Pimpimol, Burassakorn Tongmee, Padivarada Lomlai, Prsert Prasongpol, Niwooti Whangchai, Yuwalee Unpaprom, & Rameshprabu Ramaraj. 2020. *Spirogyra* cultured in fishpond wastewater for biomass

- generation. *Maejo International Journal of Energy and Environmental Communication*. 2(3):58–65.
- Ungureanu, N., Vladut, V., & Biris, S. S. 2020. Capitalization of wastewater-grown algae in bioethanol production. *Engineering for Rural Development*. 19:1859–1864.
- Vohra, M., Manwar, J., Manmode, R., Padgilwar, S., & Patil, S. 2014. Bioethanol production: feedstock and current technologies. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 2(1):573–584.
- Wahono, Satrio Kido Damayanti, E., Rosyida, V. T., & Sadyastuti, E. I. 2011. Laju pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* pada proses fermentasi pembentukan bioetanol dari biji sorgum (*Sorghum bicolor* L.). *Seminar Rekayasa Kimia Dan Proses* July 16. <https://www.researchgate.net/publication/273127155>
- Wibowo, A. H., Mubarakah, L., & Suratman, A. 2013. The Fermentation of Green Algae (*Spirogyra majuscula* Kuetz) Using Immobilization Technique of Calcium alginate for *Saccharomyces cerevisiae* Entrapment. *Indonesian Journal of Chemistry*. 13(1):7–13.
- Wiyantoko, B., Rusitasari, R., Putri, R. N., & Muhaimin. 2017. Serat Daun Nanas Menggunakan Metode Fenol-Asam Sulfat Secara Spektrofotometri Uv-Visibel. *Prosiding Seminar Nasional Kimia FMIPA UNESA* February 2018 124–131.
- Wongsawad, P., & Peerapornpisal, Y. 2015. Morphological and molecular profiling of *Spirogyra* from northeastern and northern Thailand using inter simple sequence repeat (ISSR) markers. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 22(4):382–389.
- Yuniarti, D. P., Hatina, S., & Efrinalia, W. 2018. Pengaruh jumlah ragi dan waktu fermentasi pada pembuatan bioetanol dengan bahan baku ampas tebu. *Jurnal Redoks*. 3(2):1.
- Zabed, H., Faruq, G., Sahu, J. N., Azirun, M. S., Hashim, R., & Nasrulhaq Boyce, A. 2014a. Bioethanol production from fermentable sugar juice. *The Scientific World Journal*. 2014:.
- Zabed, H., Faruq, G., Sahu, J. N., Azirun, M. S., Hashim, R., & Nasrulhaq Boyce, A. 2014b. Bioethanol production from fermentable sugar juice. *The Scientific World Journal*. 2014(April):
- Zhou, Y., Han, L. R., He, H. W., Sang, B., Yu, D. L., Feng, J. T., & Zhang, X. 2018. Effects of agitation, aeration and temperature on production of a novel glycoprotein gp-1 by *Streptomyces kanasensis* zx01 and scale-up based on volumetric oxygen transfer coefficient. *Molecules*. 23(1):1–14.

LAMPIRAN

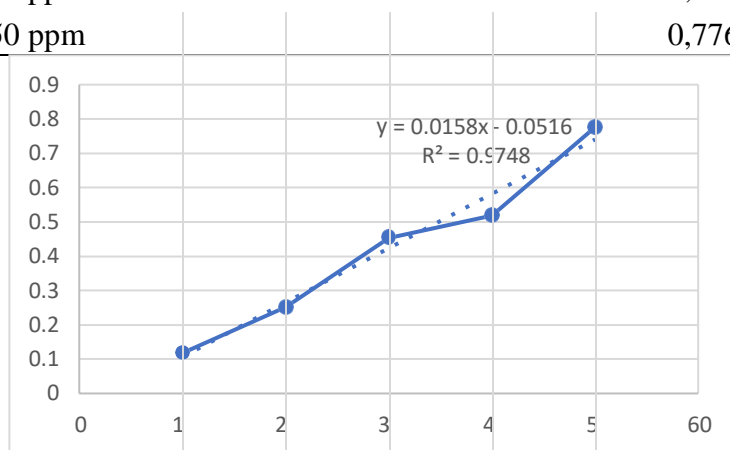
Lampiran 1. Data Penelitian

Lampiran 1.1. Analisis Kadar Gula Menggunakan Metode Fenol-Sulfat

L1.1.1. Kurva Standar Glukosa

Tabel L1.1. Nilai absorbansi glukosa standar

Konsentrasi (X)	Absorbansi (Y)
10 ppm	0,118
20 ppm	0,251
30 ppm	0,454
40 ppm	0,519
50 ppm	0,776



Gambar L1.1, Kurva standar glukosa

L1.1.2. Kadar Gula Substrat Hasil Hidrolisis

Substrat *Spirogyra* sp, setelah dihidrolisis kemudian dianalisis kadar glukosa menggunakan metode fenol-sulfat berdasarkan nilai absorbansi dari UV-Vis, selanjutnya diplotkan dengan kurva standar melalui persamaan

$$y = 0,0158x - 0,0516$$

dengan y merupakan absorbansi dan x adalah kadar gula yang dicari,

Perhitungan kadar gula hasil hidrolisis adalah sebagai berikut:

- **Konsentrasi analisa**

$$\text{Konsentrasi analisa} = \frac{5 \text{ gr}}{100 \text{ ml}} = \frac{5000 \text{ mg}}{0,1 \text{ l}} = 50,000 \text{ ppm}$$

- **Faktor pengenceran**

$$\text{Faktor pengenceran} = \frac{2 \text{ ml}}{0,02 \text{ ml}} = 100 \text{ kali}$$

- **Kadar gula bahan baku dalam ppm**

$$Y = 0,0158x - 0,0516$$

$$2,668 = 0,0158x - 0,0516$$

$$x = \frac{2,668+0,0516}{0,0158} = 167,9493671$$

$$= 167,95 \text{ ppm}$$

- **Kadar gula bahan baku dalam persen**

$$\text{Kadar gula (\%)} = \frac{\text{Kadar gula(ppm)}}{\text{konsentrasi analisa}} \times \text{FP} \times 100\%$$

$$= \frac{167,95 \text{ ppm}}{50,000 \text{ ppm}} \times 100 \times 100\%$$

$$= 34,43\%$$

Tabel L1.2. Hasil analisis kadar gula media sebelum fermentasi

Perlakuan	Absorbansi			Kadar Gula (%)			Rata-rata
	U1	U2	U3	U1	U2	U3	
S1H1	2,502	2,551	2,656	32,32	32,94	34,27	33,18
S2H1	2,701	2,602	2,498	34,84	33,59	32,27	33,57
S3H1	2,604	2,426	2,602	33,62	31,36	33,59	32,86
S1H2	2,523	2,541	2,634	32,59	32,82	33,99	33,13
S2H2	2,648	2,518	2,603	34,17	32,53	33,6	33,43
S3H2	2,669	2,634	2,668	34,44	33,99	34,43	34,29
S1H3	2,557	2,448	2,525	33,02	31,64	32,62	32,43
S2H3	2,628	2,864	2,602	33,92	36,91	33,59	34,81
S3H3	2,606	2,626	2,661	33,64	33,89	34,34	33,96

L1.1.3. Kadar Gula Substrat Setelah Fermentasi

Sampel setelah fermentasi kemudian dianalisis kadar gula sama dengan perlakuan setelah hidrolisis seperti berikut:

- **Konsentrasi analisa**

$$\text{Konsentrasi analisa} = \frac{5 \text{ gr}}{100 \text{ ml}} = \frac{5000 \text{ mg}}{0,1 \text{ l}} = 50,000 \text{ ppm}$$

- **Faktor pengenceran**

$$\text{Faktor pengenceran} = \frac{2 \text{ ml}}{0,02 \text{ ml}} = 100 \text{ kali}$$

- **Kadar gula bahan baku dalam ppm**

$$Y = 0,0158x - 0,0516$$

$$1,652 = 0,0158x - 0,0516$$

$$x = \frac{1,668+0,0516}{0,0158} = 107,8227848$$

$$= 107,82 \text{ ppm}$$

- **Kadar gula bahan baku dalam persen**

$$\text{Kadar gula (\%)} = \frac{\text{Kadar gula(ppm)}}{\text{konsentrasi analisa}} \times \text{FP} \times 100\%$$

$$= \frac{107,82 \text{ ppm}}{50,000 \text{ ppm}} \times 100 \times 100\%$$

$$= 21,57\%$$

Tabel L1.3. Hasil analisis kadar gula media setelah fermentasi

Perlakuan	Absorbansi			Kadar Gula (%)			Rata-Rata
	U1	U2	U3	U1	U2	U3	
S1H1	2.083	2.128	2.232	27.02	27.59	28.91	27.84
S2H1	2.212	2.134	2.032	28.65	27.67	26.37	27.56
S3H1	1.925	1.716	1.888	25.02	22.37	24.55	23.98
S1H2	1.723	1.764	1.862	22.46	22.98	24.22	23.22
S2H2	1.762	1.628	1.728	22.96	21.26	22.53	22.25
S3H2	1.593	1.572	1.552	20.82	20.55	20.30	20.56
S1H3	1.652	1.559	1.622	21.56	20.39	21.18	21.05
S2H3	1.626	1.849	1.612	21.24	24.06	21.06	22.12
S3H3	1.512	1.612	1.614	19.79	21.06	21.08	20.64

Lampiran 1.1.4. Kadar Gula Terpakai pada Proses Fermentasi

Perhitungan konsentrasi gula yang digunakan selama fermentasi, konsentrasi gula prafermentasi dikurangi dari konsentrasi gula pascafermentasi. Hasil konsentrasi gula yang digunakan dalam proses fermentasi disusun (Tabel L1.4.).

Kadar gula terpakai (%) (S3H2 (U3)) = (kadar gula sebelum fermentasi – kadar gula setelah fermentasi)%

$$= (34,43-20,30)\%$$

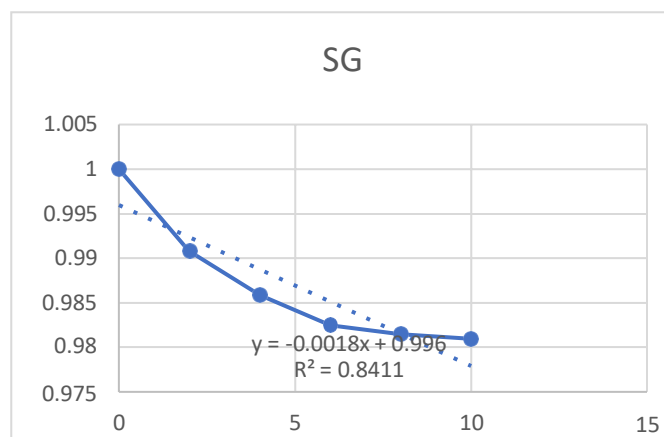
$$= 14,13\%$$

Tabel L1.4. Hasil analisis kadar gula terpakai pada proses fermentasi

Perlakuan	Glukosa Terpakai (%)			Jumlah (%)	Rata-Rata (%)
	U1	U2	U3		
S1H1	5.30	5.35	5.37	16.03	5.34
S2H1	6.19	5.92	5.90	18.01	6.00
S3H1	8.59	8.99	9.04	26.62	8.87
S1H2	10.13	9.84	9.77	29.73	9.91
S2H2	11.22	11.27	11.08	33.56	11.19
S3H2	13.62	13.44	14.13	41.19	13.73
S1H3	11.46	11.25	11.43	34.14	11.38
S2H3	12.68	12.85	12.53	38.06	12.69
S3H3	13.85	12.84	13.25	39.94	13.31

Lampiran 1.2. Hasil Analisis Kadar Bioetanol Sampel Berdasarkan Nilai Berat Jenis (*Specific Gravity/SG*)**L1.2.1. Kurva Standar Etanol****Tabel L1. 5. Hasil perhitungan kurva standar etanol**

Kadar Etanol (%)	SG
0	1
2	0,990776657
4	0,985863288
6	0,982501508
8	0,981467115
10	0,980949918



Gambar L1. 2. Kurva standar etanol

L1.2.2. Perhitungan Kadar Etanol Sampel Perlakuan *Saccharomyces cerevisiae* 2% dan Lama Fermentasi 7 Hari (S3H2)

Kadar etanol didapatkan dengan menghitung nilai berat jenis dari sampel terlebih dahulu menggunakan rumus di bawah ini:

$$\frac{\text{Berat piknometer berisi sampel} - \text{berat piknometer kosong}}{\text{Berat piknometer berisi aquades} - \text{berat piknometer kosong}}$$

Keterangan:

Berat piknometer berisi sampel = 28,946

Berat piknometer kosong = 17,607

Berat piknometer berisi aquades = 29,208

Contoh: $\frac{28,946 - 17,607}{29,208 - 17,607} = 0,97741574$

Tabel L1.6. Nilai berat jenis seluruh sampel (*specific gravity*)

Sampel	Berat Sampel	Berat Sampel-Pikno Kosong	Spesific Gravity
S1H1(1)	29,136	11,529	0,993793638
S1H1(2)	29,136	11,529	0,993793638
S1H1(3)	29,134	11,527	0,99362124
S2H1(1)	29,130	11,523	0,993276442
S2H1(2)	29,132	11,525	0,993448841
S2H1(3)	29,134	11,527	0,99362124
S3H1 (1)	29,112	11,505	0,991724851
S3H1(2)	29,110	11,503	0,991552452
S3H1(3)	29,109	11,502	0,991466253
S1H2(1)	29,060	11,453	0,987242479
S1H2(2)	29,062	11,455	0,987414878
S1H2(3)	29,065	11,458	0,987673476
S2H2(1)	29,012	11,405	0,983104905
S2H2(2)	29,010	11,403	0,982932506
S2H2(3)	29,012	11,405	0,983104905
S3H2(1)	28,952	11,345	0,977932937
S3H2(2)	28,954	11,347	0,978105336
S3H2(3)	28,946	11,339	0,97741574
S1H3(1)	29,056	11,449	0,986897681
S1H3(2)	29,054	11,447	0,986725282
S1H3(3)	29,054	11,447	0,986725282
S2H3(1)	29,014	11,407	0,983277304
S2H3(2)	29,012	11,405	0,983104905
S2H3(3)	29,010	11,403	0,982932506
S3H3(1)	28,982	11,375	0,980518921
S3H3(2)	28,986	11,379	0,980863719
S3H3(3)	28,984	11,377	0,98069994

L1.2.3. Cara mendapatkan kadar etanol sampel

Hasil berat jenis sampel kemudian dimasukkan kedalam rumus persamaan kurva standar etanol $y = -0,0018x + 0,996$, dimana y adalah berat jenis dan x adalah kadar etanol

Contoh :

$$Y = -0,0018x + 0,996$$

$$0,97741574 = -0,0018x + 0,996$$

$$x = \frac{0,97741574 - 0,996}{-0,0018}$$

$$X = 10,3246$$

$$= 10,32\%$$

Tabel L1.7. Kadar bioetanol

Sampel		Kadar Etanol		
		U1	U2	U3
5 Hari	0,5%	1,23	1,23	1,32
	1%	1,51	1,42	1,32
	2%	2,38	2,47	2,52
7 Hari	0,5%	4,87	4,77	4,63
	1%	7,16	7,26	7,16
	2%	10,04	9,94	10,32
9 Hari	0,5%	5,06	5,15	5,15
	1%	7,07	7,16	7,26
	2%	8,60	8,41	8,50

Lampiran 1. 3. Data Hasil Analisis Statistik

L1.3.1. Analisis Statistik Menggunakan *Two Way Anova*

Tests of Normality						
Standardized Residual for Kadar Etanol	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	Df	Sig.	Statistic	df	Sig.
	.078	27	.200*	.980	27	.860
*. This is a lower bound of the true significance.						
a. Lilliefors Significance Correction						
Test of Homogeneity of Variances						
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.	
Kadar Bioetanol (%)	Based on Mean	1.441	8	18	.246	
	Based on Median	.536	8	18	.814	
	Based on Median and with adjusted df	.536	8	8.202	.802	
	Based on trimmed mean	1.365	8	18	.276	

Descriptive Statistics				
Dependent Variable: Kadar Bioetanol (%)				
Jumlah Ragi Roti (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) (%)	Lama Fermentasi (hari)	Mean	Std. Deviation	N
S1	H1	1.2577	.05530	3
	H2	4.7535	.12052	3
	H3	5.1207	.05530	3
	Total	3.7106	1.84797	9
S2	H1	1.4173	.09578	3
	H2	7.1959	.05530	3
	H3	7.1639	.09578	3
	Total	5.2590	2.88226	9
S3	H1	2.4549	.07315	3
	H2	10.1011	.19938	3
	H3	8.5032	.09582	3
	Total	7.0197	3.49479	9
Total	H1	1.7100	.56685	9
	H2	7.3502	2.32154	9
	H3	6.9293	1.47703	9
	Total	5.3298	3.04348	27

Tests of Between-Subjects Effects						
Dependent Variable: Kadar Bioetanol (%)						
Source	Type III Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Corrected Model	240.639 ^a	8	30.080	2810.412	.000	.999
Intercept	766.985	1	766.985	71660.795	.000	1.000
Jumlah Ragi	49.343	2	24.672	2305.116	.000	.996
Lama Fermentasi	177.691	2	88.846	8301.014	.000	.999
Jumlah Ragi*Lama Fermentasi	13.604	4	3.401	317.759	.000	.986
Error	.193	18	.011			
Total	1007.817	27				
Corrected Total	240.831	26				

L1.3.2. Uji Lanjut Menggunakan <i>Duncan Multiple Range Test</i> ($\alpha=5\%$)								
Bioetanol (%)								
Duncan ^a								
Jumlah Ragi Roti dan Lama Feremntasi	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
S1H1	3	1.2577						
S2H1	3	1.4173						
S3H1	3		2.4549					
S1H2	3			4.7535				
S1H3	3				5.1207			
S2H3	3					7.1639		
S2H2	3					7.1959		
S3H3	3						8.5032	
S3H2	3							10.1011
Sig.		.075	1.000	1.000	1.000	.710	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Jumlah ragi roti <i>Saccharomyces cerevisiae</i>				
Duncan ^{a,b}				
Jumlah Ragi Roti (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) (%)	N	Subset		
		1	2	3
S1	9	3.7106		
S2	9		5.2590	
S3	9			7.0197
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = .011.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.
b. Alpha = .05.

Lama Fermentasi				
Duncan ^{a,b}				
Lama Fermentasi (hari)	N	Subset		
		1	2	3
H1	9	1.7100		
H3	9		6.9293	
H2	9			7.3502
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = .011.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.
b. Alpha = .05.
y

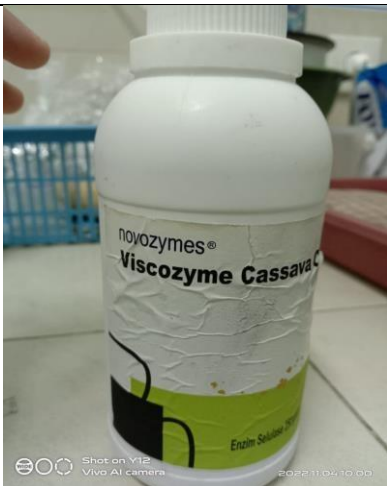
Lampiran 1. 4.Dokumentasi Penelitian



Pengumpulan Alga Hijau
Spirogyra sp,



Hasil Pengeringan Alga Hijau
Spirogyra sp,



Enzim Selulase *Novozyme*



Proses Hidrolisis Enzimatis Alga
Spirogyra sp,



Analisis Kadar Gula Menggunakan
Metode Fenol-Sulfat



Proses Fermentasi Etanol oleh
Saccharomyces cerevisiae



Destilasi Etanol Hasil Fermentasi



Pengukuran Kadar Etanol Menggunakan Piknometer



EMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
PROGRAM STUDI BIOLOGI
Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp (0341) 558933, Fax. (0341) 558933

KARTU KONSULTASI SKRIPSI

Nama : Mochamad Mardianto
NIM : 17620003
Program Studi : S1 Biologi
Semester : Ganjil TA 2022/2023
Pembimbing : Ir. Liliek Harianie, AR. MP.
Judul Skripsi : Pengaruh Penambahan Variasi Jumlah Ragi Roti *Saccharomyces cerevisiae* dan Lama Fermentasi Terhadap Kadar Etanol Dari Alga Hijau *Spirogyra* sp.

No	Tanggal	Uraian Materi Konsultasi	Ttd. Pembimbing
1.	23/03/2021	Konsultasi & Revisi Proposal Skripsi BAB I	
2.	14/07/2021	Konsultasi & Revisi BAB I,II, dan III	
3.	25/07/2021	Konsultasi Rancangan Penelitian	
4.	31/08/2021	ACC Proposal Penelitian	
5.	12/10/2022	Konsultasi BAB II dan IV	
6.	23/11/2022	Konsultasi Semua BAB dalam Naskah	
7.	2/12/2022	ACC Naskah Semua BAB	
8.	8/2/2023	Konsultasi Pasca Sidang	
9.	13/2/2023	ACC Hasil Revisi Pasca Sidang	

Pembimbing Skripsi,

Ir. Liliek Harianie, AR, M.P.
NIP.197410182003122002



17 Februari 2023
Program Studi,

Sandi Savitri, P
NIP. 19620901199803 2001



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
PROGRAM STUDI BIOLOGI
Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp (0341) 558933, Fax. (0341) 558933

KARTU KONSULTASI SKRIPSI

Nama : Mochamad Mardianto
NIM : 17620003
Program Studi : S1 Biologi
Semester : Ganjil TA 2022/ 2023
Pembimbing : Oky Bagas Prasetyo, M.PdI
Judul Skripsi : Pengaruh Penambahan Variasi Jumlah Ragi Roti *Saccharomyces cerevisiae* dan Lama Fermentasi Terhadap Kadar Etanol Dari Alga Hijau *Spirogyra* sp.

No	Tanggal	Uraian Materi Konsultasi	Ttd. Pembimbing
1.	7/7/2021	Konsultasi Integrasi Al-Qur'an Proposal Skripsi BAB I dan II	
2.	2/8/2021	ACC Integrasi Al-Qur'an Proposal Skripsi	
3.	9/11/2022	Konsultasi Integrasi Al-Qur'an dan Sains BAB IV	
4.	10/12/2022	Acc Naskah Semua BAB	
5.	17/1/2023	Konsultasi kesesuaian BAB II dan IV	
6.	8/2/2023	Acc Integrasi Sains dan Islam Semua BAB	

Pembimbing Skripsi,

Oky Bagas Prasetyo, M.PdI
NIP.197410182003122002



7 Februari 2023
Ceria Studi,

Eviandhi Savitri, M.P
NIP.19890113 20180201 1 244



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
PROGRAM STUDI BIOLOGI


Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp (0341) 558933, Fax. (0341) 558933
Website: <http://biologi.uin-malang.ac.id> Email: biologi@uin-malang.ac.id

Form Checklist Plagiasi

Nama : Mochamad Mardianto

NIM : 17620003

Judul : Pengaruh Penambahan Variasi Jumlah Ragi Roti *Saccharomyces cerevisiae*
dan Lama Fermentasi Terhadap Kadar Etanol Dari Alga Hijau *Spirogyra* sp.

No	Tim Checkplagiasi	Skor Plagiasi	TTD
1	Azizatur Rohmah, M.Sc		
2	Berry Fakhry Hanifa, M.Sc		
3	Bayu Agung Prahardika, M.Si	19%	
4	Tyas Nyonita Punjungsari, M.Sc		

Mengetahui,

Ketua Program Studi Biologi



Sandi Savitri, M. P

NIP. 19741018 200312 2 002