



Produksi Bioetanol Dari Tepung Agar *Gracilaria verrucosa* (Hudson) Papenfuss yang Dihidrolisis Dengan Menggunakan Larutan Asam Sulfat

Wahid Agung Saputra^{*)}, AB Susanto, Rini Pramesti

Program Studi Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro
Kampus Tembalang, Semarang 50275 Telp/Fax. 024-7474698
email: wahidagungsaputra@yahoo.co.id

Abstrak

Bahan bakar fosil merupakan bahan bakar tidak terbarukan dan mengalami eksploitasi berlebihan. Hal tersebut berdampak pada menipisnya cadangan minyak bumi sehingga diperlukan energi terbarukan seperti bioetanol. Bioetanol adalah bahan bakar alternatif dari biomassa yang mengandung komponen gula, pati, maupun selulosa. **Agar** merupakan polisakarida yang terdapat pada dinding sel rumput laut *Gracilaria verrucosa*. Polisakarida ini dapat dihidrolisis secara kimiawi maupun enzimatis menjadi monosakarida dan selanjutnya difermentasi menjadi bioetanol. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui potensi serbuk **agar** sebagai bahan baku bioetanol; konsentrasi asam sulfat optimum untuk menghidrolisis serbuk **agar**; dan lama fermentasi optimum terhadap etanol yang dihasilkan. Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari sampai Juni 2012 di Laboratorium Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi-LIPI, Cibinong. Serbuk **agar** diperoleh dari produsen di Malang. Khamir *Saccharomyces cerevisiae* merupakan koleksi LIPI-MC. Kadar gula pereduksi dianalisis dengan metoda Miller (1959) sedangkan kadar etanol dianalisis dengan *Gas Chromatography* (GC). Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental laboratoris untuk proses hidrolisis dan pengukuran berulang untuk proses fermentasi. Proses hidrolisis menggunakan H_2SO_4 dengan konsentrasi 0M, 0,1M, 0,3M, dan 0,5M. Proses fermentasi menggunakan khamir *S. cerevisiae* dengan waktu inkubasi 120 jam. Hasil penelitian menunjukkan serbuk **agar** dapat digunakan sebagai bahan baku bioetanol. Kadar gula reduksi optimum 35,38mg/ml \pm 0,59 didapatkan pada konsentrasi H_2SO_4 0,3 M. Kadar etanol optimum didapatkan pada waktu inkubasi 120 jam yaitu 0,77%.

Kata kunci : Bioetanol; serbuk **agar**; hidrolisis; fermentasi; *Gas Chromatography* (GC).

Abstract

Fossil fuels are non-renewable fuels and overexploited. It has an impact on depletion oil reserves so needed renewable energy such as bio-ethanol. Bioethanol is alternative fuel made from biomass containing component sugars, starches, and cellulose. **Agar** is polysaccharide in cell wall seaweed *Gracilaria verrucosa*. Polysaccharides can be hydrolyzed with chemically or enzymatically into monosaccharides and then be fermented into bioethanol. The purpose of this study was to determine the potential of powder **agar** for bioethanol feedstock; optimum sulfuric acid to hydrolyze powder **agar**, and knowing optimum fermentation time on ethanol production. The study was conducted from February to June 2012 in Microbiology Laboratory, Research Center for Biology-LIPI, Cibinong. Powder **agar** is obtained from manufacturers in Malang. Yeast *Saccharomyces cerevisiae* is a collection of LIPI-MC. Reducing sugar content was analyzed by the method of Miller (1959), while concentration ethanol were analyzed by Gas Chromatography (GC). Method used in this study is an experimental laboratory for the hydrolysis and repeatable measurements for fermentation processes. Hydrolysis process using concentration H_2SO_4 of 0M, 0.1 M, 0.3 M, and 0.5 M. Fermentation using yeast *S. cerevisiae* with the incubation time 120 hours. Results showed powder **agar** can be used as raw material for bioethanol. Optimum reduction sugar 35.38 mg/ml \pm 0.59 obtained in H_2SO_4 0.3 M. Ethanol Optimum 0.77%, obtained at 120 hours incubation.

Keywords: Bioethanol; powder **agar**; hydrolysis; fermentation; *Gas Chromatography* (GC)

^{*)} Penulis penanggung jawab

Pendahuluan

Pemanasan global dan perubahan iklim merupakan isu lingkungan yang serius. Penyebabnya adalah gas rumah kaca yang dilepaskan oleh pembakaran bahan bakar fosil (Kong, 2010). Sejumlah kebijakan Internasional maupun Nasional telah dilakukan untuk mengatasi hal tersebut. Protokol Kyoto pada Konvensi Perubahan Iklim Perserikatan Bangsa Bangsa (PBB), menyatakan pentingnya pemanfaatan energi terbarukan. Terdapat pula kebijakan Nasional PP RI No.5 Tahun 2006 tentang penggunaan energi alternatif. Selain itu, cadangan minyak bumi pasti akan habis dikarenakan jumlahnya terbatas dan sifatnya yang tidak dapat diperbaharui. Berdasarkan data ESDM 2006, minyak bumi mendominasi pemakaian energi Indonesia yaitu 52,5%; gas bumi 19%; batu bara 21,5%; air 3,7%; panas bumi 3% dan bahan bakar nabati 0,2%. Cadangan minyak bumi Indonesia diperkirakan hanya sebesar 9 milyar barel, jika produksi 500 juta barel per tahun maka akan habis dalam waktu 23 tahun (Hambali *et al.*, 2007).

Salah satu penanganan krisis energi adalah dengan mengembangkan energi terbarukan. Menurut Hambali *et al.* (2007), terdapat beberapa macam energi terbarukan yaitu Biodisel, Bioetanol, Biogas, *Pure Plant Oil* (PPO), Biobriket, dan Bio-oil. Bioetanol merupakan etanol (C₂H₅OH) yang diproduksi dari biomassa melalui fermentasi menggunakan yeast. Bioetanol termasuk Bahan Bakar Nabati (BBN) dan memiliki banyak keunggulan dibandingkan bahan bakar fosil, diantaranya dapat diperbaharui, memiliki nilai oktan yang lebih tinggi, dan bersifat ramah lingkungan (Richana, 2011). Kegunaan etanol di bidang industri adalah sebagai bahan bakar, bahan pembuatan kosmetik, obat-obatan, dan campuran minuman (Demibras, 2005).

Negara Indonesia memiliki panjang garis pantai 95.181 km, terpanjang ke

empat di dunia menurut PBB pada tahun 2008. Hal ini membuat Indonesia memiliki keanekaragaman hayati laut yang tinggi. Keanekaragaman hayati laut dapat dimanfaatkan sebagai salah satu bahan baku untuk menangani krisis energi.

Rumput laut adalah makro alga benthik yang hidup di perairan laut dan tidak memiliki akar, batang, maupun daun sejati. Rumput laut termasuk tumbuhan tingkat rendah (*thallophyta*). Berbeda dengan Lamun (*Seagrass*), rumput laut tidak memiliki bagian tubuh yang sempurna akan tetapi seluruh bagian tubuhnya hanya berupa *thallus* (Atmadja *et al.*, 1996). *G. verrucosa* merupakan jenis rumput laut merah penghasil **agar**. **Agar** dapat dihidrolisis menjadi gula sederhana. Gula sederhana adalah bahan baku utama dalam proses fermentasi untuk diubah menjadi etanol (Putri dan Sukandar, 2008).

Pada penelitian ini **agar** akan dihidrolisis dengan menggunakan asam sulfat sehingga menjadi molekul yang lebih sederhana. Selanjutnya dilanjutkan proses fermentasi etanol dengan yeast. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui potensi serbuk **agar** sebagai bahan baku bioetanol; konsentrasi asam sulfat optimum untuk menghidrolisis serbuk **agar**; dan lama fermentasi optimum terhadap etanol yang dihasilkan

Materi dan Metode

Penelitian ini terbagi dalam beberapa tahap yaitu hidrolisis dengan asam sulfat, pengukuran kadar glukosa dengan spektrofotometer, fermentasi menggunakan khamir, pengukuran kadar etanol dengan *Gas Chromatography*.

Materi yang digunakan adalah **agar** yang diperoleh dari produsen di Malang. Biakan mikroba yang digunakan adalah khamir *Saccharomyces cereviceae*.



Metode yang digunakan adalah metode eksperimental laboratoris dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial untuk proses hidrolisis. Proses ini dilakukan dengan perbedaan konsentrasi asam sulfat yaitu 0 M, 0,1 M, 0,3 M, dan 0,5 M. Proses fermentasi dengan pengukuran berulang yaitu sampling selama lima hari setiap 24 jam dan tanpa ulangan.

a. Hidrolisis Kimia

Sepuluh gram serbuk **agar** dihidrolisis dengan 100 ml H₂SO₄, 0M, 0,1M, 0,3M, dan 0,5 M didalam autoclave pada suhu 121^oC selama 15 menit. Hasil hidrolisis diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator shaker dengan kecepatan 121 rpm. Hasil ini disentrifuge dengan kecepatan 9000 rpm pada suhu 30^oC selama 10 menit. Larutan hasil hidrolisis dianalisis kadar glukosanya dengan metode Miller (1959).

b. Pengukuran Glukosa

Larutan hasil hidrolisis selanjutnya diukur kadar glukosanya. Sebanyak 125 µl sampel dan 125 µl aquades dipipetkan kedalam tabung reaksi. Kemudian 500 µl DNS ditambahkan kedalam tabung tersebut. Penangas air disiapkan untuk memanaskan larutan dan dididihkan selama 5 menit, larutan dipindahkan kedalam wadah berisi air untuk didinginkan. Yang kemudian ditambahkan 5 ml aquades kedalam masing-masing erlenmeyer. Spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm digunakan untuk mengukur kadar glukosa (Miller, 1959).

c. Fermentasi dengan Menggunakan Khamir

Fermentasi menggunakan khamir *S. cerevisiae*. Khamir ini diinkubasi selama 48 jam pada media Yeast Pepton Dextrose (YPD) dengan komposisi: 1 g yeast extract, 2 g peptone, dan 2 g dextrose pada 100 ml aquades.

Delapan puluh ml larutan hasil hidrolisis yang telah dinetralkan (pH=7) dimasukkan dalam botol fermentasi. Autoclave digunakan untuk sterilisasi larutan pada suhu 121^oC selama 15 menit. Setelah selesai, larutan dipindahkan dalam ruangan steril untuk diinokulasi yeast. Dua puluh mililiter inokulan yeast *S. cerevisiae* dimasukkan dalam botol yang berisi hasil hidrolisis. Inkubasi dilakukan secara anaerob diatas magnetik strirer. Fermentasi dilakukan selama 120 jam dan dilakukan sampling setiap 24 jam. Hasil sampling dianalisa kadar gula reduksi menggunakan metode Miller (1959) dan kadar etanol menggunakan *Gas Chromatography*.

d. Pengukuran Kadar Etanol

Pengukuran kadar etanol dengan menggunakan *Gas Chromatography* (GC-14B) Shimadzu FID system. Larutan standart etanol digunakan 0,1-1%. Pengaturan saat GC dioperasikan sebagai berikut tekanan udara 100 kpa, gas pembakar H 100 kpa dan gas pembawa N 300 kpa. Untuk memulai pengukuran, setiap 1 µl standart atau sampel diinjeksikan pada injektor 170^oC, yang dilengkapi kolom *Porapak Q* (80% ; 170^oC). Detektor (*FID/ hydrogen flame ionization detector*) dipasang pada suhu 170 °C. Dan hasilnya dicatat pada alat Chromatopac C-R6A (Shimadzu).

Hasil dan Pembahasan

Uji pengaruh perbedaan konsentrasi asam sulfat terhadap kadar glukosa dilakukan untuk mengetahui pengaruh dan konsentasi asam sulfat yang optimum terhadap kadar glukosa yang dicapai. Ditambahkan oleh Jang *et al.* (2012), hidrolisis secara kimia menggunakan asam sulfat merupakan langkah yang tepat untuk mengubah biomasa menjadi gula sederhana yang kemudian akan digunakan dalam konversi biologi menjadi etanol.

Agar merupakan suatu polisakarida yang tersusun atas monosakarida galaktosa yang saling berikatan. **Agar** tidak dapat masuk ke dalam sel khamir karena berat molekulnya yang tinggi sehingga **agar** harus dihidrolisis terlebih dahulu menjadi monosakarida. Asam sulfat digunakan untuk memotong ikatan polisakarida menjadi monosakarida (Meinita *et al.*, 2012b).

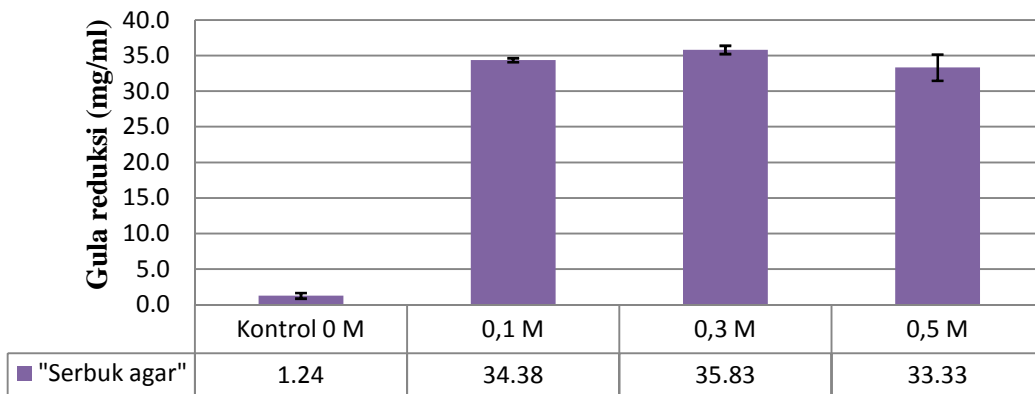
Kadar gula reduksi meningkat dengan bertambahnya konsentrasi H₂SO₄ akan tetapi menurun pada konsentrasi 0,5 M. Nilai gula reduksi yang didapatkan adalah H₂SO₄ 0,3 M (35,83mg/ml ±0,59); 0,5 M (33,33mg/ml ±1,84); 0,1 M (34,38mg/ml ±0,28); dan 0 M (1,24mg/ml ±0,39). Terlihat bahwa penambahan asam meningkatkan nilai gula reduksi yang didapatkan. Hal ini diduga asam dengan konsentrasi rendah akan dapat memutuskan ikatan agarosa dan glikosida (pada selulosa). Penurunan ini diduga akibat penambahan konsentrasi asam. Hal ini ditambahkan oleh Meinita *et al.* (2012b),

kadar glukosa menurun dengan bertambahnya konsentrasi asam. Hal ini mengakibatkan gula dan senyawa lainya lebih banyak terdegradasi menjadi asam levulinic dan hydroxymethylfurfural. Hasil hidrolisis dapat dilihat pada gambar 1. Selanjutnya uji one way ANOVA digunakan untuk melihat pengaruh perbedaan konsentrasi terhadap gula reduksi yang dihasilkan (Tabel 1).

Tabel 1. Uji One Way ANOVA Gula Reduksi Hasil Hidrolisis

Larutan	Gula reduksi (mg/ml)
H ₂ SO ₄ 0 M	1,24±0,39 ^a
H ₂ SO ₄ 0,1 M	34,38±0,28 ^b
H ₂ SO ₄ 0,3 M	35,83±0,58 ^b
H ₂ SO ₄ 0,5 M	33,33±1,84 ^b

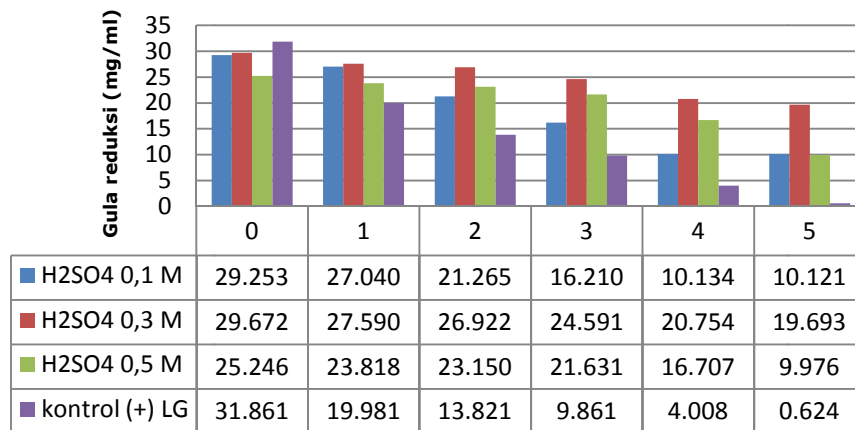
Hasil uji one way ANOVA menunjukkan bahwa gula reduksi hasil hidrolisis dengan menggunakan asam sulfat konsentrasi 0,1 M, 0,3 M, dan 0,5 M berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan perlakuan asam sulfat 0 M.



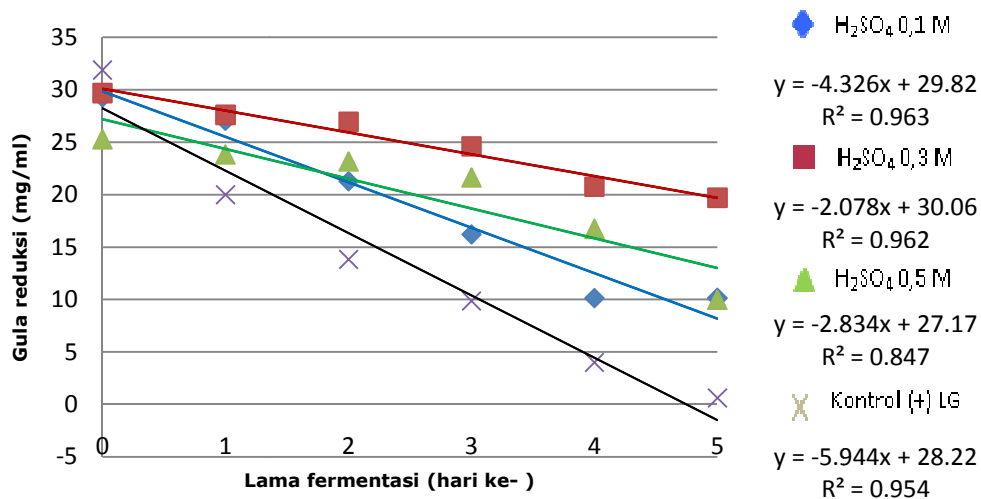
Gambar 1. Hasil Hidrolisis Agar Menggunakan Asam sulfat

Proses Fermentasi merupakan reaksi biokatalisator yang dapat mengubah gula sederhana menjadi etanol. Reaksi ini dilakukan dengan menambahkan yeast

atau bakteri yang dapat menggunakan gula sederhana sebagai sumber energi sehingga dihasilkan etanol dan karbondioksida (Cheng *et al.*, 2007).



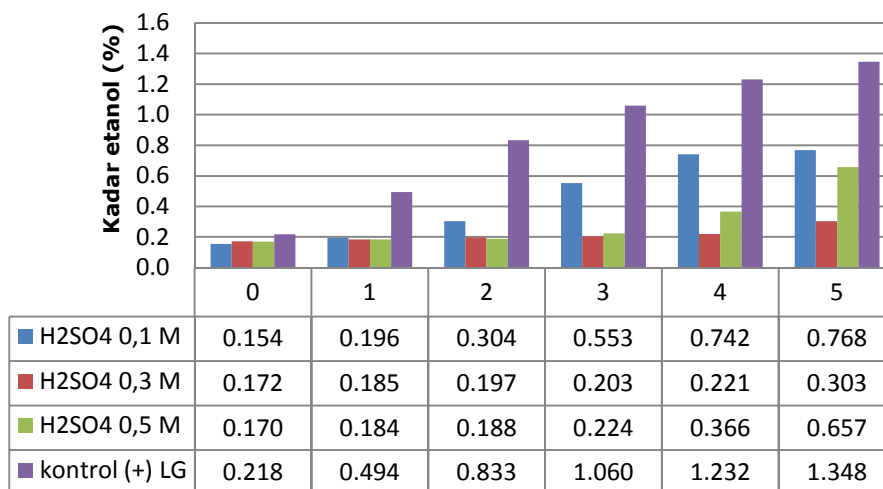
Gambar 2. Histogram Hubungan Antara Gula Reduksi (mg/ml) dengan Lama Fermentasi (hari) pada Serbuk **Agar**



Gambar 3. Grafik Hubungan Antara Gula Reduksi (mg/ml) dengan Lama Fermentasi (hari) pada Serbuk **Agar**

Yeast *S. Cerevisiae* digunakan pada penelitian ini dikarenakan dapat menggunakan galaktosa dalam proses fermentasi alkohol melalui *Leloir pathway* (Van Maris *et al.*, 2006). Yeast ini memiliki beberapa keunggulan antara lain efisien

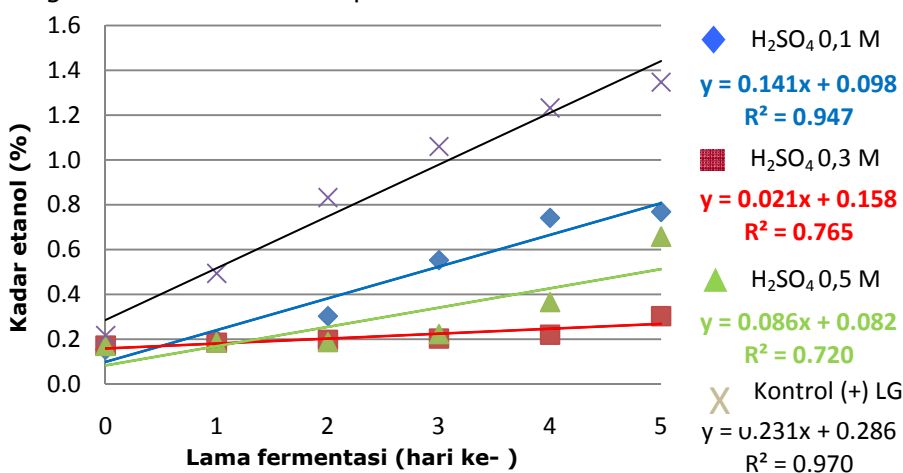
untuk memproduksi etanol dari heksosa tanpa oksigen, pH rendah dan memiliki toleransi tinggi terhadap etanol maupun inhibitor (Olsson and Hahn-Hagerdal, 1996 *dalam* Meinita *et al.*, 2012a).



Gambar 4. Histogram Hubungan Antara Kadar Etanol (%) dengan Lama Fermentasi (hari) pada Serbuk Agar

Selama proses fermentasi dilakukan pengambilan data gula reduksi dan kadar etanol. Hasil gula reduksi selama proses fermentasi ditampilkan dalam bentuk histogram dan grafik hubungan kadar gula reduksi terhadap lama fermentasi. Gambar 2 dan 3 menunjukkan gula reduksi turun dengan bertambahnya waktu fermentasi. Gula reduksi yang dihasilkan saat fermentasi cenderung mengalami penurunan. Diduga *S. cerevisiae* dapat

menggunakan gula sederhana yang ada pada hasil hidrolisis. Sesuai dengan pernyataan Putri dan Sukandar (2008), kadar gula cenderung menurun disebabkan gula yang terdapat dalam media digunakan sebagai sumber karbon bagi sel yeast untuk mensintesis energi melalui proses fermentasi alkohol.



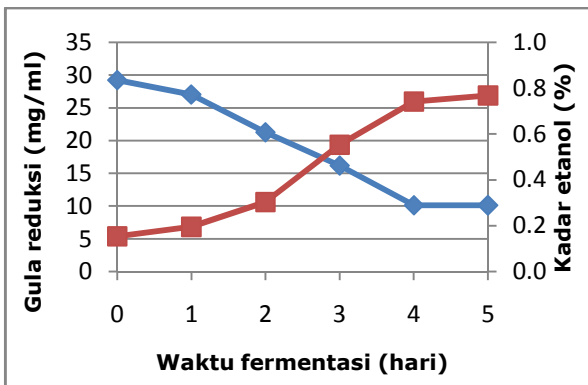
Gambar 5. Grafik Hubungan Antara Kadar Etanol (%) dengan Lama Fermentasi (hari) pada Serbuk Agar

Gambar 4 dan 5 memperlihatkan bahwa kadar etanol meningkat dengan bertambahnya waktu fermentasi. Hal ini

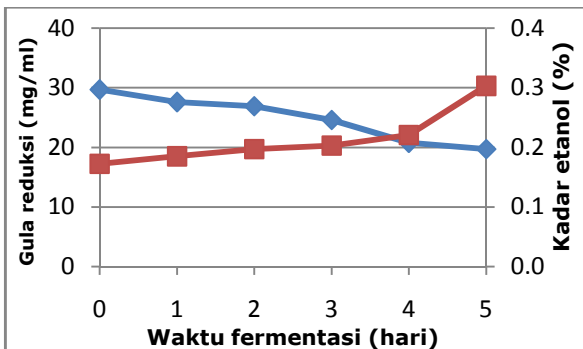
diduga pertumbuhan *S. cerevisiae* pada fase pertumbuhan logaritmik, dimana

nutrien dikonsumsi secara baik dan dihasilkan zat metabolik secara optimum.

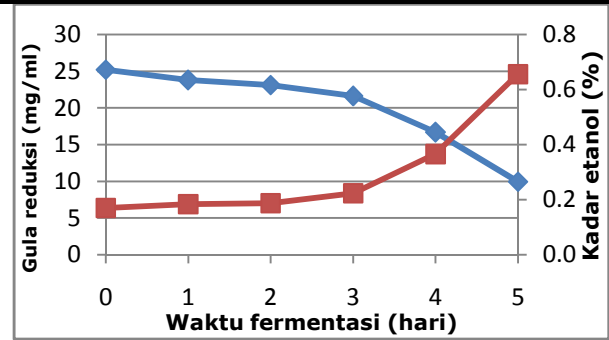
Kadar etanol maksimum didapatkan pada waktu inkubasi lima hari (120 jam) yaitu 0,77% pada konsentrasi H₂SO₄ 0,1 M. Hal ini diduga pada waktu fermentasi 120 jam, sel yeast mulai memasuki fase eksponensial dimana etanol sebagai metabolit primer dihasilkan (Putri dan Sukandar, 2008).



Gambar 6. Grafik hubungan gula reduksi (mg/ml) dan kadar etanol (%) pada H₂SO₄ 0,1 M



Gambar 7. Grafik hubungan gula reduksi (mg/ml) dan kadar etanol (%) pada H₂SO₄ 0,3 M



Gambar 8. Grafik hubungan gula reduksi (mg/ml) dan kadar etanol (%) pada H₂SO₄ 0,5 M

Lebih jelasnya dapat dilihat pada Gambar 6, 7, dan 8. Gambar tersebut memperlihatkan grafik hubungan antara Gula reduksi dan kadar etanol dengan bertambahnya waktu fermentasi.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa serbuk **agar** dapat digunakan sebagai bahan baku bioetanol. Gula reduksi tertinggi dihasilkan pada konsentrasi H₂SO₄ 0,3 M yaitu 35,88mg/ml ±0,59. Kadar etanol optimum dicapai pada waktu inkubasi 120 jam yaitu 0,77% pada konsentrasi H₂SO₄ 0,1 M.

Ucapan Terimakasih

Penulis menyampaikan terimakasih kepada Dr. rer. nat. AB Susanto, M.Sc. dan Dra. Rini Pramesti, M.Si. sebagai dosen pembimbing yang telah memberikan pengarahan dan petunjuk dalam menyelesaikan jurnal ilmiah ini. Terimakasih atas pendanaan Beasiswa unggulan yang telah membiayai penelitian ini dari awal sampai akhir.

Daftar Pustaka

Atmadja, W. S., A. Kadi, Sulistijo, dan R. Satari. 1996. Pengenalan Jenis-Jenis Rumput Laut Indonesia. Puslitbang Oseanologi -LIPI,



- Jakarta, 191 hlm. Cheng C. K., H.H. Hani dan K.S.K. Ismail. 2007. Production of Bioethanol From palm Empty Fruit Bunch. Faculty of Chemical and Natural Resources Engineering, University Malaysia Pahang, Kuantan Pahang, pp. 69-72.
- Demibras, A. 2005. Bioethanol From Cellulosic Materials: A Renewable Motor Fuel From Biomass. *Energy Sources*. 27:327-337.
- Hambali, E. 2007. Partisipasi Perguruan Tinggi dalam Pengembangan Biodiesel dan Bioetanol di Indonesia. Workshop Nasional Bisnis Biodiesel dan Bioetanol di Indonesia, Jakarta, pp. 155-123.
- Jang, J.-S., Y. K. Cho, G.-T. Jeong, and S.-K. Kim. 2012. Optimization of Saccharification and Ethanol Production by Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) From Seaweed, *Saccharina japonica*. *Bioprocess Biosyst Eng*. 35:11-18.
- Kong, G. T. 2010. Peran Biomassa Bagi Energi Terbaharukan. PT Elex Media Komputindo, Gramedia, Jakarta, 191 hlm.
- Meinita, M. D. N., Y.-K. Hong, and G.-T. Jeong. 2012a. Detoxification of Acid Catalyzed Hydrolysate of *Kappaphycus alvarezii* (cottonii). *Bioprocess Biosyst Eng*. 35:93-98.
- 2012b. Comparison of Sulfuric and Hydrochloric Acids as Catalysts in Hydrolysis of *Kappaphycus alvarezii* (cottonii). *Bioprocess Biosyst Eng*. 35:123-128.
- Miller, G. L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*. 31: 426-428.
- Putri, L. S. E. dan D. Sukandar. 2008. Konversi Pati Ganyong (*Canna edulis* Ker.) Menjadi Bioetanol Melalui Hidrolisis Asam dan Fermentasi. Jurusan Biologi, FMIPA, UNS Surakarta, *Biodiversitas*. 9 (2):112-116.
- Richana, N. 2011. Bioetanol: Bahan Baku, Teknologi, Produksi dan Pengendalian Mutu. Penerbit Nuansa, Bandung, 72 hlm.
- Van Maris, A. J. A., D. A. Abbott, E. Bellissimi, J. V. D. Brink, M. Kuyper, M. A. H. Luttik, H. W. Wisselink, W. A. Scheffers, J. P. Van Dijken, and J. T. Pronk. 2006. Alcoholic Fermentation of Carbon Sources in Biomass Hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: Current Status. *Antonie van Leeuwenhoek*. 90: 391-418.