

**MODIFIKASI FERMENTASI HIDROLISAT ASAM *Eucheuma cottonii* MENJADI BIOETANOL
MENGUNAKAN *Saccharomyces cerevisiae* DAN *Pachysolen tannophilus***

**FERMENTATION MODIFICATION OF ACID HYDROLYSATES OF *Eucheuma cottonii* INTO
BIOETHANOL USING *Saccharomyces cerevisiae* AND *Pachysolen tannophilus***

Muhammad Syukur Sarfat^{1)*}, Mulyorini Rahayuningsih¹⁾, Ani Suryani^{1,2)}, Dwi Setyaningsih^{1,2)}

¹⁾Departemen Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor
Kampus IPB Darmaga, PO Box 220 Bogor 16002, Indonesia
E-mail: mssarfata.oct87@gmail.com

²⁾Pusat Penelitian Surfaktan dan Bionergi (SBRC), Bogor.

ABSTRACT

The research objective was to modify bioethanol fermentation by batch condition from seaweed (*Eucheuma cottonii*) as a substrate to produce a high yield of bioethanol. Type of sugar found in acid hydrolysates *Eucheuma cottonii* consisted of 4.95% galactose, 0.25% glucose, 0.04% xylose, and 0.02% maltoheptaosa. The highest ethanol production from adapted *Saccharomyces cerevisiae* IPBCCAL IX was 2.38% (v/v) ethanol in fermentation broth, with 79.09% substrate efficiency and 56.30% fermentation efficiency which was fermented for 6 days. The highest ethanol production from adapted *Pachysolen tannophilus* IPBCC AC IX was 0.11% (v/v) ethanol in fermentation broth, with 15.39% substrate efficiency and 2.60% fermentation efficiency which fermented for 4 days. The highest ethanol production with culture refresh treatment using adapted *Pachysolen tannophilus* IPBCC AC IX after 24 hours fermentation by adapted *Saccharomyces cerevisiae* IPBCCAL IX was 0.81% (v/v) ethanol in fermentation broth, with 82.42% substrate efficiency and 19.79% fermentation efficiency which fermented for 6 days. The highest ethanol production with culture refresh treatment using adapted *Saccharomyces cerevisiae* IPBCCAL IX after 24 hours fermentation by adapted *Saccharomyces cerevisiae* IPBCCAL IX was 1.76% (v/v) ethanol in fermentation broth, with 53.06% substrate efficiency and 43.53% fermentation efficiency which fermented for 6 days.

Keywords: bioethanol, *Eucheuma cottonii*, *Pachysolen tannophilus*, *Saccharomyces cerevisiae*

ABSTRAK

Tujuan dari penelitian ini adalah modifikasi fermentasi bioetanol secara curah dari rumput laut (*Eucheuma cottonii*) sebagai substrat sehingga dihasilkan rendemen produk bioetanol yang tinggi. Jenis gula yang terdapat pada hidrolisat asam *Eucheuma cottonii* terdiri dari 4,95% galaktosa, 0,25% glukosa, 0,04% xilosa, dan 0,02% maltoheptaosa. Produksi etanol tertinggi dari *Saccharomyces cerevisiae* IPBCC AL IX teradaptasi adalah 2,38% (v/v) etanol pada fermentasi cair, dengan 79,09% efisiensi penggunaan substrat, dan 56,30% efisiensi fermentasi yang difermentasi selama 6 hari. Produksi etanol tertinggi dari *Pachysolen tannophilus* IPBCC AC IX teradaptasi adalah 0,11% (v/v) etanol pada fermentasi cair, dengan 15,39% efisiensi penggunaan substrat, dan 2,60% efisiensi fermentasi yang difermentasi selama 4 hari. Produksi etanol tertinggi dengan perlakuan culture refresh menggunakan *Pachysolen tannophilus* IPBCC AC IX teradaptasi setelah fermentasi berlangsung 24 jam oleh *Saccharomyces cerevisiae* IPBCC AL IX teradaptasi adalah 0,81% (v/v) etanol pada fermentasi cair, dengan 82,42% efisiensi penggunaan substrat, dan 19,79% efisiensi fermentasi yang difermentasi selama 6 hari. Produksi etanol tertinggi dengan perlakuan culture refresh menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* IPBCCAL IX teradaptasi setelah fermentasi berlangsung 24 jam oleh *Saccharomyces cerevisiae* IPBCC AL IX teradaptasi adalah 1,76% (v/v) etanol pada fermentasi cair, dengan 53,06% efisiensi penggunaan substrat, dan 43,53% efisiensi fermentasi yang difermentasi selama 6 hari.

Kata kunci: bioetanol, *Eucheuma cottonii*, *Pachysolen tannophilus*, *Saccharomyces cerevisiae*

PENDAHULUAN

Penelitian mengenai bioetanol dari selulosa berbagai tanaman darat dan limbah kehutanan telah banyak dilakukan, namun masih sangat sedikit penelitian mengenai produksi bioetanol dari rumput laut jenis *Eucheuma cottonii*. Oleh karena itu, sangat penting untuk dilakukan penelitian mengenai produksi bioetanol dari rumput laut yang nantinya

dapat digunakan sebagai bahan baku alternatif untuk menghasilkan bioetanol.

E. cottonii merupakan alga merah yang terbentuk dari polisakarida linear yang biasa disebut "karagenan". Karagenan adalah galaktan tersulfatasi linear hidrofilik yang merupakan pengulangan unit disakarida. Penyusun utama karagenan adalah galaktan (polisakarida sulfat) yang merupakan polimer dari gula galaktosa. Selain galaktosa dan

sulfat, beberapa karbohidrat juga ditemui, seperti xilosa, glukosa, *uronic acids*, dan substituen seperti methyl esters dan grup *pyruvate*. Galaktan tersulfatasi ini diklasifikasi menurut adanya unit 3,6-*anhydro galactose* (DA) dan posisi gugus sulfat (Van De Velde *et al.*, 2002).

Menurut Yunizal (2004) *E. cottonii* memiliki kandungan karbohidrat paling tinggi dibandingkan dengan jenis rumput laut yang lain yaitu mencapai 57,52% (basis basah) atau setara dengan 67,64% (basis kering) sehingga sangat menjanjikan ketika digunakan sebagai bahan baku dalam pembuatan bioetanol.

Selain itu, berdasarkan hasil hidrolisis menggunakan asam sulfat, dengan otoklaf pada suhu 121°C, tekanan 1,5 bar yang dilakukan oleh Setyaningsih *et al.* (2012) memilih *E.cottonii* dipilih sebagai bahan baku bioetanol untuk proses selanjutnya karena perolehan gula pereduksi yang tertinggi dan total padatan (ampas) sisa proses hidrolisis yang terendah. Perolehan gula pereduksi tertinggi adalah 3,28% (b/v) untuk hidrolisat *E.cottonii*, 3,22% (b/v) dengan total padatan yang rendah dibandingkan dengan *Sargassum sp.* dan limbah agar yaitu 18-37%.

Khamir yang umum digunakan untuk memproduksi bioetanol seperti *Saccharomyces cerevisiae* adalah khamir yang hanya optimal jika mengkonsumsi gula dalam bentuk glukosa, sedangkan untuk memproduksi bioetanol dari gula galaktosa mendapatkan kendala karena khamir ini belum dapat mengkonsumsi gula galaktosa secara optimal hingga menjadi bioetanol. Hasil identifikasi dari beberapa jenis khamir liar yang dilakukan oleh Inggit (2013), diperoleh hasil bahwasanya *Pachysolen tannophilus* dan *Saccharomyces cerevisiae* merupakan khamir yang dapat mengkonversi galaktosa yang terdapat pada hidrolisat asam *E. cottonii* menjadi bioetanol.

Oleh karena itu, dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai modifikasi proses produksi bioetanol dari hidrolisat asam *E. cottonii* oleh *Saccharomyces cerevisiae* IPBCC AL IX dan *Pachysolen tannophilus* IPBCC AC IX yang merupakan khamir yang telah teradaptasi pada media yang mengandung galaktosa.

Ada beberapa faktor yang mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme dalam menghasilkan produk bioetanol diantaranya, pH (Sassner *et al.*, 2008), suhu (Sassner, 2008), aerasi (Barnett *et al.*, 2000; Trust, 2008), waktu fermentasi (Prescot dan Dunn, 1981), konsentrasi gula dalam media (Wignyanto *et al.*, 2001; Gaur, 2006), serta konsentrasi dan kondisi kultur yang digunakan (Wignyanto *et al.*, 2001). Namun dalam penelitian ini, yang menjadi faktor utama yang ingin diketahui adalah kemampuan fermentatif khamir teradaptasi yaitu *Saccharomyces cerevisiae* IPBCC AL IX dan *Pachysolen tannophilus* IPBCC AC IX terhadap

kadar bioetanol yang dihasilkan serta pengaruh *culture refresh* setelah fermentasi 24 jam.

BAHAN DAN METODE

Hidrolisis *E. cottonii* dengan menggunakan H₂SO₄

Hidrolisis *E. cottonii* menggunakan H₂SO₄ mengacu pada hasil penelitian yang dilakukan oleh Setyaningsih *et al.* (2012). *E. cottonii* yang mengandung *Total Dissolved Solid* (TDS) berada pada kisaran 14-17,5 °Brix dari 10-15% (b/v) konsentrasi padatan dalam bentuk serbuk rumput laut kering dihidrolisis dengan H₂SO₄ 3% selama dua kali 30 menit pada suhu 121°C, tekanan 1,5 bar. Rendemen 32,8% (b/v) dengan 19,21% residu padatan. Perlakuan ini merupakan perlakuan terbaik dari hasil penelitian yang dilakukan oleh Setyaningsih *et al.* (2012).

Hidrolisat yang diperoleh kemudian dianalisis kadar gula pereduksi dengan metode DNS dan total padatan terlarut menggunakan refraktometer serta komponen gula sederhana (monosakarida) menggunakan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) dengan Spesifikasi pengukuran : Fase gerak: H₂SO₄0.008 N; Kolom: Aminex®HPX-87H; 300 mm x 7.8 mm; *Detector*: *Reactive Index*; *Flow rate*: 1 mL/min; *Volume injeksi*: 20 µL; *Suhu kolom*: 35°C; *Back Pressure*: 1247 psi.

Fermentasi Hidrolisat Asam Encer *E. cottonii*

Fermentasi hidrolisat asam encer *E. cottonii* yang mengandung galaktosa menjadi bioetanol dengan menggunakan dua jenis khamir yang telah teradaptasi (*Saccharomyces cerevisiae* IPBCC AL IX dan *Pachysolen tannophilus* IPBCC AC IX). Untuk proses fermentasi, pada media hidrolisat asam encer *E. cottonii* ditambahkan *trace element* (Kofli *et al.*, 2006) yaitu MgSO₄.7H₂O (2,4 g/L), FeSO₄.7H₂O (0,01 g/L), ZnSO₄.7H₂O (0,12 g/L), MnSO₄.6H₂O (0,024 g/L), CuSO₄.5H₂O (0,006 g/L) and CaCl (0,12 g/L) serta Vitamin B (1 g/L), Urea (0,5% dari °Brix), dan NPK (0,06% dari °Brix) untuk memacu aktivitas pertumbuhan khamir dalam mengkonsumsi galaktosa menjadi bioetanol. Parameter yang diuji selama fermentasi meliputi kadar gula pereduksi (Miller, 1959), kadar etanol (AOAC, 1995), dan jumlah total sel menggunakan hemasitometer sehingga diperoleh informasi mengenai efisiensi penggunaan substrat serta efisiensi fermentasi.

$$\text{Efisiensi Substrat} = \frac{S_0 - S}{S_0} \times 100\%$$

$$\text{Efisiensi Fermentasi} = \frac{\text{Etanol Aktual}}{\text{Etanol Teoritis}} \times 100\%$$

Fermentasi Khamir Teradaptasi pada Hidrolisat Asam Encer *E. cottonii*

Fermentasi dilakukan dengan menumbuhkan masing-masing kultur khamir (*S. cerevisiae* IPBCC AL IX dan *P. tannophilus* IPBCC AC IX) pada media hidrolisat asam encer *E. cottonii* yang telah diberi *trace element*. Sebanyak 10% (v/v) kultur dimasukkan ke dalam media fermentasi, kemudian diinkubasi selama 4-6 hari secara anaerobik fakultatif pada suhu ruang dan pH 4,5-5. Perlakuan ini dilakukan sebanyak 3 (tiga) kali ulangan.

Fermentasi Hidrolisat Asam Encer *E. cottonii* dengan Perlakuan *Refreshed Culture* Berbeda Setelah Fermentasi Berlangsung 24 Jam

Fermentasi dilakukan dengan cara *refreshed culture* berbeda setelah fermentasi berlangsung selama 24 jam. Awal fermentasi, pada media hidrolisat asam encer *E. cottonii* yang telah diberi *trace* kemudian ditambahkan 10% (v/v) kultur *S. cerevisiae* IPBCC AL IX dan diinkubasi selama 24 jam secara anaerobik fakultatif pada suhu ruang dan pH 4,5-5. Setelah fermentasi berlangsung selama 24 jam oleh *S. cerevisiae* IPBCC AL IX, pada media ditambahkan 10% (v/v) kultur *P. tannophilus* IPBCC AC IX, kemudian fermentasi diteruskan selama 4-6 hari secara anaerobik fakultatif. Perlakuan ini dilakukan sebanyak 3 (tiga) kali ulangan.

Fermentasi Hidrolisat Asam Encer *E. cottonii* Dengan Perlakuan *Refreshed Culture* yang Sama Setelah Fermentasi Berlangsung 24 Jam

Fermentasi dilakukan dengan cara *refreshed culture* yang sama setelah fermentasi berlangsung selama 24 jam. Awal fermentasi, pada media hidrolisat asam encer *E. cottonii* yang telah diberi *trace element* kemudian ditambahkan 10% (v/v) kultur *S. cerevisiae* IPBCC AL IX dan diinkubasi selama 24 jam secara anaerobik fakultatif pada suhu ruang dan pH 4,5-5. Setelah fermentasi berlangsung selama 24 jam oleh *S. cerevisiae* IPBCC AL IX, pada media ditambahkan 10% (v/v) kultur *S. cerevisiae* IPBCC AL IX, kemudian fermentasi diteruskan selama 3-6 hari secara anaerobik fakultatif. Perlakuan ini dilakukan sebanyak 3 (tiga) kali ulangan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hidrolisis *E. cottonii* dengan Menggunakan H_2SO_4

Hidrolisat asam encer *E. cottonii* diperoleh dengan cara dihidrolisis menggunakan asam H_2SO_4 3% yang dilakukan sebanyak 2 tahap. Hidrolisis dengan cara ini menghasilkan hidrolisat asam encer *E. cottonii* dengan rendemen $\pm 57,31\%$ dengan total padatan terlarut sebesar $\pm 12,5$ °Brix dan gula pereduksi sebesar ± 100 g/L atau $\pm 10\%$ (b/v). Total

gula pereduksi bisa lebih besar atau lebih kecil dari 10% (b/v) tergantung pada kesempurnaan proses hidrolisis.

Hasil pengukuran komponen gula yang terdapat pada hidrolisat asam encer *E. cottonii* menggunakan HPLC memberikan informasi bahwasanya komponen gula tertinggi yang terdapat pada hidrolisat asam encer *E. cottonii* yang diperoleh dari hasil hidrolisis 30 gram *E. cottonii* kering pada 100 ml larutan asam sulfat 3% (30 g/100 mL) adalah galaktosa yaitu 4,95% (Tabel 1). Selain galaktosa, pada hidrolisat asam encer *E. cottonii* juga terdapat glukosa, xilosa, dan maltoheptaosa dengan konsentrasi masing-masing secara berurutan adalah 0,25%, 0,04%, dan 0,02% (Tabel 1).

Tabel 1. Karakterisasi komponen gula yang terdapat pada hidrolisat asam encer *E. Cottonii* menggunakan HPLC*

Jenis Gula	Konsentrasi (%)
Galaktosa	4,95
Glukosa	0,25
Xilosa	0,04
Maltoheptaosa	0,02

Menurut hasil penelitian yang dilakukan oleh Karunakara dan Gurusamy (2011) pada *Euchema* sp terdapat beberapa jenis gula setelah dianalisis menggunakan HPLC, yaitu D-Galaktosa 3,6-anhidro-D-galaktosa, sulfat, D-galaktosa, dan glukosa. Dari keempat jenis gula yang terdapat pada *Euchema* sp, komponen gula tertinggi adalah D-galaktosa, sedangkan komponen gula terendah adalah glukosa.

Fermentasi Khamir Teradaptasi pada Hidrolisat Asam Encer *E. cottonii*

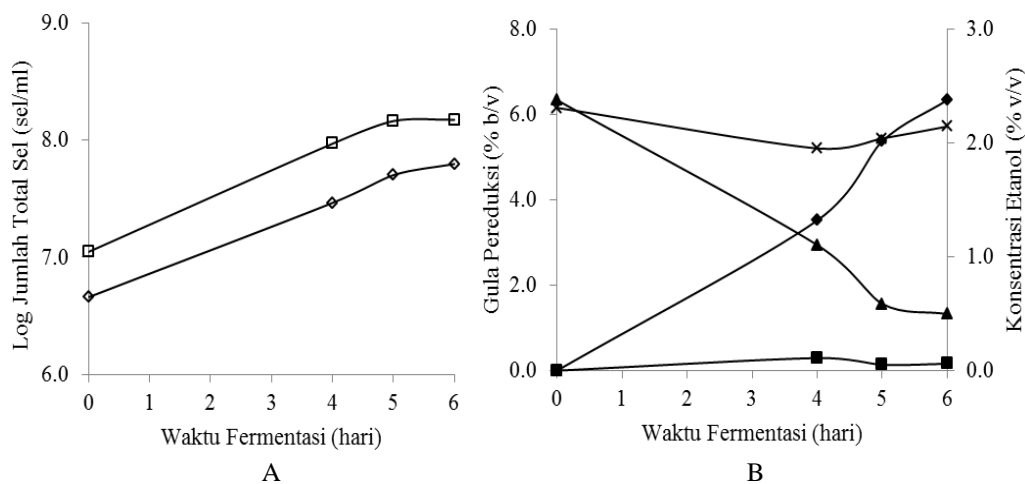
Hasil pengamatan jumlah total sel selama fermentasi diperoleh bahwasanya semakin lama waktu fermentasi maka jumlah total sel semakin meningkat (Gambar 1A). Hal ini menandakan bahwasanya selama fermentasi berlangsung, sel mengkonsumsi gula untuk tumbuh dan memperbanyak sel. Jumlah total sel *S. cerevisiae* IPBCC AL IX lebih sedikit jika dibandingkan dengan jumlah total sel *P. tannophilus* IPBCC AC IX pada akhir fermentasi selama 6 hari. Namun, peningkatan jumlah total sel pada fermentasi yang berlangsung selama 6 hari untuk kedua jenis khamir relatif sama yaitu 13,67 kali lipat untuk sel *S. cerevisiae* IPBCC AL IX dan 13,37 kali lipat untuk *P. tannophilus* IPBCC AC IX. Rendahnya jumlah total sel *S. cerevisiae* IPBCC AL IX di akhir masa fermentasi didukung juga dengan jumlah penambahan jumlah total sel diawal fermentasi yang lebih sedikit jika dibandingkan dengan jumlah total sel *P. tannophilus* IPBCC AC IX. Demikian halnya dengan tingginya jumlah total sel *P. tannophilus* IPBCC AC IX diakhir masa fermentasi didukung dengan jumlah penambahan jumlah total sel yang

lebih banyak jika dibandingkan dengan jumlah total sel *S. cerevisiae* IPBCC AL IX. Semakin tinggi peningkatan jumlah total sel selama fermentasi sampai pada konsentrasi optimum, maka pertumbuhan sel semakin baik selama fermentasi.

Hasil pengamatan sisa gula pereduksi selama fermentasi (Gambar 1B) diperoleh hasil bahwasanya semakin lama waktu fermentasi menggunakan *S. cerevisiae* IPBCC AL IX, sisa gula pereduksi semakin sedikit. Hal ini berbanding terbalik jika dibandingkan dengan fermentasi menggunakan *P. tannophilus* IPBCC AC IX yang semakin lama waktu fermentasi, sisa gula pereduksi semakin tinggi. *S. cerevisiae* IPBCC AL IX mengkonsumsi galaktosa lebih baik jika dibandingkan dengan *P. tannophilus* IPBCC AC IX dengan efisiensi penggunaan substrat tertinggi

sebesar 79,09% setelah fermentasi berlangsung selama 6 hari (Tabel 2). Efisiensi penggunaan substrat tertinggi pada fermentasi menggunakan *P. tannophilus* IPBCC AC IX adalah sebesar 15,39% setelah fermentasi berlangsung 4 hari (Tabel 2).

Hasil perhitungan *yield* etanol yang dihasilkan per substrat yang terkonsumsi ($Y_{p/s}$) selama fermentasi (Tabel 2) diperoleh hasil bahwasanya semakin lama waktu fermentasi menggunakan *S. cerevisiae* IPBCC AL IX, *yield* etanol yang dihasilkan per substrat yang terkonsumsi ($Y_{p/s}$) semakin tinggi. Fenomena yang terjadi selama fermentasi menggunakan *P. tannophilus* IPBCC AC IX, kecuali fermentasi hari ke-5 yang menurun sehingga lebih rendah jika dibandingkan dengan fermentasi hari ke-4.



Gambar 1. Hubungan antara waktu fermentasi hidrolisat asam encer *E. cottonii* menggunakan khamir teradaptasi dengan log jumlah total sel, gula pereduksi, dan konsentrasi etanol. ^ALog jumlah total sel; ^Bgula pereduksi dan konsentrasi etanol. (◇) log jumlah total sel *S. cerevisiae* IPBCC AL IX; (□) log jumlah total sel *P. tannophilus* IPBCC AC IX; (▲) gula pereduksi *S. cerevisiae* IPBCC AL IX; (x) gula pereduksi *P. tannophilus* IPBCC AC IX; (◆) konsentrasi etanol *S. cerevisiae* IPBCC AL IX; (■) konsentrasi etanol *P. tannophilus* IPBCC AC IX

Tabel 2. Hasil perhitungan efisiensi penggunaan substrat, efisiensi fermentasi, dan konsentrasi etanol yang dihasilkan dari fermentasi hidrolisat asam encer *E. cottonii* menggunakan khamir teradaptasi

Waktu Fermentasi	Efisiensi substrat (%)	Efisiensi fermentasi (%)	Etanol (% v/v)	$Y_{p/s}$ (b/b)
<i>S. cerevisiae</i> IPBCC AL IX				
Hari ke-4	53,62±4,448	31,02±1,853	1,32±0,085	0,37±0,034
Hari ke-5	75,33±7,264	46,70±2,961	2,01±0,132	0,39±0,083
Hari ke-6	79,09±1,791	56,30±5,177	2,38±0,182	0,45±0,053
<i>P. tannophilus</i> IPBCC AC IX				
Hari ke-4	15,39±7,698	2,60±0,293	0,11±0,014	0,11±0,082
Hari ke-5	11,60±0,940	1,23±0,895	0,05±0,038	0,07±0,045
Hari ke-6	7,05±7,745	1,44±0,836	0,06±0,035	0,13±1,155

Hasil pengamatan konsentrasi etanol selama fermentasi (Gambar 1-B dan Tabel 2) diperoleh hasil bahwasanya semakin lama waktu fermentasi menggunakan *S. cerevisiae* IPBCC AL IX, konsentrasi etanol yang dihasilkan semakin tinggi. Hal ini berbanding terbalik jika dibandingkan dengan fermentasi menggunakan *P. tannophilus* IPBCC AC IX yang semakin lama waktu fermentasi, konsentrasi etanol yang dihasilkan semakin rendah. *S. cerevisiae* IPBCC AL IX mengkonsumsi galaktosa menjadi etanol lebih baik jika dibandingkan dengan *P. tannophilus* IPBCC AC IX dengan konsentrasi etanol yang dihasilkan sebanyak 2,38% (v/v) dengan efisiensi fermentasi tertinggi sebesar 56,39% setelah fermentasi berlangsung selama 6 hari. Konsentrasi etanol tertinggi pada fermentasi menggunakan *P. tannophilus* IPBCC AC IX adalah sebanyak 0,11% (v/v) dengan efisiensi fermentasi sebesar 2,60% setelah fermentasi berlangsung selama 4 hari.

Hasil terbaik konversi gula menjadi etanol dan sel pada tahap ini jika menggunakan persamaan Gay Lussac terjadi pada fermentasi hidrolisat asam encer *E. cottonii* menggunakan *S. cerevisiae* IPBCC AL IX selama 6 hari yaitu dari total gula yang dikonsumsi, sebanyak 45,34% gula terkonversi menjadi etanol dan sisanya 54,66% digunakan oleh *S. cerevisiae* IPBCC AL IX untuk tumbuh dan memperbanyak sel serta menghasilkan produk lain seperti piruvat (Tabel 4). Proporsi gula yang terkonversi menjadi etanol dan sel mendekati persamaan Gay Lussac.

Data yang diperoleh dari hasil fermentasi hidrolisat asam encer *E. cottonii* menggunakan *S.*

cerevisiae IPBCC AL IX memberikan informasi bahwasanya semakin lama waktu fermentasi, maka jumlah gula yang dikonsumsi semakin tinggi, efisiensi penggunaan substrat semakin tinggi, jumlah total sel semakin banyak, konsentrasi etanol yang dihasilkan semakin tinggi, dan efisiensi fermentasi semakin tinggi. Hasil fermentasi hidrolisat asam encer *E. cottonii* menggunakan *P. tannophilus* IPBCC AC IX memberikan informasi bahwasanya semakin lama waktu fermentasi, maka jumlah gula yang dikonsumsi semakin rendah, efisiensi penggunaan substrat semakin rendah, jumlah total sel semakin banyak, konsentrasi etanol yang dihasilkan semakin rendah, dan efisiensi fermentasi semakin rendah.

Konsentrasi etanol tertinggi hasil fermentasi hidrolisat asam encer *E. cottonii* menggunakan *S. cerevisiae* IPBCC AL IX adalah sebesar 2,38% (v/v), efisiensi fermentasi sebesar 79,02%, dan *yield* etanol yang dihasilkan sebesar 0,45 g/g substrat yang difermentasi selama 6 hari. Konsentrasi etanol yang diperoleh sedikit lebih tinggi jika dibandingkan dengan yang dilakukan oleh Setyaningsih *et al.* (2012) yang memproduksi bioetanol dari *E. cottonii* menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* teradaptasi dengan waktu fermentasi 72-144 jam pada suhu ruang (30°C) menghasilkan 2,20% (v/v) etanol pada fermentasi cair dengan efisiensi penggunaan substrat sebesar 80,3% dan efisiensi fermentasi sebesar 48,9%. Penelitian yang dilakukan oleh Meinita *et al.*, (2012) menghasilkan bioetanol dari hidrolisat asam karagenan *Kappaphycus alvarezii* (*E. cottonii*) dengan *yield* 0,21 g/g galaktosa.

Tabel 3. Hasil perhitungan jumlah etanol dan sel yang dihasilkan dari total gula yang dikonsumsi selama fermentasi hidrolisat asam encer *E. cottonii* menggunakan khamir teradaptasi

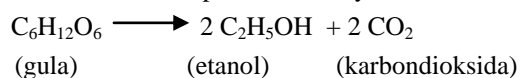
Khamir	Waktu fermentasi	Konsumsi gula (% b/v)	Etanol (% b/v)	Sel (% b/v)
<i>S. cerevisiae</i> IPBCC AL IX	Hari ke-4	3,40±0,119	1,25±0,075	2,14±0,187
	Hari ke-5	4,77±0,626	1,88±0,119	2,89±0,744
	Hari ke-6	5,05±0,373	2,27±0,209	2,74±0,474
<i>P. tannophilus</i> IPBCC AC IX	Hari ke-4	0,95±0,484	0,10±0,012	0,85±0,494
	Hari ke-5	0,72±0,070	0,05±0,036	0,67±0,060
	Hari ke-6	0,44±0,480	0,06±0,034	0,38±0,406

Tabel 4. Hasil perhitungan presentase etanol dan sel yang dihasilkan dari total gula yang dikonsumsi selama fermentasi hidrolisat asam encer *E. cottonii* menggunakan khamir teradaptasi

Waktu Fermentasi	<i>S. cerevisiae</i> IPBCC AL IX		<i>P. tannophilus</i> IPBCC AC IX	
	Konsumsi gula menjadi etanol (%)	Konsumsi gula menjadi sel (%)	Konsumsi gula menjadi etanol (%)	Konsumsi gula menjadi sel (%)
Hari ke-4	36,86	63,14	11,05	88,95
Hari ke-5	39,49	60,51	6,91	93,09
Hari ke-6	45,34	54,66	13,32	86,68

Konsentrasi etanol tertinggi hasil fermentasi hidrolisat asam encer *E. cottonii* menggunakan *P. tannophilus* IPBCC AC IX adalah 0,11% (v/v) dengan efisiensi fermentasi 2,60% yang difermentasi selama 4 hari. Konsentrasi etanol yang diperoleh pada penelitian ini relatif sama dengan konsentrasi etanol yang diperoleh pada hasil penelitian yang dilakukan oleh Maleszka *et al.* (1982) yang menggunakan 2% D-galaktosa + 0,1% D-glukosa sebagai substrat dan *P. tannophilus* sebagai inokulum yang difermentasi pada kondisi aerob selama 7 hari pada suhu 300°C menghasilkan etanol sebesar ± 0,1% (b/v), sedangkan perlakuan tanpa penambahan D-glukosa menghasilkan etanol < 0,05% (v/v) setelah fermentasi selama 9 hari pada kondisi yang sama dengan perlakuan penambahan 0,1% D-glukosa. Rendahnya konsentrasi etanol yang dihasilkan dari hasil fermentasi hidrolisat asam encer *E. cottonii* menggunakan *P. tannophilus* IPBCC AC IX dapat disebabkan karena kurang maksimal dalam mengkonversi galaktosa menjadi etanol. Beberapa literatur menjelaskan bahwasanya *P. tannophilus* lebih familiar dalam mengkonversi gula xilosa menjadi etanol. Penelitian yang dilakukan oleh Sanchez *et al.* (2003) memproduksi etanol dari D-xilosa menggunakan *P. tannophilus*. Sebanyak 25 kg/m³ D-xilosa difermentasi selama 60 jam pada kondisi aerob dengan kecepatan agitasi 500 rpm, pH 4,5, dan suhu 303 K diperoleh etanol dengan *yield* etanol per substrat ($Y_{p/s}$) sebesar 0,35 kg/kg dengan rata-rata produksi etanol spesifik (q_E) sebesar 0,06 kg/kg jam.

Selama fermentasi berlangsung, *S. cerevisiae* IPBCC AL IX menghasilkan etanol dengan konsentrasi yang jauh lebih tinggi dibandingkan dengan etanol yang dihasilkan oleh *P. tannophilus* IPBCC AC IX. Menurut Timsson (2007), *S. cerevisiae* dapat menghasilkan enzim yang dapat memetabolisme galaktosa menjadi glukosa pada jalur *Leloir*-nya. Enzim tersebut adalah galaktosa mutarotase dan UDP-galaktosa-4-epimerase (Gal10p) yang dapat mengubah (fosforilasi) β-D-galaktosa menjadi α-D-galaktosa, galaktokinase (Gal1p) yang berfungsi mengubah α-D-galaktosa menjadi α-D-galaktosa-1-fosfat, galaktosa-1-fosfat uridiltransferase (Gal7p) yang berfungsi mengubah α-D-galaktosa-1-fosfat menjadi α-D-glukosa-1-fosfat, dan fosfoglukomutase (Pgm1p/Pgm2p) yang merupakan enzim terakhir yang digunakan dalam jalur *Leloir* sebagai katalis yang mengisomerisasi α-D-glukosa-1-fosfat menjadi α-D-glukosa-6-fosfat. Glukosa yang dihasilkan dari proses metabolisme kemudian didegradasi menjadi etanol dan CO₂ melalui satu jalur metabolisme yang biasa disebut glikolisis. Secara teoritis konversi 1 molekul gula menjadi 2 molekul etanol dan 2 molekul CO₂ menurut persamaan Gay Lussac:



Untuk *P. tannophilus* belum ditemukan literatur yang menjelaskan kemampuannya menghasilkan enzim yang dapat memetabolisme galaktosa menjadi glukosa pada siklus pertumbuhannya.

Fermentasi Hidrolisat Asam Encer *E. cottonii* Dengan Perlakuan *Refreshed Culture* Berbeda Setelah Fermentasi Berlangsung 24 Jam

Fermentasi hidrolisat asam encer *E. cottonii* dengan perlakuan *refreshed culture* berbeda setelah fermentasi berlangsung 24 jam dilakukan dengan tujuan untuk mempercepat proses fermentasi. Fermentasi 24 jam pertama oleh *S. cerevisiae* IPBCC AL IX dimaksudkan dengan tujuan agar terjadi memetabolisme galaktosa menjadi glukosa sehingga ketika dilakukan *refreshed culture* menggunakan *P. tannophilus* IPBCC AC IX, kedua jenis khamir tersebut dapat dengan cepat mengkonversi glukosa menjadi etanol secara bersamaan serta konversi xilosa yang terdapat pada hidrolisat asam encer *E. cottonii* menjadi etanol oleh *P. tannophilus* IPBCC AC IX (Lee *et al.*, 1986; Sanchez *et al.*, 1999; Sanchez *et al.*, 2003).

Perlakuan *mix culture* dalam sebuah proses konversi substrat menjadi produk tertentu telah banyak dilakukan oleh para peneliti-peneliti sebelumnya, bahkan telah diaplikasikan dalam sebuah industri, misalnya PT. Rajawali II Unit PSA Palimanan, Cirebon, Jawa Barat yang menggunakan jasa khamir jenis *Saccharomyces cerevisiae* dan *Saccharomyces ellypsoideous* untuk memproduksi etanol dari molases (tetes tebu). Kedua jenis khamir ini dapat mengkonversi tetes tebu menjadi etanol meskipun ada beberapa perbedaan antara kedua jenis khamir ini, yaitu *Saccharomyces cerevisiae* pada umumnya lebih baik tingkat ketahanannya terhadap perlakuan suhu dan tumbuh baik pada kondisi yang asam dibandingkan dengan *Saccharomyces ellypsoideous*. *Saccharomyces cerevisiae* dan *Saccharomices ellypsoideous* dapat memproduksi etanol dalam jumlah besar dan mempunyai toleransi terhadap kadar etanol yang tinggi. Pencampuran kedua jenis khamir ini bertujuan untuk menciptakan saling melengkapi jika ada bahan dalam tetes tebu yang tidak dapat difermentasi oleh salah satu jenis khamir tersebut.

Sebuah penelitian oleh Collins (1951) yang melakukan *mix culture* antara *Streptococcus lactis* W2 dan *Streptococcus cremoris* HP dengan tujuan untuk mengetahui kemampuan *culture* tersebut dalam memproduksi asam. Penelitian lain dilakukan oleh Tanaka *et al.* (1986) yang memproduksi etanol dari pati dengan sistem kultur campuran terimobilisasi oleh mikroorganisme aerobik dan anaerobik. *Aspergillus awamori* digunakan sebagai mikroorganisme amilolitik aerobik dan *Zymomonas mobilis* digunakan sebagai mikroorganisme penghasil etanol pada kondisi anaerobik. Pada kasus ini, konsentrasi etanol yang dihasilkan dari 100 g/L pati adalah sebesar 25 g/L dengan koefisien *yield*

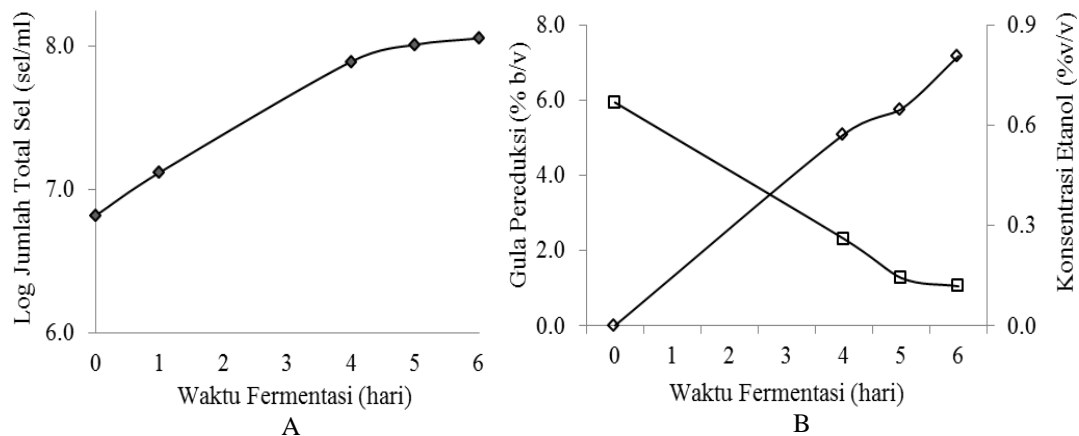
etanol per substrat ($Y_{p/s}$) adalah 0,38 g etanol per gram substrat. Penelitian berikutnya dilakukan oleh Felice *et al.* (2012) yang memproduksi etanol dari limbah industri keju (*whey*). Felice *et al.* (2012) melaporkan campuran mikroba *Candida zeylanoides* dengan *Kluyveromyces marxianus* mampu menghasilkan etanol sebagai produk utama fermentasi dari fermentasi *whey*. Konsentrasi etanol maksimum yang dicapai diperoleh dengan menggunakan kultur campuran pada kondisi hipoksia, tumbuh pada pH 4 dan suhu 30°C, dengan rendemen etanol yang dihasilkan sebesar 60 g/L. *K. marxianus* merupakan mikroba penghasil etanol, sedangkan *C. zeylanoides* merupakan mikroba yang dapat mendegradasi limbah perairan oleh aktivitas proteolitik, lipolitik, dan reduktif (Ramalho *et al.*, 2002).

Pengamatan jumlah total sel selama fermentasi diperoleh hasil bahwasanya semakin lama waktu fermentasi jumlah total sel semakin meningkat (Gambar 3A). Hal ini menandakan bahwasanya selama fermentasi berlangsung, sel mengkonsumsi gula untuk tumbuh dan memperbanyak sel.

Hasil pengamatan sisa gula pereduksi dan konsumsi gula selama fermentasi dengan perlakuan *refreshed culture* berbeda setelah fermentasi 24 jam

(Gambar 2B) diperoleh hasil bahwasanya semakin lama waktu fermentasi, sisa gula pereduksi semakin rendah serta efisiensi penggunaan substrat yang semakin tinggi. Efisiensi penggunaan substrat tertinggi sebesar 82,42% setelah fermentasi selama 6 hari (Tabel 5). Hasil perhitungan *yield* etanol yang dihasilkan per substrat yang terkonsumsi ($Y_{p/s}$) selama fermentasi (Tabel 5) diperoleh hasil bahwasanya semakin lama waktu fermentasi, *yield* etanol yang dihasilkan per substrat yang terkonsumsi ($Y_{p/s}$) cenderung fluktuatif dimana *yield* etanol yang dihasilkan per substrat yang terkonsumsi ($Y_{p/s}$) pada fermentasi selama 5 hari menurun dari fermentasi selama 4 hari dan kembali naik pada fermentasi selama 6 hari.

Hasil pengamatan konsentrasi etanol selama fermentasi (Gambar 2B dan Tabel 5) menunjukkan bahwa semakin lama waktu fermentasi, konsentrasi etanol yang dihasilkan semakin tinggi serta efisiensi fermentasi yang tinggi. Konsentrasi etanol tertinggi pada fermentasi dengan perlakuan *refreshed culture* berbeda setelah fermentasi 24 jam adalah sebesar 0,81% (v/v) dengan efisiensi fermentasi sebesar 19,78% setelah fermentasi berlangsung selama 6 hari.



Gambar 2. Hubungan antara waktu fermentasi hidrolisat asam encer *E. cottonii* dengan perlakuan *refreshed culture* berbeda setelah fermentasi berlangsung 24 jam terhadap log jumlah total sel, gula pereduksi, dan konsentrasi etanol. ^ALog jumlah total sel; ^BGula pereduksi dan konsentrasi etanol. (♦) log jumlah total sel; (□) gula pereduksi; (◇) konsentrasi etanol.

Tabel 5. Hasil perhitungan efisiensi penggunaan substrat, efisiensi fermentasi, dan konsentrasi etanol yang dihasilkan dari fermentasi hidrolisat asam encer *E. cottonii* dengan perlakuan *refreshed culture* berbeda setelah fermentasi berlangsung 24 jam

Waktu Fermentasi	Efisiensi substrat (%)	Efisiensi fermentasi (%)	Etanol (% v/v)	$Y_{p/s}$ (b/b)
4 hari	61,19±9,148	14,04±0,591	0,57±0,022	0,16±0,021
5 hari	78,68±1,664	15,87±4,963	0,65±0,204	0,14±0,047
6 hari	82,42±0,736	19,78±5,557	0,81±0,228	0,16±0,044

Rendahnya konsentrasi etanol yang dihasilkan dapat disebabkan karena adanya penambahan inokulum *P. tannophilus* IPBCC AC IX sehingga terjadi kompetisi antara keduanya yang menyebabkan terhambatnya pertumbuhan dan konversi galaktosa menjadi etanol oleh *S. cerevisiae* IPBCC AL IX yang merupakan inokulum terbaik dalam mengkonversi galaktosa menjadi etanol jika ditinjau dari kemampuan masing-masing inokulum dalam mengkonversi galaktosa menjadi etanol pada tahap fermentasi dengan menggunakan hidrolisat asam encer *E. cottonii* sebelumnya.

Hasil terbaik konversi gula menjadi etanol dan sel pada tahap ini jika menggunakan persamaan Gay Lussac terjadi pada fermentasi hidrolisat asam encer *E. cottonii* selama 6 hari yaitu dari total gula yang dikonsumsi, sebanyak 16,31% gula terkonversi menjadi etanol dan sisanya 83,69% digunakan oleh *S. cerevisiae* IPBCC AL IX dan *P. tannophilus* IPBCC AC IX untuk tumbuh dan memperbanyak sel serta menghasilkan produk lain seperti piruvat (Tabel 6).

Data yang diperoleh dari hasil fermentasi hidrolisat asam encer *E. cottonii* dengan perlakuan *refreshed culture* berbeda setelah fermentasi berlangsung 24 jam memberikan informasi bahwasanya semakin lama waktu fermentasi, maka jumlah gula yang dikonsumsi semakin tinggi, efisiensi penggunaan substrat semakin tinggi, jumlah total sel semakin banyak, konsentrasi etanol yang dihasilkan semakin tinggi, dan efisiensi fermentasi semakin tinggi.

Pada fermentasi hidrolisat asam encer *E. cottonii* dengan perlakuan *refreshed culture* setelah fermentasi berlangsung 24 jam diperoleh informasi yang sangat berbeda dengan tanpa dilakukannya *refreshed culture*, yaitu konsentrasi etanol yang dihasilkan sangat rendah menggunakan *S. cerevisiae* IPBCC AL IX meskipun sedikit lebih tinggi jika dibandingkan dengan konsentrasi etanol yang dihasilkan pada fermentasi hidrolisat asam encer *E. cottonii* dengan menggunakan *P. tannophilus* IPBCC AC IX. Rendahnya konsentrasi etanol yang dihasilkan dapat disebabkan karena adanya penambahan inokulum *P. tannophilus* IPBCC AC IX sehingga terjadi kompetisi dengan *S. cerevisiae*

IPBCC AL IX yang menyebabkan terhambatnya pertumbuhan dan konversi galaktosa menjadi etanol oleh *S. cerevisiae* IPBCC AL IX. Selain itu, terbentuknya lapisan pada permukaan media fermentasi juga diduga sebagai salah satu faktor penghambat pertumbuhan bagi *S. cerevisiae* IPBCC AL IX karena *P. tannophilus* IPBCC AC IX.

Fermentasi Hidrolisat Asam Encer *E. cottonii* Dengan Perlakuan *Refreshed Culture* yang Sama Setelah Fermentasi Berlangsung 24 Jam

Hasil pengamatan selama fermentasi diperoleh hasil bahwasanya semakin lama waktu fermentasi jumlah total sel semakin meningkat (Gambar 3A). Hal ini menandakan bahwasanya selama fermentasi berlangsung, sel mengkonsumsi gula untuk tumbuh dan memperbanyak sel.

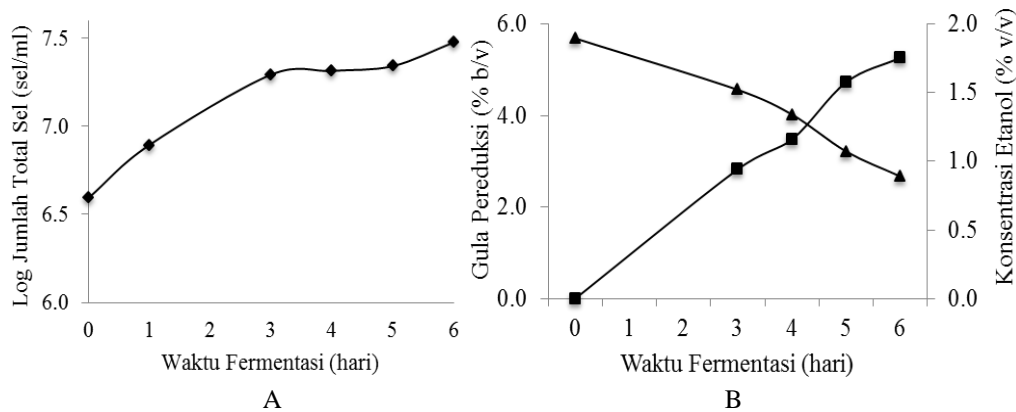
Hasil pengamatan sisa gula pereduksi selama fermentasi dengan perlakuan *refreshed culture* yang sama setelah fermentasi 24 jam (Gambar 3B) diperoleh hasil bahwasanya semakin lama waktu fermentasi, sisa gula pereduksi semakin rendah serta efisiensi penggunaan substrat yang semakin tinggi. Efisiensi penggunaan substrat tertinggi sebesar 53,06% setelah fermentasi selama 6 hari (Tabel 7). Hasil perhitungan *yield* etanol yang dihasilkan per substrat yang dikonsumsi ($Y_{p/s}$) selama fermentasi (Tabel 7) diperoleh hasil bahwasanya semakin lama waktu fermentasi, *yield* etanol yang dihasilkan per substrat yang dikonsumsi ($Y_{p/s}$) semakin menurun.

Hasil pengamatan konsentrasi etanol selama fermentasi (Gambar 3B dan Tabel 7) menunjukkan bahwasanya semakin lama waktu fermentasi, konsentrasi etanol yang dihasilkan semakin tinggi serta efisiensi fermentasi yang tinggi. Konsentrasi etanol tertinggi pada fermentasi ini adalah sebesar 1,76% (v/v) dengan efisiensi fermentasi sebesar 19,78% setelah fermentasi berlangsung selama 6 hari.

Rendahnya konsentrasi etanol yang dihasilkan dapat disebabkan karena adanya penambahan inokulum *S. cerevisiae* IPBCC AL IX yang mengganggu aktivitas dari sel *S. cerevisiae* IPBCC AL IX yang sudah mulai tumbuh pada media fermentasi.

Tabel 6. Hasil perhitungan jumlah etanol dan sel yang dihasilkan dari total gula yang dikonsumsi selama fermentasi dengan perlakuan *refreshed culture* berbeda setelah fermentasi 24 jam

Waktu Fermentasi	Konsumsi gula (% b/v)	Etanol (% b/v)	Persentase Etanol (%)	Sel (% b/v)	Persentase Sel (%)
Hari ke-4	3,63±0,488	0,57±0,022	15,61	3,06±0,483	84,39
Hari ke-5	4,67±0,169	0,64±0,200	13,71	4,03±0,343	86,29
Hari ke-6	4,89±0,088	0,80±0,224	16,31	4,09±0,192	83,69



Gambar 3. Hubungan antara waktu fermentasi hidrolisat asam encer *E. cottonii* dengan perlakuan *refreshed culture* yang sama setelah fermentasi berlangsung 24 jam terhadap log jumlah total sel, gula pereduksi, dan konsentrasi etanol.^ALog jumlah total sel; ^BGula pereduksi dan konsentrasi etanol yang dihasilkan dari fermentasi hidrolisat asam encer *E. cottonii* dengan perlakuan *refreshed culture* yang sama setelah fermentasi berlangsung 24 jam. (◆) log jumlah total sel; (▲) gula pereduksi; (■) konsentrasi etanol.

Tabel 7. Hasil perhitungan efisiensi penggunaan substrat, efisiensi fermentasi, dan konsentrasi etanol yang dihasilkan dari fermentasi hidrolisat asam encer *E. cottonii* dengan perlakuan *refreshed culture* berbeda setelah fermentasi berlangsung 24 jam

Waktu Fermentasi	Efisiensi substrat (%)	Efisiensi fermentasi (%)	Etanol (% v/v)	Y _{p/s} (b/b)
Hari Ke-3	19,73±2,354	23,36±1,799	0,94±0,073	0,84±0,172
Hari ke-4	29,26±1,564	28,75±1,941	1,16±0,078	0,69±0,092
Hari ke-5	43,35±5,711	39,10±1,575	1,58±0,064	0,65±0,138
Hari ke-6	53,06±1,726	43,53±3,905	1,76±0,158	0,57±0,053

Penambahan inokulum *S. cerevisiae* IPBCC AL IX setelah fermentasi berlangsung 24 jam dapat menyuplai oksigen berlebih pada media sehingga lebih cenderung memperbanyak sel dan sedikit memproduksi etanol. Hal ini didukung dengan data yang diperoleh yang memberikan informasi bahwasanya dari total gula yang dikonsumsi selama fermentasi berlangsung, sebagian besar gula tersebut digunakan oleh *S. cerevisiae* IPBCC AL IX untuk tumbuh dan memperbanyak sel dan sedikit yang digunakan sebagai etanol (Tabel 8).

Hasil terbaik konversi gula menjadi etanol dan sel pada tahap ini jika menggunakan persamaan Gay Lussac terjadi pada fermentasi hidrolisat asam encer *E. cottonii* selama 3 hari yaitu dari total gula yang dikonsumsi, sebanyak 82,82% gula terkonversi menjadi etanol dan sisanya 17,18% digunakan oleh *S. cerevisiae* IPBCC AL IX untuk tumbuh dan memperbanyak sel serta menghasilkan produk lain seperti piruvat (Tabel 8). Semakin lama waktu fermentasi dengan perlakuan *refreshed culture* yang sama setelah fermentasi 24 jam tidak membuat presentasi gula yang terkonversi menjadi etanol semakin tinggi, melainkan semakin rendah.

Data yang diperoleh dari hasil fermentasi hidrolisat asam encer *E. cottonii* dengan perlakuan

refreshed culture yang sama setelah fermentasi berlangsung 24 jam memberikan informasi bahwasanya semakin lama waktu fermentasi, maka jumlah gula yang dikonsumsi semakin tinggi, efisiensi penggunaan substrat semakin tinggi, jumlah total sel semakin banyak, konsentrasi etanol yang dihasilkan semakin tinggi, dan efisiensi fermentasi semakin tinggi.

Pada fermentasi hidrolisat asam encer *E. cottonii* dengan perlakuan *refreshed culture* yang sama setelah fermentasi berlangsung 24 jam diperoleh konsentrasi etanol yang lebih rendah jika dibandingkan dengan tanpa *refreshed culture* pada fermentasi hidrolisat asam encer *E. cottonii* dengan menggunakan *S. cerevisiae* IPBCC AL IX. Rendahnya konsentrasi etanol yang dihasilkan dapat disebabkan karena adanya penambahan inokulum *S. cerevisiae* IPBCC AL IX yang mengganggu aktivitas dari sel *S. cerevisiae* IPBCC AL IX yang sudah mulai tumbuh pada media fermentasi. Penambahan inokulum *S. cerevisiae* IPBCC AL IX setelah fermentasi berlangsung 24 jam dapat menyuplai oksigen berlebih pada media sehingga sel lebih cenderung memperbanyak sel dan sedikit memproduksi etanol.

Tabel 8. Hasil perhitungan jumlah etanol dan sel yang dihasilkan dari total gula yang terkonsumsi selama fermentasi dengan perlakuan *refreshed culture* yang sama setelah fermentasi 24 jam

Waktu Fermentasi	Konsumsi gula (% b/v)	Etanol (% b/v)	Persentase Etanol (%)	Sel (% b/v)	Persentase Sel (%)
Hari ke-3	1,13±0,169	0,93±0,071	82,82	0,19±0,202	17,18
Hari ke-4	1,67±0,120	1,15±0,078	68,89	0,52±0,194	31,11
Hari ke-5	2,47±0,406	1,56±0,062	63,04	0,91±0,463	36,96
Hari ke-6	3,02±0,138	1,73±0,154	57,24	1,29±0,184	42,76

Menurut Prescott dan Dunn (1981), pada permulaan proses fermentasi, khamir memerlukan oksigen untuk pertumbuhannya sehingga fermentasi berlangsung secara aerob. Setelah terbentuk CO₂, reaksi akan berubah menjadi anaerob. Alkohol yang terbentuk akan menekan fermentasi lebih lanjut setelah tercapai konsentrasi antara 13-15% volume.

Hal yang sama dikemukakan oleh Barnett *et al.* (2000), khamir tumbuh baik pada kondisi aerobik, walaupun demikian beberapa khamir dapat tumbuh pada kondisi anaerobik. Proses respirasi pada kondisi aerobik selanjutnya digantikan proses fermentasi pada kondisi anaerobik karena tidak tersedia lagi oksigen. Khamir akan selalu berespirasi pada setiap keadaan yang memungkinkan karena energi yang dihasilkan pada respirasi jauh lebih besar dibandingkan pada proses fermentasi. Bila terdapat udara pada proses fermentasi maka etanol yang dihasilkan lebih sedikit karena terjadi respirasi yang mengakibatkan terjadinya konversi gula menjadi sel, karbondioksida, dan air.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat diambil kesimpulan bahwasanya kemampuan produksi etanol tertinggi dari khamir teradaptasi adalah 2,38% (v/v etanol pada fermentasi cair), dengan 79,09% efisiensi penggunaan substrat, dan 56,30% efisiensi fermentasi selama 6 hari menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* IPBCC AL IX. Perlakuan penambahan kultur berbeda setelah fermentasi 24 jam tidak menghasilkan etanol dengan konsentrasi yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan tanpa dilakukannya penambahan kultur berbeda setelah fermentasi 24 jam. Perlakuan penambahan kultur yang sama setelah fermentasi 24 jam tidak menghasilkan etanol dengan konsentrasi yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan tanpa dilakukannya penambahan kultur yang sama setelah fermentasi 24 jam

Saran

Perlu dilakukan modifikasi fermentasi lebih lanjut mengenai perpaduan dua kultur berbeda dalam mengkonversi hidrolisat asam encer *E. cottonii* menjadi etanol. Optimasi proses hidrolisis rumput laut untuk meningkatkan kadar gula pereduksi pada hidrolisat rumput laut yang dihasilkan perlu dilakukan. Isolasi dan karakterisasi mikroba

hidrolitik yang dapat mengkonversi rumput laut menjadi etanol dengan kemampuan konversi yang tinggi, serta perlu dilakukan rekayasa genetik pada *S. cerevisiae* dengan tujuan untuk menambahkan gen tertentu yang dapat mempercepat metabolisme galaktosa menjadi etanol masih perlu dikembangkan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih disampaikan kepada Direktorat Jendral Perguruan Tinggi (Dikti) yang telah membiayai penelitian ini melalui Program Penelitian Unggulan Strategis Nasional tahun 2013.

DAFTAR PUSTAKA

- Barnett JA, Payne RW, dan Yarrow D. 2000. *Yeast Characteristic and Identification*. New York:Cambridge University Press.
- Collins EB. 1951. Action of bacteriophage on mixed strain starter cultures. i. nature and characteristics of the "Nascent Phenomenon". *J Dairy Sci.* 35(5): 371-380.
- Felice BD, Blasi VO, Castro OD, Cennamo P, Martino L, Trifuoggi M, Condorelli V, Onofrio VD, Guida M. 2012. Genetic structure of a novel biofuel-producing microorganism community. *J Genetic.* 91: 183-191.
- Gaur K. 2006. Process Optimatization for the Production of Ethanol via Fermentation. [dissertation]. Punjab: Thapar Intitute of Engineering & Technology.
- Inggit R. 2013. Potensi khamir dalam fermentasi hidrolisat rumput laut (*Kappaphycus alvarezii*) menjadi bioetanol. [Skripsi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor
- Karunakara S dan Gurusamy R. 2011. Bioethanol production as renewable biofuel from rhodopyhtes feedstock. *J Biol Technol.* 2(2): 94-99.
- Kofli NT, Keisuke N, Hiroshi S, Suteaki S. 2006. Responses of different strains of *saccharomyces cerevisiae* to osmotic stress. *Sains Malaysiana* 35 (2): 9-15.
- Lee H, James AP, Zahab DM, Mahmoudides G, Maleszka R, Schneider H. 1986. Mutants of *pachysolen tannophilus* with improved production of ethanol from D-XylOse. *J*

- Applied And Environ Microbiol.* 51 (6): 1252-1258.
- Maleszka R, Wang PY, dan Schneider H. 1982. Ethanol production from D-galactose and glycerol by *Pachysolen tannophilus*. *J Enzyme Microbiol Technol.* 4: 349-352.
- Martini A. 2003. Biotechnology of natural and winery associated strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *J I Microbiol.* 6: 207-209.
- Prescott SC dan Dunn CG. 1981. *Industrial Microbiology*. New York: McGraw – Hill Book Co. Ltd.
- Ramalho PA, Scholze H, Cardoso MH, Ramalho MT, Oliveira-Campos AM. 2002. Improved conditions for the aerobic reductive decolorisation of azo dyes by *Candida zeylanoides*. *J Enzyme Microb Technol.* 31: 848-854.
- Sanchez S, Bravo V, Castro E, Moya AJ, Camacho F. 1999. Comparative study of the fermentation of d-glucose/d-xylose mixtures with *Pachysolen tannophilus* and *Candida shehatae*. *J Bioprocess Eng.* 21:525-532.
- Sanchez S, Bravob V, Moyaa AJ, Castroa E, Camachob F. 2003. Influence of temperature on the fermentation of d-xylose by *pachysolen tannophilus* to produce ethanol and xylitol. *J Pro Biochem.* 39: 673-679.
- Sassner P, Martensson CG, Galbe M, Zacchi G. 2008. Steam pretreatment of H₂SO₄-impregnated salix for production of bioethanol. *J Biores Technol.* 99: 137-145.
- Setyaningsih D, Sri W, Indah K, Nely M, Pandit H. 2012. Acid hydrolysis technique and yeast adaptation to increase red macroalgae bioethanol production. *The 2nd Korea - Indonesia Workshop & International Symposium on Bioenergy from Biomass*. Serpong, Indonesia, 13-15 Juni 2012.
- Tanaka H, Kurosawa H, dan Murakami H. 1986. Ethanol production from starch by a coimmobilized mixed culture system of *Aspergillus awamori* and *Zymomonas mobilis*. *J Biotec and Bioeng.* 28(12): 1761-1768.
- Timsson dan David J. 2007. Galactose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Dynamic Biochem, Proc Biotechnol and Molecul Biol.* (1):1 63-73.
- Trust N. 2008. *Ethanol fermentation batch reactor design basics. Team Analysts, GB Analysts Reports*. New Jersey: Hackensack.
- Van de Velde F, Knutsen SH, Usov AI, Romella HS, Cerezo AS. 2002, 1H and 13 C high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: Application in research and industry. *J Trends in Food Sci and Technol.* 13: 73-92.
- Wignyanto, Suharjo, dan Novita. 2001. pengaruh konsentrasi gula reduksi sari hati nanas dan inokulum *Saccharomyces cerevisiae* pada fermentasi etanol. *J Tek Pert.* 2 (1): 68-77.
- Yunizal. 2004. *Teknologi Pengolahan Alginat*. Jakarta: Departemen Kelautan dan Perikanan