

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ganggang Hijau

Ganggang hijau atau alga hijau merupakan kelompok tumbuhan berklorofil yang terdiri dari satu atau banyak sel, berbentuk koloni dan merupakan filum alga yang terbesar jumlah spesiesnya di air tawar. Di dalam alga terkandung bahan-bahan organik seperti polisakarida, hormon, vitamin, mineral, dan juga senyawa bioaktif. Alga hijau ini mempunyai dinding sel berupa selulosa, serta memiliki pigmen berupa klorofil a dan b, karoten, dan xantofil. Klorofil a mempunyai jumlah terbanyak yang menyebabkan warna hijau pada alga ini. (Maddi et al, 2011)



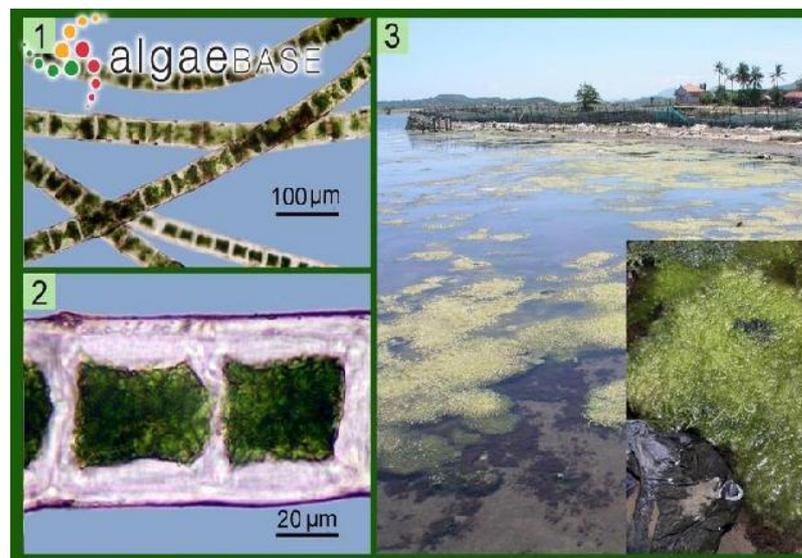
Gambar 1. Ganggang hijau (*Cladophora sp*)

Sumber : www.algaebase.org

Sejauh ini pemanfaatan ganggang atau alga sebagai komoditi perdagangan dan 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 biomassa, makanan, kosmetik, farmasi dan lain-lain.

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. Beberapa anggotanya hidup di air mengapung atau melayang, sebagian hidup sebagai plankton. Beberapa jenis ada yang hidup melekat pada tumbuhan.



Gambar 2. Habitat Ganggang Hijau

Sumber : 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. Sebagian besar fitoplankton adalah anggota alga hijau, pigmen klorofil yang dimilikinya efektif melakukan fotosintesis sehingga alga hijau merupakan produsen utama dalam ekosistem perairan.

Selain itu, banyak peneliti mengatakan bahwa alga hijau berfilamen sangat merugikan sehingga alga ini merupakan salah satu penyebab terjadinya kerusakan pada perairan. Jika keberadaan alga berfilamen di perairan melimpah, alga ini dapat mengeluarkan busa dan lendir sehingga dapat menurunkan kualitas perairan (Sze, 1993). Alga hijau berfilamen banyak ditemukan di perairan tawar. Alga berfilamen ini merupakan benang-benang yang panjang dan hanya beberapa ikan yang memanfaatkan alga berfilamen sebagai pakan alaminya.

Namun tidak semua alga berfilamen ini merugikan. Menurut Margalef (1983) *in Cambra and Aboal (1992)*, alga hijau berfilamen mempunyai filamen bercabang yang bervariasi yang memanfaatkan air dengan baik sebagai tempat hidupnya dan sangat baik mengontrol penyerapan nutrisi. Di perairan tergenang, selain dapat menyerap nutrisi dalam air juga dapat mentransfer suhu panas secara horisontal dalam kaitannya dengan gradien suhu. Di samping itu, alga berfilamen yang bercabang dengan struktur cabang yang agak kasar dapat menurunkan turbulensi air (Margalef 1983 *in Cambra and Aboal 1992*).

Alga hijau di air tawar mempunyai cara-cara berkembang biak yang beraneka ragam untuk mempertahankan hidup. Alga hijau dapat berkembang biak dengan cara aseksual dan seksual. Cara perkembangbiakan aseksual dengan membelah diri dan membentuk macam-macam spora, sedangkan perkembangbiakan secara seksual dilakukan dengan konjugasi. Alga berfilamen dan bentuk multiseluler lainnya kemungkinan bereproduksi dengan cara fragmentasi atau dengan cara membebaskan zoospora dari sel vegetatif (Darley 1982).

Pada alga berfilamen, pertumbuhan terjadi dengan melakukan pembelahan sel. *Spirogyra*, *Cladophora* dan alga filamen lainnya akan mengalami pertumbuhan biomassa tiga kali lipat hanya dalam tiga hari dan rata-rata sangat cepat selama beberapa periode (Cambra & Aboal 1992).

2.1.2 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan Alga Hijau

Pertumbuhan alga hijau 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 yang disukai bagi pertumbuhannya. Alga hijau 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, 2008).

b. Cahaya

Cahaya sangat mempengaruhi tingkah laku organisme akuatik. Pigmen klorofil menyerap cahaya biru dan merah, karoten menyerap cahaya biru dan hijau, fikoeitrin menyerap warna hijau, dan fikosianin menyerap cahaya kuning. 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).

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)

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. Riley *et al.* (1949) menyatakan bahwa laju populasi ganggang hijau di perairan dibatasi oleh konsentrasi fosfat. Nitrogen dan Fosfor akan menyatu di dalam struktur sel alga dengan rasio N:P yaitu 16:1 (Redfield 1958 *in* Summers 2008).

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 penting dalam rantai makanan di perairan tawar.
3. Menghasilkan O₂ (oksigen) dan hasil fotosintesis yang diperlukan oleh hewan lain untuk bernafas.

b. Dampak negatif

1. Dapat mengganggu jika perairan terlalu subur.
2. Membuat air berubah warna dan menjadi bau.

2.1.3 *Cladophora sp*

Cladophora adalah alga hijau yang berbentuk seperti benang bercabang hijau. Bentuk benang atau jaringnya sangat kuat dan sangat tipis. Ditemukan secara alami terjadi di sepanjang pantai, danau, dan sungai. Alga ini tumbuh terendam menempel di batu, 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.

Klasifikasi Ganggang Hijau (*Cladophora sp*) sebagai berikut :

- ❖ *Empire* : *Eukaryota*
- ❖ *Kingdom* : *Plantae*
- ❖ *Phylum* : *Chlorophyta*
- ❖ *Kelas* : *Ulvophyceae*
- ❖ *Ordo* : *Cladophorales*
- ❖ *Family* : *Cladophoraceae*
- ❖ *Genus* : *Cladophora*

Sumber : www.algaebase.org

Tabel 1. Komposisi Kimia *Cladophora sp.*

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

Sumber : *International Journal of Agriculture & Biology* (2011) and *Journal of Materials Science and Engineering* (2013)

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.

2.2 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, hemiselulosa, dan lignin. Selulosa adalah senyawa kerangka yang menyusun 40% - 50% bagian 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.

2.3 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.

2.4 Selulosa

Selulosa merupakan substansi organik yang paling melimpah di alam. Selulosa tidak larut di dalam air dan tidak dapat dicerna oleh tubuh manusia. Selulosa mendominasi karbohidrat yang berasal dari tumbuh-tumbuhan hampir mencapai 50% karena selulosa merupakan bagian yang terpenting dari dinding sel tumbuh-tumbuhan. Selulosa ditemukan dalam tanaman yang dikenal sebagai microfibril dengan diameter 2-20 nm dan panjang 100-40000 nm.

Sifat fisik selulosa adalah zat yang padat, kuat, berwarna putih, dan tidak larut dalam alkohol dan eter. Kayu terdiri dari 50% selulosa, daun kering mengandung 10-20% selulosa, sedangkan kapas mengandung 90% selulosa. Hidrolisis sempurna selulosa akan menghasilkan monomer selulosa yaitu glukosa, sedangkan hidrolisis tidak sempurna akan menghasilkan disakarida dari selulosa yaitu selobiosa (Fan dkk, 1982). Selulosa dapat dihidrolisis menjadi glukosa

dengan menggunakan media air dan dibantu dengan katalis asam atau enzim. Selanjutnya glukosa yang dihasilkan dapat difermentasi menjadi etanol.

2.5 Lignin

Lignin adalah salah satu zat komponen penyusun tumbuhan. Komposisi bahan penyusun ini berbeda-beda tergantung 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 (Taherzadeh 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 polisakaridanya.

2.6 Bioetanol

Bioetanol adalah etanol yang dibuat dari hasil fermentasi sumber hayati seperti pati, gula dan tanaman berselulosa dengan menggunakan bantuan mikroorganisme. Etanol atau etil alkohol yang dipasarkan dikenal sebagai alkohol merupakan senyawa organik dengan rumus kimia C_2H_5OH .

Bioetanol merupakan salah satu jenis bahan bakar alternatif yang prospektif di masa depan. Sebagai bahan bakar alternatif, contohnya bioetanol dapat digunakan untuk campuran bensin (gasolin) dan kemudian disebut sebagai gasohol E-10, artinya dalam setiap satuan volume bahan bakar yang digunakan kandungan premiumnya 90% dan bioetanol 10%.

Penggunaan etanol sebagai bahan bakar mempunyai beberapa keunggulan dibanding dengan BBM, yaitu : a) kandungan oksigen yang tinggi (35%) sehingga

jika dibakar sangat bersih , b) ramah lingkungan karena emisi gas karbon-mono-oksida lebih rendah 19-25% dibanding BBM sehingga tidak memberikan kontribusi pada akumulasi karbon dioksida di atmosfer (Costello and Chun, 1988) dan bersifat terbarukan, sedangkan BBM akan habis karena bahan bakunya fosil.

Ditinjau dari kebutuhan yang semakin meningkat , hal ini dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Jumlah Kebutuhan Etanol Nasional

Tahun	Kebutuhan etanol (liter)
2001	25.251.852
2002	21.076.317
2003	34.063.193
2004	230.613.100

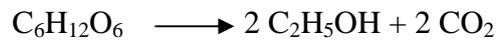
Sumber : BPS, 2005

Bioetanol / etanol dapat dibuat dengan beberapa cara yaitu :

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 biasanya berkadar rendah. Untuk mendapatkan alkohol dengan kadar yang lebih tinggi diperlukan proses pemurnian melalui penyulingan atau distilasi.
2. Melalui sintesa kimia yaitu melalui reaksi gas etilen dan uap air dengan asam sebagai katalis. Katalis yang dipakai misalnya asam fosfat.

Etanol dapat diproduksi secara fermentasi dari bahan baku yang mengandung gula atau secara sintetis dapat juga diproduksi dari turunan minyak bumi. Tetapi hampir 93% produksi etanol di dunia diproduksi secara fermentasi. Berdasarkan pengalaman dan ketersediaan teknologi penyediaan glukosa untuk proses fermentasi inilah proses produksi etanol digolongkan menjadi tiga generasi. Generasi pertama adalah pemanfaatan glukosa dari sirup gula alami seperti nira dan molase sisa pabrik gula. Berdasarkan penilikan sejarah, teknologi seperti ini sudah sangat populer dan melekat hampir di semua budaya masyarakat di belahan dunia mana saja.

Glukosa difermentasikan untuk menghasilkan etanol menurut reaksi:



Generasi kedua adalah pemanfaatan glukosa dari hasil hidrolisis pati. Proses produksi ini lebih maju dan lebih membutuhkan kajian teknologi dibandingkan generasi pertama. Proses hidrolisis pati tanpa bantuan katalis membutuhkan kondisi suhu dan tekanan tinggi. Seiring dengan perkembangan teknologi maka dikembangkan berbagai jenis katalis dan biokatalis yang bisa memungkinkan penyelenggaraan reaksi pada suhu lebih rendah bahkan pada suhu ruang bila menggunakan biokatalis amilase. Generasi paling mutakhir dari proses produksi etanol adalah pemanfaatan glukosa dari hasil proses hidrolisis selulosa.

Selulosa adalah komponen organik dengan rumus molekul $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$ yang merupakan polisakarida yang tersusun atas beta-glukosa. Selulosa menyusun dinding sel tanaman hijau. Berdasarkan susunan selulosa yang merupakan polisakarida dan adanya potensi selulosa untuk dikonversi menjadi etanol, maka selulosa sangat berpotensi untuk dijadikan sebagai bahan baku etanol. Ketersediaan selulosa yang melimpah di bumi karena keberadaannya sebagai penyusun dinding sel tumbuhan hijau, serta keberadaannya yang melimpah pada bahan non pangan, bahan berselulosa bisa dijadikan pilihan yang tepat untuk mengurangi kompetisi dengan bahan baku etanol selama ini.

Etanol yang diproduksi dari bahan berlignoselulosa meliputi dua tahap reaksi. Tahap pertama adalah konversi selulosa menjadi gula dan tahap kedua adalah produksi etanol dari gula hasil konversi. Konversi selulosa menjadi gula dilakukan melalui reaksi hidrolisis. Reaksi hidrolisis dapat dilakukan secara kimia maupun secara enzimatis.

Substrat yang dapat difermentasikan menjadi etanol adalah :

1. Bahan yang mengandung gula, antara lain : tebu dan sisa produknya (molase, bagasse, gula bit, buah-buahan, kentang, sorgum, dan lain-lain).
2. Bahan-bahan berpati, antara lain : tapioka, maizena, gandum, padi dan kentang.
3. Bahan-bahan biomassa lignoselulosa, antara lain : sumber selulosa dan lignoselulosa yang berasal dari limbah pertanian dan kayu.

Kegunaan etanol/bioetanol adalah sebagai berikut:

Berdasarkan Fessenden (1992) kegunaan etanol adalah:

1. Digunakan dalam minuman beralkohol
2. Sebagai pelarut dan reagensia dalam laboratorium dan industri.
3. Sebagai bahan bakar. Etanol mempunyai nilai kalor (Q) sebesar 12.800 Btu/lb. Sedangkan jika dicampur dengan gasoline dimana prosentase 10% etanol dan 90% gasoline akan menghasilkan produk dengan nama dagang Gasohol yang dihasilkan nilai kalor (Q) sebesar 112.000 Btu/gallon (Hunt, 1981).

Berdasarkan Austin (1984) kegunaan etanol adalah:

1. Sebagai bahan industri kimia.
2. Sebagai pelarut dan untuk sintesis senyawa kimia lainnya.
3. Sebagai bahan baku (raw material) untuk membuat ratusan senyawa kimia lain, seperti asetaldehid, etil asetat, asam asetat, etilene dibromida, glycol, etil klorida, dan semua etil ester.

Sifat fisika etanol dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Sifat Fisika Etanol

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

Sumber : Rizani, 2000

Dalam kondisi kamar, etanol berwujud cairan yang tidak berwarna, mudah menguap, mudah terbakar, mudah larut dalam air dan tembus cahaya. Etanol merupakan senyawa organik golongan alkohol primer. Reaksi yang dapat terjadi pada etanol antara lain dehidrasi, dehidrogenasi, oksidasi dan esterifikasi (Rizani, 2000).

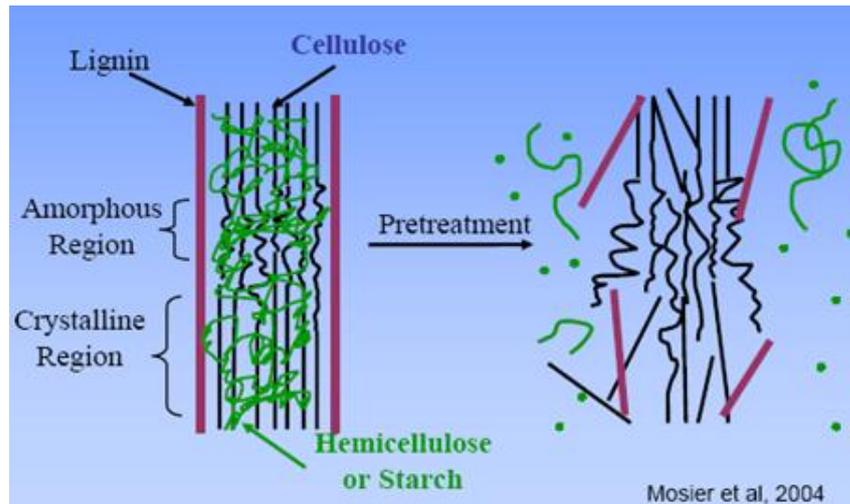
Pembuatan bioetanol telah dikenal dan dapat diaplikasikan dengan mudah pada banyak negara berkembang . produksi bioetanol pada skala medium dapat dilaksanakan di area pedesaan dan dapat menjadi sumber utama pencarian dengan biaya yang relatif rendah. Pada kondisi tertentu produksi bioetanol dapat memberikan nilai tambah bagi produksi agrikultur dan membantu menstabilkan pendapatan daerah. Tetapi bagaimanapun nilai ekonomi dari produksi bioetanol dan konsumsinya dibandingkan dengan harga minyak bumi sangat bergantung dari kondisi sektor agrikultural, industri dan pengembangan energi masing-masing.

2.7 Pretreatment

Pretreatment biomassa ligniselulosa harus dilakukan untuk mendapatkan hasil yang tinggi 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 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. Efek *pretreatment* secara skematis ditunjukkan oleh gambar 3 dibawah ini.



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

2.8 Hidrolisis

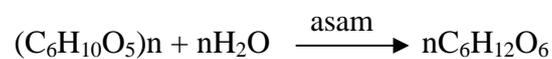
Hidrolisis meliputi proses pemecahan polisakarida di dalam biomassa ligniselulosa, yaitu selulosa dan hemiselulosa menjadi monomer gula penyusunnya. Hidrolisis sempurna selulosa menghasilkan glukosa, sedangkan hemiselulosa menghasilkan beberapa monomer gula pentose (C5) dan Heksosa (C6). Hidrolisis dapat dilakukan secara kimia (asam) atau enzimatik.

Hidrolisis secara kimia dapat dilakukan dengan menggunakan asam encer maupun asam pekat. Penggunaan asam encer pada proses hidrolisis dilakukan pada temperatur dan tekanan tinggi dengan waktu reaksi yang singkat (beberapa menit). Temperatur yang dibutuhkan adalah mencapai 200°C. Asam encer yang digunakan adalah 0,2-4% berat (Nguyen and Tucker, 2002). Penggunaan asam encer untung menghidrolisis selulosa biasa mampu mencapai konversi reaksi sampai 50% (Badger, 2002). Konversi yang rendah ini disebabkan oleh degradasi gula hasil hidrolisis yang terbentuk karena temperatur reaksi yang digunakan

tinggi. Degradasi gula tersebut tidak hanya menurunkan konversi reaksi, namun juga dapat meracuni mikroorganisme pada saat reaksi fermentasi pada pembentukan etanol.

Penggunaan asam pekat pada proses hidrolisis selulosa dilakukan pada temperatur yang lebih rendah daripada asam encer. Sumber asam yang biasa digunakan adalah asam sulfat. Temperatur reaksi adalah 100°C dan membutuhkan waktu reaksi antara 1 dan 2 jam Temperatur yang lebih rendah meminimalisasi degradasi gula.

Reaksi yang terjadi pada proses hidrolisis selulosa menjadi glukosa yaitu :



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 (H₂SO₄) dan asam klorida (HCl). Asam sulfat merupakan asam yang paling banyak digunakan dan dimanfaatkan untuk hidrolisis asam.

Metode lain yang digunakan untuk menghidrolisis selulosa adalah secara enzimatik. Enzim merupakan protein alam yang dapat mengkatalisis reaksi tertentu. Untuk dapat bekerja, enzim harus kontak langsung dengan substrat yang akan dihidrolisa. Karena selulosa secara alami terikat oleh lignin yang bersifat permeabel terhadap air sebagai pembawa enzim, maka untuk proses hidrolisis secara enzimatik membutuhkan *pretreatment* sehingga enzim dapat berkontak langsung dengan selulosa.

Hidrolisis secara enzimatik memanfaatkan enzim penghidrolisis selulosa, yaitu selulase atau bisa juga langsung menggunakan mikroba penghasil selulase, misalnya *Trichoderma reesei*. Keuntungan hidrolisis secara enzimatik adalah efisiensi reaksi tinggi karena enzim bersifat selektif sehingga pembentukan produk samping bisa diminimalisasi, kondisi reaksi temperatur dan tekanan tidak tinggi, bahkan bisa dilakukan pada temperatur ruang dan tekanan atmosfer sehingga tidak membutuhkan peralatan khusus untuk reaksi. Sedangkan

kekurangan proses hidrolisis secara enzimatik adalah waktu reaksi yang dibutuhkan lebih lama, bisa mencapai 72 jam.

Adapun faktor-faktor yang mempengaruhi proses hidrolisis antara lain :

1. Konsentrasi katalis, semakin besar konsentrasi katalis maka laju hidrolisis akan semakin cepat. Dimana dalam hal ini, laju hidrolisis sebanding dengan konsentrasi H^+ . pH yang baik untuk hidrolisis adalah 2,3 (Soebijanto, 1986)
2. Temperatur, semakin besar temperatur hidrolisis maka laju hidrolisis akan berlangsung lebih cepat.
3. Ukuran partikel, semakin kecilnya ukuran partikel akan meningkatkan luas permukaan kontak sehingga proses hidrolisis lebih optimal.

2.9 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 memberikan dampak yang merugikan yaitu;

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

Penggunaan metode pasteurisasi untuk proses sterilisasi berguna untuk membunuh bakteri patogen. Pasteurisasi dapat dilakukan untuk pada suhu yang relatif rendah dalam waktu yang lama yaitu $65^{\circ}C$ selama 30 menit atau pada suhu tinggi dalam waktu singkat yaitu $72^{\circ}C$ selama 15 menit.

2.10 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.

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%, Na₃PO₄ 0,02%, KNO₃ 0,02% (Vullo dan Vachsmann, 2005). Tujuan dibiakkannya ragi dalam starter adalah mengadaptasikan sel dalam media fermentasi. Dengan adanya adaptasi pada starter ini diharapkan sebagai tahap awal fermentasi.

2.11 Fermentasi

Fermentasi berasal dari kata *fervere* yang berarti mendidihkan. Seiring perkembangan teknologi, definisi fermentasi meluas menjadi semua proses yang melibatkan mikroorganisme untuk menghasilkan suatu produk primer dan produk sekunder dalam suatu lingkungan yang dikendalikan. Pada mulanya istilah fermentasi digunakan untuk menunjukkan proses pengubahan glukosa menjadi etanol yang berlangsung secara anaerob. Namun kemudian istilah fermentasi berkembang lagi menjadi seluruh perombakan senyawa organik yang dilakukan mikroorganisme dimana melibatkan enzim yang dihasilkannya. Dengan kata lain, fermentasi adalah perubahan struktur kimia dari bahan-bahan organik dengan memanfaatkan agen biologis terutama enzim sebagai biokatalis.

Media yang digunakan didalam fermentasi harus memenuhi syarat-syarat sebagai berikut :

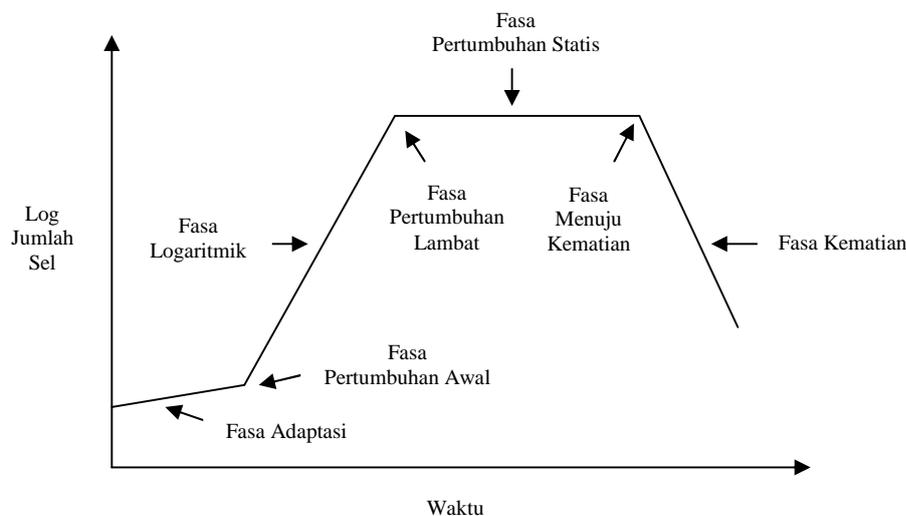
1. Mengandung nutrisi yang dibutuhkan bagi pertumbuhan sel *sacharomyces serevisiae*.
2. Mengandung nutrisi yang dapat digunakan sebagai sumber energi bagi sel *sacharomyces serevisiae*.
3. Tidak mengandung zat yang menghambat pertumbuhan sel.
4. Tidak terdapat kontaminan yang dapat meningkatkan persaingan dalam penggunaan substrat.

Reaksi yang terjadi pada proses fermentasi yaitu:

Pada fermentasi etanol, glukosa akan dipecah menjadi etanol dan karbon dioksida.



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 subtrat 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 mikroorganisme dilakukan dengan cara sterilisasi (Hidayat,2006).



Gambar 4. Kurva Pertumbuhan Mikroorganisme
(Sumber : Srikandi Fardiaz; 1992)

1. Fasa adaptasi, pada fasa ini mikroba menyesuaikan diri dengan lingkungan dan medium baru dari pada tumbuh atau berkembang biak. Mikroba berusaha merombak materi-materi dalam medium agar dapat digunakan sebagai nutrisi untuk pertumbuhan. Bila dalam medium komponen yang tidak dikenal mikroba, mikroba akan memproduksi enzim ekstraseluler untuk merombak komponen tersebut.
2. Fasa pertumbuhan awal, setelah mengalami fasa adaptasi sel mulai membelah dengan kecepatan yang semakin rendah karena baru selesai tahap penyesuaian diri.
3. Fasa pertumbuhan lambat, pada fasa ini pertumbuhan populasi mikroba diperlambat karena zat nutrisi didalam medium sudah banyak berkurang dan adanya hasil metabolisme yang beracun. Pada fasa ini pertumbuhan sel tidak stabil tetapi jumlah populasi masih naik karena jumlah sel yang tumbuh lebih banyak daripada jumlah sel yang mati.
4. Fasa pertumbuhan tetap (statis), pada fasa ini jumlah sel tetap karena jumlah sel yang tumbuh sama dengan jumlah sel yang mati.
5. Fasa menuju kematian dan fasa kematian, pada fasa ini sebagian populasi jasad renik mulai mengalami kematian karena nutrisi di dalam medium sudah habis dan energi cadangan didalam sel sudah habis.

Faktor-faktor yang mempengaruhi fermentasi antara lain :

1. Ragi

Ragi merupakan kunci keberhasilan atau kegagalan suatu 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 stress fisika dan kimia (Meidyawati, 1997)

Ada beberapa jenis ragi yang mempunyai kemampuan untuk menghasilkan etanol, namun hampir 95% fermentasi melibatkan jenis *sacharomyces cerevisiae*. Khamir ini dipilih karena tahan terhadap konsentrasi asam yang relatif tinggi sampai batas tertentu, dapat tumbuh dengan cepat, serta mampu menghasilkan etanol dalam jumlah relatif banyak. Pemanfaatan *sacharomyces cerevisiae* untuk pembuatan etanol dapat menghasilkan etanol 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. 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., Na_3PO_4 sebagai sumber fosfat untuk sintesis asam nukleat, KNO_3 sebagai sumber K untuk 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 (pH)

Pada umumnya pH untuk fermentasi dibutuhkan keasamaan optimum antara 3,0-5,0. *Sacharomyces* dapat tumbuh dengan baik pada pH 4,8.(Wijana, 1991)

5. Kadar Gula

Gula yang ditambahkan pada hidrolisat ganggang bertujuan untuk memperoleh kadar etanol yang tinggi, tetapi bila kadar gula terlalu tinggi maka aktifitas khamir dapat terhambat. Kadar gula yang optimum untuk aktifitas pertumbuhan khamir adalah 10 hingga 18 persen. (Iroi, 2008)

6. Suhu

Menurut Wijiyono, suhu untuk tiap-tiap golongan mikroba memiliki suhu pertumbuhan yang optimum yang berbeda-beda, untuk *sacharomyces cereviseae* suhu optimumnya 19 hingga 32°C.

Proses fermentasi dibagi menjadi dua tipe yaitu fermentasi aerob dan anaerob. Fermentasi aerob akan menghasilkan asam laktat, sedangkan untuk fermentasi anaerob akan menghasilkan alkohol. Dalam fermentasi pembuatan bioetanol digunakan yeast untuk merombak glukosa menjadi bioetanol. Hal yang perlu diperhatikan dalam proses fermentasi ini adalah menyiapkan wadah yang tidak mempunyai akses udara untuk keluar masuk sehingga proses fermentasi pembuatan bioetanol dapat berjalan dengan baik.

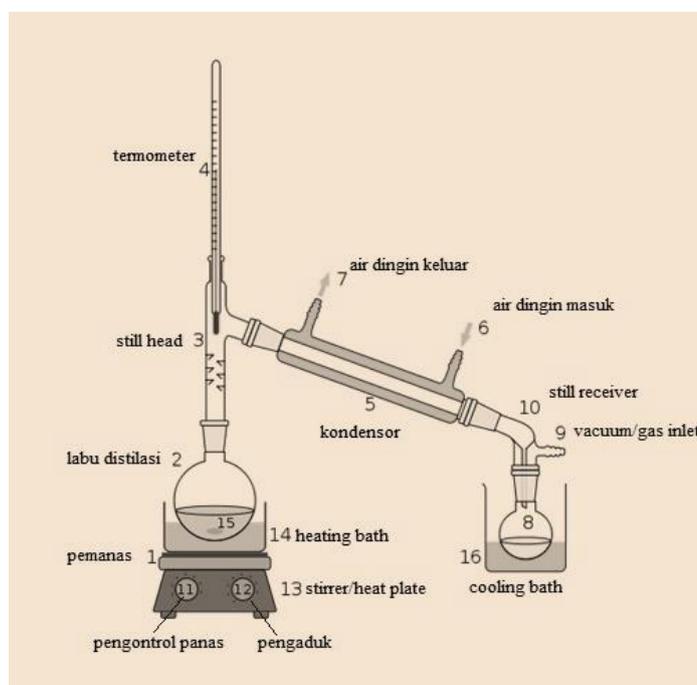
Alkohol yang dihasilkan dari proses fermentasi biasanya masih mengandung gas-gas antara lain CO₂ yang dihasilkan dari perubahan glukosa menjadi bioetanol dan senyawa aldehid yang perlu dibersihkan. Gas CO₂ pada hasil fermentasi tersebut biasanya mencapai 35% volume, sehingga untuk memperoleh bioetanol yang berkualitas baik, bioetanol tersebut harus dibersihkan dari gas tersebut. Proses pembersihan (washing) CO₂ dilakukan dengan menyaring bioetanol yang terikat oleh CO₂, sehingga dapat diperoleh bioetanol yang bersih dari gas CO₂. (Wasito, 1981)

2.12 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 diembunkan dan dikembalikan sebagian ke dalam kolom agar terjadi kontak antara uap yang naik ke atas dengan embun yang dikembalikan.



Gambar 5. Rangkaian 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 kedalam alat penguap.
4. Kondensasi lanjut dari distilat panas dalam sebuah alat pendingin.
5. Penampungan distilat dalam sebuah bejana.
6. Pengeluaran residu dari alat penguap.

2.13 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.

2.13.1 Indeks Bias

Indeks bias didefinisikan sebagai perbandingan antara kecepatan cahaya dalam ruang hampa udara dengan cepat rambat cahaya pada suatu medium. 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.

2.13.2 Gas Kromatografi

Kromatografi adalah suatu cara pemisahan yang penting didalam analisis kimia. Di dalam kromatografi diperlukan adanya dua fase yang tidak saling bercampur, yaitu fase diam dan fase gerak. Fase diamnya disini berupa zat padat yang ditempatkan dalam suatu kolom atau dapat juga berupa cairan terserap dalam bentuk berupa lapisan yang tipis ada butir-butir halus suatu zat padat pendukung yang ditempatkan didalam kolom. Sedangkan fase geraknya dapat berupa gas atau cairan. 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).



Gambar 6. Peralatan Gas Kromatografi

Campuran yang akan dipisahkan komponen-komponennya, dimasukkan ke dalam kolom yang mengandung fase diam. Dengan bantuan fase gerak, komponen-komponen campuran itu kemudian dibawa bergerak melalui fase diam di dalam kolom. Perbedaan afinitas antara komponen-komponen itu bergerak dengan kecepatan berbeda melalui kolom. Akibat adanya perbedaan kecepatan komponen-komponen itu terpisah satu sama lain. Pada gas kromatografi, fase geraknya berupa gas dan fase diamnya berupa cairan. Partisi komponen cuplikan berdasarkan pelarutan uap komponen itu di dalam gas uap. Gas Kromatografi terdiri dari :

1. Tangki gas pembawa. Gas yang bertindak sebagai fase gerak disebut juga gas pembawa atau *carrier gas*. Gas pembawa yang biasa digunakan seperti Helium (He), Nitrogen, dan Hidrogen (H).
2. Alat pengatur tekanan (*regulator*), *regulator* digunakan untuk mengatur tekanan gas-gas yang digunakan.
3. *Injection Port* adalah cabang untuk memasukkan cuplikan dengan cara penyuntikan.
4. Kolom, tempat terjadinya proses pemisahan komponen-komponen cuplikan. Kolom ini ditempatkan didalam oven bersuhu tinggi, sehingga komponen-komponen cuplikan tetap berupa uap.
5. *Detector* berfungsi untuk mendeteksi komponen-komponen yang keluar dari kolom. *Detector* ini akan mengirimkan insyarat listrik ke alat pencatat (*recorder*).
6. *Recorder* merupakan alat pencatat yang berfungsi untuk mencatat insyarat-insyarat. *Recorder* yang banyak digunakan saat ini disebut integrator yang mempunyai fasilitas yang lebih lengkap dari recorder biasa.

2.13.3 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 7. Kertas pH Indikator Universal

2.13.4 Berat Jenis

Berat jenis didefinisikan sebagai massa suatu bahan per satuan volum 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 kg/dm³ atau g/mL, dan g/liter. Berat jenis mempunyai harga konstan pada suatu temperatur tertentu dan tidak tergantung pada jumlah bahan cuplikan (sampel). Alat yang dapat menentukan berat jenis, yaitu aerometer, piknometer, dan neraca whestphaal. Namun pada penelitian kali ini

menggunakan piknometer untuk menentukan berat jenis bioetanol yang dihasilkan.

Berat jenis suatu zat cair dapat dihitung dengan mengukur secara langsung berat jenis zat cair dalam piknometer dan volume zat ditentukan berdasarkan volume piknometer

$$\text{Berat Jenis Etanol} = \frac{\text{Berat zat cair dalam piknometer}}{\text{Volume zat cair dalam Piknometer}}$$

Dimana :

- Berat zat cair dalam piknometer = (Berat piknometer + zat cair) – (Berat Piknometer kosong)
- Volume zat cair dalam piknometer = volume piknometer
- Volume piknometer ditentukan dengan menggunakan zat cair yang telah diketahui berat jenisnya