

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Ganggang Hijau

Ganggang atau alga merupakan kelompok tumbuhan yang berklorofil yang terdiri dari satu atau banyak sel dan berbentuk koloni. Di dalam alga terkandung bahan-bahan organik seperti polisakarida, hormon, vitamin, mineral, dan juga senyawa bioaktif. Sejauh ini pemanfaatan alga sebagai komoditi perdagangan atau bahan baku industri masih relatif kecil jika dibandingkan dengan keanekaragaman jenis alga yang ada di Indonesia. Padahal komponen kimiawi yang terdapat dalam alga sangat bermanfaat bagi bahan baku industri makanan, kosmetik, farmasi dan lain-lain.



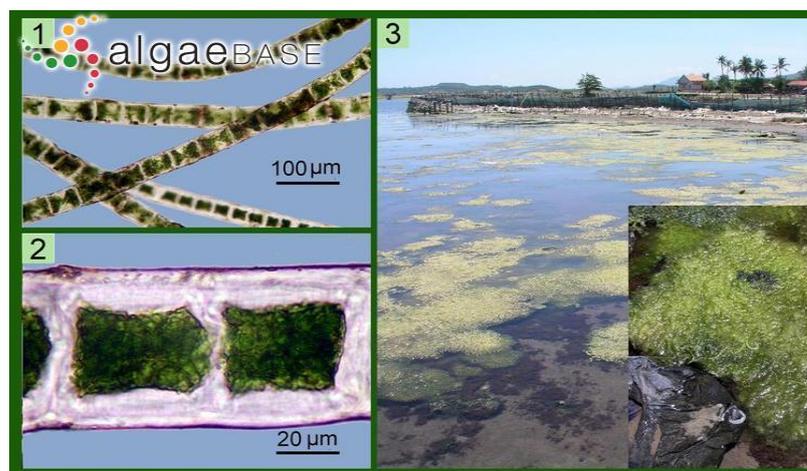
Gambar 1. Ganggang Hijau *Cladophora Sp*  
Sumber : [www.algaebase.org](http://www.algaebase.org)

Alga berperan sebagai produsen dalam ekosistem. berbagai jenis alga yang hidup bebas di air terutama tubuhnya yang bersel satu dan dapat berperan aktif merupakan penyusun fitoplankton. Sebagiaian besar fitoplankton adalah anggota alga hijau, pigmen klorofil yang dimilikinya efektif melakukan fotosintesis sehingga alga hijau merupakan produsen utama dalam ekosistem perairan.

Ganggang hijau / Chlorophyta adalah salah satu kelas dari ganggang berdasarkan zat warna atau pigmentasinya. Ganggang hijau ada yang bersel tunggal dan ada pula yang bersel banyak berupa benang, lembaran atau membentuk koloni spesies ganggang hijau yang bersel tunggal ada yang dapat berpindah tempat, tetapi ada pula yang menetap. Alga hijau merupakan kelompok terbesar dari vegetasi algae. Alga hijau berbeda dengan divisi lainnya karena memiliki warna hijau yang jelas seperti tumbuhan tingkat tinggi karena mengandung pigmen klorofil a dan klorofil b lebih dominan dibandingkan karoten dan xantofit.

### 2.1.1 Habitat Ganggang Hijau

Ganggang hijau merupakan golongan terbesar diantara ganggang dan sebagian besar hidup di air tawar beberapa diantaranya hidup di air laut dan air payau. Pada umumnya melekat pada batuan dan seringkali muncul apabila air menjadi surut. Jenis yang hidup di air tawar, bersifat kosmopolit, terutama hidup di tempat yang cahayanya cukup seperti kolam, danau, genangan air, Alga hijau ditemukan pula pada lingkungan semi akuatik yaitu pada batu-batuan, tanah lembab dan kulit batang pohon yang lembab. Beberapa anggotanya hidup di air mengapung atau melayang, sebagian hidup sebagai plankton. Beberapa jenis ada yang hidup melekat pada tumbuhan atau hewan.



Gambar 2. Habitat Ganggang Hijau  
Sumber : [www.algaebase.org](http://www.algaebase.org)

Dampak positif dan negatif ganggang hijau dalam kehidupan yaitu :

a. Dampak positif

1. Sebagai sumber protein sel tunggal.
2. Sebagai plankton, merupakan salah satu komponen yang penting dalam rantai makanan di perairan tawar.
3. Menghasilkan O<sub>2</sub> (oksigen) dan hasil fotosintesis yang diperlukan oleh hewan lain untuk bernafas.

b. Dampak negatif

1. Membuat air berubah warna dan menjadi bau.
2. Menjadi masalah dalam proses penjernihan air.
3. Menyebabkan penyumbatan pada saringan pengolahan air.

### 2.1.2 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan Alga

Pertumbuhan alga dapat dipengaruhi oleh faktor eksternal seperti faktor lingkungan. Faktor lingkungan yang mempengaruhi laju pertumbuhan alga diantaranya adalah suhu, cahaya, pH, dan konsentrasi elemen-elemen esensial atau nutrisi yang dipakai untuk fotosintesis.

a. Suhu

Suhu juga sangat berperan mengendalikan kondisi ekosistem perairan. Organisme akuatik memiliki kisaran suhu tertentu (batas atas dan batas bawah) yang disukai bagi pertumbuhannya. misalnya alga dari filum Chlorophyta akan tumbuh dengan baik pada kisaran suhu 20°C-30°C (Goldman & Horne 1983). Skala suhu untuk pertumbuhan alga *Cladophora* antara 15°C-25°C (Harris 2005 *in* Summers 2008).

b. Cahaya

Cahaya sangat mempengaruhi tingkah laku organisme akuatik. Alga planktonik menunjukkan respon yang berbeda terhadap perubahan intensitas cahaya. Pigmen klorofil menyerap cahaya biru dan merah, karoten menyerap

cahaya biru Menurut Wells *et al.* (1999), di perairan cahaya memiliki dua fungsi utama yaitu memanasi air sehingga terjadi perubahan suhu dan berat jenis (densitas) dan selanjutnya menyebabkan terjadinya pencampuran massa dan kimia air, dan merupakan sumber energi bagi proses fotosintesis alga dan tumbuhan air. Beberapa filamen alga mulai tumbuh kurang dari satu meter dengan penetrasi cahaya yang sampai ke dasar kolam (Pennstate 2006). dan hijau, fikocerin menyerap warna hijau, dan fikosianin menyerap cahaya kuning.

#### c. pH

pH juga mempengaruhi toksisitas suatu senyawa kimia. Senyawa amonium yang dapat terionisasi banyak ditemukan pada perairan yang memiliki pH rendah. Amonium bersifat tidak toksik. Namun, pada suasana alkalis (pH tinggi) lebih banyak ditemukan amonia yang tak terionisasi dan bersifat toksik (Tebbut 1992). Pada pH kurang dari 4, sebagian besar tumbuhan air mati karena tidak dapat bertoleransi terhadap pH rendah (Haslam 1995). Fitoplankton dapat berkembang pada kisaran pH 6,5 sampai dengan 8 (Goldman & Horne 1983)

#### d. Nutrien

Suplai nutrien berasal dari hasil dekomposisi bahan organik dan regenerasi dari nutrien, dan oleh pengadukan vertikal air yang memungkinkan sediaan nutrien yang tersimpan di lapisan air di bawah dapat dimanfaatkan di lapisan air permukaan. Asimilasi nutrien untuk pertumbuhan tumbuhan akan mengurangi konsentrasinya di perairan, yang kelak pada saat nutrien sangat rendah maka laju produksi menjadi terbatas. Riley *et al.* (1949) in Goldman & Horne (1983) menyatakan bahwa laju. populasi fitoplankton di perairan dibatasi oleh konsentrasi fosfat bila ketersediaan fosfat tersebut kuantitasnya kurang dari kebutuhan untuk lima hari untuk pertumbuhan populasi. Nitrogen dan Fosfor akan menyatu di dalam struktur sel alga dengan rasio N:P yaitu 16:1 (Redfield 1958 in Summers 2008).

### 2.1.3 *Cladophora* sp.

*Cladophora* adalah alga hijau yang berbentuk seperti benang bercabang hijau. Bentuk benang atau jarringnya sangat kuat dan sangat tipis. Ditemukan secara alami terjadi di sepanjang pantai danau dan sungai. Ini tumbuh terendam menempel di batu, jatuh kayu apung, tanaman bawah air dan permukaan keras lainnya. Seperti tumbuh, ia memiliki kecenderungan untuk mengumpulkan puing-puing mengambang dan akhirnya melepaskan dari rumah bawah lautnya karena kurangnya sinar matahari menembus daerah yang lebih rendah. Tubuh *Cladophora* dominan berwarna hijau, yang telah tua berwarna agak kecoklatan.

Pada ganggang hijau jenis *Cladophora*, sel-selnya berinti banyak, kloroplas berbentuk jala dengan pirenoid-pirenoid membentuk koloni berupa benang-benang yang bercabang, menjadi suatu berkas, hidup dalam air tawar yang mengalir atau dalam air laut, dan biasanya berkas benang-benang itu melekat pada suatu substrat. Berkembang biak secara vegetatif dengan zoospora dan generatif dengan isogami.

Klasifikasi tumbuhan ganggang hijau (*Cladophora Sp*) sebagai berikut :

*Empire* : *Eukaryota*

*Kingdom* : *Plantae*

*Phylum* : *Chlorophyta*

*Kelas* : *Ulvophyceae*

*Ordo* : *Cladophorales*

*Family* : *Cladophoraceae*

*Genus* : *Cladophora*

*Species* : *Cladophora vadorum*

Sumber : [www.algaebase.org](http://www.algaebase.org)

Tabel 1. Komposisi Kimia *Cladophora* sp.

Komposisi kimia	% (Massa)
Karbohidrat	52,54-60,98%
Lemak	2,04-2,56%
Protein	10,72-17,69%
Abu	14,71-16,86%
Selulosa	51 %

Sumber : Maddi et al. (2011)

#### Sifat- sifat umum dan khusus *Cladophora*

##### a. sifat- sifat umum

1. Ganggang ini bersifar kering dan tidak berlendir
2. Tumbuh pada batu dan kayu yang terendam dan terkena cahaya langsung dalam kondisi yang sangat buruk akan tumbuh pada tanaman juga. Biasanya Cenderung tinggal di satu titik, yang membuatnya mudah untuk dihilangkan.

##### b. sifat- sifat khusus

1. Sel-selnya berinti banyak, bercabang (filament)
2. Kloroplas berbentuk jala dengan pirenoid-pirenoid membentuk koloni berupa Benang-benang yang bercabang menjadi suatu berkas.
3. Hidup dalam air tawar yang mengalir atau dalam air laut, dan biasanya benang-benang itu melekat pada substrat.

#### 2.1.4 Lignoselulosa

Bahan lignoselulosa merupakan biomassa yang berasal dari tanaman dengan komponen utama lignin, selulosa, dan hemiselulosa (Fujita dan Harada, 1991). 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). Selulosa adalah senyawa kerangka yang menyusun 40% - 50% bagian kayu dalam bentuk selulosa mikrofibril, di mana hemiselulosa adalah senyawa matriks yang berada di antara mikrofibril mikrofibril selulosa. Lignin, di lain pihak adalah senyawa yang keras yang menyelimuti dan mengeraskan dinding sel. Salah satu proses konversi bahan lignoselulosa yang banyak diteliti adalah proses konversi lignoselulosa menjadi etanol generasi kedua yang selanjutnya dapat digunakan untuk mensubstitusi bahan bakar bensin untuk keperluan transportasi.

### **2.1.5 Hemiselulosa**

Hemiselulosa merupakan istilah umum bagi polisakarida yang larut dalam alkali. Hemiselulosa sangat dekat asosiasinya dengan selulosa dalam dinding sel tanaman (Fengel dan Wegener, 1984; Howard dkk. 2003). Hemiselulosa merupakan polisakarida yang mempunyai berat molekul lebih kecil daripada selulosa. Molekul hemiselulosa lebih mudah menyerap air, bersifat plastis, dan mempunyai permukaan kontak antar molekul yang lebih luas dari selulosa (Oshima, 1965).

Berbeda dengan selulosa yang hanya tersusun atas glukosa, hemiselulosa tersusun dari bermacam-macam jenis gula. Lima gula netral, yaitu glukosa, mannanosa, dan galaktosa (heksosan) serta xilosa dan arabinosa (pentosan) merupakan konstituen utama hemiselulosa (Fengel dan Wegener, 1984). Berbeda dari selulosa yang merupakan homopolisakarida dengan monomer glukosa dan derajat polimerisasi yang tinggi (10.000– 14.000 unit), rantai utama hemiselulosa dapat terdiri atas hanya satu jenis monomer (homopolimer), seperti xilan, atau terdiri atas dua jenis atau lebih monomer (heteropolimer), seperti glukomannan. Rantai molekul hemiselulosa pun lebih pendek daripada selulosa.

### **2.1.6 Selulosa**

Selulosa adalah polimer glukosa yang membentuk rantai linier dan dihubungkan oleh ikatan  $\beta$ -1,4 glikosidik. Struktur yang linier menyebabkan selulosa bersifat kristalin dan tidak mudah larut. Selulosa tidak mudah didegradasi secara kimia maupun mekanis. Di alam, biasanya selulosa berasosiasi dengan

polisakarida lain seperti hemiselulosa atau lignin membentuk kerangka utama dinding sel tumbuhan (*Holtzapfle, 1993*).

Kebanyakan selulosa berasosiasi dengan lignin sehingga sering disebut sebagai lignoselulosa. Selulosa, hemiselulosa dan lignin dihasilkan dari proses fotosintesis. Pada saat yang sama, komponen-komponen utama penyusun tanaman ini diuraikan oleh aktifitas mikroorganisme. Beberapa mikroorganisme mampu menghidrolisis selulosa untuk digunakan sebagai sumber energi, seperti bakteri dan fungi (*Enari, 1983*). Rantai selulosa terdiri dari satuan glukosa anhidrida yang saling berikatan melalui atom karbon pertama dan keempat. Ikatan yang terjadi adalah ikatan  $\beta$ -1,4-glikosidik.

Selulosa dapat dikonversi menjadi produk-produk bernilai ekonomi yang lebih tinggi seperti glukosa, etanol dan pakan ternak dengan jalan menghidrolisis selulosa dengan bantuan selulase sebagai biokatalisator atau dengan hidrolisis secara asam/basa (*Ariestaningtyas, 1991*).

### **2.1.7 Lignin**

Lignin atau zat kayu adalah salah satu zat komponen penyusun tumbuhan. Komposisi bahan penyusun ini berbeda-beda bergantung jenisnya. Lignin merupakan zat organik polimer yang banyak dan yang penting dalam dunia tumbuhan. Lignin tersusun atas jaringan polimer fenolik yang berfungsi merekatkan serat selulosa dan hemiselulosa sehingga menjadi sangat kuat. (Sun dan Cheng, 2002). Struktur kimia lignin mengalami perubahan di bawah kondisi suhu yang tinggi dan asam. Pada reaksi dengan temperatur tinggi mengakibatkan lignin terpecah menjadi partikel yang lebih kecil dan terlepas dari selulosa (Tahezadeh dan Karimi, 2008). Saat ini biomassa lignoselulosa sedang dilirik untuk bahan baku pembuatan bahan bakar masa depan (etanol). Kandungan lignin merupakan salah satu penghambat utama biokonversi lignoselulosa menjadi etanol. Lignin melindungi selulosa, sehingga selulosa sulit untuk dihidrolisis menjadi glukosa. Proses pretreatment saat ini banyak dilakukan untuk memecah pelindung ini sehingga selulosa menjadi mudah dihidrolisis tanpa banyak kehilangan polysakaridanya.

## 2.2 Bioetanol

Bioetanol ( $C_2H_5OH$ ) adalah cairan biokimia dari proses fermentasi gula dari sumber karbohidrat menggunakan bantuan mikroorganisme. Etanol atau *etil alkohol* (lebih dikenal dengan alkohol, dengan rumus kimia  $C_2H_5OH$ ) adalah cairan tak berwarna dengan karakteristik antara lain mudah menguap, mudah terbakar, larut dalam air, tidak karsinogenik, dan jika terjadi pencemaran tidak memberikan dampak lingkungan yang signifikan. Penggunaan etanol sebagai bahan bakar bernilai oktan tinggi atau aditif peningkat bilangan oktan pada bahan bakar sebenarnya sudah dilakukan sejak abad 19. Mula-mula etanol digunakan untuk bahan bakar lampu pada masa sebelum perang saudara di Amerika Serikat. Kemudian pada tahun 1860 Nikolous Otto menggunakan bahan bakar etanol dalam mengembangkan mesin kendaraan dengan siklus Otto.

Etanol dan air membentuk larutan azeotrop. Karena itu pemurnian etanol yang mengandung air dengan cara penyulingan biasa hanya mampu menghasilkan etanol dengan kemurnian 98%. Etanol murni (absolute) dihasilkan pertama kali pada tahun 1796 oleh Johan Tobias Lowitz yaitu dengan cara menyaring alkohol hasil distilasi melalui arang.

Selama perang dunia II campuran etanol dan bensin telah digunakan di Eropa. Namun, setelah perang berakhir bioetanol kalah bersaing dengan bensin yang harganya lebih murah. Penggunaan campuran alkohol dan bensin digunakan lagi pada tahun 1970-an akibat embargo minyak Negara-negara Arab terhadap Negara-negara barat pada tahun 1973 yang menyebabkan krisis minyak. Pada tahun 1985 Brazil mengeluarkan program pencampuran 20% bioetanol dengan bensin untuk menghemat 40% konsumsi bensin.

Kelebihan-kelebihan bioetanol dibandingkan bensin :

1. Bioetanol aman digunakan sebagai bahan bakar, titik nyala etanol tiga kali lebih tinggi dibandingkan dengan bensin.
2. Emisi hidrokarbon lebih sedikit.

Kekurangan-kekurangan bioetanol dibandingkan bensin :

1. Mesin dingin lebih sulit melakukan starter
2. Bioetanol bereaksi dengan logam seperti magnesium dan aluminium.

Sebagai alternatif digunakan campuran bioetanol dengan bensin. Sebelum dicampur, bioetanol harus dimurnikan hingga 100%. Campuran ini dikenal dengan sebutan gasohol. Etanol dapat dibuat dengan beberapa cara sebagai berikut:

1. Etanol untuk konsumsi umumnya dihasilkan dengan proses fermentasi atau peragian bahan makanan yang mengandung pati atau karbohidrat, seperti beras dan umbi. Alkohol yang dihasilkan dari proses fermentasi biasanya berkadar rendah. Untuk mendapatkan alkohol dengan kadar yang lebih tinggi diperlukan proses pemurnian melalui penyulingan atau distilasi. Etanol untuk Keperluan industri dalam skala lebih besar dihasilkan dari fermentasi tetes, Yaitu hasil samping dalam industri gula tebu atau gula bit.
2. Melalui sintesa kimia melalui reaksi gas etilen dan uap air dengan asam sebaai katalis. Katalais yang dipakai misalnya asam fosfat, dan asam sulfat.

Seperti kita ketahui, etanol dikategorikan dalam 2 kelompok utama : (Rama prihandana,,dkk,2007)

- a. Etanol 95-96% v/v, disebut etanol berhidrasi yang dibagi dalam :
  1. *Technical / raw sprint grade*, yang digunakan untuk bahan bakar spirtus, disifektan dan pelarut.
  2. *Indsutrial grade*, digunakan untuk bahan baku industri dan pelarut.
  3. *Pot able grade*, untuk minuman berkualitas tinggi.
- b. Etanol >95,5% v/v, digunakan untuk bahan bakar. Jika dimurnikan lebih lanjut dapat digunakan untuk keperluan farmasi dan pelarut di laboratorium analisis. Etanol disebut fuel grade ethanol (FGE) atau anhidrous ethanol (etanol anhidrat) atau etanol kering, yakni etanol yang bebas air atau hanya mengandung air minimal.

Sifat fisika etanol dapat dilihat pada tabel 2

Tabel 2. Sifat Fisika Etanol

Sifat Fisika	Nilai
Massa molekul relatif	46,07 gram/mol
Titik beku	-114,1oC
Titik didih normal	78,32oC
Desitas pada 20 oC	0,7893 gram/ml
Kelarutan dalam air pada 20oC	sangat larut
Viskositas pada 20oC	1,17 Centipoise
Kalor spesifik pada 20oC	0,579 kal/gr oC
Kalor pembakaran pada 25oC	7092,1 kal/gr
Kalor pembakaran pada 25oC	200,6 kal/gr

Sumber : Rizani, 2000

Manfaat etanol dalam industri yaitu :

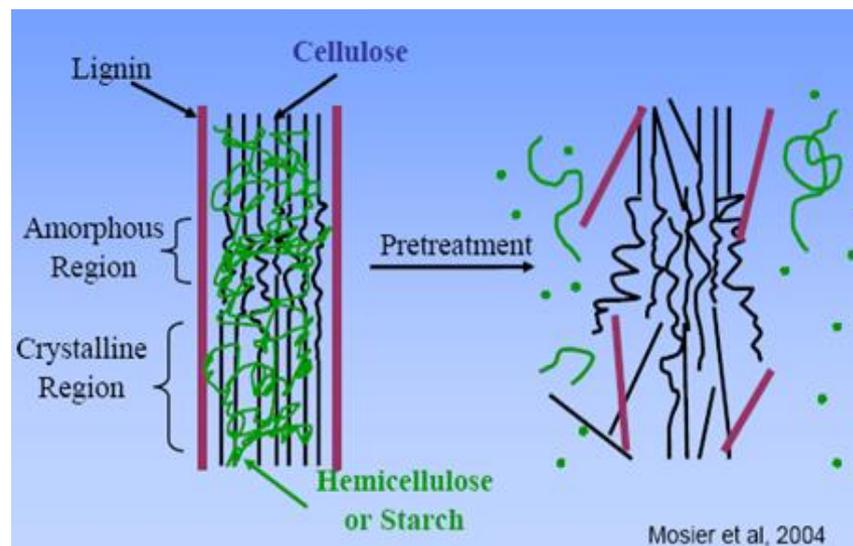
1. Sebagai bahan baku industri turunan alkohol
2. Sebagai bahan campuran untuk miras
3. Sebagai bahan dasar industri farmasi
4. Sebagai bahan campuran bahan bakar untuk kendaraan
5. Sebagai bahan baku indistri parfum
6. Sebagai bahan anti beku
7. Sebagai bahan pelarut organik

### **2.3 Pre Treatment**

*Pretreatment* biomassa ligniselulosa harus dilakukan untuk mendapatkan hasil yang tinggi dimana penting dimana penting untuk pengembangan teknologi biokonversi dalam skala komersial (Mosier, et al, 2005). Tujuan dari *pretreatment* adalah untuk membuka struktur ligniselulosa agar selulosa menjadi lebih mudah diakses oleh enzim yang memecah polymer polisakarida menjadi monomer gula.

*Pretreatment* mengubah struktur selulosa biomassa untuk membuat selulosa lebih mudah diakses enzim yang mengkonversi polimer karbohidrat.

Selanjutnya, ketika lignoselulosa adalah dipisahkan menjadi komponen-komponennya, dapat dihidrolisis menjadi gula difermentasi (Monosakarida) dengan menggunakan asam mineral atau enzim. Monosakarida kemudian dapat lebih dikonversi ke bahan kimia berbasis bio yang berharga (Kamm, 2004). Pretreatment dapat dilakukan secara kimia maupun fisik. Metode fisik yang dapat dilakukan adalah dengan menggunakan temperatur dan tekanan tinggi, penggilingan, radiasi, atau pendinginan, kesemuanya membutuhkan energi yang tinggi. Sedangkan metode pretreatment secara kimia menggunakan solven untuk memecah dan melarutkan lignin (metode delignifikasi) (Badger, 2002). Tujuan dari *pretreatment* adalah untuk memecahkan perisai lignin dan struktur kristal selulosa sementara meningkatkan porositas selulosa. Tujuan *pretreatment* secara skematis ditunjukkan oleh gambar 3 dibawah ini.



**Gambar 3.** Efek pretreatment terhadap stuktur biomassa lignoselulosa  
 Sumber : (Mosier et al. 2004)

## 2.4 Hidrolisis

Hidrolisis meliputi proses pemecahan polisakarida di dalam biomassa ligniselulosa, yaitu selulosa dan hemiselulosa menjadi monomer gula penyusunnya. Hidrolisis sempurna selulosa menghasilkan glukosa, sedangkan

hemiselulosa menghasilkan beberapa monomer gula pentose (C5) dan Heksosa (C6). Hidrolisis dapat dilakukan secara kimia (asam) atau enzimatik.

Didalam metode hidrolisis asam, biomassa ligniselulosa dipaparkan dengan asam pada suhu dan tekanan tertentu selama waktu tertentu, dan menghasilkan monomer gula dari polimer selulosa dan hemiselulosa. Beberapa asam yang umum digunakan untuk hidrolisis asam antara lain adalah asam sulfat ( $H_2SO_4$ ) dan asam klorida (HCl). Asam sulfat merupakan asam yang paling banyak digunakan dan dimanfaatkan untuk hidrolisis asam.

## 2.5 Sterilisasi

Sterilisasi merupakan suatu proses untuk mematikan semua mikroba dan merusak spora (sel yang tidak aktif yang lebih resisten terhadap panas dibandingkan dengan sel vegetatif mikroorganisme) sehingga tidak ada lagi mikroba yang dapat berkembang biak pada medium yang akan dipakai pada pembuatan etanol.

Sterilisasi perlu dilakukan karena kontaminasi mikroba lain akan membeikan dampak yang merugikan yaitu;

- a. Kontaminan meningkatkan persaingan di dalam mengkonsumsi substrat.
- b. Kontaminan dapat menghambat proses metabolisme sel.

Prosedur sterilisasi cukup beranekragam tergantung prosedur mana sterilisasi mungkin berhasil. Pada prinsipnya sterilisasi dapat dilakukan dengan tiga cara, yaitu :

### 1. Mekanik

Menggunakan suatu saringan yang berpori sangat kecil ( 0,22 mikron atau 0,45 mikron) sehingga mikroba tertahan dalam saringan tersebut. Proses ini ditujukan untuk sterilisasi bahan yang peka terhadap panas, misalnya larutan enzim dan antibiotik.

### 2. Fisik

#### a. Pemanasan Basah

- Panas Lembab (Pemansan dengan tekanan)

Proses sterilisasi dengan menggunakan panas ini sangat tergantung pada waktu dan suhu sterilisasi. Suhu sterilisasi bergantung pada tekanan uap, biasanya suhu uap adalah  $100^{\circ}\text{C}$ , mensterilkan pada suhu ini akan diperlukan waktu yang sangat lama mungkin berjam – jam. Namun apabila uap dibatasi dalam bejana yang tertutup, tekanannya akan naik, dan suhu uap akan naik dengan sebanding.

#### - Air Mendidih (Perebusan)

Bentuk vegetative organism pathogen segera dirusak pada suhu air mendidih ( $100^{\circ}\text{C}$ ). biasanya organisme akan mati dalam waktu beberapa menit pada suhu  $80^{\circ}\text{C}$ , namun beberapa endospora bakteri memperlihatkan ketahanan luar biasa terhadap panas, dan mungkin bertahan hidup pada suhu air mendidih sampai 20 jam.

#### - Pasteurisasi

Pasteurisasi yaitu proses pemanasan pada suhu dan waktu tertentu dimana semua pathogen yang berbahaya bagi manusia akan terbunuh. Pasteurisasi dapat dilakukan pada suhu yang relative rendah dalam waktu yang lama yaitu  $65^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit, atau pada suhu tinggi dalam waktu singkat yaitu  $72^{\circ}\text{C}$  selama 15 detik. Setelah pasteurisasi, produk harus didinginkan dengan cepat untuk mencegah pertumbuhan bakteri yang masih hidup.

#### b. Pemanasan Kering (Sterilisasi Panas – Kering)

Sterilisasi ini kurang efektif untuk membunuh bakteri karena menyebabkan dehidrasi sel. Pemanasan ini sering menggunakan oven dengan sistem udara statis. Sterilisasi panas – kering memerlukan suhu yang lebih tinggi untuk keefektifan penuh dari sterilisasi uap.

#### c. Radiasi

radiasi didefinisikan sebagai transmisi energi melalui ruangan. Semua bentuk radiasi dapat merusak mikroorganisme, yaitu dapat menyebabkan kematian. Dua kelompok utama radiasi yang telah digunakan untuk mengendalikan mikroorganisme adalah radiasi pengionan ( sinar-X, sinar Gamma, dan Sinar Katode) dan sinar Ultra Violet.

### 3. Kimia

Menggunakan senyawa disinfektan misalnya alkohol (Elina Margaretty,2007).

#### 2.6 Starter

Starter merupakan bibit dari mikroorganisme. Starter untuk membuat bioetanol biasanya menggunakan biakan murni *sacharomyces cerevisiae*, selain itu dapat juga digunakan ragi. Adapun ragi yang digunakan pada pembuatan bioetanol dari ganggang hijau yaitu ragi roti.

*Sacharomyces cerevisiae* merupakan mikroorganisme yang paling banyak digunakan pada fermentasi pembuatan alkohol karena cepat berkembang biak, tahan terhadap kadar alkohol yang tinggi, tahan terhadap suhu yang tinggi, mempunyai sifat stabil dan mudah beradaptasi dengan media fermentasi dengan media fermentasi.

Menurut Kastini, 1992 starter ini dibuat dengan menambahkan mikroba yang telah dibiarkan dalam media pembiakan kedalam media fermentasi. Starter yang ditambahkan pada substrat atau media fermentasi sebanyak 10% dari volume substrat (Judoamidjojo,1992). Makin banyak jumlah starter yang ditambahkan makin baik karena hal ini akan dapat mempersingkat fase adaptasi. Media kompleks pada umumnya untuk starter dan fermentasi terdiri atas, glukosa 8-10%, yeast 0,6%, Urea 0,15%,  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  0,02%,  $\text{KNO}_3$  0,02% (Vullo dan Vachsman, 2005). Tujuan dibiakkannya ragi dalam starter adalah mengadaptasikan sel dalam media fermentasi. Dengan adanya adaptasi pada starter ini diharapkan sebagai tahap awal fermentasi.

#### 2.7 Fermentasi

Fermentasi merupakan proses unik yang dilakukan oleh mikroba, yakni cepat, murah, aman, hemat energi dan nilai organoleptik ( nilai yang dapat dirasakan oleh lidah) rata-rata sesuai dengan selera (Waluyi,2004). Fermentasi adalah proses mikrobiologi yang dikendalikan oleh manusia untuk memperoleh

produk, dimana terjadi pemecahan karbohidrat dan asam amino secara anaerob (Perry,1996).

Fermentasi adalah proses produksi energi dalam sel dalam keadaan anaerobik (tanpa oksigen). Secara umum, Fermentasi adalah salah satu bentuk respirasi anaerobik, akan tetapi, terdapat definisi yang lebih jelas mendefinisikan fermentasi sebagai respirasi dalam lingkungan anaerobik dengan tanpa akseptor electron eksternal. Fermentasi alkohol secara sederhana, berlangsung sebagai berikut (Rinzani,2000):



Proses fermentasi yang dilakukan adalah proses fermentasi yang tidak menggunakan oksigen atau proses anaerob. Cara pengaturan produksi etanol dari gula cukup kompleks, konsentrasi substrat, oksigen, dan produk etanol, semua mempengaruhi metabolisme khamir, daya hidup sel, pertumbuhan sel, pembelahan sel, dan produksi etanol. Seleksi galur khamir yang cocok dan mempunyai toleransi yang tinggi terhadap baik konsentrasi, substrat ataupun alkohol merupakan hal yang penting untuk peningkatan hasil (Isroi,2008).

Fermentasi pertama kalinya dilakukan perlakuan dasar terhadap bibit fermentasi atau perispan starter. Dimana starter diinokulasikan sampai benar-benar siap menjadi umpan fermentasi, baru dimasukkan kedalam substrat yang akan di fermentasi. Bibit fermentasi yang biasa digunakan adalah *Saccharomyces cerevisiae*.

*Saccharomyces cerevisiae* mempunyai ciri-ciri sebagai berikut:

- Mempunyai bentuk sel yang bulat, pendek oval, atau oval.
- Mempunyai ukuran sel (4,2-6,6) x (5-11) micron dalam waktu tiga hari pada 25° C dan pada media agar.
- Dapat bereproduksi dengan cara penyembulan atau multilateral.
- Mampu mengubah glukosa dengan baik.
- Dapat berkembang dengan baik pada suhu antara 20-30°C

Gula adalah bahan yang umum dalam fermentasi. Beberapa contoh hasil fermentasi adalah etanol, asam laktat, dan hydrogen, akan tetapi beberapa

komponen lain dapat juga dihasilkan dari fermentasi seperti asam butirat dan aseton (Wikipedia.co.id).

Ragi dikenal sebagai bahan yang umum digunakan dalam fermentasi untuk menghasilkan etanol dalam bir, anggur dan minuman beralkohol lainnya. Ragi yang sering digunakan dalam industri fermentasi etanol adalah *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces* dapat tumbuh dengan baik dalam kondisi aerob maupun anaerob. Tapi dalam kondisi anaerob, ragi akan memfermentasikan substrat menjadi gula sangat cepat dan akan segera dikonversi menjadi etanol. Seperti yang telah kita ketahui bahwa ternyata didalam udara masih banyak terdapat spora-spora bakteri dan mikroorganisme hidup. Agar tidak mengganggu jalannya fermentasi yang utama, maka semua spora maupun mikroorganisme yang ada dalam udara harus dihilangkan terlebih dahulu. Penghilangan mikroorgansime dilakukan dengan cara sterilisasi (Hidayat,2006).

Faktor-faktor yang mempengaruhi fermentasi etanol yaitu :

#### 1. Ragi

Ragi merupakan kunci keberhasilan atau kegagalan suatu fermentasi termasuk fermentasi ganggang hijau dalam menghasilkan etanol. kriteria pemilihan khamir untuk produksi etanol adalah mempunyai laju fermentasi dan laju pertumbuhan cepat, perolehan etanol banyak, tahan terhadap konsentrasi etanol dan glukosa tinggi, tahan terhadap konsentrasi garam tinggi, pH optimum fermentasi rendah, serta tahan terhadap stres fisika dan kimia (Meidyawati,1997).

Ada beberapa jenis ragi yang mempunyai kemampuan untuk menghasilkan etanol, namun hampir 95% fermentasi melibatkan *Saccharomyces cereviceae*. Khamir ini dipilih karena tahan terhadap konenstrasi asam yang relative tinggi sampai batas tertentu, dapat tumbuh dengan cepat, serta mampu menghasilkan etanol dalam jumlah relatif banyak. Pemanfaatan *Saccharomyces cereviceae* untuk pembuatan etanol dapat menghasilkan 18-20% (v/v) dalam keadaan optimum (Hidayat,2006).

## 2. Nutrisi

Pada proses fermentasi, mikroorganisme sangat memerlukan nutrisi yang baik agar dapat diperoleh hasil fermentasi yang baik, yaitu berupa etanol. Nutrisi merupakan faktor yang cukup penting karena nutrisi dibutuhkan untuk pertumbuhan mikroorganisme.

Fungsi nutrisi yaitu antara lain : urea sebagai sumber nitrogen untuk pembentukan asam nukleat dan asam amino,  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  sebagai sumber fosfat untuk sintesis asam nukleat,  $\text{KNO}_3$  sebagai sumber K untuk kofaktor enzim, dan  $\text{MgSO}_4$  sebagai sumber Mg menjaga stabilitas ribosom dan dinding sel, sekaligus kofaktor enzim (Jaksen,2007).

## 3. Oksigen

Ketersediaan oksigen harus diatur selama proses fermentasi. Hal ini berhubungan dengan sifat mikroorganisme yang digunakan. Contoh khamir dalam pembuatan anggur dan roti biasanya membutuhkan oksigen selama proses fermentasi berlangsung, sedangkan untuk bakteri-bakteri penghasil asam tidak membutuhkan oksigen selama proses fermentasi berlangsung.

## 4. Derajat keasaman

Pada umumnya pH untuk fermentasi *Saccharomyces cerevisiae* dapat tumbuh dengan baik pada pH 4-5 (wijayana,1991).

## 5. Waktu Fermentasi

Waktu fermentasi biasanya ditentukan pada jenis bahan, jenis ragi, dan gula. Pada umumnya diperlukan waktu 3 sampai 7 hari untuk memperoleh hasil fermentasi yang sempurna.

## 6. Suhu

Suhu untuk tiap-tiap golongan mikroorganisme memiliki suhu pertumbuhan yang optimum berbeda-beda. Umumnya diperlukan suhu sekitar 20-32°C untuk pertumbuhan mikroorganisme, bila suhu kurang dari 20-32°C

pertumbuhan mikroorganisme penghasil asam akan lambat sehingga tidak dapat terjadi pertumbuhan produk. Untuk *Saccharomyces cereviceae* suhu untuk menghasilkan produk optimum adalah 28-32°C.

#### 7. Kada Gula

Gula yang digunakan dalam pembuatan starter bertujuan untuk memperoleh kadar etanol yang lebih tinggi. Tetapi bila kadar gula terlalu sedikit maka aktivitas khamir akan terhambat. Kadar gula yang optimum untuk aktivitas pertumbuhan khamir adalah 10 sampai 18% (Isroi,2008). Apabila kadar glukosa melebihi 25% maka akan meperlambat proses fermentasi dan apabila melebihi 70% maka fermentasi akan berhenti. Faktor-faktor yang dapat menyebabkan berhentinya pertumbuhan mikroba antara lain :

1. Penyusutan konsentrasi nutrisi yang dibutuhkan dalam pertumbuhan mikroba karena habis dikonsumsi.
2. Produk akhir metabolisme yang menghambat pertumbuhan mikroba karena terjadinya inhibisi dan represi.

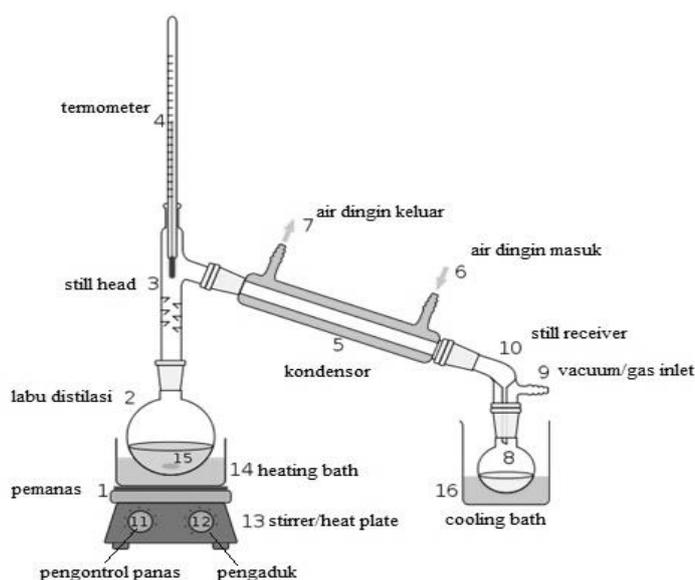
Beberapa contoh hasil fermentasi adalah etanol, asam laktat, dan hidrogen. Akan tetapi beberapa komponen lain dapat juga dihasilkan dari fermentasi seperti asam butirat dan aseton.

### 2.8 Distilasi

Dalam pembuatan etanol, distilasi merupakan tahap akhir proses. Hal ini dilakukan untuk meningkatkan konsentrasi etanol yang dihasilkan. Distilasi merupakan suatu metode pemisahan komponen bahan kimia berdasarkan perbedaan titik didih pada penelitian ini digunakan distilasi sederhana. Dengan memanaskan larutan pada suhu rentang antara 78-90°C pada tekanan 1 atm akan mengakibatkan sebagian bioetanol atau etanol menguap karena titik didih etanol adalah 78°C sedangkan titik didih air adalah 100°C.

Distilasi dapat dilakukan dengan 2 macam cara yaitu :

1. Pembentukan uap dengan cara mendidihkan larutan yang akan dipisahkan dimana uap kemudian diembunkan tanpa dikembalikan ke kolom distilasi.
2. Pembentukan uap dengan cara mendidihkan larutan yang akan dipisahkan dimana kemudian uap yang diembunkan dan dikembalikan sebagian ke dalam kolom agar terjadi kontak antara uap yang naik ke atas dengan embun yang dikembalikan



Gambar 4. Distilasi sederhana

Distilasi pada umumnya dilakukan secara kontinyu atau tak kontinyu, pada tekanan normal atau vakum. Pada distilasi atmosferik yang paling sering dilakukan adalah operasi tak kontinyu. Dalam hal ini campuran yang akan dipisahkan dimasukkan kedalam alat penguap (labu) dan dididihkan. Pendidihan terus dilangsungkan hingga sejumlah tertentu komponen yang mudah menguap terpisahkan. Selama pendidihan, fraksi komponen yang mudah menguap dalam cairan bertambah besar, sehingga komposisi destilat yang dihasilkan juga terus berubah.

Peristiwa yang terjadi pada distilasi atmosferik adalah :

1. Penguapan komponen yang mudah menguap dari campuran dalam alat penguap.
2. Pengeluaran uap yang terbentuk melalui sebuah pipa yang lebar dan kosong, tanpa perpindahan panas dan perpindahan massa yang disengaja atau dipaksakan, yang dapat menyebabkan kondensat mengalir kembali ke alat penguap.
3. Tetes cairan yang sukar menguap yang ikut terbawa dalam uap dipisahkan dengan bantuan siklon dan disalurkan kembali ke dalam alat penguap.
4. Kondensasi lanjut dari destilat panas dalam sebuah alat pendingin.
5. Penampungan destilat dalam sebuah bejana.
6. Pengeluaran residu dari alat penguap.

## **2.9 Analisa Produk**

Produk hasil proses fermentasi kemudian didistilasi untuk memisahkan komponen bioetanol dari campuran. Setelah produk bioetanol diperoleh maka dilakukan analisa meliputi indeks bias, gas kromatografi, pH, dan berat jenis.

### **2.9.1 Indeks Bias**

Pengujian indeks bias dapat digunakan untuk menentukan kemurnian bioetanol. Makin panjang rantai karbon dan makin banyak ikatan rangkap, maka indeks bias semakin besar. Indeks bias juga dipengaruhi faktor-faktor proses oksidasi dan suhu. Alat yang digunakan untuk menentukan indeks bias adalah refraktometer.

### **2.9.2 Kromatografi Gas**

Kromatografi Gas (gambar 5) adalah teknik kromatografi yang bisa digunakan untuk memisahkan senyawa organik yang mudah menguap. Senyawa-senyawa tersebut harus mudah menguap dan stabil pada temperatur pengujian, utamanya dari 50 – 300°C. Jika senyawa tidak mudah menguap atau tidak stabil

pada temperatur pengujian, maka senyawa tersebut bisa diderivatisasi agar dapat dianalisis dengan kromatografi gas (*Mardoni, 2005*).



Gambar 5. Kromatografi Gas

Sumber : Laboratorium Kimia Analitik Politeknik Negeri Sriwijaya

Dalam kromatografi gas atau KG, fase gerak berupa gas lembam seperti helium, nitrogen, argon bahkan hidrogen digerakkan dengan tekanan melalui pipa yang berisi fase diam.

Tekanan uap atau keatsirian memungkinkan komponen menguap dan bergerak bersama-sama dengan fase gerak yang berupa gas. Kromatografi gas merupakan metode yang sangat tepat dan cepat untuk memisahkan campuran yang sangat rumit. Komponen campuran dapat diidentifikasi dengan menggunakan waktuambat (waktu retensi) yang khas pada kondisi yang tepat. Waktuambat ialah waktu yang menunjukkan berapa lama suatu senyawa tertahan dalam kolom (*Gritter, 1991*).

Waktu retensi ( $t_R$ ) adalah perbedaan waktu antara penyuntikan komponen sampel dengan puncak maksimum yang tercatat pada kromatogram. Volume retensi ( $v_R$ ) adalah produk dari waktu retensi dan kecepatan aliran gas pengemban. Umumnya, waktu retensi yang sudah disetel ( $t'_R$ ) dan volume retensi yang sudah disetel ( $v'_R$ ), dan retensi relatif ( $T_{A/B}$ ) digunakan untuk analisis kualitatif. Waktu retensi atau volume retensi yang sudah disetel adalah perbedaan antara waktu retensi atau volume retensi dari sampel dengan suatu komponen yang inert, biasanya udara. Retensi relatif adalah rasio dari waktu retensi atau

volume retensi yang disetel dari standar dengan waktu retensi atau volume retensi yang disetel dari komponen sampel.

Sistem peralatan dari kromatografi gas terdiri dari 7 bagian utama.

Diantaranya :

1. Tabung gas pembawa
2. Pengontrolan aliran dan regulator tekanan
3. Injection port (tempat injeksi cuplikan)
4. Kolom
5. Detektor
6. Rekorder (pencatat)
7. Sistem termostat untuk (3), (4), (5)

Cara pemisahan dari sistem ini sangat sederhana sekali, cuplikan yang akan dipisahkan diinjeksikan kedalam injektor, aliran gas pembawa yang inert akan membawa uap cuplikan kedalam kolom. Kolom akan memisahkan komponen-komponen cuplikan tersebut. Komponen-komponen yang telah terpisah tadi dapat dideteksi oleh detektor sehingga memberikan sinyal yang kemudian dicatat pada rekorder dan berupa puncak-puncak (kromatogram).

#### 1. Gas Pembawa

Gas pembawa ditempatkan dalam tabung bertekanan tinggi. Untuk memperkecil tekanan tersebut agar memenuhi kondisi pemisahan maka digunakan *drager* yang dapat mengurangi tekanan dan mengalirkan gas dengan laju tetap. Aliran gas akan mengelusi komponen-komponen dengan waktu yang karakteristik terhadap komponen tersebut (waktu retensi). Karena kecepatan gas tetap maka komponen juga mempunyai volume yang karakteristik untuk gas pembawa (volume retensi). Adapun persyaratan-persyaratan yang harus dipenuhi oleh gas pembawa adalah :

- Inert, agar tidak terjadi interaksi dengan pelarut.
- Murni, mudah didapat dan murah harganya.
- Dapat mengurangi difusi dari gas
- Cocok untuk detektor yang digunakan.

## 2. Tempat Injeksi

Sebelum memasuki kolom maka ia harus dirubah menjadi uap dan ini dilakukan pada tempat injeksi. Suhu pada tempat injeksi ini haruslah  $\pm 50^{\circ}\text{C}$  diatas titik didih tertinggi yang ada dalam campuran cuplikan dan tidak boleh terlalu tinggi karena kemungkinan dapat mengurai senyawa yang akan dianalisa.

## 3. Kolom

Ada 2 jenis kolom yang digunakan dalam kromatografi gas secara umum, yaitu kolom jejal (*packed columns*) dan kolom tubuler terbuka (*open tubular columns*). kolom jejal (*packed columns*) adalah kolom metal atau gelas yang diisi bahan pengepak terdiri dari penunjang padatan yang dilapisi fase cair yang tidak menguap (untuk kromatografi gas-padatan). Kolom tubuler terbuka sangat berbeda dengan kolom jejal, yaitu gas yang mengalir sepanjang kolom tidak mengalami hambatan, karena kolomnya merupakan tabung tanpa bahan pengisi.

Kolom jejal umumnya mempunyai panjang yang berkisar antara 0,7 sampai 2 meter, sedangkan kolom tubuler terbuka dapat mempunyai panjang dari 30 sampai 300 meter. Kolom yang panjang ini biasanya dibuat dalam bentuk melilit bergulung seperti spiral.

Kemampuan memisahkan komponen per meter kolom pada kolom tubuler terbuka tidak jauh berbeda dengan pemisahan pada kolom jejal. Meskipun demikian, penggunaan kolom yang sangat panjang bersama-sama dengan waktu analisis yang relatif cepat merupakan alat penolong yang berharga bagi para ahli kimia untuk dapat memisahkan komponen-komponen yang perbedaannya kecil didalam sifat-sifat fisiknya. Ada 2 jenis kolom tubuler terbuka, yaitu WCOT (*Wall Coated Open Tubular Columns*) dan SCOT (*Support Coated Open Tubular Columns*).

## 4. Detektor

Detektor dapat menunjukkan adanya sejumlah komponen didalam aliran gas pembawa serta sejumlah dari komponen-komponen tersebut. Detektor yang diinginkan adalah detektor yang mempunyai sensitifitas yang tinggi, noisenya

rendah, responnya linear, dapat memberikan respon dengan setiap senyawa, tidak sensitif terhadap perubahan temperatur dan kecepatan aliran dan juga tidak mahal harganya.

#### 5. Rekorder (Pencatat)

Rekorder jenis potensiometer yang dipergunakan dalam kromatografi gas adalah *servo-operated voltage balancing device*.

Adapun keunggulan dari kromatografi gas-cair (GLC) yaitu :

##### 1. Kecepatan

- a. gas yang merupakan fasa bergerak sangat cepat mengadakan kesetimbangan antara fase bergerak dengan fase diam.
- b. kecepatan gas yang tinggi dapat juga digunakan

##### 2. Sederhana

Alat GLC relatif sangat mudah dioperasikan. Interpretasi langsung dari data yang diperoleh dapat dikerjakan. Harga dari alat GLC relatif murah.

##### 3. Sensitif

GLC sangat sensitif . Alat yang paling sederhana dapat mendeteksi konsentrasi dalam ukuran 0,01% (= 100 ppm). GLC hanya memerlukan sejumlah kecil dari cuplikan, biasanya dalam ukuran mikroliter karena sensitivitas dari GLC ini sangat tinggi.

##### 4. Pemisahan

Dengan GLC memungkinkan untuk memisahkan molekul-molekul dari suatu campuran, di mana hal ini tidak mungkin dipisahkan dengan cara-cara yang lain.

##### 5. Analisa, dapat digunakan sebagai :

- 1) Analisa kualitatif yaitu dengan membandingkan waktu retensi.
- 2) Analisa kuantitatif yaitu dengan perhitungan luas puncak.

### 2.9.3 Derajat Keasaman (pH)

pH adalah derajat keasaman yang digunakan untuk menyatakan tingkat keasaman atau kebasaan yang dimiliki oleh suatu larutan. Indikator asam basa adalah alat yang digunakan untuk mengetahui sifat asam dan basa dari suatu larutan. Ada beberapa jenis indikator yang dapat digunakan untuk membedakan sifat asam basa, antara lain kertas lakmus, kertas indikator universal, pH meter, indikator alami, larutan indikator universal

Pada penelitian kali ini menggunakan kertas indikator universal untuk menguji derajat keasaman (pH) pada bioetanol. Indikator universal hampir sama dengan kertas lakmus. Kelebihan indikator universal adalah mampu mengukur pH suatu larutan. Penggunaannya dengan mencelupkan indikator universal kedalam larutan yang akan diukur. Setelah itu mencocokkan warna dengan tabel warna yang telah disediakan. Dengan demikian dapat mengetahui pH dari larutan yang sudah diukur.



Gambar 6. Kertas pH

#### 2.9.4 Berat jenis

Berat jenis didefinisikan sebagai massa suatu bahan per satuan volume bahan tersebut. Bentuk persamaannya dapat dituliskan sebagai berikut,

$$\text{Berat jenis} = \frac{\text{Massa}}{\text{Volume}} \quad \text{atau} \quad \frac{m}{v}$$

Satuan berat jenis adalah  $\text{kg/dm}^3$  atau  $\text{g/mL}$ , dan  $\text{g/liter}$ . Berat jenis mempunyai harga konstan pada suatu temperatur tertentu dan tidak tergantung pada jumlah bahan cuplikan (sampel). Dikenal beberapa alat yang dapat menentukan berat jenis, yaitu aerometer, piknometer, dan neraca Westphal. Namun pada penelitian kali ini menggunakan piknometer untuk menentukan berat jenis bioetanol yang dihasilkan.