



**PRODUKSI SUBSTRAT FERMENTASI BIOETANOL
DARI ALGA MERAH *Gracilaria verrucosa*
MELALUI HIDROLISIS ENZIMATIK DAN KIMIAWI**

Skripsi
disusun sebagai salah satu syarat
untuk memperoleh gelar Sarjana Sains
Program Studi Kimia

oleh
Firstyarikha Habibah
4311411063

JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG

2015

PERNYATAAN

Saya menyatakan skripsi ini bebas plagiat, dan apabila dikemudian hari terbukti terdapat plagiat dalam skripsi ini, maka saya bersedia menerima sanksi sesuai ketentuan perundang-undangan.

Semarang, 26 Februari 2015



Firstyarikha Habibah

4311411063

PENGESAHAN

Skripsi yang berjudul

Produksi Substrat Fermentasi Bioetanol dari Alga Merah *Gracilaria verrucosa* melalui Hidrolisis Enzimatik dan Kimiawi

disusun oleh

Firstyarikha Habibah

4311411063

telah dipertahankan dihadapan sidang Panitia Ujian Skripsi FMIPA UNNES pada tanggal 26 Februari 2015.



Dr. Wiyanto, M.Si
NIP. 196310121988031001

Sekretaris

Dra. Woro Sumarni, M.Si
NIP. 196507231993032001

Ketua Penguji

Prof. Dr. Supartono, M.S
NIP. 195412281983031003

Anggota Penguji/
Pembimbing I

Samuel Budi Wardhana Kusuma, S.Si., M.Sc
NIP. 198204182006041002

Anggota Penguji/
Pembimbing II

Dr. Nanik Wijayati, M.Si
NIP. 196910231996032002

MOTTO DAN PERSEMBAHAN

MOTTO:

1. Man Jadda Wajada (Siapa yang bersungguh-sungguh pasti berhasil)
(Ahmad Fuadi)
2. Bermimpilah, karena Tuhan akan memeluk mimpi-mimpi itu
(Andrea Hirata)
3. Hiduplah untuk memberi sebanyak-banyaknya, bukan untuk menerima
sebanyak-banyaknya (Andrea Hirata)
4. Selesaikan dengan baik apa yang sudah berani kita mulai

PERSEMBAHAN:

Karya ini kupersembahkan untuk:

1. Kedua orang tua (Papah Juwari, S.Pd., M.A.
dan Mamah Siti Solechah)
2. Adik-adik (Fahmi, Bela, Amar)
3. Almamater, Universitas Negeri Semarang
4. Negara Indonesia

PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan pada Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul **“Produksi Substrat Fermentasi Bioetanol dari Alga Merah *Gracilaria verrucosa* melalui Hidrolisis Enzimatik dan Kimiawi”** tepat pada waktunya.

Dalam penyusunan skripsi ini penulis menyadari bahwa penyusunan skripsi tidak akan selesai dengan baik tanpa adanya dukungan, bantuan dan kerjasama dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Rektor Universitas Negeri Semarang yang telah memberikan fasilitas-fasilitas kepada penulis
2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam yang telah memberikan izin kepada penulis dalam penyusunan skripsi
3. Ketua Jurusan Kimia yang telah memberikan izin kepada penulis dalam penyusunan skripsi
4. Ketua Program Studi kimia yang telah membantu dan membimbing dalam penyusunan skripsi
5. Samuel Budi Wardhana Kusuma, S.Si., M.Sc. Pembimbing I yang senantiasa memberikan bimbingan, ilmu dan pengarahan kepada penulis
6. Dr. Nanik Wijayati, M.Si. Pembimbing II yang dengan bijaksana memberikan bimbingan, ilmu dan pengarahan kepada penulis
7. Prof. Dr. Supartono, M.S. Penguji yang telah memberikan ilmu dan pengarahan kepada penulis

8. Kepala Laboratorium Kimia Universitas Negeri Semarang yang telah memberikan izin kepada penulis dalam melakukan penelitian di Laboratorium Kimia
9. Teknisi dan laboran Laboratorium Kimia yang telah memberikan izin dan membantu penulis dalam pelaksanaan penelitian di Laboratorium Kimia
10. Solikhah, Ika, Ela, Erlin, Tyak dan Puji, sahabat seperjuangan yang selalu memberikan semangat dan dukungan
11. Dewi, Anis, Nindya, Anggun dan Dian, sahabat yang selalu menguatkan. Terima kasih sudah menjadi keluarga di perantauan ini
12. Keluarga Besar BEM FMIPA 2012, 2013 dan 2014 yang telah menjadi ruh penulis dalam menyelesaikan pendidikan di UNNES
13. Kimia 2011 yang saling mendukung dalam kebaikan

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih ada kekurangan, baik dari segi teknik penulisan, penyusunan maupun tata bahasa yang digunakan. Oleh karena itu, penulis memohon maaf dan mengharapkan saran dan kritik yang bersifat membangun demi sempurnanya skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat memberi manfaat dan kontribusi dalam perkembangan ilmu pengetahuan.

Semarang, Februari 2015

Penulis

ABSTRAK

Habibah, Firstyarikha. 2015. *Produksi Substrat Fermentasi Bioetanol dari Alga Merah Gracilaria verrucosa melalui Hidrolisis Enzimatik dan Kimiawi*. Skripsi, Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang. Pembimbing Utama Samuel Budi Wardhana Kusuma, S.Si., M.Sc. dan Pembimbing Pendamping Dr. Nanik Wijayati, M.Si.

Kata Kunci: Substrat fermentasi, Bioetanol, Hidrolisis

Beberapa tahun terakhir ini Indonesia mengalami kelangkaan bahan bakar minyak (BBM) yang disebabkan oleh menipisnya persediaan minyak bumi dan harga minyak dunia yang tidak stabil. Hal ini sangat berlawanan dengan semakin tingginya kebutuhan masyarakat akan BBM. Untuk memenuhi kebutuhan dan konsumsi BBM harus dicari sumber energi alternatif yang terbarukan. Salah satunya dengan mengkonversi biomassa menjadi bioetanol. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pH dan suhu yang digunakan pada proses hidrolisis enzimatik dan pengaruh konsentrasi HCl dan waktu yang digunakan pada proses hidrolisis kimiawi untuk menghasilkan substrat fermentasi bioetanol dengan kandungan gula reduksi tinggi serta untuk mengetahui bahwa substrat yang dihasilkan dari proses hidrolisis ketika difermentasi menghasilkan bioetanol. Alga merah *Gracilaria verrucosa* dihidrolisis secara enzim dengan pH bufer fosfat (6, 7, 8), dan suhu inkubasi (30, 50, 70°C), serta dihidrolisis secara kimia dengan HCl (10, 20, 30 %), dan waktu hidrolisis (1, 2, 3 jam). Penentuan kadar glukosa hasil hidrolisis dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Setelah mendapatkan substrat fermentasi bioetanol yang mengandung gula reduksi, substrat difermentasi dengan ragi roti *Saccharomyces cerevisiae* selama 7 hari, kemudian diambil filtratnya untuk selanjutnya didistilasi. Distilat yang keluar dianalisis secara fisika dan kimia serta dianalisis menggunakan instrumen GC, GC-MS dan FTIR untuk mengetahui bahwa distilat yang dihasilkan mengandung senyawa etanol. Hasil analisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis menunjukkan bahwa pada penelitian ini hidrolisis enzimatik menghasilkan gula reduksi tertinggi sebesar 3566,67 ppm yang dilakukan pada pH 6 dan suhu inkubasi 30°C sedangkan hidrolisis kimiawi menghasilkan gula reduksi tertinggi sebesar 1493,33 ppm yang dilakukan dengan HCl 30% selama 3 jam. Hasil analisis distilat hasil fermentasi secara fisika dan kimia sama dengan hasil analisis etanol *Pro analysis*, dan ketika dianalisis menggunakan GC, GC-MS dan FTIR diketahui distilat mengandung senyawa etanol.

ABSTRACT

Habibah, Firstyariakha. 2015. *Production of Fermentation Substrate Bioethanol from Red Alga Gracilaria verrucosa using Enzymatic and Chemical Hydrolysis*. Thesis, Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Semarang State University. Main Supervisor Samuel Budi Wardhana Kusuma, S.Si., M.Sc. and Supervising Companion Dr. Nanik Wijayati, M.Si.

Keywords: Fermentation substrate, Bioethanol, Hidrolysis

In recent years, Indonesia has a shortage of oil (BBM) that is caused by a shortage of oil and oil prices are unstable. This is in contrast with the increasing fuel demand. To fulfill the needs and consumption of fuel, it should find alternative renewable energy sources. One by converting biomass into bioethanol. This study aimed to determine the effect of pH and temperature used in the enzymatic hydrolysis process and the effect of HCl concentration and the time spent on the chemical hydrolysis process to produce fermentation substrate bioethanol with high grade of reducing sugar and to know that the substrate resulting from the hydrolysis process will contain bioethanol when it is fermented. Enzymatic hydrolyzed of red alga *Gracilaria verrucosa* at the pH of phosphate buffer (6, 7, 8), and the incubation temperature (30, 50, 70 ° C) and chemically hydrolyzed with HCl (10, 20, 30%) , and the hydrolysis time (1, 2, 3 hours). Determining glucose levels of hydrolysis results were analyzed using UV-Vis spectrophotometer. After obtaining the fermentation substrate bioethanol containing a reducing sugar, substrate fermented with *Saccharomyces cerevisiae* yeast bread for 7 days and then taken the filtrate to distilled. Distillates analyzed on the physical and chemical analysis and analyzed using GC, GC-MS and FTIR instruments in order to determine that the distillate containing ethanol compounds. Analysis by spectrophotometer UV-Vis showed that enzymatic hydrolysis in this experiment produce high reducing sugar 3566,67 ppm at pH 6 and incubation temperature of 30° C while chemical hydrolysis produce high reducing sugar 1493,33 ppm at HCl concentration 30% for 3 hours. The results of the analysis physics and chemistry of the fermentation distillate as same as the analysis results of ethanol *Pro analysis*, and when analyzed by GC, GC-MS and FTIR is known distillate containing ethanol compounds.

DAFTAR ISI

	Halaman
PRAKATA.....	vi
ABSTRAK.....	viii
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
BAB I : PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
BAB II : TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Alga Merah <i>Gracilaria verrucosa</i>	5
2.2 Lignoselulosa.....	7
2.3 Hidrolisis.....	10
2.4 Metode Miller.....	13
2.5 Fermentasi.....	13
2.6 Bioetanol.....	14
BAB III : METODE PENELITIAN	
3.1 Populasi dan Sampel.....	17
3.2 Variabel Penelitian.....	17
3.3 Prosedur Penelitian.....	18

BAB IV : HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

4.1 Tahap Perlakuan Awal	26
4.2 Proses Hidrolisis	29
4.3 Penentuan Kadar Glukosa.....	35
4.4 Proses Fermentasi	39
4.5 Proses Distilasi	41
4.6 Analisis Data	41

BAB V : PENUTUP

5.1 Simpulan.....	47
5.2 Saran	47

DAFTAR PUSTAKA	49
----------------------	----

LAMPIRAN.....	52
---------------	----

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Komposisi kimia substrat selulosa alga merah <i>Gracilaria verrucosa</i>	27
4.2 Komposisi kimia substrat selulosa alga merah <i>Gracilaria verrucosa</i> hasil delignifikasi	29
4.3 Hasil absorbansi larutan standar glukosa.....	31
4.4 Hasil hidrolisis kimiawi dengan variasi konsentrasi dan waktu.....	35
4.5 Kadar glukosa hasil hidrolisis enzimatik dengan variasi suhu dan pH	36
4.6 Kadar glukosa hasil hidrolisis kimiawi dengan variasi konsentrasi dan waktu .	38
4.7 Perbandingan sifat fisik dan kimia antara bioetanol dengan etanol <i>Pro analysis</i>	41

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Alga merah <i>Gracilaria verrucosa</i>	6
2.2 Struktur selulosa	8
2.3 Struktur hemiselulosa	9
2.4 Struktur lignin.....	10
2.5 Mekanisme reduksi glukosa oleh asam 3,5-dinitrosalisilat	13
4.1 Mekanisme reaksi hidrolisis enzimatik	30
4.2 Kurva kalibrasi larutan standar glukosa	32
4.3 Kurva kalibrasi larutan standar protein	33
4.4 Mekanisme reaksi hidrolisis kimiawi	34
4.5 Kadar glukosa (ppm) hasil hidrolisis enzimatik dengan perbedaan suhu inkubasi.....	36
4.6 Kadar glukosa (ppm) hasil hidrolisis kimiawi dengan perbedaan konsentrasi HCl.....	38
4.7 Skema jalur fermentasi glukosa oleh ragi.....	40
4.8 Kromatogram GC hasil distilasi fermentasi glukosa dari hidrolisis enzimatik dan kimiawi	43
4.9 Spektrum MS komponen pertama dari distilat fermentasi glukosa hasil hidrolisis kimiawi	44
4.10 Fragmentasi etanol.....	44
4.11 Spektrum MS komponen kedua dari distilat fermentasi glukosa hasil hidrolisis kimiawi	44

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Skema Kerja Penelitian	52
2. Dokumentasi Penelitian	59
3. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum.....	60
4. Kurva Standar Glukosa.....	61
5. Kurva Standar Protein	62
6. Penentuan Aktivitas Enzim dan Aktivitas Spesifik	63
7. Perhitungan Kadar Glukosa pada Sampel	64
8. Pembuatan Larutan	67
9. Analisis Lignin dan Selulosa	69
10. Hasil Analisis Distilat dengan GC.....	70
11. Hasil Analisis Distilat dengan MS.....	73
12. Hasil Analisis Distilat dengan IR	75

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

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

Bioetanol merupakan salah satu jenis *biofuel* (bahan bakar cair dari pengolahan tumbuhan) disamping biodiesel. Bioetanol adalah etanol yang dihasilkan dari fermentasi glukosa (gula) yang dilanjutkan dengan proses distilasi. Proses distilasi dapat menghasilkan etanol dengan kadar 95% volume, untuk digunakan sebagai bahan bakar (*biofuel*) perlu lebih dimurnikan lagi hingga mencapai 99% yang lazim disebut *fuel grade ethanol* (FGE).

Bahan baku untuk proses produksi bioetanol diklasifikasikan menjadi tiga kelompok, yaitu gula, pati dan selulosa. Sumber gula yang berasal dari gula tebu, gula bit, molase dan buah-buahan dapat langsung dikonversi menjadi etanol. Sumber dari bahan berpati seperti jagung, singkong, kentang dan akar tanaman harus dihidrolisis terlebih dahulu menjadi gula. Sumber selulosa yang berasal dari kayu, limbah pertanian, limbah pabrik pulp dan kertas, semuanya harus dikonversi menjadi gula (Lin dan Tanaka, 2006).

Salah satu sumber selulosa yang bisa dikonversi menjadi gula dan kemudian difermentasi menjadi bioetanol adalah rumput laut jenis alga merah *Gracilaria*

verrucosa. Alga merah ini mengandung selulosa sebesar 13,04%, lignin sebesar 3,84% dan ketika difermentasi dengan *Zymomonas mobilis* mampu menghasilkan bioetanol perkilogram alga merah sebesar 23,01% dengan kadar 29,60% (Ahmad, 2014).

Alga merah *Gracilaria verrucosa* yang merupakan biomassa berlignoselulosa ini dapat dimanfaatkan menjadi bioetanol karena akan menghasilkan gula ketika dihidrolisis dan jika dilanjutkan dengan fermentasi akan menghasilkan bioetanol. Hidrolisis pati dan selulosa menjadi gula dapat dilakukan dengan hidrolisis secara kimiawi, fisik dan enzimatik. Hidrolisis secara enzimatik memiliki perbedaan mendasar dibandingkan hidrolisis secara kimiawi dan fisik dalam hal spesifitas pemutusan rantai polimer pati dan selulosa. Hidrolisis secara kimiawi dan fisik akan memutus rantai polimer secara acak, sedangkan hidrolisis enzimatik akan memutus rantai polimer secara spesifik pada percabangan tertentu (Setyawati & Rahman, 2011). Pada penelitian ini menggunakan hidrolisis enzimatik dengan enzim selulase yang berasal dari isolasi jamur tiram (*Pleurotus ostreatus*) dan hidrolisis kimiawi menggunakan HCl. Berdasarkan penelitian Siswati *et al*, (2009), katalis HCl menghasilkan glukosa lebih tinggi dibandingkan H₂SO₄. Hal ini terjadi karena H₂SO₄ bersifat membakar selulosa sedangkan HCl tidak, sehingga glukosa yang dihasilkan lebih sedikit. Dalam hal ini, asam berfungsi sebagai katalisator yaitu untuk mempercepat terjadinya proses hidrolisis.

Setelah hidrolisis berjalan sempurna maka dilanjutkan dengan fermentasi. Proses fermentasi dilakukan dengan penambahan ragi roti (*Saccharomyces cerevisiae*), salah satu spesies ragi yang dikenal mempunyai daya konversi gula

menjadi etanol, yang menghasilkan enzim zimase dan invertase. Enzim zimase berfungsi sebagai pemecah sukrosa menjadi monosakarida (glukosa dan fruktosa). Enzim invertase selanjutnya mengubah glukosa menjadi etanol (Judoamidjojo *et al.*, 1992).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan hal-hal yang diungkapkan di atas, dirumuskan permasalahan sebagai berikut:

1. Berapa pH dan suhu yang digunakan agar enzim selulase dari jamur tiram dapat menghidrolisis alga merah *Gracilaria verrucosa* sehingga menghasilkan substrat fermentasi bioetanol dengan kandungan gula reduksi tinggi?
2. Berapa konsentrasi HCl dan waktu yang dapat menghidrolisis alga merah *Gracilaria verrucosa* sehingga menghasilkan substrat fermentasi bioetanol dengan kandungan gula reduksi tinggi?
3. Apakah substrat yang dihasilkan dari proses hidrolisis ketika difermentasi menghasilkan bioetanol?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan yang ingin dicapai pada penelitian ini antara lain :

1. Mengetahui pH dan suhu yang digunakan agar enzim selulase dari jamur tiram dapat menghidrolisis alga merah *Gracilaria verrucosa* sehingga menghasilkan substrat fermentasi bioetanol dengan kandungan gula reduksi tinggi

2. Mengetahui konsentrasi HCl dan waktu yang dapat menghidrolisis alga merah *Gracilaria verrucosa* sehingga menghasilkan substrat fermentasi bioetanol dengan kandungan gula reduksi tinggi
3. Mengetahui bahwa substrat yang dihasilkan dari proses hidrolisis ketika difermentasi menghasilkan bioetanol

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang ingin dicapai pada penelitian ini adalah :

1. Bagi Pengembangan IPTEKS
 - a. Memberi informasi mengenai pH dan suhu yang digunakan pada proses hidrolisis enzimatik, serta konsentrasi HCl dan waktu yang digunakan pada proses hidrolisis kimiawi untuk menghasilkan gula reduksi tinggi
 - b. Memberi informasi bahwa substrat yang dihasilkan dari proses hidrolisis ketika difermentasi menghasilkan bioetanol
2. Bagi Masyarakat
 - a. Memberi alternatif energi yang ramah lingkungan sebagai pengganti bahan bakar minyak (BBM)
 - b. Mendorong peningkatan budidaya alga merah *Gracilaria verrucosa* pada masyarakat petani tambak
3. Bagi Peneliti Lain
 - a. Mendorong peneliti lain untuk meneliti aktivitas spesifik enzim selulase dari jamur tiram dan pemurniannya
 - b. Mendorong peneliti lain untuk meneliti bioetanol dari alga merah *Gracilaria verrucosa*

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Alga Merah *Gracilaria verrucosa*

Alga merah bercirikan warna merah yang bersifat membedakan (meskipun spesies tertentu dapat menunjukkan warna agak hijau atau coklat). Seperti halnya alga coklat, *Rhodophyta* hampir sebagian besar hidup di laut, dari 2.500 spesies kurang dari sepertiganya hidup dalam air tawar dan tersebar luas di lautan khusus daerah lebih panas. Alga merah tumbuh pada batu-batuan di daerah pasang dan juga dalam air sejauh cahaya dapat menembusnya (90 meter atau lebih di bawah permukaan). Beberapa bentuk berfilamen, tetapi kebanyakan strukturnya kompleks dan bercabang (seperti bulu).

Alga merah *Gracilaria verrucosa* merupakan genus dari alga merah yang mempunyai nama daerah yang bermacam-macam, seperti: sango-sango, rambu kasang, janggut dayung, dongi-dongi, bulung embulung, agar-agar karang, agar-agar jahe, bulung sangu dan lain-lain. Alga merah marga *Gracilaria* banyak jenisnya, masing-masing memiliki sifat-sifat morfologi dan anatomi yang berbeda serta nama ilmiah yang berbeda pula, seperti: *Gracilaria confervoides*, *Gracilaria gigas*, *Gracilaria verucosa*, *Gracilaria lichenoides*, *Gracilaria crasa*, *Gracilaria blodgettii*, *Gracilaria arcuata*, *Gracilaria taenioides*, *Gracilaria eucheumoides*, dan lain sebagainya (Anggadiredja *et al.*, 2006).

Gracilaria verrucosa adalah salah satu jenis yang sangat populer di masyarakat petani tambak Indonesia. Alga ini sering dibudidayakan di daerah tambak dengan kondisi air payau. Pemanfaatan *Gracilaria verrucosa* sebagai bahan baku agar telah mengarah ke industri (Sugiyatno, 2010).

2.1.1 Morfologi

Ciri-ciri umum rumput laut marga *Gracilaria* adalah bentuk *thallus* yang memipih atau silindris, membentuk rumpun dengan tipe percabangan yang tidak teratur, *thallus* menyempit pada pangkal percabangan. Sifat substansi *thallus* *Gracilaria* seperti tulang rawan (*cartilagenous*). Ujung-ujung *thallus* pada umumnya meruncing, permukaannya halus atau berbintil-bintil. Garis tengah *thallus* berkisar antara 0,5-4,0 mm. Panjang dari *Gracilaria* dapat mencapai 30 cm atau lebih. Ciri khusus secara morfologis memiliki duri yang tumbuh berderet melingkari *thallus* dengan interval yang bervariasi sehingga membentuk ruas-ruas *thallus* di antara lingkaran duri.



Gambar 2.1. Alga Merah *Gracilaria verrucosa*

Seperti pada alga kelas lainnya, morfologi *Gracilaria* tidak memiliki perbedaan antara akar, batang dan daun. Tanaman ini berbentuk batang yang disebut dengan *thallus* dengan berbagai bentuk percabangannya. *Gracilaria* membutuhkan substrat sebagai tempat menempel agar tetap pada tempatnya dan membutuhkan sinar matahari untuk proses fotosintesis. *Gracilaria* umumnya tumbuh lebih baik di tempat yang dangkal daripada di tempat dalam. Substrat tempat melekat dapat berupa batu, pasir, lumpur, dan lain-lain. Kebanyakan lebih

menyukai intensitas cahaya matahari yang tinggi. Suhu merupakan faktor penting untuk pembiakan dan pertumbuhan. Suhu optimum untuk pertumbuhan adalah antara 20-28°C dan tumbuh pada kisaran kadar garam yang tinggi. Dalam keadaan basah, dapat bertahan hidup di atas permukaan air selama satu hari (Aslan, 1991).

2.1.2 Taksonomi

Sinulingga dan Sri (2006) mengklasifikasikan *Gracilaria verrucosa* dalam taksonomi sebagai berikut :

Divisi : Rhodophyta

Class : Rhodophyceae

Ordo : Gigartinales

Familia : Gracilariaceae

Genus : *Gracilaria*

Spesies : *Gracilaria verrucosa*

2.2 Lignoselulosa

Bahan lignoselulosa merupakan biomassa yang berasal dari tanaman dengan komponen utama selulosa, hemiselulosa dan lignin (Hermiati *et al.*, 2010). Ketersediaannya yang cukup melimpah, terutama sebagai limbah pertanian, perkebunan, dan kehutanan, menjadikan bahan ini berpotensi sebagai salah satu sumber energi melalui proses konversi, baik proses fisika, kimia maupun biologis. Lignoselulosa mengandung tiga komponen penyusun utama, yaitu selulosa (30-50%-berat), hemiselulosa (15-35%-berat), dan lignin (13-30%-berat).

2.2.1 Selulosa

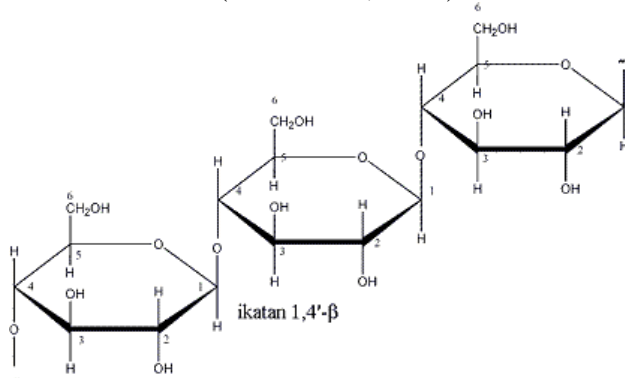
Selulosa merupakan senyawa organik yang paling melimpah di bumi. Diperkirakan sekitar 10^{11} ton selulosa dibiosintesis tiap tahun, dan selulosa

mencakup sekitar 50% dari karbon tak-bebas di bumi. Daun kering me 10-20% selulosa; kayu, 50%; dan kapas 90%.

Selulosa membentuk komponen serat dari dinding sel tumbuhan. Ketegaran selulosa disebabkan oleh struktur keseluruhannya. Molekul selulosa merupakan rantai-rantai, atau mikrofibril, dari D-glukosa sampai sebanyak 14.000 satuan yang terdapat sebagai berkas-berkas terpuntir mirip tali, yang terikat satu sama lain oleh ikatan hidrogen.

Suatu molekul tunggal selulosa merupakan polimer lurus dari 1,4'- β -D-glukosa. Hidrolisis lengkap dalam HCl 40% dalam-air, hanya menghasilkan D-glukosa. Disakarida yang terisolasi dari selulosa yang terhidrolisis sebagian adalah selobiosa, yang dapat dihidrolisis lebih lanjut menjadi D-glukosa dengan suatu katalis asam atau dengan emulsi enzim. Selulosa sendiri tidak mempunyai karbon hemiasetal-selulosa tidak dapat mengalami mutarotasi atau dioksidasi oleh reagensia seperti reagensia Tollens (Fessenden & Fessenden, 1986).

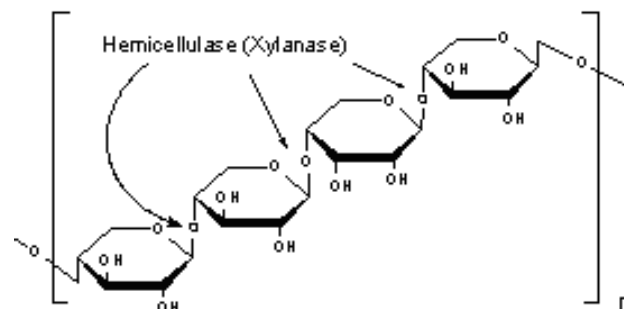
Selulosa merupakan polimer linier dari β -D-glukosa yang dihubungkan satu sama lain dengan ikatan glikosidik β (1 \rightarrow 4). Selulosa merupakan komponen struktur utama dinding sel. Selulosa dicirikan dengan kekuatan daya tahannya yang tinggi terhadap zat-zat kimia dan relatif tidak larut dalam air. Selulosa dapat dihidrolisis dengan enzim selulase (Kusnandar, 2010).



Gambar 2.2. Struktur Selulosa

2.2.2 Hemiselulosa

Hemiselulosa merupakan heteropolisakarida yang mengandung berbagai gula, terutama pentose. Hemiselulosa umumnya terdiri atas dua atau lebih residu pentose yang berbeda. Komposisi hemiselulosa sering mengandung asam uronat sehingga mempunyai sifat asam. Hemiselulosa memiliki derajat polimerisasi yang lebih rendah, lebih mudah terhidrolisis dalam asam, mempunyai suhu bakar yang lebih rendah dibandingkan dengan selulosa, dan tidak berbentuk serat-serat panjang. Selain itu, umumnya hemiselulosa larut dalam alkali dengan konsentrasi rendah, dimana semakin banyak cabangnya semakin tinggi kelarutannya. Hemiselulosa dapat dihidrolisis dengan *enzim hemicellulase (xylanase)* (Kusnandar, 2010).

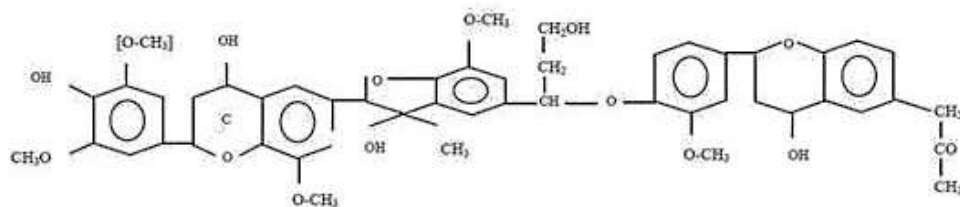


Gambar 2.3. Struktur Hemiselulosa

2.2.3 Lignin

Kebanyakan sel tumbuh-tumbuhan dikelilingi oleh struktur polisakarida yang kaku, amat kuat, sebanding dengan plastik yang diperkuat oleh gelas-fiber. Kerangka dinding sel tumbuh-tumbuhan terdiri dari lapisan-lapisan serat selulosa yang panjang, melebar, saling bersimpangan, yang lebih kuat daripada kawat baja dengan diameter yang sama. Kerangka seperti serabut ini diliputi oleh matriks seperti semen yang terdiri dari polisakarida struktural jenis lain dan bahan polimer lain yang disebut *lignin* (Lehninger, 1982).

Lignin merupakan kompleks polimer aromatik yang mempunyai struktur tiga dimensi. Lignin mempunyai peranan dalam memberikan kekerasan pada dinding sel, bertindak sebagai zat pengikat antarsel dan bersama-sama dengan komponen dinding sel yang lain menyebabkan sel mempunyai ketahanan yang baik, serta memperlambat penyerapan air dari dinding sel dan melindungi sel dari serangan mikroorganisme. Lignin bersifat sangat inert, tidak larut serta tahan terhadap pencernaan (Kusnandar, 2010).



Gambar 2.4. Struktur Lignin

2.3 Hidrolisis

Hidrolisis bertujuan untuk memecah selulosa dan hemiselulosa menjadi monosakarida (glukosa & *xylosa*) yang selanjutnya akan difermentasi menjadi etanol. Hidrolisis sempurna selulosa menghasilkan glukosa, sedangkan hemiselulosa menghasilkan beberapa monomer gula pentose (C5) dan heksosa (C6).

Hidrolisis pati dan selulosa menjadi gula dapat dilakukan dengan hidrolisis secara kimiawi, fisik dan enzimatik. Hidrolisis secara enzimatik memiliki perbedaan mendasar dibandingkan hidrolisis secara kimiawi dan fisik dalam hal spesifitas pemutusan rantai polimer pati dan selulosa. Hidrolisis secara kimiawi (asam) dan fisik akan memutus rantai polimer secara acak, sedangkan hidrolisis enzimatik akan memutus rantai polimer secara spesifik pada percabangan tertentu (Setyawati & Rahman, 2011).

Hidrolisis enzimatis memiliki beberapa keuntungan dibandingkan hidrolisis kimiawi, antara lain: tidak terjadi degradasi gula hasil hidrolisis, kondisi proses yang lebih lunak (suhu dan tekanan rendah, pH netral), serta proses enzimatis merupakan proses yang ramah lingkungan (Gunam *et al.*, 2011). Namun, hidrolisis enzimatis memerlukan waktu yang lebih lama dibandingkan dengan hidrolisis kimiawi.

2.3.1 Hidrolisis Enzimatis

Saat ini, perhatian sudah diarahkan pada penggunaan enzim untuk menghidrolisis selulosa. Hidrolisis enzimatis lebih diutamakan karena memiliki beberapa keuntungan dibandingkan hidrolisis kimiawi, antara lain: tidak terjadi degradasi gula hasil hidrolisis, kondisi proses yang lebih lunak (suhu dan tekanan rendah, pH netral), serta proses enzimatis merupakan proses yang ramah lingkungan (Gunam *et al.*, 2011).

Enzim yang dapat menghidrolisis selulosa adalah selulase. Meryandini *et al.*, (2009) melakukan penelitian tentang isolasi bakteri selulolitik dan karakterisasi enzimnya. Pengukuran aktivitas enzim selulase ekstrak kasar, dilakukan pada hari optimum produksi enzim selulase tiap isolat dengan metode miller. Karakterisasi enzim selulase meliputi penentuan pH dan suhu optimum serta substrat yang sesuai. Pengujian pada berbagai pH dilakukan pada pH 3 sampai dengan pH 9 dengan selang 0,5 unit menggunakan bufer sitrat fosfat 0,2 M (pH 3-5,5), bufer fosfat 0,2 M (pH 6-8) dan bufer tris-HCl 0,2 M (pH 8-9). Suhu yang digunakan adalah 30°C sampai dengan 90°C dengan selang 10°C.

Enzim selulase yang digunakan pada penelitian ini berasal dari isolasi jamur tiram (*Pleurotus ostreatus*). Jamur tiram biasanya tumbuh pada media yang

mengandung selulosa misalnya seperti jerami, kayu, pepohonan dan lain-lain. Ramadhina (2009) melakukan penelitian tentang pembuatan bioetanol dari selulosa batang jagung dengan proses hidrolisis menggunakan enzim selulase dari jamur tiram. Efektivitas enzim selulase dari jamur tiram dibuktikan menggunakan substrat selulosa murni yaitu CMC (*Carboxyl Metil Cellulose*) yang dilarutkan dalam bufer phospat 0,01 M pH 8 kemudian diukur menggunakan metode miller. Metode miller bertujuan untuk mengukur adanya aktivitas glukosa yang dihasilkan dari proses hidrolisis enzimatik terhadap selulosa menggunakan reagen DNS dan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum.

2.3.2 Hidrolisis Kimiawi

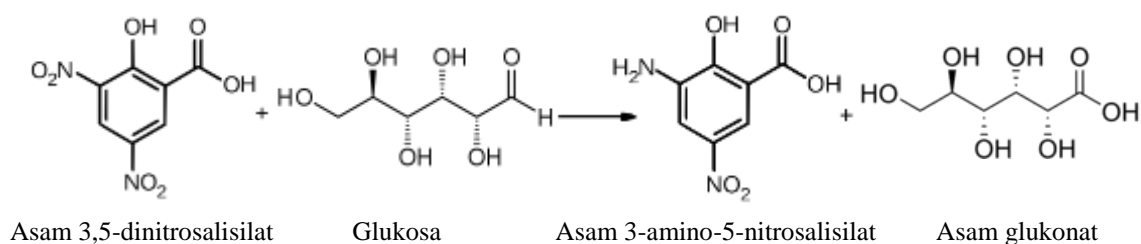
Beberapa asam yang umum digunakan untuk hidrolisis kimiawi antara lain asam sulfat (H_2SO_4), asam perklorat ($HClO_4$), dan HCl. Berdasarkan penelitian Siswati *et al.*, (2009), katalis HCl menghasilkan glukosa lebih tinggi dibandingkan H_2SO_4 . Hal ini terjadi karena H_2SO_4 bersifat membakar selulosa sedangkan HCl tidak, sehingga glukosa yang dihasilkan lebih sedikit. Dalam hal ini, asam berfungsi sebagai katalisator yaitu untuk mempercepat terjadinya proses hidrolisis.

Hidrolisis kimiawi dengan asam dapat dikelompokkan menjadi hidrolisis asam pekat dan hidrolisis asam encer (Taherzadeh & Karimi, 2007). Penggunaan asam pekat pada proses hidrolisis selulosa dilakukan pada temperatur yang lebih rendah daripada asam encer. Konsentrasi asam yang digunakan adalah 10-30%, temperatur reaksi adalah $100^{\circ}C$ dan membutuhkan waktu reaksi antara 2-6 jam. Temperatur yang lebih rendah meminimalisasi degradasi gula. Keuntungan dari

penggunaan asam pekat ini adalah konversi gula yang dihasilkan tinggi, yaitu bisa mencapai konversi 90% (Badger, 2002).

2.4 Metode Miller

Penentuan kadar glukosa dapat dilakukan salah satunya dengan menggunakan metode Miller. Metode ini digunakan untuk mengukur gula pereduksi dengan teknik kolorimetri. Teknik ini hanya dapat mendeteksi satu gula pereduksi, misalnya glukosa. Glukosa memiliki gugus aldehida, sehingga dapat dioksidasi menjadi gugus karboksil. Gugus aldehida yang dimiliki oleh glukosa akan dioksidasi oleh asam 3,5-dinitrosalisilat menjadi gugus karboksil dan menghasilkan asam 3-amino-5-nitrosalisilat pada kondisi basa dengan suhu 90-100°C (Bintang, 2010). Reaksi yang terjadi tertera pada Gambar 2.5.



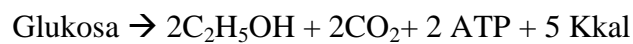
Gambar 2.5. Mekanisme reduksi glukosa oleh asam 3,5-dinitrosalisilat

Penentuan kadar glukosa dengan Metode Miller menggunakan reagen asam dinitrosalisilat (DNS) berwarna kuning jingga yang terdiri atas asam 3,5-dinitrosalisilat, rochelle salt, fenol, bisulfit dan alkali. Penambahan rochelle salt untuk melindungi reagen dari hilangnya oksigen; fenol untuk menguatkan warna; bisulfit untuk menjaga warna tetap stabil; dan alkali untuk mereduksi glukosa (Miller, 1959).

2.5 Fermentasi

Fermentasi adalah suatu proses perubahan kimia pada substrat organik, baik karbohidrat, protein, lemak atau lainnya, melalui kegiatan katalis biokimia yang

dikenal sebagai enzim dan dihasilkan oleh jenis mikroba spesifik. Secara biokimia fermentasi juga dapat diartikan sebagai pembentukan energi melalui senyawa organik. Secara sederhana proses fermentasi alkohol dari bahan baku yang mengandung gula atau glukosa terlihat pada reaksi berikut:



Dari reaksi diatas , 70% energi bebas yang dihasilkan dibebaskan sebagai panas dan secara teoritis 100% karbohidrat diubah menjadi 51,1% etanol dan 48,9% menjadi CO₂. Pada proses fermentasi, glukosa dapat diubah secara anaerobik menjadi alkohol oleh bermacam-macam mikroorganisme. Khamir sering digunakan dalam proses fermentasi etanol, seperti *Saccharomyces cerevisiae*, *S. uvarum*, *Schizosaccharomyces sp* dan *Kluyveromyces sp*. Secara umum khamir dapat tumbuh dan memproduksi etanol secara efisien pada pH 3,5-6,0 dan suhu 28-35°C. Laju awal produksi etanol dengan menggunakan khamir akan meningkat pada suhu yang lebih tinggi, namun produktifitas keseluruhan menurun karena adanya pengaruh peningkatan etanol yang dihasilkan. Khamir yang sering dipergunakan dalam proses fermentasi etanol adalah *Saccharomyces cerevisiae*. Khamir ini bersifat fakultatif anaerobik, tumbuh baik pada suhu 30°C dan pH 4,0 – 4,5.

2.6 Bioetanol

Bioetanol adalah salah satu jenis *biofuel* (bahan bakar cair dari pengolahan tumbuhan) disamping biodiesel. Bioetanol adalah etanol yang dihasilkan dari fermentasi glukosa (gula) yang dilanjutkan dengan proses distilasi. Proses distilasi dapat menghasilkan etanol dengan kadar 95% volume, untuk digunakan sebagai

bahan bakar (*biofuel*) perlu lebih dimurnikan lagi hingga mencapai 99% yang lazim disebut *fuel grade ethanol* (FGE).

Di bawah ini adalah sifat fisik etanol :

Massa molekul relatif	: 46,07 g/mol
Titik didih	: 78,4°C
Titik leleh	: -114,3°C
Titik nyala	: 13°C
Densitas	: 0,789 gr/cm ³
Viskositas pada 20°C	: 1,200 cP
Tekanan uap	: 44 mmHg

(Ashriyani, 2009)

Tahap inti proses pembuatan bioetanol adalah fermentasi gula baik yang berupa glukosa, fruktosa maupun sukrosa oleh yeast atau ragi terutama *S. cerevisiae* dan bakteri *Z. mobilis*. Pada proses ini gula dikonversi menjadi etanol dan gas karbon dioksida. Secara umum proses pembuatan bioetanol meliputi tiga tahapan, yaitu persiapan bahan baku, fermentasi dan pemurnian. Pada tahap persiapan, bahan baku berupa padatan terlebih dahulu harus dikonversi menjadi larutan gula sebelum difermentasi menjadi etanol sedangkan bahan-bahan yang sudah berada dalam bentuk larutan seperti molase dapat langsung difermentasi (Arnata, 2009).

Salah satu sumber selulosa yang bisa dikonversi menjadi gula dan kemudian difermentasi menjadi bioetanol adalah rumput laut jenis alga merah *Gracilaria verrucosa*. Berdasarkan penelitian Ahmad (2014), alga merah *Gracilaria verrucosa* mengandung selulosa sebesar 13,04%, lignin sebesar 3,84% dan ketika

difermentasi dengan *Zymomonas mobilis* pada pH 6 selama 7 hari mampu menghasilkan bioetanol perkilogram alga merah sebesar 23,01% dengan kadar 29,60%. Sebelum difermentasi, *Gracilaria verrucosa* dihidrolisis secara enzimatik menggunakan *Trichoderma viride* dengan pH 5,5 selama 6 hari.

Ashriyani (2009) melakukan penelitian mengenai pembuatan bioetanol dari substrat makroalga genus *Eucheuma* dan *Gracilaria*. Makroalga genus *Gracilaria* ketika dihidrolisis secara enzimatik menggunakan *Trichoderma viride* menghasilkan gula pereduksi sebesar 0,089 mg/mL pada konsentrasi substrat 5% dan waktu inkubasi 48 jam. Hidrolisat *Gracilaria* kemudian difermentasi oleh sel *Saccharomyces cerevisiae* yang terimobilisasi dalam Ca alginat. Kondisi optimum proses fermentasi diperoleh pada pH 4 dan waktu inkubasi 24 jam yang menghasilkan kadar etanol sebesar 0,698% dengan *yield* etanol terhadap gula pereduksi yang dihasilkan sebesar 0,0596 mL/mg dan *yield* etanol terhadap substrat sebesar 0,106 mL/g.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Populasi dan Sampel

3.1.1 Populasi

Populasi adalah seluruh obyek dari penelitian. Populasi dalam penelitian ini adalah alga merah *Gracilaria verrucosa*

3.1.2 Sampel

Sampel adalah wakil dari populasi yang diteliti. Sampel dalam penelitian ini adalah alga merah *Gracilaria verrucosa* dari tambak di Desa Mororejo Kecamatan Kaliwungu Kabupaten Kendal

3.2 Variabel Penelitian

Dalam penelitian ini ada 3 macam variabel yaitu :

1. Variabel Bebas

Variabel bebas yaitu variabel yang akan diteliti pengaruhnya terhadap variabel terikat. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi HCl (10, 20, 30 %), waktu hidrolisis kimiawi (1, 2, 3 jam), pH bufer fosfat (6, 7, 8), dan suhu hidrolisis enzimatis (30, 50, 70°C).

2. Variabel Terikat

Variabel terikat adalah variabel yang menjadi titik pusat penelitian. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar glukosa alga merah *Gracilaria verrucosa* hasil hidrolisis enzimatis dan kimiawi dan etanol hasil fermentasi dari alga merah *Gracilaria verrucosa*

3. Variabel Terkendali

Variabel terkendali adalah faktor-faktor lain yang dapat mempengaruhi hasil reaksi yang dikendalikan agar tidak mempengaruhi variabel bebas. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah berat alga merah, ukuran alga merah, proses *pretreatment* (delignifikasi), suhu proses hidrolisis kimiawi, waktu inkubasi proses hidrolisis enzimatik, pH fermentasi, jumlah ragi roti dan waktu inkubasi

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Alat dan bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian meliputi: blender, oven, ayakan 100 mesh, ayakan 50 mesh, seperangkat alat refluks, cawan penguapan, alat-alat gelas (pyrex), sentrifuge, penangas air, inkubator, termometer, seperangkat alat distilasi, neraca digital, labu leher tiga dengan pendingin balik, erlenmeyer, abbe-refraktometer, spektrofotometer Genesys 20, FTIR Shimadzu 8201 PC, GC 6820 Agilent dan GC-MS QP-2010SE Shimadzu.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: alga merah *Gracilaria verrucosa*, akuades, akuabides, HCl, jamur tiram, NaOH 6 M, NaOH 0,01 M, H₂SO₄ 1N, H₂SO₄ 72%, asam 3,5-dinitrosalisilat, rochelle salt (Kalium Natrium Tartrat Tetrahidrat), fenol, NaOH, Natrium bisulfit, glukosa, bufer fosfat, kalium kromat, etanol *pro analysis* buatan *Merck*, ammonium sulfat padat, dan urea.

3.3.2 Cara Kerja

3.3.2.1 *Persiapan Bahan Baku*

Alga merah *Gracilaria verrucosa* dicuci bersih kemudian dikeringkan dengan sinar matahari. Sampel kering dipotong dengan ukuran 1-2 cm, dihaluskan dengan blender hingga menjadi serbuk kasar dan dioven dengan suhu 60°C selama 4 jam. Serbuk kasar alga merah *Gracilaria verrucosa* yang telah kering diblender kembali hingga menjadi serbuk halus kemudian diayak menggunakan pengayak berukuran 100 mesh. Serbuk alga merah *Gracilaria verrucosa* yang lolos ayakan 100 mesh dipakai sebagai sampel untuk perlakuan selanjutnya.

3.3.2.2 *Analisis Lignin dan Selulosa*

Analisis lignin dan selulosa dilakukan dengan metode Chesson (Datta, 1981). Sebanyak 1 g (a) sampel kering ditambahkan 150 mL akuades, direfluks pada suhu 100° C dengan water bath selama 1 jam. Hasilnya disaring, residu dicuci dengan air panas (300 mL). Residu kemudian dikeringkan dengan oven sampai berat konstan kemudian ditimbang (b). Residu ditambahkan 150 mL H₂SO₄ 1N kemudian direfluks dengan water bath selama 1 jam pada suhu 100°C. Hasilnya disaring dan dicuci dengan akuades sampai netral (300 mL) lalu dikeringkan (c). Residu kering ditambahkan 10 mL H₂SO₄ 72% dan direndam pada suhu kamar selama 4 jam. Ditambahkan 150 mL H₂SO₄ 1 N dan direfluks pada water bath selama 1 jam pada pendingin balik. Residu disaring dan dicuci dengan akuades sampai netral (400 mL) kemudian dipanaskan dalam oven pada suhu 105°C dan hasilnya ditimbang sampai bobot tetap (d), selanjutnya residu diabukan dan ditimbang (e).

Perhitungan kadar selulosa dan kadar lignin sebagai berikut:

$$\text{Kadar selulosa} = \frac{c-d}{a} \times 100 \% \dots\dots\dots(1)$$

$$\text{Kadar lignin} = \frac{d-e}{a} \times 100\% \dots\dots\dots(2)$$

(Sari *et al*, 2012)

3.3.2.3 Proses Pretreatment (Delignifikasi)

Dimodifikasi dari Anggriani *et al*, (2011) dan Ramadhina (2011), proses *pretreatment* (delignifikasi) dilakukan dengan menggunakan 350 gr serbuk alga merah *Gracilaria verrucosa* ditambah NaOH 0,01 M hingga terendam semua. Proses perendaman dilakukan selama 24 jam. Setelah 24 jam residu dicuci dengan air panas hingga netral dan dikeringkan di oven pada suhu 105°C. Residu kering digerus dalam cawan porselin kemudian diayak dengan ayakan 50 mesh. Residu hasil delignifikasi dengan ukuran 50 mesh siap digunakan untuk proses hidrolisis.

3.3.2.4 Analisis Lignin dan Selulosa *Gracilaria verrucosa* Hasil Delignifikasi

Analisis lignin dan selulosa *Gracilaria verrucosa* hasil delignifikasi dilakukan dengan memodifikasi metode Sari (2012) menggunakan metode Chesson (Datta, 1981). Sebanyak 1 g (a) sampel kering hasil delignifikasi ditambahkan 150 mL akuades, direfluks pada suhu 100°C selama 1 jam. Hasilnya disaring, residu dicuci dengan air panas (300 mL). Residu kemudian dikeringkan dengan oven sampai berat konstan kemudian ditimbang (b). Residu ditambahkan 150mL H₂SO₄ 1N kemudian direfluks selama 1 jam pada suhu 100°C. Hasilnya disaring dan dicuci dengan akuades sampai netral (300 mL). Residu kemudian dikeringkan dengan oven sampai konstan kemudian ditimbang (c). Residu kering ditambahkan 10 mL H₂SO₄ 72% dan direndam pada suhu kamar selama 4 jam.

Ditambahkan 150 mL H₂SO₄ 1 N dan direfluks selama 1 jam. Residu disaring dan dicuci dengan akuades sampai netral (400 mL) kemudian dipanaskan dalam oven pada suhu 105°C dan hasilnya ditimbang sampai bobot tetap (d), selanjutnya residu diabukan dan ditimbang (e).

Perhitungan kadar selulosa dan kadar lignin sebagai berikut:

$$\text{Kadar selulosa} = \frac{c-d}{a} \times 100 \% \dots\dots\dots(1)$$

$$\text{Kadar lignin} = \frac{d-e}{a} \times 100\% \dots\dots\dots(2)$$

3.3.2.5 Tahap Produksi Gula (Hidrolisis)

3.3.2.5.1 Hidrolisis Enzimatik

3.3.2.5.1.1 Proses Isolasi Enzim Selulase

Proses isolasi enzim selulase dilakukan dengan memodifikasi metode Ramadhina (2011). Sebanyak 50 g jamur tiram ditambah dengan 50 mL akuabides, dihaluskan dengan blender kemudian diambil 50 mL untuk dimasukkan ke dalam kulkas selama 60 menit. Ekstrak kasar kemudian disentrifuge pada 3500 rpm selama 20 menit. Supernatan adalah enzim selulase kasar yang kemudian diuji aktivitas enzimnya.

3.3.2.5.1.2 Penentuan Aktivitas Enzim Selulase

Penentuan aktivitas enzim dilakukan dengan memodifikasi metode Anggarawati (2012) dan Ramadhina (2011). Sebanyak 40 mL CMC 0,5% dalam buffer phospat 0,1 M pH 6 ditambah dengan 10 mL enzim selulase kasar. Selanjutnya larutan ini disheaker dengan kecepatan 150 rpm dengan suhu kamar selama 30 menit, aktivitas enzim dihentikan dengan cara dipanaskan pada air mendidih selama 15 menit. Setelah itu, dari larutan tersebut diambil 3 mL dan

ditambah dengan 3 mL pereaksi miller kemudian dipanaskan dalam waterbath selama 15 menit, lalu ditambah 1 mL Rochelle salt (K.Natrium Tartrat Tetrahidrat) kemudian didinginkan. Setelah dingin, larutan diukur pada $\lambda=585$ nm dengan spektrofotometer UV-Vis dan mencatat absorbansinya. Perlakuan kontrol dilakukan secara bersamaan dengan metode dan tahapan yang sama pada pengujian sampel. Kontrol merupakan enzim selulase yang telah diinaktivasi (dipanaskan pada air mendidih selama 15 menit) terlebih dahulu kemudian direaksikan dengan substrat.

Aktivitas selulase dinyatakan dalam satuan internasional yaitu U/mL, dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\text{Aktivitas selulase (U/mL)} = \text{Konsentrasi glukosa sampel} \times \frac{1000}{V \times t \times BM} \quad (3.1)$$

$$\text{Konsentrasi glukosa sampel} = ((A_s - A_b) - (A_k - A_b)) \quad (3.2)$$

Keterangan:

A_s = Absorbansi sampel

A_b = Absorbansi blanko

A_k = Absorbansi kontrol

V = Volume enzim

t = Waktu inkubasi

BM = Bobot molekul glukosa (180)

Aktivitas enzim selulase dalam memecah selulosa menjadi glukosa ditentukan melalui persamaan yang diperoleh dari kurva standar glukosa. Kurva standar glukosa dibuat dengan pembuatan larutan glukosa dengan berbagai konsentrasi (0 - 160 ppm). Masing-masing larutan diambil 3 mL, ditambahkan 3 mL pereaksi miller kemudian dipanaskan dalam waterbath selama 15 menit, lalu

ditambah 1 mL Rochelle salt (K.Natrium Tartrat Tetrahidrat) kemudian didinginkan. Setelah dingin, larutan diukur pada $\lambda=585$ nm dengan spektrofotometer UV-Vis dan mencatat absorbansinya.

3.3.2.5.1.3 Penentuan Kadar Protein Total

Penentuan kadar protein total bertujuan untuk mengukur jumlah kandungan protein yang terdapat dalam enzim selulase kasar menggunakan metode biuret. Proses ini diawali dengan pembuatan reagen biuret dengan cara melarutkan 0,75 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dan 3 g Kalium Natrium Tartrat Tetrahidrat ($\text{KNaC}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) ke dalam 500 mL aquades. Selanjutnya membuat kurva standar protein dengan cara menyiapkan larutan standar protein berbagai konsentrasi (0 - 5 mg/mL). Larutan ini masing-masing diambil 1 mL, kemudian ditambah 4 mL reagen biuret, dikocok dan didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar. Selanjutnya larutan ini diukur absorbansinya pada $\lambda=540$ nm dengan spektrofotometer UV-Vis. Setelah didapatkan kurva standar protein, sampel enzim selulase kasar ditentukan kadar proteinnya dengan cara diambil 1 mL, kemudian ditambah 4 mL reagen biuret, dikocok dan didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar. Selanjutnya larutan ini diukur pada $\lambda=540$ nm dengan spektrofotometer UV-Vis dan dicatat absorbansinya. Data absorbansi ini selanjutnya diplotkan pada kurva standar protein.

3.3.2.5.1.4 Proses Hidrolisis dengan Enzim Selulase Jamur Tiram

Dimodifikasi dari Ramadhina (2011), sebanyak 10 g *Gracilaria verrucosa* hasil delignifikasi ditambah dengan 100 mL bufer fosfat 0,1 M sesuai variasi pH (6, 7, dan 8) dan dibuat bubur. Bubur ditambah 10 mL enzim selulase segar kemudian diinkubasi selama 2 jam dengan suhu sesuai variasi (30, 50, dan

70°C). Setelah 2 jam, campuran dididihkan selama 15 menit untuk menghentikan aktivitas enzim. Campuran kemudian disaring dan filtrat masing-masing dianalisis kadar glukosanya dengan spektrofotometer UV-Vis.

3.3.2.5.2 Hidrolisis Kimiawi

Dimodifikasi dari Anggriani *et al*, (2011) dan Ramadhina (2011), hidrolisis kimiawi dilakukan menggunakan 10 g serbuk *Gracilaria verrucosa* hasil delignifikasi ditambah dengan 100 mL HCl sesuai variasi konsentrasi (10, 20, dan 30%). Campuran ini dimasukkan dalam labu leher tiga dilengkapi pendingin balik dengan suhu 100°C selama waktu tertentu sesuai variasi (1, 2, dan 3 jam). Campuran kemudian disaring dan filtrat masing-masing dianalisis kadar glukosanya dengan spektrofotometer UV-Vis.

3.3.2.6 Analisis Glukosa Hasil Hidrolisis

Analisis glukosa hasil hidrolisis dengan memodifikasi dari Ramadhina (2011). Sebanyak 3 mL sampel hasil hidrolisis ditambahkan 3 mL pereaksi miller kemudian dipanaskan dalam penangas air selama 15 menit, lalu ditambah 1 mL Rochelle salt (K.Natrium Tartrat Tetrahidrat) kemudian didinginkan. Setelah dingin, larutan diukur pada $\lambda=585$ nm dengan spektrofotometer UV-Vis, dicatat absorbansinya dan diplotkan pada kurva standar.

3.3.2.7 Tahap Produksi Alkohol

Dimodifikasi dari Ariyani (2013). Sebanyak 50 mL filtrat dari proses hidrolisis dimasukkan ke dalam erlenmeyer. Kemudian mengatur pH filtrat menjadi 5 lalu ditambah dengan 3 gram ammonium sulfat dan 3 gram urea sebagai nutrisi. Selanjutnya dilakukan pasteurisasi pada suhu 80°C selama 15 menit lalu didinginkan. Ditambahkan 3 gram ragi roti (*Saccharomyces*

cereviseae). Selanjutnya diinkubasi dengan cara menutup rapat labu erlenmeyer pada suhu berkisar antara 27-30°C selama 7 hari. Kemudian disaring dan diambil filtratnya untuk proses distilasi. Proses distilasi dilakukan dengan memasukkan hasil fermentasi dalam labu alas bulat dan labu distilat dipasang pada alat distilasi. Sampel didistilasi pada suhu 80°C hingga teruapkan semua atau tidak ada cairan yang menetes. Kemudian distilat dimasukkan dalam botol siap untuk dianalisis dengan menggunakan GC, FTIR dan GC-MS.

3.3.2.8 Pengukuran Indeks Bias, Nyala Api dan Reaksi dengan Kalium Kromat

3.3.2.8.1 Pengukuran Indeks Bias

Dimodifikasi dari Ramadhina (2011), Indeks bias ditetapkan dengan refraktometer pada suhu 25°C. Alirkan sampel pada plat kaca refraktometer kemudian tutup penjepit kaca sampel. Lihat himpitan warna pada skala dan catat indeks biasnya. Sebelum dialiri sampel, plat kaca refraktometer harus dibersihkan dulu dengan tisu kering.

3.3.2.8.2 Nyala Api

Uji nyala api dilakukan dengan meneteskan 5 tetes sampel bioetanol ke atas searik kertas kemudian kertas dibakar. Lihat nyala api yang muncul.

3.3.2.8.3 Reaksi dengan Kalium Kromat

Sampel bioetanol direaksikan dengan larutan kalium kromat dengan cara memasukkan 0,5 mL sampel bioetanol ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 5 tetes larutan kalium kromat yang telah diasamkan dengan asam sulfat encer. Lihat perubahan warna yang terjadi.

BAB V

PENUTUP

5.1 Simpulan

Dari penelitian dan pembahasan yang telah diuraikan dapat disimpulkan bahwa:

1. Hidrolisis enzimatis yang paling baik dilakukan pada pH 6 dan suhu inkubasi 30°C dibanding pH 7 dan 8 serta suhu inkubasi 50°C dan 70°C dengan konsentrasi gula reduksi sebesar 3566,67 ppm
2. Hidrolisis kimiawi yang paling baik dilakukan dengan HCl 30% selama 3 jam dibanding HCl 10% dan 20% serta waktu refluks 1 jam dan 2 jam dengan konsentrasi gula reduksi sebesar 1493,33 ppm
3. Substrat yang dihasilkan dari proses hidrolisis ketika difermentasi menghasilkan bioetanol dibuktikan dengan hasil analisis distilat hasil fermentasi secara fisika dan kimia sama dengan hasil analisis etanol *Pro analysis* dan ketika dianalisis menggunakan GC, GC-MS dan FTIR diketahui distilat mengandung senyawa etanol

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian ini disarankan untuk melakukan penelitian lebih lanjut sebagai berikut:

1. Dilakukan penelitian untuk mengidentifikasi aktivitas spesifik dan kadar protein enzim selulase dari jamur tiram

2. Dilakukan proses fermentasi dari substrat hasil hidrolisis dengan variasi jumlah nutrient, jenis ragi dan waktu untuk mendapatkan kadar etanol terbaik

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, Ahyar. 2014. Bioethanol Production from Cellulose in Red Algae *Gracilaria verrucosa* by Separated Hydrolysis and Fermentation System Using *Trichoderma viride* and *Zymomonas mobilis*. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 2014 April ; 5 (2) : (B) 445-452
- Anggadiredja J.T. 2006. *Nilai Protein dan Asam Amino Beberapa Jenis Makroalga Laut*. Jakarta : Direktorat Pengkajian Ilmu Kehidupan-BPPT
- Anggarawati, Desi. 2012. Aktivitas Enzim Selulase Isolat SGS 2609 BBP4B-KP Menggunakan Substrat Limbah Pengolahan Rumput Laut yang Dipretreatment dengan Asam. *Skripsi*. Universitas Indonesia, Depok
- Anggriani, Dini, Erika Ariane Susilo, Nonot Soewarno. 2011. Hidrolisis Biji Sorgum menjadi Bioetanol Menggunakan NaOH-*Papain* dengan Metode Sakarifikasi dan Fermentasi Simultan. *Artikel Ilmiah*. Laboratorium Proses Pemisahan Teknik Kimia FTI-ITS
- Ariyani, Endang. 2013. Produksi Bioetanol dari Jerami Padi (*Oryza sativa L.*). *Indonesian Journal of Chemical Science* 2 (2) (2013)
- Arnata, I W. 2009. Teknologi Bioproses Pembuatan Bioetanol dari Ubi Kayu Menggunakan *Trichoderma viride*, *Aspergillus niger* dan *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis. IPB, Bogor
- Ashriyani, Atikah. 2009. Pembuatan Bioetanol dari Substrat Makroalga Genus *Euclima* dan *Gracilaria*. Skripsi. Universitas Indonesia, Depok
- Aslan, L.M. 1991. *Budidaya Rumput Laut*. Yogyakarta: Penerbit Kanisius
- Badger, PC., 2002. *Ethanol from Cellulose : A General Review*. In Trend in New Crops and New Uses., J.Jannick and A.Whipkey (eds). Alexandria,VA : ASHS Press
- Bintang, Maria. 2010. *Biokimia-Teknik Penelitian*. Jakarta: Erlangga
- Fessenden RJ, Fessenden JS. 1999. *Kimia Organik Edisi Ketiga Jilid 2* . Pudjaatmaka AH, penerjemah; Jakarta : Erlangga. Terjemahan dari: Organic Chemistry
- Gunam, Ida Bagus Wayan, Ketut Buda, I Made Yoga Semara Guna. 2010. Pengaruh Perlakuan Delignifikasi dengan Larutan NaOH Konsentrasi Substrat Jerami Padi terhadap Produksi Enzim Selulase dari *Aspergillus niger* NRRL A-II, 264. *Jurnal Biologi* XIV: 55-61
- Gunam, Ida Bagus Wayan, Wayan Redi Aryanta, Ida Bagus N. Surya Darma. 2011. Produksi Selulase Kasar dari Kapang *Trichoderma viride* dengan

Perlakuan Konsentrasi Substrat Ampas Tebu dan Lama Fermentasi.
Jurnal Biologi Volume XV No.2 Desember 2011

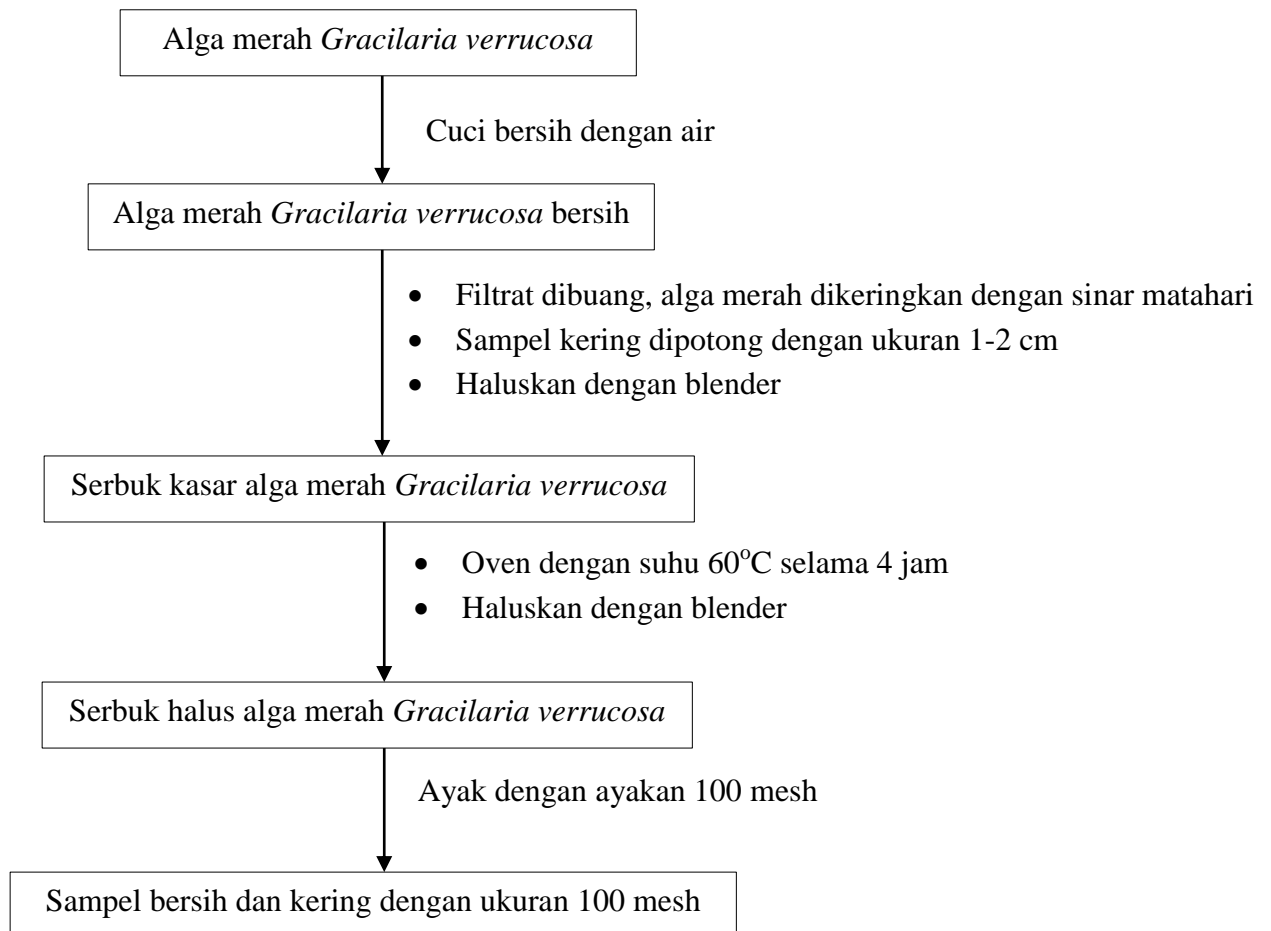
- Hermiati, E., D . Mangunwidjaja, T .C. Sunarti, O . Suparno, dan B. Prasetya. 2010. Pemanfaatan Biomassa Lignosellulosa Ampas Tebu Untuk Produksi Bioetanol. *Jurnal Litbang Pertanian*. 29 (4). 121-130
- Judoamidjojo, M., Abdul A.D., Endang G.S. 1992. *Teknologi Fermentasi*. Jakarta: Rajawali Press.
- Judoamidjojo, R.M., E.G Said dan L. Hartoto. 1989. *Biokonversi*. PAU Bioteknologi IPB, Bogor
- Kusnandar, Feri. 2010. *Kimia Pangan: Komponen Makro*. Jakarta: Dian Rakyat
- Lehninger, Albert L. 1982. *Dasar-dasar Biokimia Jilid 1*. Maggy Thenawidjaja, penerjemah; Jakarta: Erlangga. Terjemahan dari: Principles of Biochemistry
- Lin, Y., dan S. Tanaka. 2006. Ethanol Fermentation from Biomass Resources: Current State and Prospects. *Appl. Microbiol Biotechnol* 69:627-642
- Meryandini, Anja, Wahyu Widosari, Besty Maranatha, Titi Candra Sunarti, Nisa Rachmania, dan Hasrul Satria. 2009. Isolasi Bakteri Selulolitik dan Karakterisasi Enzimnya. *Makara Sains*, vol. 13, no. 1, April 2009: 33-38
- Miller, Gail Lorenz. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Journal Analytical Chemistry*, vol. 31, no. 3, March 1959
- Parjimo dan Agus Andoko. 2007. *Budidaya Jamur*. PT. Agromedia Pustaka: Jakarta
- Ramadhina, Wasis Hening. 2011. *Pembuatan Bioetanol dari Selulosa Batang Jagung (Zea mays linn)*. Skripsi. Universitas Negeri Semarang, Semarang
- Riyanto, Frendi. 2010. *Pembibitan Jamur Tiram (Pleurotus ostreatus) di Balai Pengembangan dan Promosi Tanaman Pangan dan Hortikultura (BPPTPH) Ngipiksari, Sleman, Yogyakarta*. Tugas Akhir. Universitas Sebelas Maret, Surakarta
- Sari, Anita Purnama, Ahyar Ahmad, Hanapi Usman. 2012. *Produksi Bioetanol dari Selulosa Alga Merah dengan Sistem Fermentasi Simultan Menggunakan Bakteri Clostridium acetobutylicum*. Tesis. Universitas Hasanudin, Makassar
- Setyawati, Harimbi dan Nanik Astuti Rahman. 2011. Pemanfaatan Kulit Pisang sebagai Bahan Baku Bioetanol dengan Proses Hidrolisis Enzimatik. *Sains dan Terapan Kimia*, Vol.5, No.2 (Juli 2011), 105-111

- Sinulingga, M., dan Sri Darmanti 2006. *Kemampuan Mengikat Air oleh Tanah Pasir yang Diperlukan dengan Tepung Rumput Laut Gracilaria verrucosa*. Laboratorium Biologi Struktur dan Fungsi Tumbuhan, Jurusan Biologi FMIPA UNDIP
- Sjostrom, Eero. 1981. *Kimia Kayu Dasar-dasar dan Penggunaan*. Terjemahan Hardjono Hamidjojo. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press
- Sugiyatno. 2010. *Interaksi Antara Sistem Budidaya dan Metode Tanam Terhadap Pertumbuhan dan Kandungan agar Gracilaria verrucosa (Hudson) Papenfus*. Skripsi. Universitas Diponegoro, Semarang
- Taherzadeh, M. and Karimi, K. 2007. Acid-based Hydrolysis Processes for Ethanol from Lignocellulosic Material. *Bioresources* 2 (3), 472-499
- Triana, R. 2013. Pemurnian dan karakterisasi enzim glukosa oksidase dari isolat lokal *Aspergillus niger* (IPBCC.08.610). *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor, Bogor

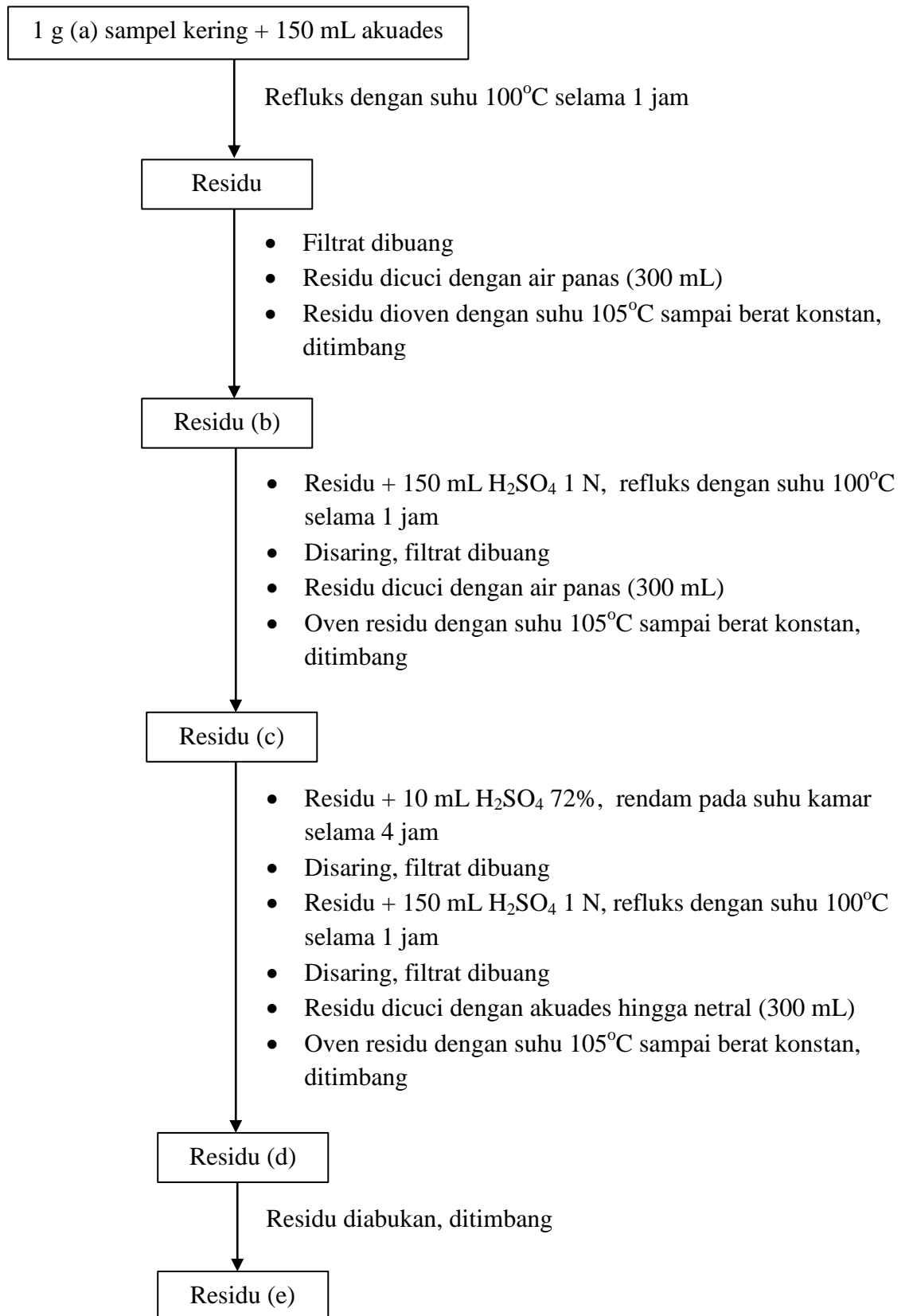
LAMPIRAN

Lampiran 1. Skema Kerja Penelitian

1. Persiapan Bahan Baku

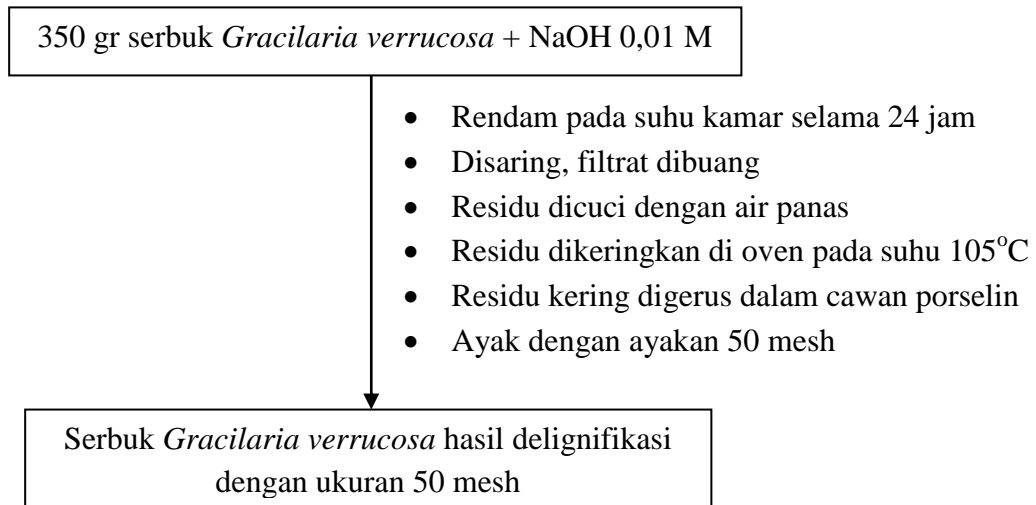


2. Analisis Lignin dan Selulosa *Gracilaria verrucosa*
Dimodifikasi dari Sari *et al*, (2012)

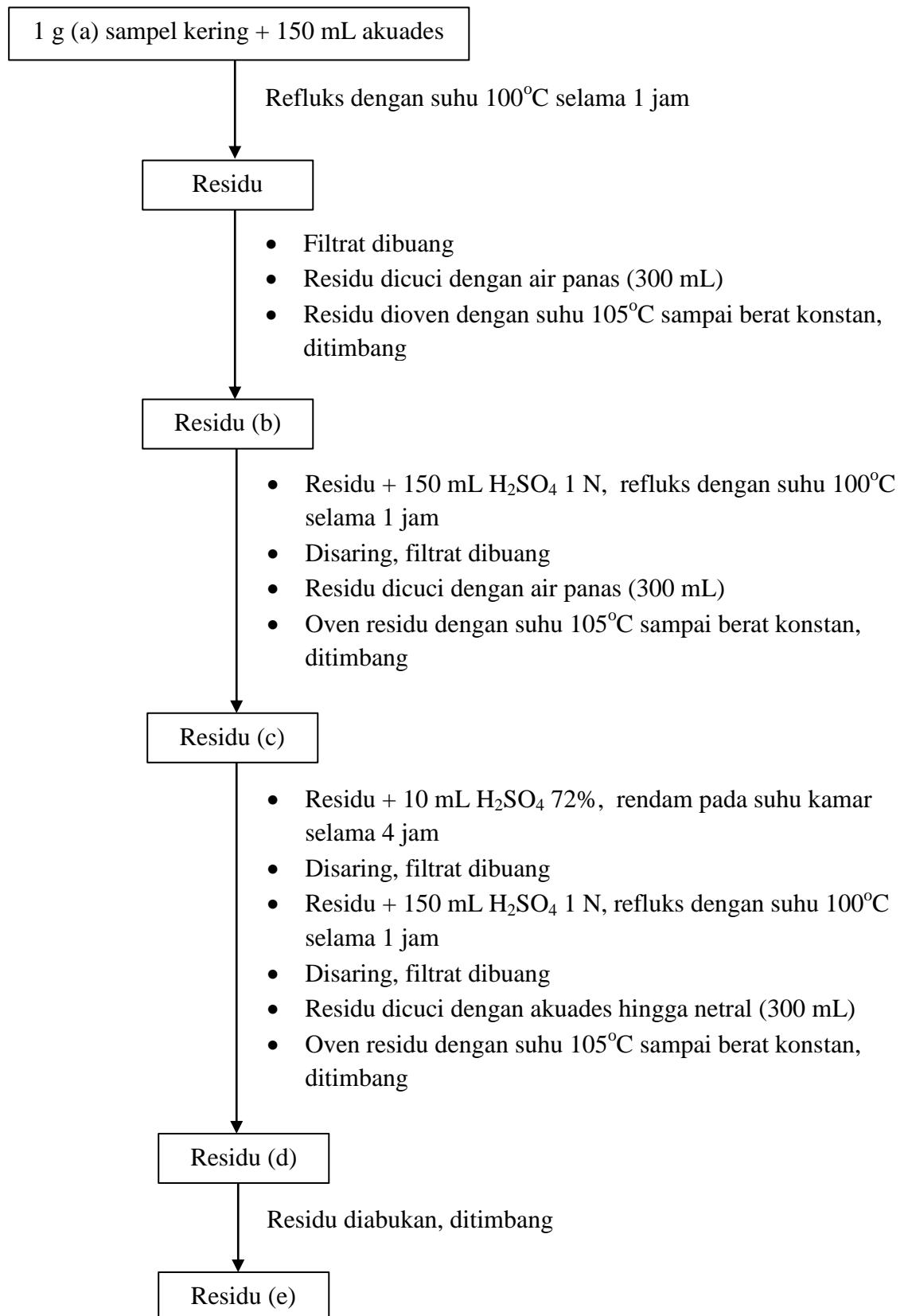


3. Proses *Pretreatment* (Delignifikasi)

Dimodifikasi dari Anggriani *et al*, (2011) dan Ramadhina (2011)



4. Analisis Lignin dan Selulosa *Gracilaria verrucosa* Hasil Delignifikasi Dimodifikasi dari Sari *et al*, (2012)

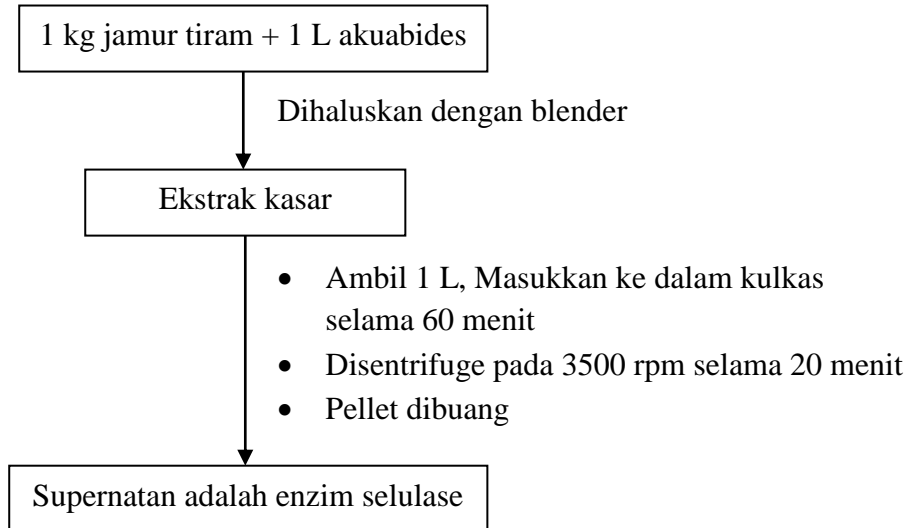


5. Tahap Produksi Gula (Hidrolisis)

a. Hidrolisis Enzimatik

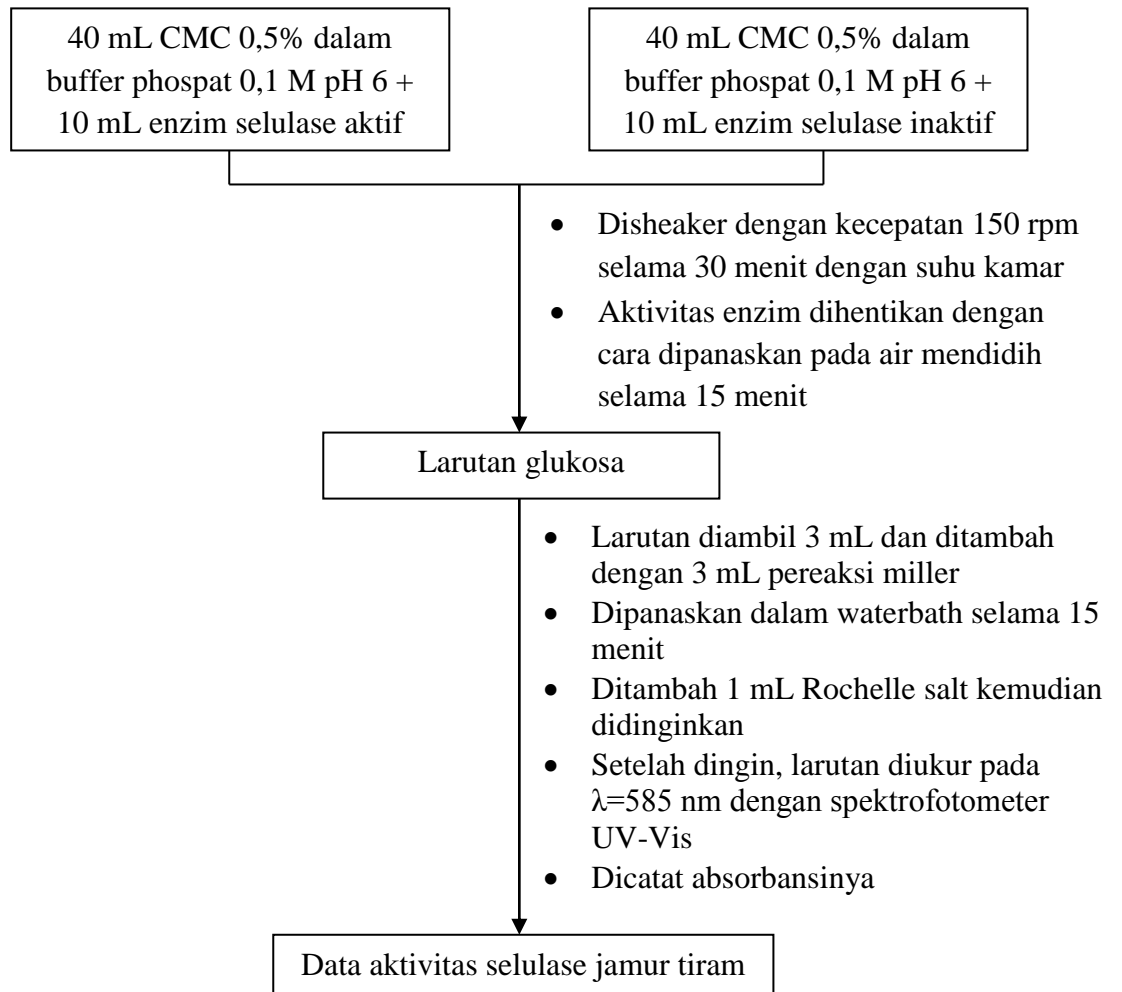
1) Proses Isolasi Enzim Selulase

Dimodifikasi dari Ramadhina (2011)

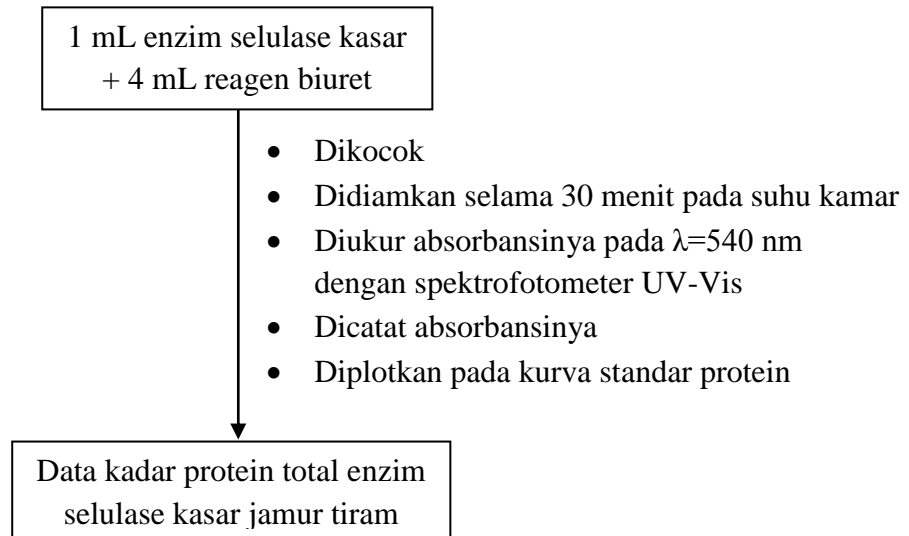


2) Penentuan Aktivitas Enzim Selulase

Dimodifikasi dari Anggarawati (2012) dan Ramadhina (2011)

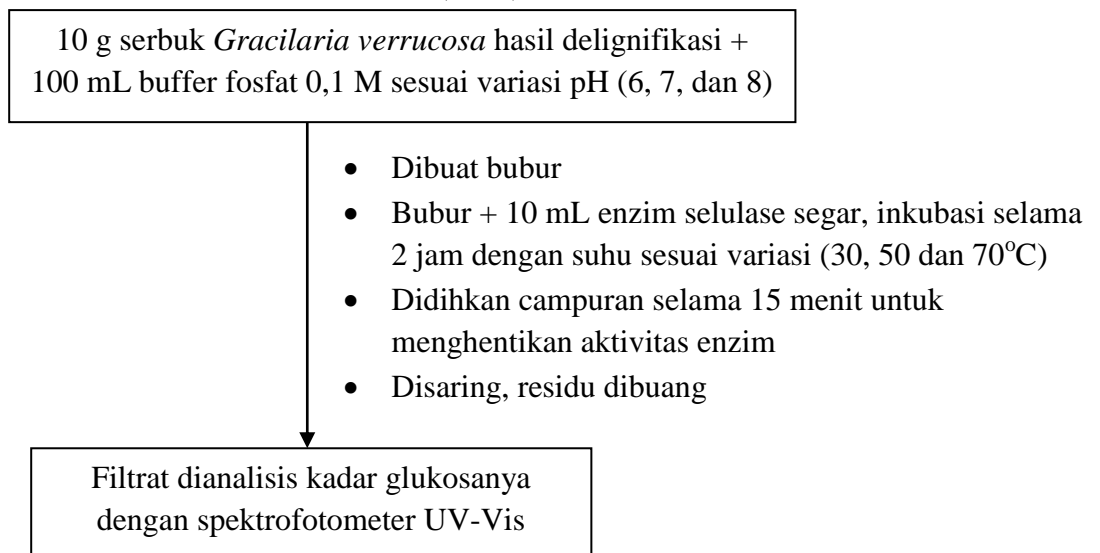


3) Penentuan Kadar Protein Total



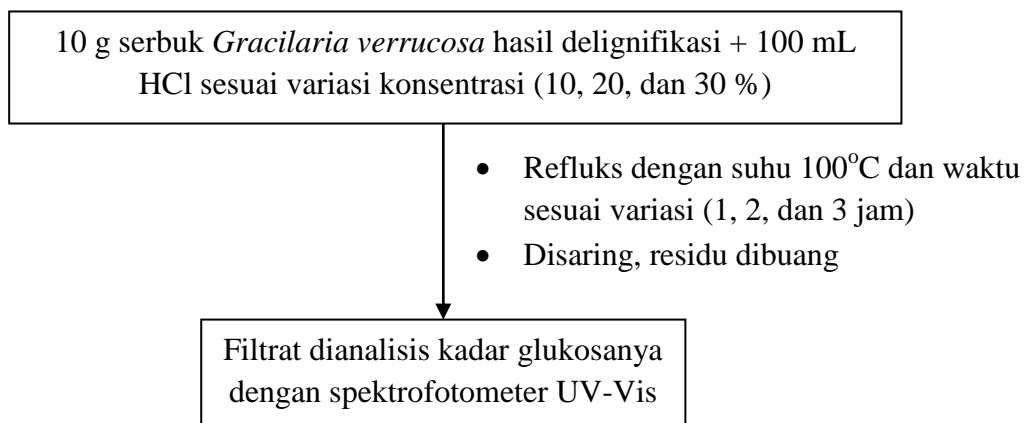
4) Proses Hidrolisis dengan Enzim Selulase Jamur Tiram

Dimodifikasi dari Ramadhina (2011)



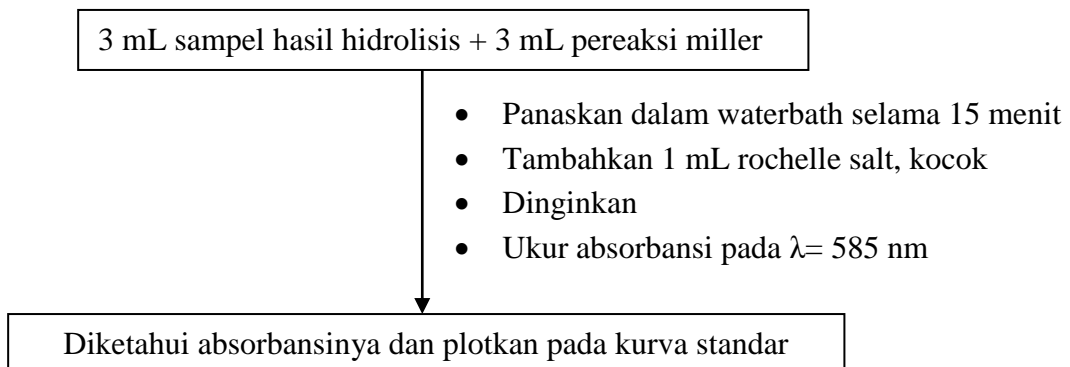
b. Hidrolisis Kimiawi

Dimodifikasi dari Anggriani *et al*, (2011) dan Ramadhina (2011)



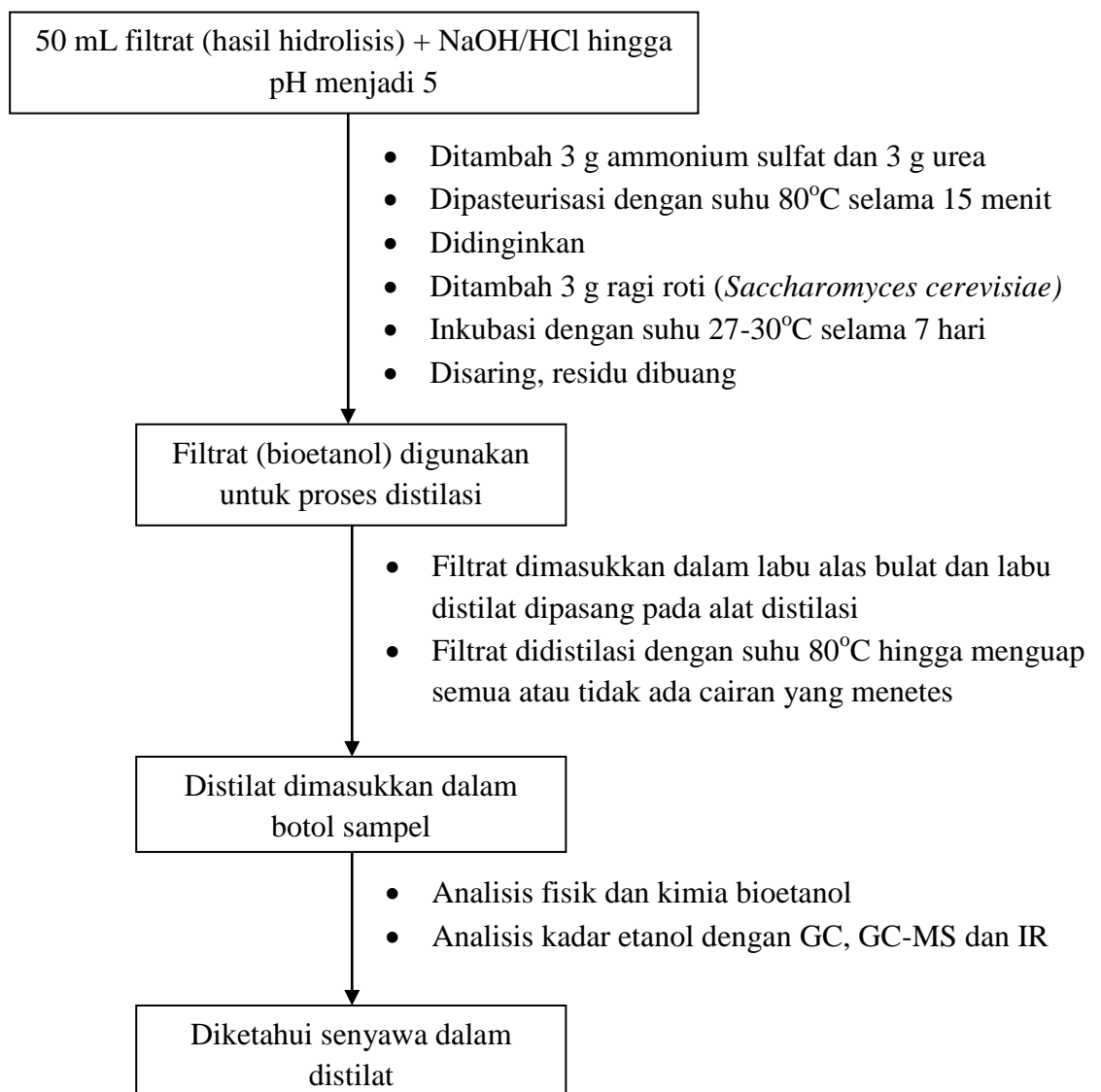
6. Analisis Glukosa Hasil Hidrolisis

Dimodifikasi dari Ramadhina (2011)



7. Tahap Produksi Alkohol

Dimodifikasi dari Ariyani (2013)



Lampiran 2. Dokumentasi Penelitian



Pengeringan alga



Pengayakan sampel



Hidrolisis Kimiawi



Produksi Enzim Selulase
Jamur Tiram



Distilasi Bioetanol

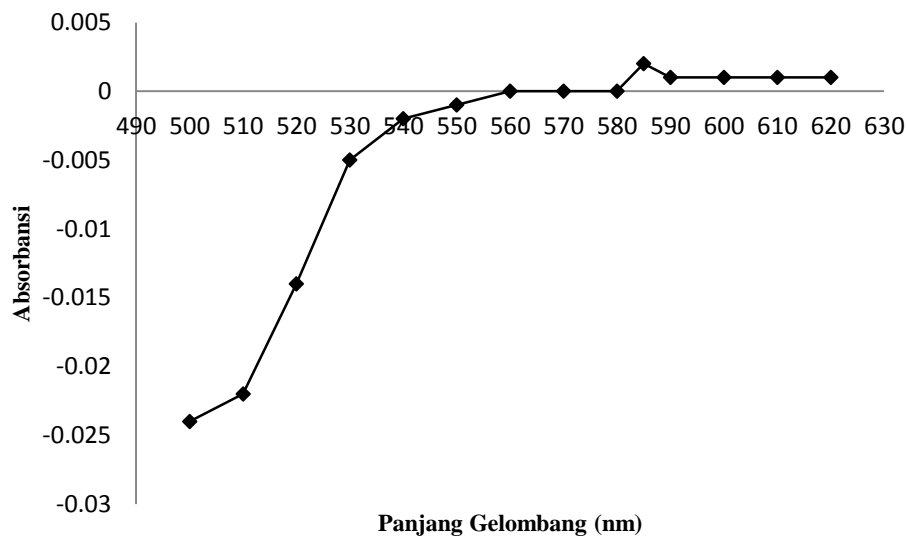


Analisis Indeks Bias Bioetanol

Lampiran 3. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Didapatkan Panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) = 585 nm dengan absorbansi 0,002.

Panjang Gelombang (nm)	Absorbansi
500	-0,024
510	-0,022
520	-0,014
530	-0,005
540	-0,002
550	-0,001
560	0
570	0
580	0
585	0,002
590	0,001
600	0,001
610	0,001
620	0,001

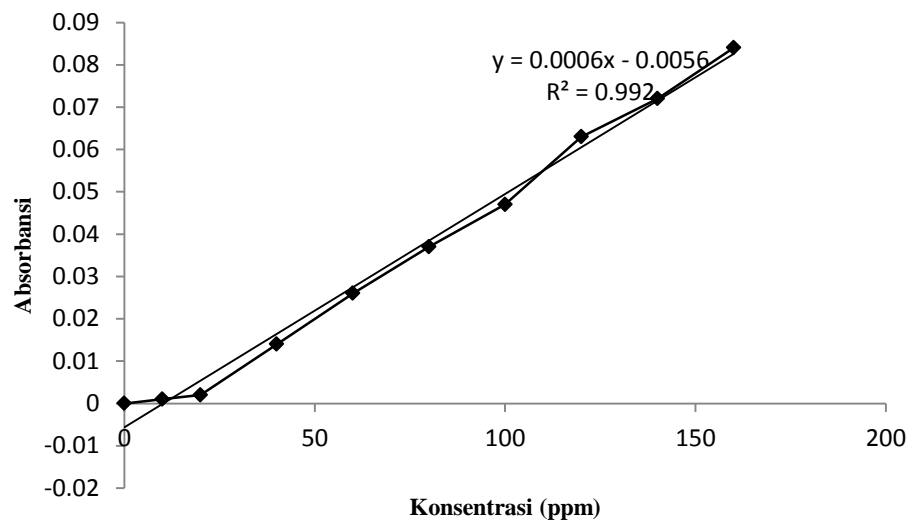


Lampiran 4. Kurva Standar Glukosa

Kurva kalibrasi larutan standar glukosa menghasilkan persamaan linier

$y = 0,0006x - 0,0056$ dengan $R^2 = 0,992$.

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
0	0
10	0,001
20	0,002
40	0,014
60	0,026
80	0,037
100	0,047
120	0,063
140	0,072
160	0,084

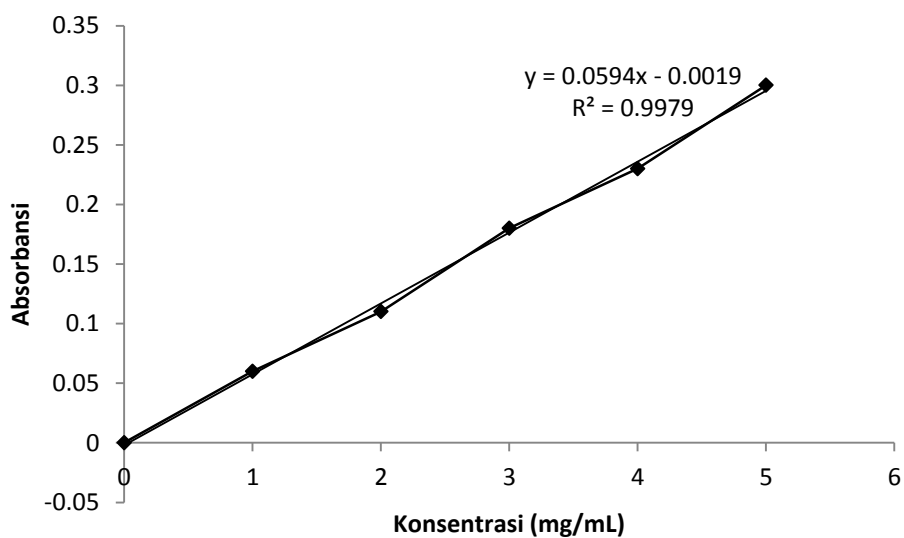


Lampiran 5. Kurva Standar Protein

Kurva kalibrasi larutan standar glukosa menghasilkan persamaan linier

$y = 0.0594x - 0.0019$ dengan $R^2 = 0.9979$.

Konsentrasi (mg/mL)	Absorbansi
0	0
1	0.06
2	0.11
3	0.18
4	0.23
5	0.3



Lampiran 6. Penentuan Aktivitas Enzim dan Aktivitas Spesifik

$$\begin{aligned}\text{Aktivitas selulase} &= \text{Konsentrasi glukosa sampel} \times \frac{1000}{V \times t \times BM} \\ &= 1,4833 \times \frac{1000}{10 \times 30 \times 180} \\ &= 0,02746 \text{ U/mL}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Aktivitas Spesifik} &= \frac{\text{Aktivitas selulase}}{\text{Kadar protein total}} \\ &= \frac{0,02746}{4,5606} \\ &= 0,00602 \text{ U/mg}\end{aligned}$$

Lampiran 7. Perhitungan Kadar Glukosa pada Sampel

Sampel Hasil Hidrolisis Enzimatik

$$\begin{aligned}
 &\text{Kadar glukosa pada pH 6, suhu } 30^{\circ}\text{C} \\
 y &= 0,0006x - 0,0056 \\
 0,080 &= 0,0006x - 0,0056 \\
 0,0006x &= 0,080 + 0,0056 \\
 0,0006x &= 0,0856 \\
 x &= 142,666 \\
 \text{Kadar} &= 142,666 \times 25 \text{ (Pengenceran)} \\
 &= 3566,70 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 &\text{Kadar glukosa pada pH 8, suhu } 50^{\circ}\text{C} \\
 y &= 0,0006x - 0,0056 \\
 0,036 &= 0,0006x - 0,0056 \\
 0,0006x &= 0,036 + 0,0056 \\
 0,0006x &= 0,0416 \\
 x &= 69,333 \\
 \text{Kadar} &= 69,333 \times 25 \text{ (Pengenceran)} \\
 &= 1733,33 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 &\text{Kadar glukosa pada pH 7, suhu } 30^{\circ}\text{C} \\
 y &= 0,0006x - 0,0056 \\
 0,072 &= 0,0006x - 0,0056 \\
 0,0006x &= 0,072 + 0,0056 \\
 0,0006x &= 0,0776 \\
 x &= 129,333 \\
 \text{Kadar} &= 129,333 \times 25 \text{ (Pengenceran)} \\
 &= 3233,33 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 &\text{Kadar glukosa pada pH 6, suhu } 70^{\circ}\text{C} \\
 y &= 0,0006x - 0,0056 \\
 0,004 &= 0,0006x - 0,0056 \\
 0,0006x &= 0,004 + 0,0056 \\
 0,0006x &= 0,0096 \\
 x &= 16 \\
 \text{Kadar} &= 16 \times 25 \text{ (Pengenceran)} \\
 &= 400 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 &\text{Kadar glukosa pada pH 8, suhu } 30^{\circ}\text{C} \\
 y &= 0,0006x - 0,0056 \\
 0,063 &= 0,0006x - 0,0056 \\
 0,0006x &= 0,063 + 0,0056 \\
 0,0006x &= 0,0686 \\
 x &= 114,333 \\
 \text{Kadar} &= 114,333 \times 25 \text{ (Pengenceran)} \\
 &= 2858,33 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 &\text{Kadar glukosa pada pH 7, suhu } 70^{\circ}\text{C} \\
 y &= 0,0006x - 0,0056 \\
 0,003 &= 0,0006x - 0,0056 \\
 0,0006x &= 0,003 + 0,0056 \\
 0,0006x &= 0,0086 \\
 x &= 14,333 \\
 \text{Kadar} &= 14,333 \times 25 \text{ (Pengenceran)} \\
 &= 358,33 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 &\text{Kadar glukosa pada pH 6, suhu } 50^{\circ}\text{C} \\
 y &= 0,0006x - 0,0056 \\
 0,036 &= 0,0006x - 0,0056 \\
 0,0006x &= 0,036 + 0,0056 \\
 0,0006x &= 0,0416 \\
 x &= 69,333 \\
 \text{Kadar} &= 69,333 \times 50 \text{ (Pengenceran)} \\
 &= 3466,67 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 &\text{Kadar glukosa pada pH 8, suhu } 70^{\circ}\text{C} \\
 y &= 0,0006x - 0,0056 \\
 0,001 &= 0,0006x - 0,0056 \\
 0,0006x &= 0,001 + 0,0056 \\
 0,0006x &= 0,0066 \\
 x &= 11 \\
 \text{Kadar} &= 11 \times 25 \text{ (Pengenceran)} \\
 &= 275 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 &\text{Kadar glukosa pada pH 7, suhu } 50^{\circ}\text{C} \\
 y &= 0,0006x - 0,0056 \\
 0,058 &= 0,0006x - 0,0056 \\
 0,0006x &= 0,058 + 0,0056 \\
 0,0006x &= 0,0636 \\
 x &= 106 \\
 \text{Kadar} &= 106 \times 25 \text{ (Pengenceran)} \\
 &= 2650 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

Sampel Hasil Hidrolisis Kimiawi

Kadar glukosa pada HCl 10%, 1 jam

$$y = 0,0006x - 0,0056$$

$$0,034 = 0,0006x - 0,0056$$

$$0,0006x = 0,034 + 0,0056$$

$$0,0006x = 0,0396$$

$$x = 66$$

$$\text{Kadar} = 66 \times 10 \text{ (Pengenceran)}$$

$$= 660 \text{ ppm}$$

Kadar glukosa pada HCl 20%, 3 jam

$$y = 0,0006x - 0,0056$$

$$0,063 = 0,0006x - 0,0056$$

$$0,0006x = 0,063 + 0,0056$$

$$0,0006x = 0,0686$$

$$x = 114,333$$

$$\text{Kadar} = 114,333 \times 10 \text{ (Pengenceran)}$$

$$= 1143,33 \text{ ppm}$$

Kadar glukosa pada HCl 10%, 2 jam

$$y = 0,0006x - 0,0056$$

$$0,045 = 0,0006x - 0,0056$$

$$0,0006x = 0,045 + 0,0056$$

$$0,0006x = 0,0506$$

$$x = 84,333$$

$$\text{Kadar} = 84,333 \times 10 \text{ (Pengenceran)}$$

$$= 843,33 \text{ ppm}$$

Kadar glukosa pada HCl 30%, 1 jam

$$y = 0,0006x - 0,0056$$

$$0,068 = 0,0006x - 0,0056$$

$$0,0006x = 0,068 + 0,0056$$

$$0,0006x = 0,0736$$

$$x = 122,66$$

$$\text{Kadar} = 122,66 \times 10 \text{ (Pengenceran)}$$

$$= 1226,67 \text{ ppm}$$

Kadar glukosa pada HCl 10%, 3 jam

$$y = 0,0006x - 0,0056$$

$$0,047 = 0,0006x - 0,0056$$

$$0,0006x = 0,047 + 0,0056$$

$$0,0006x = 0,0526$$

$$x = 87,666$$

$$\text{Kadar} = 87,666 \times 10 \text{ (Pengenceran)}$$

$$= 876,66 \text{ ppm}$$

Kadar glukosa pada HCl 30%, 2 jam

$$y = 0,0006x - 0,0056$$

$$0,075 = 0,0006x - 0,0056$$

$$0,0006x = 0,075 + 0,0056$$

$$0,0006x = 0,0806$$

$$x = 134,333$$

$$\text{Kadar} = 134,333 \times 10 \text{ (Pengenceran)}$$

$$= 1343,33 \text{ ppm}$$

Kadar glukosa pada HCl 20%, 1 jam

$$y = 0,0006x - 0,0056$$

$$0,060 = 0,0006x - 0,0056$$

$$0,0006x = 0,060 + 0,0056$$

$$0,0006x = 0,0656$$

$$x = 109,33$$

$$\text{Kadar} = 109,33 \times 10 \text{ (Pengenceran)}$$

$$= 1093,33 \text{ ppm}$$

Kadar glukosa pada HCl 30%, 3 jam

$$y = 0,0006x - 0,0056$$

$$0,084 = 0,0006x - 0,0056$$

$$0,0006x = 0,084 + 0,0056$$

$$0,0006x = 0,0896$$

$$x = 149,33$$

$$\text{Kadar} = 149,33 \times 10 \text{ (Pengenceran)}$$

$$= 1493,33 \text{ ppm}$$

Kadar glukosa pada HCl 20%, 2 jam

$$y = 0,0006x - 0,0056$$

$$0,061 = 0,0006x - 0,0056$$

$$0,0006x = 0,061 + 0,0056$$

$$0,0006x = 0,0666$$

$$x = 111$$

$$\text{Kadar} = 111 \times 10 \text{ (Pengenceran)}$$

$$= 1110 \text{ ppm}$$

Kadar Glukosa Hasil Hidrolisis Enzimatik

Suhu Inkubasi (°C)	pH Bufer Fosfat	Absorbansi	Konsentrasi Glukosa (ppm)
30	6	0,080	3566,67
30	7	0,042	3233,33
30	8	0,084	2858,33
50	6	0,036	3466,67
50	7	0,058	2650,00
50	8	0,036	1733,33
70	6	0,004	400,00
70	7	0,003	358,33
70	8	0,001	275,00

Kadar Glukosa Hasil Hidrolisis Kimiawi

Konsentrasi HCl (%)	Waktu (Jam)	Absorbansi	Konsentrasi Glukosa (ppm)
10	1	0,034	660,00
10	2	0,045	843,33
10	3	0,047	876,67
20	1	0,060	1093,33
20	2	0,061	1110,00
20	3	0,063	1143,33
30	1	0,068	1226,67
30	2	0,075	1343,33
30	3	0,084	1493,33

Lampiran 8. Pembuatan Larutan

1. Pereaksi Miller

a. Larutan DNS

DNS 1 g, fenol 0,2 g, sodium disulfide 0,05 g dan NaOH 1 g, dilarutkan dalam 100 mL aquades

b. Larutan Rochelle salt

40 g kalium natrium tartrat tetrahidrat dilarutkan dalam 100 mL aquades

2. Buffer phospat 0,1 M

pH	Volume 0,2 M Na_2HPO_4 (mL)	Volume 0,2 M NaH_2PO_4 (mL)	Keterangan
6	6,15	43,85	Dilarutkan dalam 100 mL aquades
7	30,5	19,5	Dilarutkan dalam 100 mL aquades
8	47,35	2,65	Dilarutkan dalam 100 mL aquades

3. Larutan HCl

Konsentrasi (%)	Larutan induk HCl 37% (mL)	Keterangan
10	27,02	Dilarutkan dalam 100 mL aquades
20	54,054	Dilarutkan dalam 100 mL aquades
30	81,081	Dilarutkan dalam 100 mL aquades

4. Larutan glukosa standar

a. Larutan baku induk glukosa (1000 ppm)

100 mg glukosa dilarutkan dalam 100 mL aquades

b. Larutan standar

Dengan rumus pengenceran:

10 ppm : 0,5 mL larutan induk, diencerkan hingga 50 mL

20 ppm : 1 mL larutan induk, diencerkan hingga 50 mL

40 ppm : 2 mL larutan induk, diencerkan hingga 50 mL

60 ppm : 3 mL larutan induk, diencerkan hingga 50 mL

80 ppm : 4 mL larutan induk, diencerkan hingga 50 mL

100 ppm : 5 mL larutan induk, diencerkan hingga 50 mL

120 ppm : 6 mL larutan induk, diencerkan hingga 50 mL

140 ppm : 7 mL larutan induk, diencerkan hingga 50 mL

160 ppm : 8 mL larutan induk, diencerkan hingga 50 mL

5. Larutan protein standar

a. Larutan baku induk protein (10 mg/mL)

1 g albumin dilarutkan dalam 100 mL aquades

b. Larutan standar

Dengan rumus pengenceran:

1 mg/mL : 1 mL larutan induk, diencerkan hingga 10 mL


2 mg/mL : 2 mL larutan induk, diencerkan hingga 10 mL

3 mg/mL : 3 mL larutan induk, diencerkan hingga 10 mL

4 mg/mL : 4 mL larutan induk, diencerkan hingga 10 mL

5 mg/mL : 5 mL larutan induk, diencerkan hingga 10 mL

Lampiran 9. Analisis Lignin dan Selulosa





Lab. Chem-Mix Pratama


HASIL ANALISA
 Nomor: 818/CMP/12/2014
 Laboratorium Pengujian : Laboratorium Chem-Mix Pratama
 Tanggal Pengujian : 8 Desember 2014

No	Kode Sample	Analisa	Ulangan 1 %	Ulangan 2 %
	Alga Merah G Verrucosa	Selulosa	4,5241	4,4323
		Lignin	3,2373	3,1303
	Alga Merah G Verrucosa (Delignifikasi)	Selulosa	5,4220	5,3966
		Lignin	2,4463	2,5500

Diperiksa oleh penyelia,

Analisis



(Fifit Indriastuti)

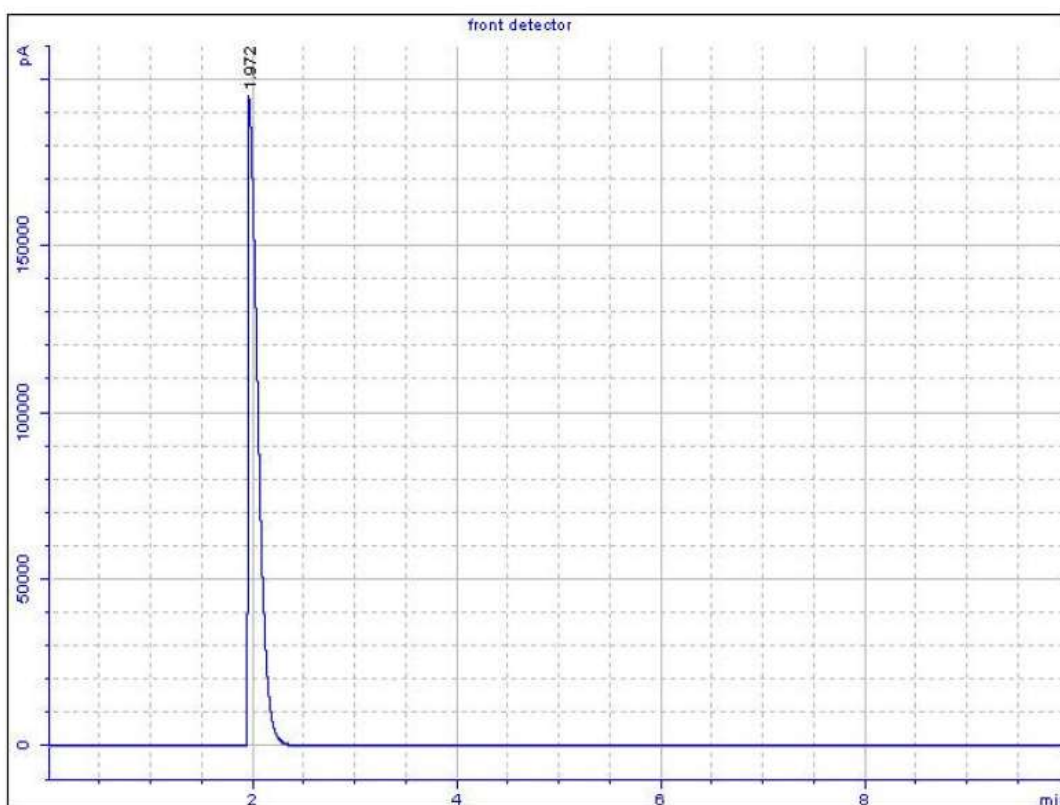
Laboratorium : Kretek, Jambidan, Banguntapan, Bantul, Yogyakarta
 Telp. (0274) 7116832

Lampiran 10. Hasil Analisis Distilat dengan GC

Etanol *Pro Analysis*

Agilent Certity QA/QC Report

Sample name:	*Reprocessed: SAMPLE-21
Sample note:	Ethanol Absolute
Submission time:	Tuesday, November 18, 2014 12:23:13 PM
Operator:	
Injection date:	Tuesday, November 18, 2014 12:26:33 PM
GC Description:	GC1 - SN: CN10713006
Signal description:	FID1 A, front detector
Method:	BIOETHANOL
Method last saved:	Wednesday, November 19, 2014 9:23:20 AM

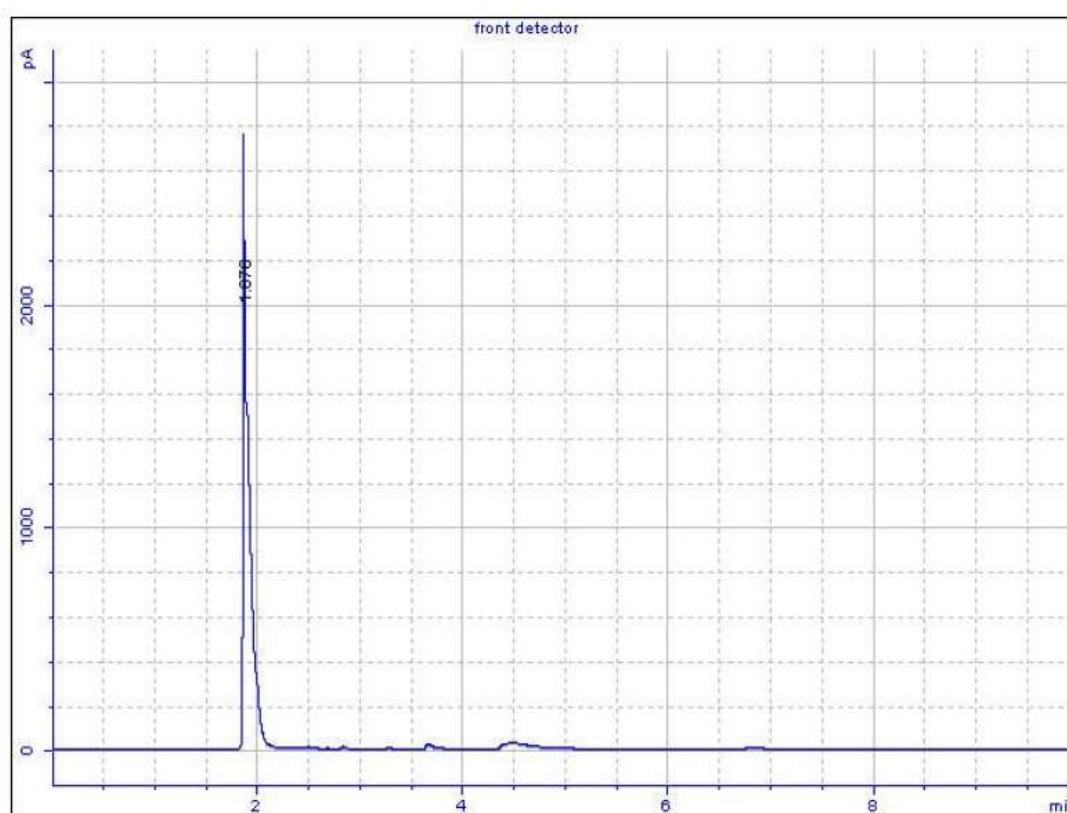


Signal	Retention Time [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Area %
1	1.972	PB S	0.101	1301607.46715	100.00000

Hasil Hidrolisis Enzimatik

Agilent Cerity QA/QC Report

Sample name:	*Reprocessed: Sample-1
Sample note:	Firstyarikha- bioethanol hidr.enzim
Submission time:	Tuesday, January 06, 2015 7:59:53 AM
Operator:	
Injection date:	Tuesday, January 06, 2015 8:11:43 AM
GC Description:	GC1 - SN: CN10713006
Signal description:	FID1 A, front detector
Method:	BIOETHANOL
Method last saved:	Wednesday, January 07, 2015 1:41:52 PM

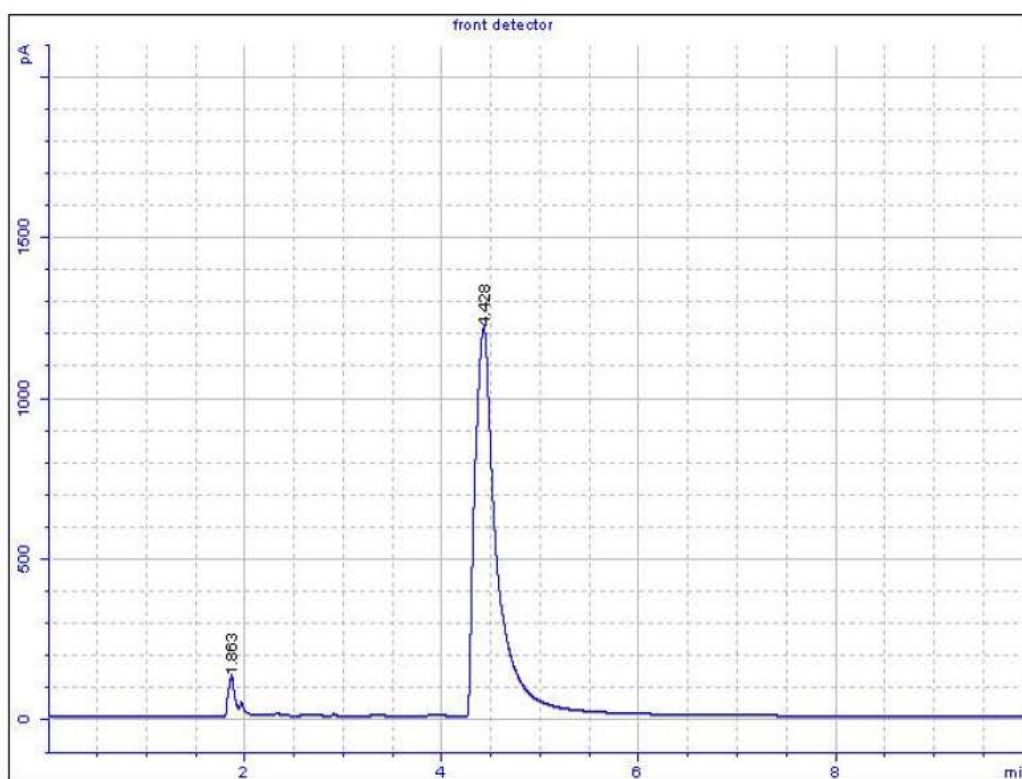


Signal	Retention Time [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Area %
1	1.876	PV	0.069	10464.57497	100.00000

Hasil Hidrolisis Kimiawi

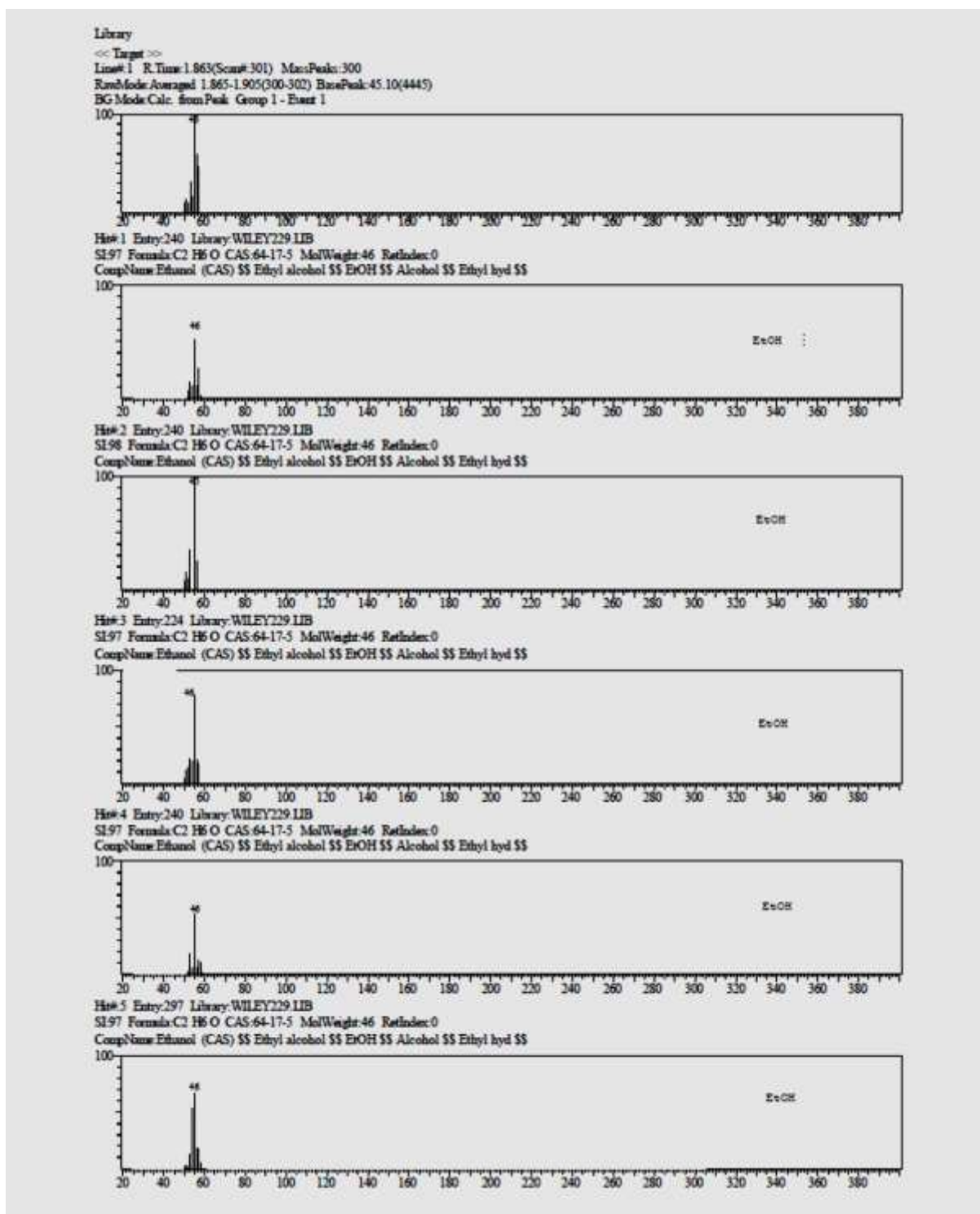
Agilent Cerity QA/QC Report

Sample name:	*Reprocessed: Sample-2
Sample note:	Firstyarikha- bioethanol Alga merah
Submission time:	Tuesday, January 06, 2015 8:12:23 AM
Operator:	
Injection date:	Tuesday, January 06, 2015 8:26:53 AM
GC Description:	GC1 - SN: CN10713006
Signal description:	FID1 A, front detector
Method:	BIOETHANOL
Method last saved:	Wednesday, January 07, 2015 1:43:16 PM



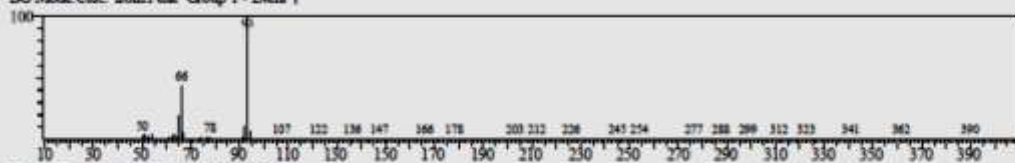
Signal	Retention Time [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Area %
1	1.863	PV	0.092	774.15001	3.83143
1	4.428	VB	0.240	19431.08936	96.16857

Lampiran 11. Hasil Analisis Distilat dengan MS



<< Target >>

List# 2 R-Time: 4.065 (Scan# 818) MassPeak: 180
 RunMode: Averaged 4.080-4.090 (817-819) BasePeak: 93.15 (23428)
 BG Mode: Calc. from Peak Group 1 - Event 1



Hit# 1 Entry: 147681 Library: WILEY7.LIB

SI: 96 Formula: C14 H18 N2 SI CAS: 13435-09-1 MolWeight: 242 RefIndex: 0

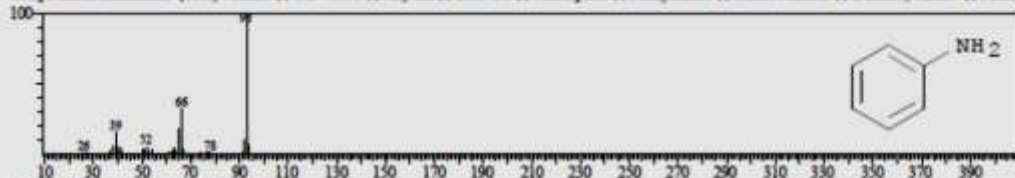
CompName: Sibromazine, 1,1-dimethyl-N,N-diphenyl- (CAS) Bis(phenylamino)dimethylamine SS



Hit# 2 Entry: 4765 Library: WILEY7.LIB

SI: 96 Formula: C6 H7 N CAS: 62-53-3 MolWeight: 93 RefIndex: 0

CompName: Benzenamine (CAS) Aniline SS C.I. 76000 SS Anyvim SS Blue Oil SS Aminophen SS Phenylamine SS Anzino benzene SS Benzene, amino- SS Anilin



Hit# 3 Entry: 4763 Library: WILEY7.LIB

SI: 96 Formula: C6 H7 N CAS: 62-53-3 MolWeight: 93 RefIndex: 0

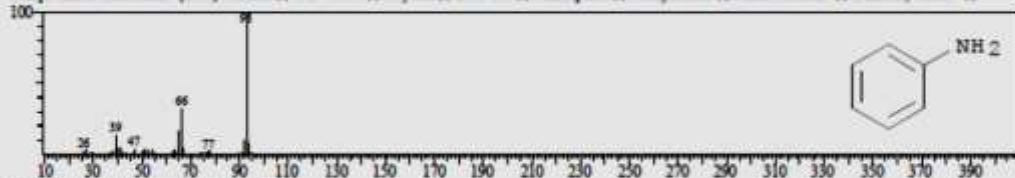
CompName: Benzenamine (CAS) Aniline SS C.I. 76000 SS Anyvim SS Blue Oil SS Aminophen SS Phenylamine SS Anzino benzene SS Benzene, amino- SS Anilin



Hit# 4 Entry: 4764 Library: WILEY7.LIB

SI: 96 Formula: C6 H7 N CAS: 62-53-3 MolWeight: 93 RefIndex: 0

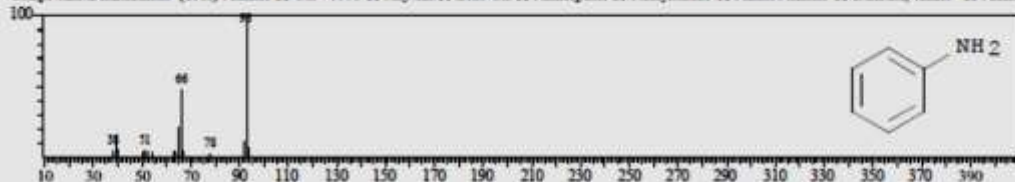
CompName: Benzenamine (CAS) Aniline SS C.I. 76000 SS Anyvim SS Blue Oil SS Aminophen SS Phenylamine SS Anzino benzene SS Benzene, amino- SS



Hit# 5 Entry: 4771 Library: WILEY7.LIB

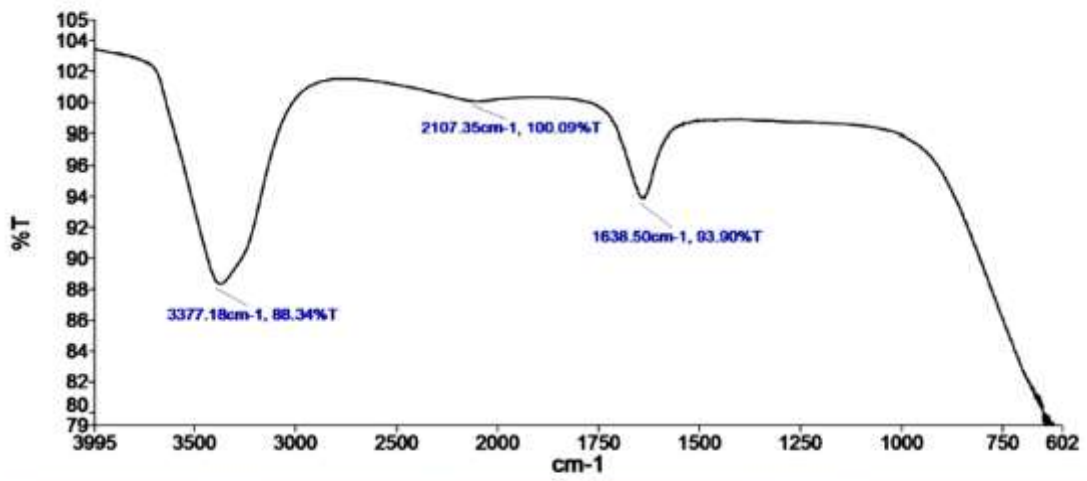
SI: 95 Formula: C6 H7 N CAS: 62-53-3 MolWeight: 93 RefIndex: 0

CompName: Benzenamine (CAS) Aniline SS C.I. 76000 SS Anyvim SS Blue Oil SS Aminophen SS Phenylamine SS Anzino benzene SS Benzene, amino- SS Anilin



Lampiran 12. Hasil Analisis Distilat dengan IR

Spectrum



Name	Description
— firstyanikha	kimiawi