

**PENGARUH KONSENTRASI AMMONIUM SULFAT ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)  
SEBAGAI SUMBER NITROGEN TERHADAP PRODUKSI BIOETANOL  
BERBAHAN BAKU *Glacilaria* sp.**

Ni Putu Widayanti<sup>1)</sup>, Wiwik Susanah Rita<sup>1)</sup>, dan Yenni Ciawi<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>*Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana, Bukit Jimbaran, Bali*

<sup>2)</sup>*Fakultas Teknik Universitas Udayana, Bukit Jimbaran, Bali*

---

**ABSTRAK**

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan kadar gula reduksi dan pati pada *Glacilaria* sp. dan mengetahui pengaruh konsentrasi ammonium sulfat ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) sebagai sumber nitrogen terhadap produksi bioetanol berbahan baku *Glacilaria* sp. Konsentrasi ammonium sulfat yang digunakan adalah 0,25%; 0,50%; 0,75%; dan 1% (b/v). Metode penelitian ini meliputi penentuan kadar air, kadar gula reduksi dan kadar pati dengan metode Nelson-Somogyi, optimasi waktu fermentasi, pengukuran pH akhir, dan penentuan kadar etanol.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar gula reduksi dan kadar pati yang terkandung pada *Glacilaria* sp. adalah sebesar 17,14% dan 15,42%. Konsentrasi (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sebesar 1% (b/v) dalam media menghasilkan etanol dengan jumlah optimum, yaitu sebesar 1,04% (v/v) pada hari ke-7. Media fermentasi dengan konsentrasi (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1%; 0,75%; 0,50%; dan 0,25% (b/v) menghasilkan etanol dengan jumlah yang optimum yaitu, berurutan, 0,96% (v/v) pada hari ke-5; 0,78% (v/v) pada hari ke-7; 0,74% (v/v) pada hari ke-7; dan 0,73% (v/v) pada hari ke-7. Secara keseluruhan, kondisi optimum untuk memproduksi bioetanol berbahan baku *Glacilaria* sp. terdapat pada media dengan konsentrasi (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1% (b/v) dan kadar etanol yang dihasilkan adalah sebesar 0,96% (v/v).

Kata kunci : *Glacilaria* sp., fermentasi, ammonium sulfat, dan bioetanol

**ABSTRACT**

The aims of this research are to determine the concentration of reducing sugar and starch in *Glacilaria* sp. and to investigate the influence of the concentration of ammonium sulfate as nitrogen source on the production of bioethanol using *Glacilaria* sp. as the carbon source. The concentrations of ammonium sulfate employed were 0,25%; 0,50%; 0,75%; and 1% (w/v). The methods employed in this research were the determination of water content, glucose and starch concentration using Nelson-Somogyi method, determining the optimum duration of fermentation, pH measurement, and the determination of ethanol concentration.

The results showed that the concentrations of reducing sugar and starch in *Glacilaria* sp. are 17,14% and 15,42%. The concentration of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, which produced the optimum concentration of ethanol (1,04% (v/v) on seventh day), was 1% (w/v). The fermentation media containing (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> of 1%; 0,75%; 0,5%; and 0,25% (w/v) produced optimum concentrations of ethanol, which were 0,96% (v/v) on fifth day; 0,78% (v/v) on seventh day; 0,74% (v/v) on seventh days; and 0,73% (v/v) on seventh day, respectively. The optimum concentration of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was 1% (w/v), which produced maximum concentration of bioethanol from *Glacilaria* sp., of 0,96% (v/v).

Keywords : *Glacilaria* sp., fermentation, ammonium sulphate, and bioethanol

## PENDAHULUAN

Indonesia terkenal sebagai salah satu negara maritim terbesar di dunia yang sebagian besar wilayahnya terdiri atas perairan. Hal tersebut menyebabkan negara Indonesia kaya akan sumber daya alam lautnya terutama rumput laut yang melimpah (Gautam *et al.*, 2000). Rumput laut yang tumbuh di perairan Bali telah diteliti di Universitas Udayana, tetapi kebanyakan mengarah pada identifikasi makronutrien. Brahmana (2010) telah mengidentifikasi kadar pati dari rumput laut yang tumbuh di sekitar Pantai Segara, dan diperoleh bahwa kadar pati tertinggi dimiliki oleh spesies *Gracilaria* sp. *Gracilaria* sp. adalah salah satu kelas dari alga merah yang tumbuh melekat pada substrat tertentu. Sejauh ini pemanfaatan *Gracilaria* sp. hanya sebatas sebagai bahan baku pangan, obat, dan produk kesehatan. Namun, spesies laut ini ternyata memiliki potensi sebagai sumber Energi Baru dan Terbarukan (EBT) yang dapat menyumbangkan solusi dalam menghadapi kelangkaan bahan bakar minyak (BBM) di era globalisasi ini.

Salah satu sumber mengatakan bahwa kandungan rumput laut kering terdiri atas air (11,28%), abu (36,05%), protein (1,86%), lemak (0,42%), serat kasar (8,96%), dan karbohidrat (41,43%). Pati yang terdapat pada *Gracilaria* sp. dapat dihidrolisis dengan asam sehingga pecah menjadi molekul glukosa. Glukosa dapat diubah menjadi produk etanol melalui proses fermentasi dengan bantuan mikroorganisme berupa *Saccharomyces cerevisiae*. Penggunaan *Saccharomyces cerevisiae* dalam pembuatan etanol telah banyak dikembangkan di beberapa negara seperti Brazil, Afrika Selatan, dan Amerika Serikat karena *Saccharomyces cerevisiae* mampu memproduksi etanol dalam jumlah besar (Harvey, 2009; Narita, 2005).

Etanol hasil fermentasi harus didestilasi agar etanol yang diperoleh lebih murni. Penggunaan metode destilasi untuk memperoleh bioetanol disebabkan karena senyawa kimia tersebut mampu dipisahkan berdasarkan perbedaan titik didihnya atau kevolatilan dari senyawa kimia tersebut. Salah satu kegunaan penting bioetanol yaitu dapat dijadikan energi

alternatif yang dapat menambah volume bahan bakar minyak yang jumlahnya sangat terbatas untuk ke depannya. Selain itu, bioetanol juga dapat digunakan sebagai campuran dalam bahan bakar minyak (BBM) yang berfungsi sebagai agen peningkat angka oktan dan sumber oksigen untuk pembakaran yang ramah lingkungan sebagai pengganti metil tetra butil eter (MTBE) (Archunan, 2004; Kim *et al.*, 2008).

Pengambilan sampel *Glacilaria* sp. dilakukan pada salah satu perairan yang berpotensi memproduksi rumput laut yaitu di Pantai Serangan yang berlokasi di Kota Denpasar.

Salah satu faktor yang mempengaruhi dalam pembuatan bioetanol agar memperoleh hasil maksimum adalah media. Media untuk produksi etanol harus memenuhi kebutuhan elemen dasar dalam pembentukan biomassa dan produk fermentasi. Kebutuhan elemen dasar mikroba yang digunakan yaitu sumber karbon yang diperoleh dari karbohidrat. Selain itu, diperlukan zat tambahan seperti sumber nitrogen, sulfur, dan mineral lain dalam media fermentasi. Wijiyono (2009) menyatakan bahwa mikroba membutuhkan paling sedikit 267 mg N/liter untuk dapat melakukan proses pertumbuhan dan fermentasi. Salah satu sumber nitrogen yang dapat dimanfaatkan sebagai sumber nutrisi dalam media fermentasi adalah ammonium sulfat. Pada penelitian ini, digunakan ammonium sulfat ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) sebagai sumber nitrogen yang murah dan dipelajari pengaruhnya pada proses fermentasi etanol (Hakim, 2007).

Tersedianya sumber nitrogen dengan konsentrasi yang tepat dalam media fermentasi diharapkan mampu meningkatkan pertumbuhan mikroba sehingga dapat diperoleh kadar etanol maksimum. Berdasarkan kenyataan tersebut, perlu dilakukan penambahan ammonium sulfat ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) sebagai sumber nitrogen dengan konsentrasi yang bervariasi untuk menentukan pengaruhnya terhadap produksi etanol pada fermentasi *Glacilaria* sp.

## MATERI DAN METODE

### Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: sampel rumput laut *Glacilaria* sp., ragi NKL, asam sulfat ( $H_2SO_4$ ) natrium hidroksida (NaOH), pereaksi Nelson, pereaksi arsenomolibdat, standar glukosa, alkohol 70%, spiritus, standar etanol, dan ammonium sulfat ( $(NH_4)_2SO_4$ ).

### Peralatan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: neraca analitik, seperangkat alat gelas laboratorium, pipet volume, pipet ukur, pipet tetes, pipet mikro, cawan porselen, botol fermentasi (botol kaca), kertas saring, ayakan, kertas indikator pH, blender, hotplate, jarum ose, *Shaker (Atta model AE-3605)*, termometer, inkubator (*Sanyo*), Autoklaf (*LaboAutoclave*), desikator, *aluminium foil*, *clippark*, pisau, oven, spatula, magnetik stirer, botol semprot, seperangkat alat spektrofotometer UV-Vis (*Varian DMS 80*), seperangkat alat destilasi, dan seperangkat alat kromatografi gas (*Varian 3300*).

### Cara Kerja

#### *Persiapan sampel rumput laut*

Sampel rumput laut dibersihkan dari pengotornya, kemudian dikeringkan dengan kipas angin sampai kering selama  $\pm 3$  hari. Sampel rumput laut yang telah kering dihancurkan dengan menggunakan blender. Kemudian disaring menggunakan ayakan, sehingga didapatkan tepung rumput laut.

#### *Penentuan kadar air secara gravimetri*

Mula-mula cawan kosong dikeringkan dalam oven selama 1 jam dengan suhu  $105^{\circ}C$ , kemudian didinginkan dalam desikator selama 30 menit dan ditimbang berulang-ulang hingga beratnya konstan. Sampel ditimbang sebanyak 2 gram dalam cawan tersebut, kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu  $100-105^{\circ}C$  selama 5 jam atau sampai beratnya konstan. Cawan yang berisi sampel didinginkan di dalam desikator selama 30 menit lalu ditimbang hingga beratnya konstan (AOAC, 1970).

#### *Persiapan sampel untuk analisis kadar gula reduksi*

Sebanyak 1 gram tepung rumput laut *Glacilaria* sp. dibuat suspensi dengan cara dicampur dengan  $H_2SO_4$  3,5% (v/v) dengan perbandingan 1:8 (b/v), kemudian sampel dipanaskan pada suhu  $100^{\circ}C$  dan diaduk dengan stirer pada skala 5 selama 1 jam. Suspensi rumput laut tersebut selanjutnya diuji secara kualitatif dengan reagen Benedict dan diukur kadar gula reduksinya secara kuantitatif. Sampel yang telah diketahui kadar gula reduksinya selanjutnya disiapkan sebagai media fermentasi (Junk dan Pancoast, 1980).

#### *Pembuatan kurva standar glukosa*

Sebanyak 1 mL larutan standar glukosa 0 (blanko); 20 ppm; 40 ppm; dan 60 ppm secara terpisah dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian masing-masing tabung reaksi tersebut ditambahkan dengan 1 mL reagen Nelson dan semua tabung dipanaskan pada penangas air yang mendidih selama 20 menit. Selanjutnya semua tabung reaksi diambil dan didinginkan di dalam gelas beker yang berisi air dingin sehingga suhu tabung reaksi mencapai  $25^{\circ}C$ . Setelah dingin, campuran ditambah 1 mL reagen arsenomolibdat dan diaduk sampai semua endapan  $Cu_2O$  yang ada larut kembali. Larutan tersebut ditambah 7 mL akuades dan diaduk sampai homogen. Absorbansi campuran selanjutnya diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 540 nm (Sudarmadji *et al.*, 1997).

#### *Penentuan kadar gula reduksi dan kadar pati (Metode Nelson-Somogyi)*

Sebanyak 1,0 mL filtrat jernih yang disaring dari hasil hidrolisis rumput laut dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 1 mL reagen Nelson dan dipanaskan pada penangas air yang mendidih selama 20 menit. Selanjutnya larutan tersebut diambil dan didinginkan di dalam gelas beker yang berisi air dingin sehingga suhu tabung reaksi mencapai  $25^{\circ}C$ . Setelah dingin, larutan tersebut ditambah 1 mL reagen arsenomolibdat dan dikocok sampai semua endapan  $Cu_2O$  yang ada larut kembali. Selanjutnya larutan tersebut ditambahkan 7 mL akuades dan divortex sampai

homogen. Kemudian absorbansi campuran diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 540 nm. Setelah kadar gula reduksi diketahui, berat pati dihitung dengan cara mengalikan berat glukosa dengan 0,9 sehingga kadar pati dapat diketahui (Sudarmadji *et al.*, 1997 dimodifikasi).

### **Regenerasi kultur**

Sebanyak 0,5 gram ragi NKL (*Saccharomyces cerevisiae*) ditambah 25 mL larutan glukosa 1% dalam erlenmeyer 50 mL, diisolasi pada kondisi anaerobik dengan cara ditutup rapat dengan *clipark*, *aluminium foil*, dan plastik. Labu erlenmeyer yang telah berisi ragi dan glukosa 1% (b/v) diletakkan di atas shaker selama 24 jam dengan temperatur ruang 29-30°C (Fardiaz, 1992).

### **Pembuatan inokulum untuk fermentasi**

Biakan pada larutan glukosa 1% (b/v) diinokulasi dengan cara ditambahkan suspensi rumput laut sebanyak 10 mL, kemudian diinkubasi selama ± 48 jam dengan kondisi aerobik pada suhu 30°C. Inokulasi rutin dilakukan setiap 48 jam sebanyak 3 kali. Inokulum yang telah diinokulasi sebanyak 3 kali akan digunakan pada fermentasi utama (Fardiaz, 1989).

### **Pembuatan kurva standar etanol**

Labu ukur 5 mL yang kosong ditimbang terlebih dahulu dan dicatat massanya. Labu ukur 5 mL yang berisi air suling selanjutnya ditimbang dan dicatat massanya dan dinyatakan sebagai etanol 0% (hanya mengandung air suling). Sebanyak 4 buah standar etanol 5%; 10%; 20%, dan 40% masing-masing disiapkan dalam labu ukur 5 mL kemudian ditimbang dan dicatat massanya.

Sebanyak 1 µL larutan standar etanol masing-masing 0% (tidak dilakukan); 5%; 10%; 20%, dan 40% diinjeksikan satu per satu ke dalam tempat injeksi sampel pada kromatografi gas. Hasil pendeteksian etanol dalam sampel akan direkam oleh rekorder pada GC. Luas area dari masing-masing standar etanol pada kromatogram selanjutnya dicatat. Luas area selanjutnya diplotkan dengan konsentrasi standar etanol sehingga membentuk kurva standar untuk

melihat kelinierannya. Setelah diketahui garisnya linier, kurva hubungan antara berat jenis (densitas) dengan konsentrasi standar etanol selanjutnya dibuat sebagai kurva standar untuk mengukur kadar etanol pada sampel (Tuti *et al.*, 2010).

### **Optimasi waktu fermentasi dengan penambahan (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1% (b/v) pada media fermentasi**

Sebanyak 10 gram tepung rumput laut dihidrolisis dengan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3,5% (v/v) dengan perbandingan 1:8 (b/v), kemudian sampel dipanaskan pada suhu 100°C dan diaduk dengan stirer pada skala 5 selama 1 jam. Cairan hasil hidrolisis diatur pHnya dengan cara menambahkan larutan NaOH 4 M sedikit demi sedikit hingga pHnya berkisar antara 4-5. Suspensi tersebut kemudian dipindahkan ke dalam 4 buah botol yang sudah steril. Masing-masing botol ditambah glukosa 1% (b/v), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1% (b/v), inokulum sebanyak 2%, dan diisi kode A, B, C, dan D. Media tersebut kemudian difermentasi di dalam inkubator pada temperatur 78-85°C selama 3, 5, 7, dan 9 hari. Hasil fermentasi kemudian didestilasi pada temperatur 78-85°C. Etanol yang diperoleh kemudian ditimbang dan dihitung densitasnya. Hasil perhitungan densitas selanjutnya diplotkan pada kurva hubungan antara densitas dengan konsentrasi etanol untuk memperoleh kadar etanol pada sampel. Waktu fermentasi yang menghasilkan etanol dengan kadar optimum selanjutnya akan digunakan sebagai waktu optimum untuk fermentasi selanjutnya.

### **Hidrolisis rumput laut untuk fermentasi**

Rumput laut *Glacilaria* sp. ditimbang masing-masing sebanyak 5 gram untuk semua jenis perlakuan (16 jenis perlakuan). Masing-masing sampel dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3,5% (v/v) dengan perbandingan 1:8 (b/v), kemudian sampel dipanaskan pada suhu 100°C dan diaduk dengan stirer pada skala 5 selama 1 jam.

### **Pengaturan pH dan penambahan nutrisi**

Cairan hasil hidrolisis diatur pHnya dengan cara menambahkan larutan NaOH 4 M sedikit demi sedikit hingga pHnya berkisar

antara 4-5. Suspensi tersebut kemudian dipindahkan ke dalam 16 botol fermentasi yang telah diberi label masing-masing sebanyak 50 mL. Masing-masing suspensi rumput laut ditambah 1 ml larutan glukosa 2% (b/v) dan larutan ammonium sulfat ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 1% (b/v) pada botol A<sub>1</sub>-A<sub>4</sub>; 0,75 % (b/v) pada botol B<sub>1</sub>-B<sub>4</sub>; 0,5% (b/v) pada botol C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>; dan 0,25% (b/v) pada botol D<sub>1</sub>-D<sub>4</sub> kemudian dikocok beberapa kali agar bercampur secara homogen.

### **Fermentasi alkohol**

Masing-masing media kemudian ditambah inokulum sebanyak 2% dari jumlah media fermentasi. Penambahan inokulum dilakukan secara aseptik di atas bunsen. Fermentasi dilakukan di dalam inkubator pada temperatur 25-30<sup>0</sup>C. Seluruh media diinkubasi selama 4, 5, 6, dan 7 hari.

### **Pengukuran pH akhir**

Media yang difermentasi diukur pH akhirnya pada hari ke-4, 5, 6, dan 7 secara kualitatif dengan menggunakan indikator pH. Pengukuran pH media dilakukan dengan mengamati perubahan warna yang terjadi selanjutnya mencocokkan warnanya dengan warna indikator pH. Hasil pengukuran yang diperoleh kemudian dicatat.

### **Pengukuran kadar etanol**

Cairan hasil fermentasi masing-masing media (media A sampai D) didestilasi mulai dari hari ke-4 sampai hari ke-7. Cairan tersebut diukur volumenya terlebih dahulu kemudian dimasukkan ke dalam labu destilasi 250 mL dan ditambahkan beberapa butir batu didih. Selanjutnya sampel didestilasi pada suhu 78<sup>0</sup>-85<sup>0</sup>C. Kemudian hasil destilasi dimasukkan tepat sampai tanda batas ke dalam labu ukur yang disesuaikan dengan jumlah destilat yang diperoleh. Dinding labu ukur dikeringkan, lalu ditimbang. Labu ukur dicuci sampai bersih, dikeringkan dan dibiarkan pada suhu kamar, lalu ditimbang. Penentuan berat air suling juga dilakukan dengan labu ukur tersebut (Harvey, 2009 dimodifikasi). Kadar etanol ditentukan dengan bantuan kurva hubungan antara densitas dengan konsentrasi standar etanol (Tuti *et al.*, 2010).

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **Penentuan Kadar Air, Gula Reduksi, dan Pati Rumput Laut *Glacilaria* sp.**

Kadar air dalam suatu bahan sangat erat kaitannya dengan aktivitas air (a<sub>w</sub>) yang dapat digunakan oleh mikroba untuk pertumbuhannya sehingga dapat digunakan untuk mengetahui daya awet dari bahan. Kadar air rumput laut kering yang diperoleh dari penelitian ini adalah 18,38%.

Hasil uji kualitatif dengan reagen Benedict menunjukkan adanya kandungan gula reduksi yang cukup besar dalam sampel *Glacilaria* sp. yang ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna merah bata pada sampel saat dipanaskan. Hasil uji kuantitatif dengan metode Nelson-Somogyi (Sudarmadji *et al.*, 1997) menunjukkan kadar gula reduksi pada rumput laut *Glacilaria* sp. adalah 17,14%. Kadar gula reduksi tersebut cukup baik untuk proses fermentasi. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Amerine dan Cruess (1960), yang menyatakan bahwa glukosa dapat difermentasi dengan baik pada kadar gula pereduksi 15-20%. Terhadap konsentrasi gula yang lebih tinggi, misalnya di atas 25%, khamir tidak akan memfermentasi lagi karena kadar gula yang terlalu tinggi dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme.

Kadar pati yang terkandung dalam sampel *Glacilaria* sp. dapat dihitung yaitu dengan cara mengalikan berat glukosa dengan 0,9 (Sudarmadji *et al.*, 1997). Kadar pati rata-rata dari rumput laut *Glacilaria* sp. tersebut yaitu sebesar 15,42%

Hasil dari pengukuran absorbansi sejumlah standar glukosa dengan seri konsentrasi 0-60 ppm pada panjang gelombang 540 nm diperoleh persamaan regresi  $y = 0,00565x - 0,002$  dengan  $r = 0,9997$ , nilai ini menunjukkan bahwa absorbansi dengan konsentrasi memberikan hubungan yang linier.

### **Pembuatan Kurva Standar Hubungan antara Densitas dan Konsentrasi Etanol untuk Analisis Sampel**

Konsentrasi larutan standar yang dipilih untuk pembuatan kurva standar adalah 0%, 5%, 10%, 20%, dan 40%. Hasil perhitungan densitas

dari masing-masing larutan standar etanol disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Perhitungan Densitas Standar Etanol

Konsentrasi standar etanol	Densitas etanol
0 %	1,0000
5 %	0,9916
10 %	0,9850
20 %	0,9689
40 %	0,9425

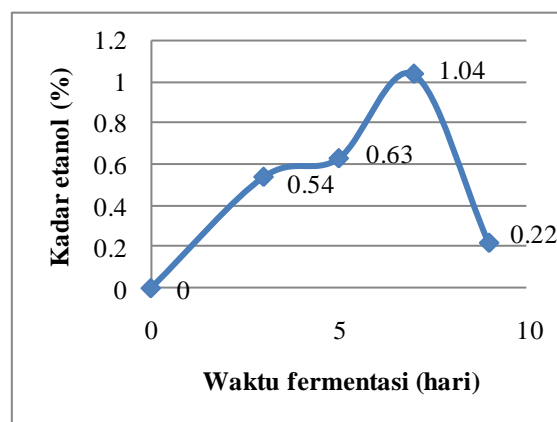
Tabel 1 menunjukkan hubungan antara konsentrasi dan densitas standar etanol. Persamaan garis regresi linier yang diperoleh dari hasil perhitungan, yaitu  $y = -696,5x + 695,8$  dengan koefisien regresi sebesar 0,9980. Kadar etanol pada sampel dapat diketahui dengan memplotkan data densitas etanol dari sampel pada kurva standar hubungan densitas dengan konsentrasi etanol (Tuti, *et al.*, 2010).

### Optimasi Waktu Fermentasi dengan Konsentrasi Ammonium Sulfat 1% (b/v) pada Media

Waktu fermentasi yang dipilih agar mikroba mampu melakukan fermentasi secara optimum adalah 3, 5, 7, dan 9 hari. Pemilihan waktu fermentasi tersebut didasarkan pada penelitian Prescott dan Dunn (1959) yang menyatakan bahwa fermentasi etanol memerlukan waktu 3-7 hari. Keempat komposisi media fermentasi yang sama dengan variasi waktu yang berbeda menghasilkan etanol dengan kadar yang berbeda. Kadar etanol yang diperoleh dari hasil optimasi waktu fermentasi disajikan pada Gambar 1.

Gambar 1 menunjukkan terjadinya peningkatan kadar etanol sampai hari ke-7, yaitu berturut-turut 0,54% (v/v) pada hari ke-3, 0,63% (v/v) pada hari ke-5, hingga mencapai kadar maksimum yaitu 1,04% (v/v) pada hari ke-7. Hingga hari ke-7 diduga pertumbuhan dan aktivitas *Saccharomyces cerevisiae* berada pada fase logaritmik dan kesediaan nutrisi sangat mencukupi serta dihasilkan zat-zat metabolik secara maksimal. Kecepatan pertumbuhan pada fase logaritmik dipengaruhi oleh tersedianya

nutrien yang cukup dalam media (Fardiaz, 1989). Pada hari ke-9 kadar etanol yang dihasilkan menurun yaitu mencapai 0,22% (v/v). Hal ini diduga disebabkan oleh beberapa faktor, diantaranya proses fermentasi sudah berjalan lambat karena kandungan gula dan nutrisi di dalam media semakin sedikit sehingga etanol yang dihasilkan semakin menurun serta terjadi oksidasi alkohol yang sudah terbentuk menjadi asam asetat.



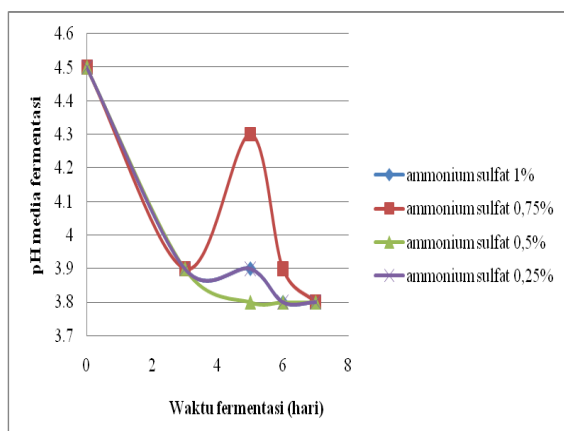
Gambar 1. Kurva Optimasi Waktu Fermentasi dengan Konsentrasi Ammonium Sulfat 1% (b/v) pada Media

### Pengukuran pH Akhir Fermentasi

pH awal media sebelum fermentasi adalah 4,5 yang menunjukkan pH optimum bagi mikroba untuk tumbuh dan melakukan fermentasi. Setelah fermentasi berlangsung dengan variasi waktu dan konsentrasi ammonium sulfat sebagai sumber nitrogen, maka dapat diketahui pH akhir media fermentasi. Pengaruh waktu fermentasi dan konsentrasi ammonium sulfat terhadap pH media disajikan pada Gambar 2.

Kurva pada Gambar 2 menunjukkan semakin lama fermentasi berlangsung, maka pH akhir fermentasi secara keseluruhan cenderung semakin rendah. Kecenderungan pH media fermentasi semakin menurun kemungkinan disebabkan ammonium sulfat yang digunakan sel khamir sebagai sumber nitrogen diubah menjadi  $\text{NH}_4^+$ . Molekul  $\text{NH}_4^+$  akan berikatan dengan sel sebagai  $\text{R-NH}_3$ . Dalam proses ini,  $\text{H}^+$  ditinggalkan dalam media, sehingga semakin

lama waktu fermentasi semakin rendah pH media (Judoamidjojo *et al.*, 1989). Namun, media dengan konsentrasi  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,75% (v/v) dan waktu fermentasi 5 hari menunjukkan perubahan pH yaitu dari 3,9 menjadi 4,3. Hal ini diduga karena kondisi media fermentasi yang kurang optimum yang menyebabkan pertumbuhan sel khamir sangat sedikit sehingga hanya sedikit sel yang berikatan dengan  $\text{NH}_4^+$ .



Gambar 2. Kurva Pengaruh Waktu Fermentasi dan Konsentrasi Ammonium Sulfat terhadap pH Media

Proses terjadinya penurunan pH juga dapat diakibatkan terbentuknya metabolit-metabolit selama proses fermentasi berlangsung. Selama proses fermentasi terjadi pembentukan asam seperti asam laktat, asam asetat, dan asam piruvat yang dapat menurunkan pH media (Reed dan Peepler, 1973). Asam-asam tersebut terbentuk akibat adanya oksigen (Fardiaz 1989).

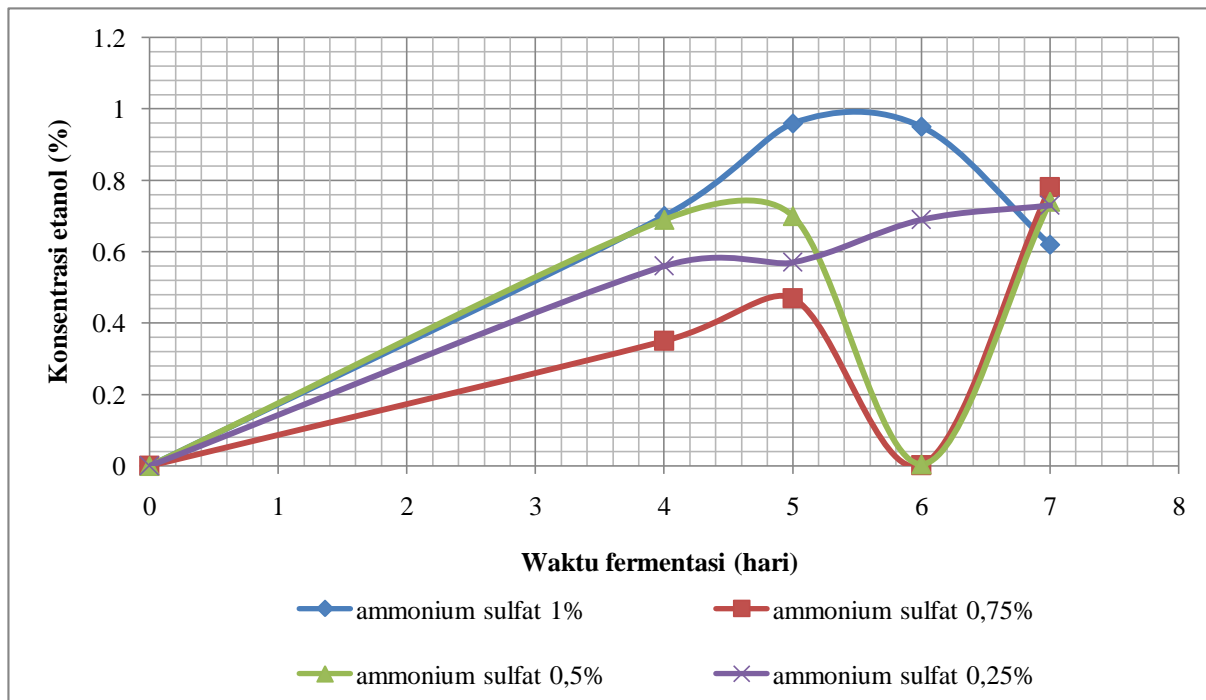
### Pengaruh Konsentrasi Ammonium Sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ terhadap Produksi Bioetanol Berbahan Baku *Glacilaria* sp.

Pengaruh ammonium sulfat terhadap produksi bioetanol dapat diketahui dengan menggunakan variasi konsentrasi ammonium sulfat, yaitu 0,25 %, 0,5 %, 0,75 %, dan 1 % (b/v) pada media fermentasi. Jumlah etanol yang dihasilkan dari 16 sampel dengan variasi konsentrasi etanol dan lama waktu fermentasi disajikan pada Gambar 3.

Kurva pada Gambar 3 menunjukkan bahwa kultur dengan konsentrasi ammonium

sulfat 1% (b/v) mengalami peningkatan kadar etanol dari hari ke-4 sampai hari ke-5 yaitu dari 0,70% menjadi 0,96% (v/v). Penurunan kadar etanol mulai terjadi pada hari ke-6 sampai hari ke-7 yaitu dari 0,95% menjadi 0,62% (v/v). Fermentasi pada media dengan konsentrasi ammonium sulfat 0,75% (b/v) menghasilkan etanol sebanyak 0,35% (v/v) pada hari ke-4. Peningkatan kadar etanol terjadi pada hari ke-5 yaitu dari 0,35% menjadi 0,47% (v/v). Kadar etanol mulai menurun pada hari ke-6, yaitu 0,002% (v/v). Selanjutnya, terjadi peningkatan etanol pada hari ke-7 yaitu mencapai 0,78% (v/v). Pada media fermentasi dengan konsentrasi ammonium sulfat 0,5% (b/v), terjadi peningkatan kadar etanol yang dihasilkan, yaitu 0,69% (v/v) pada hari ke-4 dan 0,70% (v/v) pada hari ke-5. Kadar etanol mulai menurun pada hari ke-6 dengan kadar etanol 0,005% (v/v). Kadar etanol kembali meningkat pada hari ke-7, yaitu sebanyak 0,74% (v/v). Fermentasi pada media dengan konsentrasi ammonium sulfat 0,25% (b/v), terjadi peningkatan jumlah etanol yang dihasilkan mulai hari ke-4 sampai hari ke-7, yaitu berturut-turut 0,56%; 0,57%; 0,69%; dan 0,73% (v/v). Kadar etanol terendah yang dihasilkan oleh kultur dengan konsentrasi awal ammonium sulfat 1%; 0,75%; 0,5%; dan 0,25% (b/v) adalah masing-masing sebesar 0,62% (v/v) pada hari ke-7; 0,002% (v/v) pada hari ke-6; 0,005% (v/v) pada hari ke-6; dan 0,56% (v/v) pada hari ke-4.

Fermentasi pada media dengan konsentrasi ammonium sulfat 1% (b/v) menghasilkan etanol dengan kadar paling optimum pada hari ke-5. Sampai hari ke-5 diduga pertumbuhan dan aktivitas *Saccharomyces cerevisiae* berada pada fase logaritmik. Nutrien yang tersedia pada media dikonsumsi secara baik serta dihasilkan zat-zat metabolik secara maksimal pada fase ini. Kecepatan pertumbuhan pada fase tersebut dipengaruhi oleh ketersediaan nutrien dalam media (Fardiaz, 1989). Peningkatan konsentrasi ammonium sulfat akan meningkatkan ion ammonium dalam media. Selanjutnya ion ammonium sebagai sumber nitrogen digunakan dalam pembentukan asam amino, asam nukleat, dan protein sel (EgboSimba dan Slaughter, 1987).



Gambar 3. Kurva Pengaruh Waktu Fermentasi dan Konsentrasi Ammonium Sulfat terhadap Produksi Bioetanol Berbahan Baku *Glacilaria* sp.

Kadar etanol yang sangat rendah dihasilkan pada hari ke-6, yaitu pada media dengan konsentrasi ammonium sulfat 0,75% dan 0,5% (b/v). Hal ini diduga disebabkan oleh beberapa faktor yaitu proses fermentasi sudah berjalan lambat karena kandungan gula dan nutrisi di dalam media semakin sedikit. Keadaan ini juga diduga disebabkan karena etanol sudah mengalami oksidasi berubah menjadi asam asetat, sehingga pH media menjadi turun dan aktivitas *Saccharomyces cerevisiae* menjadi terhambat. Faktor lain yang dapat mempengaruhi adalah adanya kontaminan seperti bakteri asam laktat dan bakteri asam asetat yang mampu menjadi inhibitor dalam proses fermentasi sehingga etanol yang dihasilkan sangat rendah.

Kadar etanol yang dihasilkan secara keseluruhan masih kecil. Salah satu faktor yang berpengaruh adalah jumlah rumput laut yang digunakan sedikit yaitu 5 gram dalam 50 mL media fermentasi. Jumlah glukosa yang digunakan sebagai sumber C dalam fermentasi

sangat berpengaruh terhadap kadar etanol yang dihasilkan. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Karta (2012) menunjukkan bahwa fermentasi dengan media yang berbahan alga *Codium geppiorum* 25 gram tanpa penambahan ammonium sulfat menghasilkan etanol rata-rata 3,03%. Semakin banyak jumlah rumput laut yang digunakan, maka ketersediaan sumber C akan semakin banyak sehingga mampu memenuhi kebutuhan mikroba untuk tumbuh dan beraktivitas. Faktor lain yang juga berpengaruh terhadap jumlah etanol yang dihasilkan dalam fermentasi adalah ketersediaan oksigen. Berdasarkan kurva pada Gambar 3, fase logaritmik berlangsung dengan cepat yang ditandai dengan peningkatan jumlah etanol yang diikuti dengan penurunan jumlah etanol yang tidak teratur. Hal ini diduga disebabkan oleh ketersediaan oksigen untuk mikroba yang belum mencukupi karena ketiadaan oksigen menyebabkan jumlah sel khamir menjadi terbatas sehingga kemampuan mikroba untuk



melakukan pertumbuhan menjadi kurang maksimal.

Berdasarkan kurva pengaruh konsentrasi ammonium sulfat terhadap produksi bioetanol maka dapat diketahui ammonium sulfat sangat berpengaruh terhadap proses fermentasi. Hal ini terlihat dari kadar etanol tertinggi yang diperoleh pada konsentrasi  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1% (b/v). Ammonium sulfat berperan sebagai sumber nitrogen bagi mikroba. Sumber nitrogen ini digunakan untuk pembentukan asam nukleat dan asam-asam amino.

## SIMPULAN DAN SARAN

### Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan hal-hal sebagai berikut:

1. Kadar gula reduksi dan kadar pati rata-rata yang terkandung dalam rumput laut *Glacilaria* sp. yang diambil di Pantai Serangan adalah 17,14% dan 15,42%.
2. Waktu optimum yang diperlukan mikroba untuk menghasilkan etanol dengan kadar tertinggi adalah pada hari ke-7 yaitu dari 115 mL media rumput laut *Glacilaria* sp. diperoleh etanol dengan kadar 1,04% (v/v).
3. Penambahan ammonium sulfat 1% (b/v) pada media fermentasi mampu menghasilkan etanol secara optimal yaitu sebesar 0,96% (v/v) pada hari ke-5, penambahan ammonium sulfat 0,75%; 0,5%; dan 0,25% (b/v) menghasilkan etanol secara optimal pada hari ke-7 dengan kadar masing-masing sebesar 0,78%; 0,74%; dan 0,73% (v/v). Penambahan ammonium sulfat 1% (b/v) menghasilkan etanol dengan kadar terendah terjadi pada hari ke-7 yaitu sebesar 0,62% (v/v) sedangkan pada penambahan ammonium sulfat 0,75%; 0,5%; dan 0,25% (b/v) dihasilkan etanol dengan kadar terendah masing-masing sebesar 0,002% (v/v) dan 0,005% (v/v) pada hari ke-6 dan 0,56% (v/v) pada hari ke-4.
4. Kondisi optimum produksi bioetanol berbahan baku *Glacilaria* sp. terdapat pada penambahan konsentrasi ammonium sulfat 1% (b/v) pada media rumput laut dengan

kadar etanol yang dihasilkan sebesar 0,96% (v/v) pada hari ke-5.

### Saran

Sesuai hasil penelitian, dapat dikemukakan saran sebagai berikut:

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap penambahan konsentrasi ammonium sulfat di atas 1% untuk menentukan kondisi optimum lainnya sehingga diperoleh kondisi optimum yang dapat memproduksi bioetanol dengan jumlah dan kualitas yang lebih baik.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh sumber nitrogen yang lain terhadap produksi bioetanol berbahan baku *Glacilaria* sp.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai jenis mikroba lain yang mampu memfermentasi *Glacilaria* sp. dengan kadar etanol yang lebih optimal.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Melalui kesempatan ini penulis menyampaikan terimakasih kepada ibu Dra. Iryanti Eka Suprihatin, M.Sc., Ph.D, ibu Ida Ayu Gede Widihati, S.Si., M.Si., dan bapak Putu Suarya, S.Si., M.Si. atas saran dan masukannya, serta pihak-pihak lain yang telah membantu dalam penyelesaian penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Archunan, G., 2004, *Microbiology*, 1<sup>th</sup> ed., Sarup and Sons, New Delhi
- Brahmana, E. M., 2010, Identifikasi Beberapa Rumput Laut di Pantai Segara, Sanur yang Memiliki Kadar Pati dan Protein yang Relatif Tinggi serta Komposisi Asam Aminonya, *Skripsi*, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Udayana, Bukit Jimbaran
- Egbosimba, E. E. dan Slaughter, J. C., 1987. The Influence of Ammonium Permease Activity and Carbon Source on The Uptake of Ammonium from Simple

- Defined Media by *Saccharomyces cerevisiae*, *J. General Microbiology*, 133:375-379
- Fardiaz, S., 1989, *Fisiologi Fermentasi*, Pusat Antar Universitas, Institut Pertanian Bogor, Bogor
- Fardiaz, S., 1992, *Mikrobiologi Pangan I*, PT. Gramedia Pustaka Umum, Jakarta
- Gautam, M., Lele, U., Kartodiharjo, H., Khan, A., Erwinsyah, I., and Rana, R., 2000, *Indonesia The Challenges of Bank Involvement in Forest*, Operation Evaluation Department, Evaluation Country Case Study Series, World Bank, Washington DC, USA
- Hakim, K., 2007, Pengaruh Penambahan Ammonium Sulfat Terhadap Produksi Etanol pada Fermentasi Umbi singkong (*Manihot utilissima* Pohl.) dengan Inokulum *Saccharomyces cerevisiae*, *Skripsi*, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta, Surakarta
- Harvey, F., 2009, Bioetanol Berbahan Dasar Ampas Rumput Laut *Kappaphycus alvarezii*, *Skripsi*, Institut Pertanian Bogor, Bogor
- Judoamidjojo, R. M., Sa'id, E. G., dan Hartoto, L., 1989, *Biokonversi*, Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Dirjen Dikti, Pusat Antar Universitas Bioteknologi Institut Pertanian Bogor
- Junk, W. R. dan Pancoast, H., 1980, *Handbook of Sugar*, The Avi Publishing Company Inc., Westport-Connecticut
- Karta, W., 2012, Pembuatan Bioetanol dari Alga *Codium geppiorum* dan Pemanfaatan Batu Kapur Nusa Penida Teraktivasi untuk Meningkatkan Kualitas Bioetanol, *Tesis*, Program Pascasarjana, Universitas Udayana, Denpasar
- Kim, G. S., Myung, K. S., Kim, Y. J., Oh, K. K., Kim, J. S., Ryu, H. J., and Kim, K. H., 2008, *Method of Producing Biofuel Using Sea Algae*, World Intellectual Property Organization, Seoul
- Narita, V., 2005, *Saccharomyces cerevisiae Superjamur yang Memiliki Sejarah Luar Biasa*, Pustaka Utama, Jakarta
- Prescott, S. G. dan Dunn, C. G., 1959, *Industrial Microbiology*. The AVI Publisher, Connecticut
- Reed, G. and Peepler, H. J., 1973, *Yeast Technology*, The AVI Publishing Co., Inc., New York
- Sudarmadji, S., Haryono, B., dan Suhardi, 1997, *Prosedur Analisa untuk Bahan Makanan dan Pertanian Edisi keempat*, Liberty, Yogyakarta
- Tuti, S. dan Mahasiswa Angkatan 2008, 2010, *Laporan Kunjungan Mata Kuliah Pilihan Bioenergi Sub-Materi Bioetanol*, Program Studi Diploma III Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Diponegoro, Semarang
- Wijiyono, 2009, *Efektivitas Penambahan Ammonium terhadap Pertumbuhan dan Laju Fermentasi Saccharomyces cerevisiae dalam Pembuatan Anggur*, diakses melalui: <<http://wijiyovan.wordpress.com/2008/10/21/efektivitas-penambahan-ammonium-terhadap-pertumbuhan-dan-laju-fermentasi-saccharomyces-cerevisiae-dalam-pembuatan-anggur/>>, diakses tanggal 2 Desember 2011