

Optimasi Proses Hidrolisis Rumput Laut *Ulva Reticulata* dengan Katalis HNO_3 untuk Produksi Bioetanol

Sefrinus Maria Dolfi Kolo^{1*}, Noviana Mery Obenu¹, Lusitania Kefi¹, Felicitas F.Fuel¹

¹Program Studi Kimia, Fakultas Pertanian, Universitas Timor, Kefamenanu, NTT, Indonesia

Corresponding Author:
Sefri Maria Dolfi Kolo
sefrichem@unimor.ac.id

Received: October 2022
Accepted: February 2023
Published: March 2023

©Sefri Maria Dolfi Kolo et al.
This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Abstract

One alternative to make biofuels and replace petroleum-based fuels is to convert non-food ingredients from *Ulva reticulata* seaweed into bioethanol. Seventy percent of the earth's surface is covered by microalgae and seaweeds that can be converted into bioethanol. *Ulva* seaweed contains 50.3% carbohydrates in the form of heteropolysaccharides such as glucose, arabinose, rhamnose and xylose. Optimization of the seaweed hydrolysis catalyzed by HNO_3 using Microwave irradiation was done by varying acid concentration (1, 3, 5, 7%), hydrolysis time (30, 40, 50, and 60 minutes), and hydrolysis temperature (75, 100, 125, 150°C). Fermentation was carried out by varying inoculum concentrations (6, 8, and 10% (v/v)) for 5, 6 and 7 days at a temperature of 30°C and a pH of 4.5. Analysis of the surface texture of the sample was carried out by Scanning Electron Microscopy (SEM). The analysis of reducing sugars concentration was carried out using the dinitrosalicylate (DNS) method. Ethanol analysis was carried out by Gas Chromatography (GC). The results of SEM analysis showed that prior to hydrolysis, the surface morphology of the powder was still compact and intact. Whereas after being hydrolyzed with HNO_3 it was seen that the surface texture of the powder suffered significant damage. The hydrolysis results showed that the optimum conditions during the pretreatment of *U. reticulata* powder was at acid concentration of 7%, reaction time of 50 minutes, reaction temperature of 150°C and 250 watts of power which gave hydrolysate with reducing sugar concentration of 86.5 g/L. Fermentation of the hydrolysate using yeast *Saccharomyces cerevisiae* produced bioethanol with concentration of 37.2% as analyzed using a gas chromatograph.

Keywords: *Ulva reticulata*; Hydrolysis; Microwave; Fermentation; Bioethanol

Pendahuluan

Biomassa laut termasuk alga, saat ini menjadi pertimbangan untuk mengatasi isu pemanasan global dan sebagai alternatif bahan bakar nabati, karena memiliki produktivitas yang tinggi^[1]. Makroalga sangat potensial sebagai sumber biofuel karena tidak dapat dikonsumsi, dapat tumbuh eksponensial dalam air garam,

kondisi buruk, dan dalam air asin^[2]. Kandungan karbohidrat dan lipid pada rumput laut dianggap dapat menjadi sumber energi terbarukan generasi ke-3^[3]. Yu-Qing et al., (2016) menyebutkan bahwa rumput laut *Ulva reticulata* mengandung karbohidrat berupa heteropolisakarida jenis glukosa, arabinosa, ramnosa, dan xilosa yang sangat berlimpah. Tentu hal ini sangat mendukung program

pemerintah Indonesia untuk mewujudkan pemanfaatan energi terbarukan sekurang-kurangnya 23% di tahun 2025^[5]. Selain itu, rumput laut jenis *Ulva reticulata* banyak tersebar di laut Timor - Nusa Tenggara Timur. Namun, *Ulva reticulata* ini belum dimanfaatkan oleh masyarakat di Pulau Timor sebagai bahan makanan, sehingga tidak berkompetisi dengan pangan saat menjadi bioetanol.

Konversi biomassa dari rumput laut menjadi bioetanol dapat dilakukan melalui beberapa tahap yakni perlakuan awal, hidrolisis, dan fermentasi serta destilasi (pemurnian)^[6]. Penggunaan katalis asam saat hidrolisis sangat berpengaruh terhadap perolehan gula pereduksi. Katalis HCl dan HNO₃ lebih efisien dalam menghasilkan glukosa kadar tinggi pada suhu, konsentrasi, dan waktu yang sama jika dibanding dengan katalis H₂SO₄. Penambahan asam dan suhu tinggi, reaksi katalis semakin cepat sehingga pati terdegradasi menjadi glukosa lebih cepat. Asam klorida (HCl) dan asam nitrat (HNO₃) adalah asam kuat yang bersifat monoprotik, dimana proses pembentukan H⁺ terjadi dalam satu tahap, sehingga reaksi hidrolisis yang dikatalisisnya berlangsung lebih cepat dibanding H₂SO₄^[7]. Selain itu, salah satu alternatif alat pada perlakuan awal (deliginifikasi dan hidrolisis) yakni penggunaan *microwave irradiation*. Penggunaan *microwave irradiation* dapat meningkatkan efisiensi reaksi kimia dan memiliki banyak keuntungan, yakni waktu yang dibutuhkan relatif lebih singkat dibandingkan dengan metode konvensional, laju reaksi hidrolisis pati menjadi glukosa meningkat 50-100 kali, waktu produksinya lebih pendek, menghemat biaya, selain itu lebih ramah lingkungan karena konsentrasi asam yang digunakan lebih rendah^[8].

Hidrolisis menggunakan *microwave irradiation* pada beberapa rumput laut menghasilkan kadar gula pereduksi yang berbeda. Hidrolisis mikroalga *Chorella vulgaris* menghasilkan kadar gula pereduksi yang sangat tinggi sebesar 98.11 g/L^[9] sedangkan hidrolisis makroalga merah *Euchema denticulatum* menghasilkan kadar gula pereduksi sebesar 51.47 g/L^[10]. Kolo et al., (2021) melaporkan bahwa hidrolisis rumput laut *U. reticulata* dengan H₂SO₄ 2% selama 50

menit dapat memaksimalkan produksi gula pereduksi sebesar 33.4 g/L. Selanjutnya fermentasi produk hidrolisis menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* pada kondisi konsentrasi inokulum 10% selama 6 hari menghasilkan bioetanol dengan konsentrasi sebesar 5.02%^[11]. Nilai ini belum optimal untuk menghasilkan bioetanol dengan kadar sesuai SNI sehingga perlu dilakukan optimasi waktu dan konsentrasi inokulum saat fermentasi. Salah satu karakteristik bioetanol menurut SNI yakni memiliki kadar bioetanol sebesar 94% setelah denaturasi. Berdasarkan penelitian sebelumnya bioethanol dari rumput laut *Ulva reticulata* belum memenuhi SNI. Hal ini dikarenakan belum optimalnya pada perlakuan awal, saat fermentasi dan pemurnian melalui destilasi bertingkat.

Sejauh pengetahuan penulis, penelitian mengenai produksi bioetanol dari *U. reticulata* pertama kali diteliti tahun 2021 oleh Kolo et al^[11]. Penelitian Kolo et al.,(2021) menggunakan pelarut H₂SO₄ tanpa optimasi pada proses hidrolisis dan fermentasi sehingga dihasilkan kadar bioetanol yang rendah. Permasalahan utama pada produksi bioetanol dari biomassa yakni perlakuan awal baik alat maupun pemilihan pereaksi yang digunakan. Oleh karena itu, produksi bioetanol dari *U. reticulata* pada penelitian ini perlu dilakukan untuk mendapatkan hasil gula pereduksi dan bioetanol yang optimum melalui optimasi pada proses hidrolisis dan fermentasi. Kebaruan dari penelitian ini yakni rumput laut *Ulva reticulata* asal laut Timor ini dikonversi menjadi bioetanol melalui optimasi waktu hidrolisis, suhu hidrolisis dan konsentrasi HNO₃ menggunakan *microwave* dan dilanjutkan optimasi waktu dan variasi konsentrasi inokulum saat proses fermentasi. Penggunaan katalis HNO₃ dilakukan dengan tujuan mendapatkan kadar gula pereduksi yang tinggi saat proses hidrolisis. Hidrolisat dengan kadar gula yang tinggi diharapkan menghasilkan kadar etanol yang tinggi saat proses fermentasi. Tekstur permukaan serbuk *U. reticulata* sebelum dan sesudah hidrolisis dianalisis dengan SEM. Keberhasilan hidrolisis diselidiki dengan analisis gula pereduksi. Bioetanol yang diproduksi kemudian dimurnikan dengan

destilasi bertingkat dan dikarakterisasi dengan Kromatografi Gas (GC).

Metodologi Penelitian

Bahan kimia

Pelarut tahap perlakuan awal yaitu: HNO₃ (Merck) dan NaOH (teknis), Bahan penetralan media fermentasi yaitu HCl (teknis), Bahan untuk tahap analisa yaitu: Glukosa (Merck), Etanol (Merck), dan asam asetat (Merck).

Media agar miring yaitu: (ekstrak ragi 10 g/L; pepton 20 g/L; glukosa 20 g/L; agar 25 g/L), media inokulum terdiri atas media inokulum *Saccaromyces cerevisiae* (ekstrak ragi 5 g/L; pepton 5 g/L; xilosa dan glukosa 20 g/L sebagai sumber karbon), media fermentasi terdiri atas ekstrak ragi 5 g/L; Pepton 5 g/L; KH₂PO₄ 5 g/L, MgSO₄.7H₂O 0.4 g/L, NH₄SO₄ 0.5 g/L; Hidrolisat glukosa.

Peralatan

Alat-alat gelas yang digunakan dalam penelitian biokimia meliputi: cawan petri, gelas piala 50, 100, 1000, dan 2000 mL; labu erlenmeyer 250 mL; gelas ukur 5, 10, dan 25 mL; gelas arloji, corong kaca, pengaduk, tabung reaksi, pipet tetes dan peralatan gelas lainnya. Penimbangan semua bahan dilakukan menggunakan neraca analitik (*Mettler Toledo AG 204, USA* dan *OHAUS Portable advance*). Pengecekan pH larutan menggunakan pH meter (*Thermo Orion model 710 A+*). Alat-alat dan media pertumbuhan disterilisasi dengan *autoclave* (*Sturdy SA-232 X*). Inkubasi dilakukan menggunakan inkubator temperatur 37°C

(*FISHER model 503*), inkubator temperatur 65°C (*J.P. Selecta, s.a*), dan *water bath* (*Precision 280 series*), GC, Spektrofotometer UV-Vis, *Microwave* merk *Kirin*, fermentor dan alat SEM (*Zeiss, Type EVO MA 10*). Alat-alat lainnya meliputi: pengaduk magnetik (*Jeio Tech TM-17R*), pengocok atau *vortex* (*Genie 2 Scientetific Industries*), kuvet, kawat ose, dan tabung falcon ukuran 15 mL dan 45 mL.

Prosedur penelitian

Stock Pemiakan dan Peremajaan S. cerevisiae

S. cerevisiae dari stock diinokulasi pada 50 ml medium (Glukosa 10 g/l; ekstrak ragi 1.0 g/l; KH₂PO₄ 0.1 g/l; MgSO₄.7H₂O 0.1 g/l; dan (NH₄)₂SO₄, 0.1 g/l) dalam erlenmeyer, kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam menggunakan orbital shaker dengan kecepatan 100 rpm^[12].

Preparasi Rumput Laut U. reticulata.

Preparasi *U. reticulata* terdiri dari dua langkah yaitu pengeringan dan penggilingan, kemudian disaring menggunakan saringan ± 35 mesh sehingga diperoleh tepung *U. reticulata*.

Sakarifikasi Tepung Rumput Laut U. reticulata

Tahapan sakarifikasi pada tepung *U. reticulata* bertujuan untuk menghidrolisis selulosa menjadi bentuk monosakarida seperti glukosa. Sakarifikasi dilakukan dengan perlakuan konsentrasi HNO₃ (4 perlakuan), suhu (4 perlakuan) dan waktu (4 perlakuan) yang ditunjukkan pada Tabel 1. Semua perlakuan dilakukan 3 kali pengulangan.

Tabel 1. Optimasi hidrolisis serbuk *U. reticulata* dengan katalis HNO₃.

Perlakuan	Variasi			
	% (v/v) HNO ₃	Waktu (menit)	Temperatur (°C)	Daya (watt)
1.	1; 3; 5; 7	40	100	100
2.	Hasil perlakuan 1	30; 40; 50 dan 60	100	100
3.	Hasil perlakuan 1	Hasil perlakuan 2	75; 100; 125 dan 150	100
	Hasil perlakuan 1	Hasil perlakuan 2	Hasil perlakuan 2	100; 150; 200 dan 250
4.	Produksi Bioetanol dengan Konsentrasi, Waktu, Temperatur dan Daya Optimum			

Hidrolisis asam dilakukan dengan cara sebagai berikut: 3 g tepung *U. reticulata* dan 100 ml HNO₃ 1%; 3%; 5%; dan 7% (v/v) dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 ml, kemudian dipanaskan menggunakan *Microwave irradiation*. Hasil optimum pada variasi konsentrasi HNO₃ selanjutnya dilanjutkan dengan variasi waktu, temperatur dan daya dengan kondisi yang tertera pada Tabel 1. Medium tersebut selanjutnya didinginkan pada suhu ruang, selanjutnya hidrolisat didetoksifikasi menggunakan larutan NH₄OH hingga pH 10 dan selanjutnya pH diturunkan menjadi 5. Medium fermentasi tersebut dilakukan penambahan nutrisi NPK 0.04% dan NH₂SO₄ 0.15% ke dalam medium, selanjutnya, medium dipanaskan pada suhu 105°C selama 15 menit^[9].

Produksi Bioetanol

Medium fermentasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah 100 ml hidrolisat dalam erlenmeyer 250 ml untuk masing-masing perlakuan penelitian. Langkah pertama pembuatan starter dilakukan dengan menginokulasikan kultur khamir *S. cerevisiae* hasil peremajaan dari kultur cair ke dalam 100 ml medium fermentasi, kemudian diinkubasi pada suhu kamar sampai terjadinya pertengahan fase logaritmik^[13]. Fermentasi dilakukan dengan menggunakan ragi *S. cerevisiae*. Volume kerja fermentasi untuk medium hidrolisat sebanyak 200 mL. Hidrolisat serbuk *U. reticulata* terlebih dahulu dinetralkan untuk analisa gula pereduksi, lalu dimasukkan media fermentasi dan diautoklaf pada temperatur 121°C selama 15 menit. Fermentasi dilakukan secara anaerobik. Medium fermentasi menggunakan aqua dm sebagai pelarut. Fermentasi diatur pada pH 4.5 dan temperatur 30°C menggunakan NaOH atau HCl 2 M. Media inokulum dimasukkan secara berurutan sesuai waktu pertumbuhan kedua kultur ragi. Variasi inokulum yaitu 6%, 8%, dan 10% (v/v). Variasi Waktu Fermentasi yaitu 5, 6, dan 7 hari^[14].

Analisis Tekstur Permukaan Serbuk

Hasil hidrolisis disaring lalu dinetralkan untuk proses selanjutnya. Fraksi padat dilihat tekstur

permukaannya dengan SEM^[15], sedangkan fraksi cair dianalisis kandungan gula pereduksi dengan metode DNS menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

Analisis Gula Pereduksi

Pengukuran gula reduksi menggunakan metode 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS). Sampel sebanyak 1 mL ditambah 1 mL reagen DNS kemudian dicampur dan dipanaskan pada suhu 100 °C selama 10 menit. Pengukuran gula reduksi dilakukan dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 570 nm. Kandungan gula reduksi ditentukan berdasarkan kurva standar glukosa^[16].

Analisis Produk Bioetanol

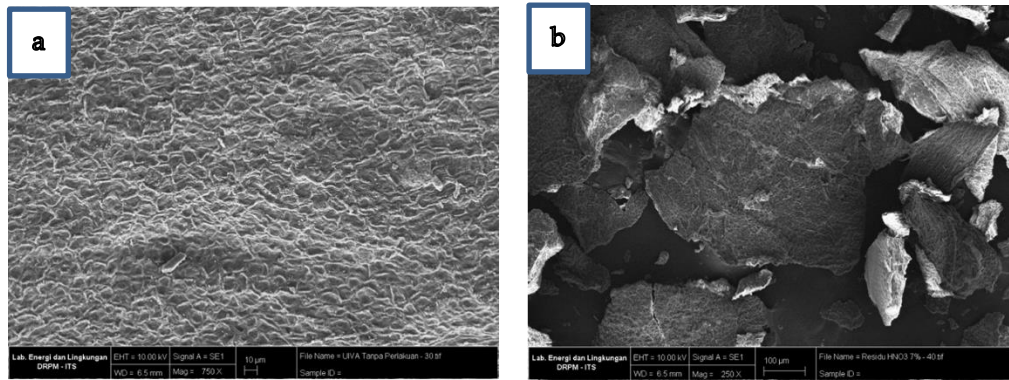
Sebanyak 1 mL fraksi n-heksan, etil asetat dan sisa air masing-masingnya ditambahkan 10 mL akuades dikocok selama 1 menit sampai terbentuk busa. Ditambahkan 2 tetes HCl pekat, jika busa tidak hilang selama 7 menit, maka sampel positif mengandung saponin.

Hasil dan Diskusi

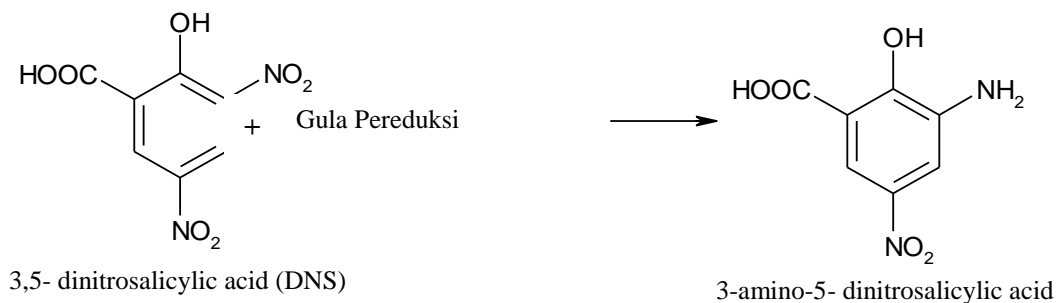
Analisis Tekstur Permukaan Serbuk menggunakan Scanning Electron Microscope (SEM)

Hasil perlakuan awal pada serbuk *Ulva reticulata* selanjutnya dilakukan pengamatan morfologi permukaan serbuk menggunakan SEM sedangkan analisis kuantitatif dilakukan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Pengujian SEM bertujuan untuk melihat permukaan serbuk sebelum dan setelah perlakuan awal. Pengujian dilakukan pada 2 sampel yaitu serbuk awal ukuran 100 mesh, dan serbuk hasil hidrolisis dengan perbesaran 750x (Gambar 1).

Berdasarkan analisis *Scanning Electron Microscope* (SEM) pada hasil perlakuan awal serbuk menunjukkan bahwa ada pengaruh atau perubahan morfologi permukaan setelah mendapat perlakuan dengan bantuan *microwave*. Sebelum hidrolisis, morfologi permukaan serbuk masih kompak dan utuh (Gambar 1a).



Gambar 1. Citra SEM morfologi permukaan serbuk *Ulva reticulata*: **a.** tanpa perlakuan awal, **b.** Setelah proses hidrolisis.



Gambar 2. Reaksi antara DNS dengan Gula Pereduksi ^[17]

Sedangkan setelah dihidrolisis dengan HNO_3 terlihat bahwa tekstur permukaan serbuk mengalami kerusakan yang signifikan (Gambar 1b). Proses hidrolisis menggunakan asam (HNO_3) dapat memutuskan ikatan β -1,4-glikosidik pada selulosa dan memutuskan β -1,4-D-piranosil pada hemiselulosa menjadi gula sederhana (glukosa, xilosa, galaktosa, arabinosa dan manosa).

Proses Hidrolisis

Hidrolisat serbuk *U. reticulata* selanjutnya direaksikan dengan DNS untuk menganalisa kandungan gula pereduksi. Pereaksi DNS digunakan untuk menentukan kandungan gula pereduksi sebab DNS memiliki senyawa aromatik yang dapat bereaksi dengan gula pereduksi membentuk senyawa *3-amino-5-dinitrosalicylic acid* (Gambar 2). Reaksi ini berlangsung dalam suasana basa sehingga jika pada sampel terdapat gula pereduksi maka

larutan akan berubah warna dari kuning menjadi jingga kemerahan. Senyawa *3-amino-5-dinitrosalicylic acid* yang terbentuk dari reaksi antara DNS dengan gula reduksi dapat menyerap gelombang elektromagnetik pada panjang gelombang 540 nm. Semakin banyak molekul *3-amino-5-dinitrosalicylic acid* yang terbentuk maka semakin banyak pula kadar gula pereduksi yang terdapat pada sampel dan mengakibatkan serapannya makin tinggi^[17].

Kandungan Gula Pereduksi pada Serbuk *U. reticulata*

Kadar gula pereduksi menyatakan tingkat konversi dari polisakarida menjadi gula sederhana akibat adanya perombakan pati menjadi glukosa. Optimasi perlakuan awal dilakukan dengan menganalisa kadar gula pereduksi dari hidrolisat serbuk *U. reticulata* dan hasilnya terlihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Data Gula Pereduksi serbuk *U. reticulata*

Tanpa Microwave (g/L)	HNO ₃ (% v/v)	GP (g/L)	WR (Menit)	GP (g/L)	Temp (°C)	GP (g/L)	DI (watt)	GP (g/L)
	1	24.5	30	17.2	100	39.2	100	-
	3	41.9	40	31.9	150	86.5	150	-
31.87	5	57.9	50	45.9	200	73.9	200	-
	7	72.5	60	35.2	250	51.9	250	83.3

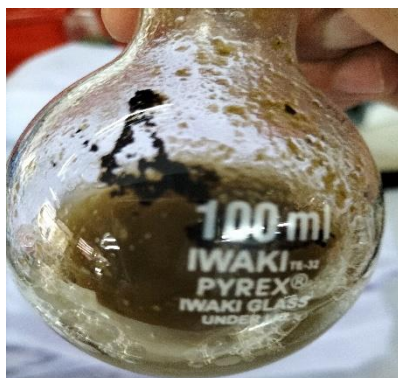
Singkatan: HNO₃: Asam Nitrat; GP: Gula Pereduksi; WR: Waktu Reaksi; Temp: Temperatur; DI: Daya Iradiasi.

Perlakuan awal pada penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan hasil gula pereduksi yang lebih tinggi. Optimasi dilakukan dengan memodifikasi proses perlakuan awal menggunakan teknik *Microwave irradiation* untuk meningkatkan efisiensi reaksi. Hasil perlakuan awal hidrolisis asam pada serbuk *U. reticulata* dengan menggunakan *Microwave irradiation* yang disajikan pada Tabel 2. Kekuatan *Microwave irradiation* tampaknya mempengaruhi jumlah reduksi gula secara signifikan (Tabel 2).

Berdasarkan hasil hidrolisis pada Tabel 2 terlihat adanya peningkatan konsentrasi gula pereduksi seiring meningkatnya konsentrasi asam nitrat yang digunakan dalam proses hidrolisis. Trend yang berbeda yang ditunjukkan ketika dilakukan variasi waktu dimana kadar gula pereduksi meningkat pada waktu 30 hingga 50 menit (17.2–45.9 g/L), tetapi menurun pada waktu 60 menit (35.2 g/L). Ketika dilakukan variasi suhu reaksi, kadar gula pereduksi meningkat pada suhu 100 hingga 150°C (39.2–86.5 g/L), tetapi menurun pada 200 hingga 250 °C (51.9 g/L). Kondisi ini disebabkan beberapa produk diubah menjadi senyawa sekunder seperti furfural dan hidroksimetilfurfural (HMF)^[8]. Hal ini didukung oleh penelitian sebelumnya oleh Zhou et al^[18] yang melaporkan bahwa selama

proses perlakuan awal sejumlah senyawa beracun seperti asam, furfural, HMF, dan senyawa fenolik diproduksi bersamaan dengan gula. Senyawa-senyawa tersebut akan menghambat saat proses fermentasi sehingga perlu dilakukan detoksifikasi hidrolisis untuk meningkatkan proses fermentasi^[19]. Selain itu, Kolo et al, 2022^[20] melaporkan bahwa penurunan kadar gula pereduksi seiring peningkatan suhu hidrolisis menyebabkan gula mengalami karamelisasi dan terbentuk arang pada dinding labu (Gambar 3). Hasil gula pereduksi tertinggi pada penelitian ini sebesar 86.5 g/L, lebih tinggi dari penelitian yang dilakukan oleh Kolo et al, 2021 menggunakan katalis H₂SO₄ dengan kadar gula pereduksi tertinggi mencapai 33.4 g/L^[11]. Efektivitas jenis katalis HNO₃ lebih tinggi menghasilkan glukosa pada suhu, konsentrasi dan waktu yang sama dibanding dengan H₂SO₄.

Kondisi optimal hidrolisis asam serbuk *U. reticulata* yang dikombinasikan dengan *Microwave irradiation* didapat pada konsentrasi asam nitrat 7% (v/v) dengan suhu reaksi 150°C selama 50 menit yang menghasilkan 86.5 g/L gula reduksi. Hasil ini lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan awal tanpa *microwave* yaitu hanya 31.87 g/L dengan konsentrasi gula meningkat sebesar 36.8% dibandingkan dengan yang tanpa *microwave*.



Gambar 3. Hasil hidrolisis serbuk *Ulva reticulata*

Proses Fermentasi

Hidrolisat serbuk *U. reticulata* selanjutnya digunakan sebagai substrat dalam proses fermentasi menggunakan ragi *S. cerevisiae* secara anaerob atau tanpa menggunakan oksigen. Konversi glukosa menjadi etanol terjadi melalui jalur *Embden Mayerhof Parans* (EMP) atau glikolisis^[21]. Hasil fermentasi biasanya tidak menimbulkan bau busuk dan akan menghasilkan gas karbon dioksida.

Hasil fermentasi biasanya dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti pH, suhu, waktu fermentasi, bahan pangan atau substrat, jenis mikroba, konsentrasi gula dan nutrisi. Dalam penelitian ini, nutrisi yang digunakan adalah ammonium sulfat ((NH₄)₂SO₄) yang berfungsi sebagai sumber nitrogen. Penambahan ammonium sulfat dalam media fermentasi dapat meningkatkan pertumbuhan mikroba yang lebih tinggi selama proses fermentasi jika dibandingkan dengan nutrisi sumber nitrogen lainnya^[22]. Tingkat keasaman (pH) juga turut berpengaruh dalam proses fermentasi dimana pH yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 4.5. Penggunaan pH ini disebabkan karena bakteri *S. cerevisiae* dapat hidup dan bertumbuh dengan baik pada kondisi pH 4-5^[23].

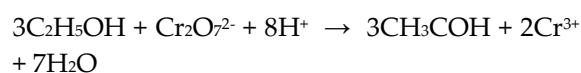
Selain tingkat keasamaan (pH), faktor lain yang mempengaruhi proses fermentasi adalah waktu fermentasi. Jika waktu fermentasi terlalu cepat maka etanol yang dihasilkan jumlahnya sedikit sebab ragi *S. cerevisiae* masih dalam proses pertumbuhan dan jika berlangsung dalam waktu yang lama maka ragi *S. cerevisiae* akan

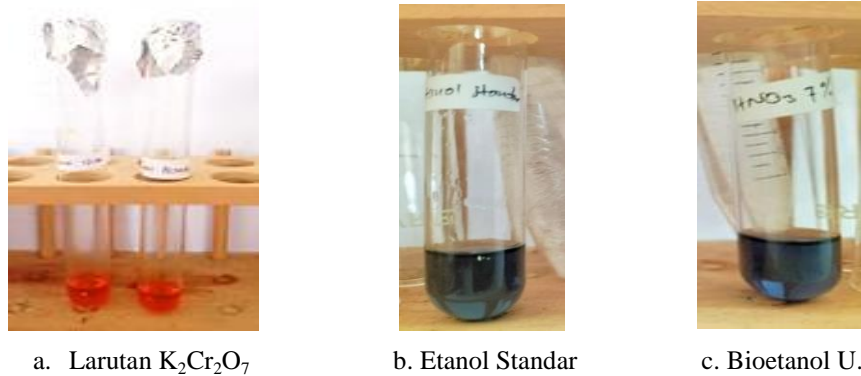
mati sehingga akan berpengaruh terhadap etanol yang dihasilkan. Semakin lama waktu fermentasi maka kadar bioetanol yang dihasilkan cenderung semakin tinggi, akan tetapi ketika fermentasi telah mencapai waktu optimum maka kadar etanol untuk waktu fermentasi berikutnya cenderung menurun. Semakin lama waktu proses fermentasi maka efisiensi substrat akan semakin tinggi^[24]. Dalam penelitian ini, waktu fermentasi yang dipakai adalah 5 hari. Pemilihan waktu fermentasi didasarkan pada penelitian yang dilakukan oleh Bahri et al yang menyatakan bahwa waktu fermentasi berkisar antara 4-7 hari^[25]. Hal ini juga diperkuat oleh penelitian yang dilakukan oleh Muin et al^[26] dimana hasil penelitiannya didapatkan waktu fermentasi optimum adalah 120 jam.

Penentuan Kadar Bioetanol pada Sampel Serbuk *U. Reticulata*

Analisis Kualitatif

Analisis kualitatif dilakukan untuk mengetahui adanya etanol dari sampel hasil fermentasi. Adanya etanol dalam suatu larutan dapat diuji secara oksidasi menggunakan larutan kalium dikromat (K₂Cr₂O₇). Prinsip yang digunakan adalah reaksi redoks yang terjadi antara etanol dengan K₂Cr₂O₇ dalam suasana asam, menurut persamaan reaksi berikut^[27]:



a. Larutan $K_2Cr_2O_7$

b. Etanol Standar

c. Bioetanol U.

Gambar 4. Hasil Uji Kualitatif Etanol Standar dan Bioetanol

Uji kualitatif dari sampel hasil fermentasi dan etanol murni dalam penelitian ini menggunakan senyawa $K_2Cr_2O_7$ dapat dilihat pada Gambar 4.

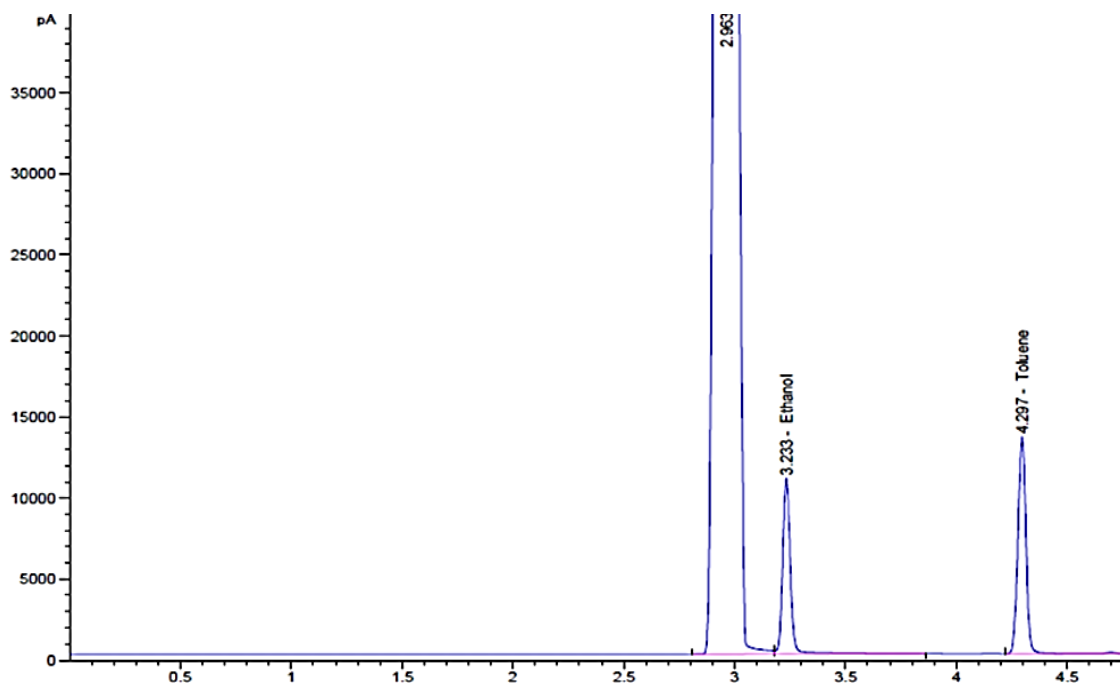
Hasil uji kualitatif pada Gambar 4, terlihat bahwa terjadi perubahan warna dari jingga (Gambar 4a) menjadi hijau kebiruan baik pada etanol murni maupun pada sampel hasil fermentasi (Gambar 4b dan c). Menurut Bello et al menyebutkan bahwa uji positif adanya etanol ditandai dengan berubahnya warna kalium dikromat dari jingga menjadi hijau kebiruan^[28]. Jadi dapat disimpulkan bahwa pada sampel hasil fermentasi telah terjadi perubahan glukosa menjadi etanol yang ditandai dengan terjadi perubahan warna larutan kalium dikromat dari jingga menjadi hijau kebiruan saat ditambahkan sampel hasil fermentasi^[29].

Analisis Kuantitatif

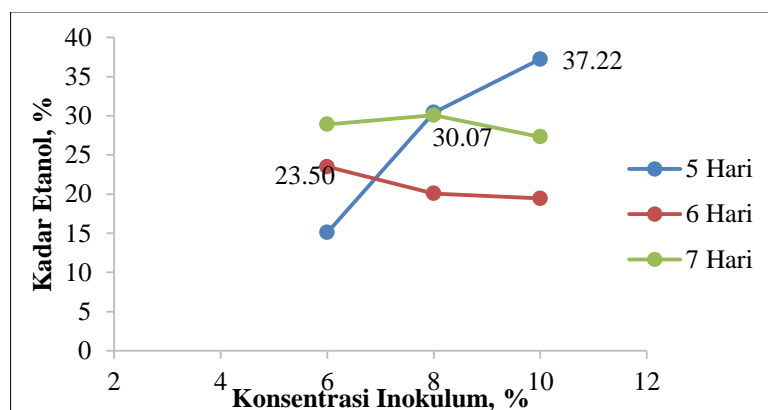
Analisis kuantitatif kadar bioetanol dalam sampel serbuk *U. reticulata* dilakukan dengan menggunakan alat kromatografi gas (GC). Analisis menggunakan GC dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya etanol yang dihasilkan dari proses fermentasi. Dalam analisis menggunakan GC, diperlukan senyawa tambahan sebagai standar internal agar terjadi pemisahan sempurna antara *peak* sampel sehingga pengukuran kadar senyawa tidak dipengaruhi oleh senyawa lain. Senyawa yang digunakan sebagai standar internal dalam penelitian ini adalah toluena. Toluena dipilih

sebagai standar internal karena memiliki rumus molekul yang mirip dengan rumus molekul dari etanol. Adanya kemiripan tersebut maka kelarutan diantara kedua larutan pun mudah diketahui berdasarkan prinsip *like dissolve like*^[30].

Kromatogram hasil kromatografi gas pada Gambar 5, menunjukkan bahwa pada sampel hasil fermentasi mengandung 3 puncak dengan waktu retensi yang berbeda yaitu 2.963, 3.233, dan 4.297 menit dimana senyawa yang keluar terlebih dahulu yakni senyawa heksana kemudian diikuti dengan etanol dan toluena. Peak dari senyawa heksana keluar lebih dahulu karena heksana memiliki titik didih yang paling rendah ($68.7^{\circ}C$) dibandingkan dengan etanol ($78.3^{\circ}C$) dan toluena ($110.6^{\circ}C$)^[31]. Hal ini dikarenakan komponen-komponen campuran dalam sampel akan terpisah atau keluar sesuai dengan titik didih yang dimiliki. Komponen yang memiliki titik didih lebih rendah akan menguap terlebih dahulu sehingga akan keluar sebagai peak pertama pada kromatogram. Dalam penelitian ini, heksana digunakan sebagai pelarut untuk melarutkan etanol dan toluena sebelum diinjeksikan pada GC. Heksana digunakan sebagai pelarut karena heksana merupakan senyawa non polar dan merupakan pelarut organik yang baik sebab memiliki titik didih yang rendah (mudah menguap), tidak berbahaya, tidak beracun, tidak mudah meledak atau terbakar, murah dan bersifat inert (tidak bereaksi dengan zat terlarut)^[20].



Gambar 5. Kromatogram Bioetanol Hasil Fermentasi



Gambar 6. Pengaruh Konsentrasi Inokulum dan Lama Fermentasi terhadap Perolehan Kadar Etanol

Berdasarkan kromatogram pada Gambar 5, terlihat bahwa waktu retensi dari sampel hasil fermentasi terdeteksi etanol pada 3233 menit. Kromatogram yang diperoleh dapat digunakan untuk menghitung konsentrasi bioetanol dalam sampel dengan membandingkan luas area dari puncak etanol dengan luas area dari standar. Hasil perhitungan didapatkan konsentrasi optimum etanol pada konsentrasi inokulum 10% sebesar 37.2 % pada waktu fermentasi 5 hari (Gambar 6).

Hasil distilasi bioetanol *Ulva reticulata* memiliki kemurnian tertinggi pada konsentrasi inokulum 10% yang dipanen pada hari ke-5 sebesar 37,22% menggunakan kromatografi gas (GC) yang terdeteksi pada waktu retensi 3233 menit (Gambar 5). Hasil bioetanol pada penelitian ini lebih tinggi jika dibandingkan penelitian terdahulu oleh Kolo et al. (2021) menggunakan bahan baku yang sama yakni *Ulva reticulata* sebesar 5.02%^[11]. Hal ini dipengaruhi oleh perbedaan kadar gula

pereduksi saat perlakuan awal yang menggunakan katalis H_2SO_4 dan HNO_3 . Perlakuan konsentrasi inokulum 10% pada fermentasi hari ke-5 menghasilkan bioetanol lebih tinggi. Febriani et al, (2020) melaporkan penggunaan konsentrasi inokulum terlalu tinggi (>15%) dapat menyebabkan penurunan viabilitas sel. Selain itu, kadar bioetanol terlalu tinggi dari hasil fermentasi yang lama akan bersifat toksik bagi sel sehingga sel mengalami kematian dan menurun viabilitasnya^[32].

Rendahnya konsentrasi bioetanol yang dihasilkan dalam penelitian ini disebabkan oleh beberapa faktor seperti belum semua molekul glukosa yang diubah menjadi etanol dan juga karena pada saat proses hidrolisis menggunakan asam biasanya terbentuk senyawa *hidroksimetilfurfural* (HMF) dimana senyawa ini merupakan senyawa inhibitor yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme dalam proses fermentasi. Selain itu juga disebabkan karena proses fermentasi yang berjalan lambat karena kandungan nutrisi dalam media yang jumlahnya sedikit. Keadaan ini juga disebabkan karena etanol sudah mengalami oksidasi menjadi asam asetat baik pada saat proses penyaringan atau saat pemindahan sampel hasil distilasi dari labu distilasi ke botol reagen. Anggraini dan Yuniningsih menyebutkan bahwa aktivitas dalam proses fermentasi mengakibatkan peningkatan pada kadar etanol. Namun, lama kelamaan etanol akan terurai menjadi asam asetat meskipun aktivitas fermentasi menurun^[33]. Faktor lain yang menyebabkan rendahnya konsentrasi bioetanol yaitu adanya kontaminan seperti bakteri asam laktat dan bakteri asam asetat yang mampu menjadi inhibitor dalam proses fermentasi^[22]. Faktor yang juga mempengaruhi yaitu masih terdapat kandungan air pada sampel hasil distilasi.

Kesimpulan

Penelitian ini dapat disimpulkan Kondisi optimal perlakuan awal serbuk *U. reticulata* menggunakan *microwave irradiation* Tipe Kirin pada proses hidrolisis dengan HNO_3 encer adalah konsentrasi HNO_3 7 %, waktu reaksi 50

menit dan suhu 150°C yang menghasilkan gula pereduksi dengan kadar sebesar 86.5 g/L. Hasil fermentasi menggunakan ragi *S. cerevisiae* didapatkan kadar bioetanol sebesar 37.2% berdasarkan analisa kromatografi gas.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada LPPM Universitas Timor yang telah mendanai ini, Laboratorium Kimia Universitas Timor, UPT Laboratorium Kimia Universitas Katolik Widya Mandira Kupang, Laboratorium Energi dan Lingkungan Universitas Sepuluh Nopember Surabaya dan Laboratorium PT. Gelora Djaja Surabaya yang telah membantu menganalisis sampel pada penelitian ini.

Daftar Pustaka

1. Sari, A. P., Ahmad, A., Usman, H. & Tuwo, A., Produksi Bioetanol dari Selulosa Alga Merah dengan Sistem Fermentasi Simultan Menggunakan Bakteri *Clostridium acetobutylicum*. *J. Rumpit Laut Indones.*, **2(2)**: 58–62 (2017).
2. Godvin Sharmila, V., Dinesh Kumar, M., Pugazhendi, A., Bajhaiya, A. K., Gugulothu, P. & Rajesh Banu, J., Biofuel production from Macroalgae: present scenario and future scope. *Bioengineered*, **12(2)**: 9216–9238 (2021).
3. Mathimani, T. & Pugazhendhi, A., Utilization of algae for biofuel, bio-products and bio-remediation. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, **17**: 326–330 (2019).
4. Yu-Qing, T., Mahmood, K., Shehzadi, R. & Ashraf, M. F., *Ulva Lactuca* and Its Polysaccharides: Food and Biomedical Aspects. *Journal of Biology*, **6(1)**: (2016).
5. Hutagulung, A. M., Yunita, W., Rahamri, N. C. & Johansyah, A., *Rencana Strategis 2015-2019 Kementerian Energi dan Sumber Daya Mineral Direktorat Jenderal Minyak dan Gas Bumi*. Kementerian Energi dan Sumber Daya Mineral Direktorat Jenderal Minyak dan Gas Bumi, (2015).
6. Agustini, N. W. S. & Febrian, N., HIDROLISIS BIOMASSA MIKROALGA

- Porphyridium cruentum MENGGUNAKAN ASAM (H₂SO₄ dan HNO₃) DALAM PRODUKSI BIOETANOL. *J. Kim. dan Kemasan*, **41(1)**: 1–10 (2019).
7. Saleh, H. A., Saokani, J. & Rijal, S., Penentuan Nilai Kalor Serta Pengaruh Asam Klorida (HCl) Terhadap Kadar Bioetanol Bonggol Pisang (Musa Paradisiacal). *Al-Kimia*, **4(1)**: 68–77 (2016).
 8. Kolo, S. M. D., Wahyuningrum, D. & Hertadi, R., The Effects of Microwave-Assisted Pretreatment and Cofermentation on Bioethanol Production from Elephant Grass. *Int. J. Microbiol.*, **2020**: 1–11 (2020).
 9. Yu, K. L., Chen, W. H., Sheen, H. K., Chang, J. S., Lin, C. S., Ong, H. C., Show, P. L., *et al.*, Bioethanol production from acid pretreated microalgal hydrolysate using microwave-assisted heating wet torrefaction. *Fuel*, **279(February)**: 118435 (2020).
 10. Teh, Y. Y., Lee, K. T., Chen, W. H., Lin, S. C., Sheen, H. K. & Tan, I. S., Dilute sulfuric acid hydrolysis of red macroalgae *Eucheuma denticulatum* with microwave-assisted heating for biochar production and sugar recovery. *Bioresour. Technol.*, **246**: 20–27 (2017).
 11. Kolo, S. M. D., Presson, J. & Amfotis, P., Produksi Bioetanol sebagai Energi Terbarukan dari Rumput Laut *Ulva reticulata* Asal Pulau Timor. *ALCHEMY J. Penelit. Kim.*, **17(2)**: 159 (2021).
 12. Sarjono, P. R., Mulyani, N. S., Noprastika, I., Ismiyanto., Ngadiwiyana. & Prasetya, N. B. A., PENGARUH WAKTU FERMENTASI TERHADAP AKTIVITAS *Saccharomyces cerevisiae* DALAM MENGHIDROLISIS ECENG GONDOK (*Eichhornia crassipes*). *J. Penelit. Saintek*, **26(2)**: 95–108 (2021).
 13. Somaprabha, A., Saravanan, K. & Durairaj, K., EVALUATION AND PRODUCTION OF BIOETHANOL USING AGRICULTURAL WASTE WITH BANANA PSEUDOSTEM AND PEELS OF PINE APPLE AND BANANA PEEL. *Int. Res. J. Mod. Eng. Technol. Sci.*, **4(12)**: 2023–2036 (2023).
 14. Widyastuti, P., Pengolahan Limbah Kulit Singkong Sebagai Bahan Bakar Bioetanol melalui Proses Fermentasi. *J. Kompetensi Tek.*, **11(1)**: 41–46 (2019).
 15. Alayoubi, R., Mehmood, N., Husson, E., Kouzayha, A., Tabcheh, M., Chaveriat, L., Sarazin, C., *et al.*, Low temperature ionic liquid pretreatment of lignocellulosic biomass to enhance bioethanol yield. *Renew. Energy*, **145(July)**: 1808–1816 (2020).
 16. Dave, N., Varadavenkatesan, T., Selvaraj, R. & Vinayagam, R., Modelling of fermentative bioethanol production from indigenous *Ulva prolifera* biomass by *Saccharomyces cerevisiae* NFCCI1248 using an integrated ANN-GA approach. *Sci. Total Environ.*, **791(June)**: 148429 (2021).
 17. Kolo, S. M. D. & Sine, Y., Produksi Bioetanol dari Ampas Sorgum Lahan Kering dengan Perlakuan Awal Microwave Irradiasi. *J. Saintek Lahan Kering*, **2(2)**: 39–40 (2019).
 18. Zhou, C., Zhao, J., Yagoub, A. E. G. A., Ma, H., Yu, X., Hu, J., Bao, X., *et al.*, Conversion of glucose into 5-hydroxymethylfurfural in different solvents and catalysts: Reaction kinetics and mechanism. *Egypt. J. Pet.*, **26(2)**: 477–487 (2017).
 19. Tyagi, S., Lee, K.-J., Mulla, S. I., Garg, N. & Chae, J.-C., *Production of Bioethanol From Sugarcane Bagasse: Current Approaches and Perspectives. Applied Microbiology and Bioengineering*, **(1)**: Elsevier Inc., (2019). doi:10.1016/b978-0-12-815407-6.00002-2
 20. Kolo, S. M. D., Pardosi, L. & Baru, A. E., The Effect of Hydrolysis Time Using Microwave on Bioethanol Production from Sorghum Waste (*Sorghum Bicolor* L.). *J. Sains dan Terap. Kim.*, **16(1)**: 28 (2022).
 21. Malik Ibrahim, A., Febrian Pradana, A., Priyosakti, G., Arifin, M., Alawiyah, T. & Perliansyah, P., POTENSI TANAMAN PANDAN LAUT (*Pandanus tectorius*) DAN LIMBAH INDUSTRI GANDUM KOTA CILEGON SEBAGAI BAHAN BAKU SINTESIS BIOETANOL. *J. Penelit. Has. Hutan*, **38(2)**: 91–104 (2020).
 22. Arifwan., Erwin. & Kartika, R., Pembuatan Bioetanol Dari Singkong Karet (Manihot

- glaziovii muell) Dengan Hidrolisis Enzimatis Dan Difermentasi Menggunakan *Saccharomyces cerevisiae*. *J. At.*, **01(1)**: 10–12 (2016).
23. FITRIA, N. & LINDASARI, E., Optimasi Perolehan Bioetanol dari Kulit Nanas (*Ananas cosmosus*) dengan Penambahan Urea, Variasi Konsentrasi Inokulasi Starter dan Waktu Fermentasi. *J. Reka Lingkungan.*, **9(1)**: 1–10 (2020).
24. Susmanto, P., Yandriani, Y., Dania, B. & Ellen, E., Pengaruh Jenis Nutrient Dan Waktu Terhadap Efisiensi Substrat Dan Kinetika Reaksi Fermentasi Dalam Produksi Bioetanol Berbahan Baku Biji Durian. *J. Integr. Proses*, **9(2)**: 1–8 (2020).
25. Bahri, S., Aji, A. & Yani, F., Pembuatan Bioetanol dari Kulit Pisang Kepok dengan Cara Fermentasi menggunakan Ragi Roti. *J. Teknol. Kim. Unimal*, **7(2)**: 85 (2019).
26. Muin, R., Lestari, D. & Sari, T. W., Pengaruh Konsentrasi Asam Sulfat dan Waktu Fermentasi terhadap Kadar Bioetanol Yang Dihasilkan Dari Biji Alpukat. *J. Tek. Kim.*, **20(4)**: 1–7 (2015).
27. Saidu, I., Danjuma, A. M. & Wakkala, A., Bioethanol Production and Proximate Composition of Waste Potatoes. *J. Energy Res. Rev.*, **8(3)**: 26–30 (2021).
28. Telussa, I., Fransina, E. G. & Singerin, J., Produksi Bioetanol dari Mikroalga Laut Ambon *Chlorella sp.* Galur TAD. *J. Sains Dasar*, **11(2)**: 63–69 (2022).
29. Bello, A. ., Jumare, F. I., Hussein, R. A., Haruna, Z. A., Nafiu, A. & Sanusi, A., SUSTAINABLE PRODUCTION OF BIOETHANOL FROM MAIZE BY SIMULTANEOUS SACCHARIFICATION AND FERMENTATION USING *ACREMONIUM BUTYRI* AND *ZYMOMONAS*. *Sci. World J.*, **17(4)**: 538–541 (2022).
30. Kolo, S. M. D., Obenu, N. M. & Rohy, N. T., Pengaruh Perlakuan Awal Ampas Biji Jewawut (*Setaria italica* L.) dengan Microwave Irradiation Untuk Produksi Bioetanol. *ALCHEMY J. Penelit. Kim.*, **18(2)**: 183 (2022).
31. Kolo, S. M. D., Obenu, N. M. & Tuas, M. Y. C., Pengaruh Pretreatment Makroalga *Ulva Reticulata* Menggunakan Microwave Irradiation Untuk Produksi Bioetanol. *J. Kim.*, **16(2)**: 212 (2022).
32. Febriani, Y., Sidharta, B. R. & Pranata, F. S., Produksi Bioetanol Pati Umbi Talas (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) dengan Variasi Konsentrasi Inokulum dan Waktu Fermentasi *Zymomonas mobilis*. *Biota J. Ilm. Ilmu-Ilmu Hayati*, **5(2)**: 92–98 (2020).
33. Abrina Anggraini, S. P. & Yuniningsih, S., Pemanfaatan Limbah Gula untuk Pembuatan Bioethanol yang dipengaruhi oleh Komposisi Khamir pada Proses Fermentasi. *Reka Buana J. Ilm. Tek. Sipil dan Tek. Kim.*, **5(2)**: 74 (2020).