

**BIOKONVERSI BIOMASSA SELULOSA DARI *Nannochloropsis* sp.
MENJADI BIOETANOL MENGGUNAKAN ISOLAT *INDIGENOUS*
*COMPOST Actinomyces***

Skripsi

Oleh

Muhamad Raifar Gunawan



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
2023**

ABSTRAK

BIOKONVERSI BIOMASSA SELULOSA DARI *Nannochloropsis* sp. MENJADI BIOETANOL MENGGUNAKAN ISOLAT *INDIGENOUS* *COMPOST Actinomyces*

Oleh

Muhamad Raifar Gunawan

Persediaan bahan bakar fosil mengalami penurunan, yang menimbulkan permasalahan terhadap ketahanan energi di Indonesia pada masa yang akan datang. Bioetanol merupakan bahan bakar alternatif yang dapat mensubstitusi penggunaan bahan bakar fosil. Mikroalga *Nannochloropsis* sp. berpotensi sebagai bahan baku pembuatan bioetanol karena mengandung karbohidrat dan umum tumbuh di perairan wilayah Indonesia. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh isolat *Actinomyces* yang mempunyai aktivitas selulase dan jumlah bioetanol yang dihasilkan dari fermentasi biomassa *Nannochloropsis* sp. menggunakan *Saccharomyces cerevisiae*. Tahapan penelitian yang dilakukan meliputi karakterisasi biomassa *Nannochloropsis* sp., isolasi *Actinomyces indigenus*, penapisan bakteri selulolitik, penentuan waktu dan pH optimum pada hidrolisis biomassa, hidrolisis enzimatis oleh isolat *Actinomyces* terpilih, dan fermentasi hidrolisat menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* selama 24 jam. Hasil karakterisasi menunjukkan bahwa *Nannochloropsis* sp. mengandung 15,23% selulosa dan 85,77% senyawa lainnya. Hasil isolasi *Actinomyces* diperoleh satu isolat unggul yaitu Act-11 yang memiliki indeks selulolitik 1,77 dengan aktivitas unit sebesar 0,296 U.mL⁻¹. Penentuan kondisi optimum menunjukkan aktivitas optimum Act-11 terhadap biomassa *Nannochloropsis* sp. berada pada pH 6 dan waktu fermentasi 96 jam. Hidrolisis biomassa pada kondisi optimum menghasilkan glukosa dengan persen rendemen 88,79%. Fermentasi hidrolisat menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* menghasilkan bioetanol sebesar 2,53 gL⁻¹ dengan persen efisiensi sebesar 49,49%.

Kata kunci: *Nannochloropsis* sp., *Actinomyces*, bioetanol, hidrolisis, selulase

ABSTRACT

BIOCONVERSION OF CELLULOSE BIOMASS FROM *Nannochloropsis* sp. BECOME BIOETHANOL USING INDIGENOUS COMPOST *Actinomyces* ISOLATES

By

Muhamad Raifar Gunawan

The supply of fossil fuels has decreased, which has created problems for energy security in Indonesia in the future. Bioethanol is an alternative fuel that can substitute the use of fossil fuels. Microalgae *Nannochloropsis* sp. has the potential as a raw material for making bioethanol because it contains carbohydrates and commonly grows in Indonesian territorial waters. This study aims to obtain *Actinomyces* isolates that have cellulase activity and the amount of bioethanol produced from the fermentation of *Nannochloropsis* sp. biomass. using *Saccharomyces cerevisiae*. The stages of the research carried out included characterizing *Nannochloropsis* sp. biomass, isolating *Actinomyces* indigenous, screening cellulolytic bacteria, determining the optimum time and pH for biomass hydrolysis, enzymatic hydrolysis by selected *Actinomyces* isolates, and hydrolyzate fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* for 24 hours. The characterization results showed that *Nannochloropsis* sp. contains 15.23% cellulose and 85.77% other compounds. The results of the isolation of *Actinomyces* obtained one superior isolate, namely Act-11 which had a cellulolytic index of 1.77 with a unit activity of 0.296 U.mL⁻¹. The presentation of the optimum conditions showed the optimum activity of Act-11 against *Nannochropsis* sp. biomass. was at pH 6 and the fermentation time was 96 hours. Biomass hydrolysis at optimum conditions produces glucose with a percentage yield of 88.79%. Hydrolyze fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* produced 2.53 gL⁻¹ of bioethanol with an efficiency percentage of 49.49%.

Keywords: *Nannochloropsis* sp., *Actinomyces*, bioethanol, hydrolysis, cellulose

**BIOKONVERSI BIOMASSA SELULOSA DARI *Nannochloropsis* sp.
MENJADI BIOETANOL MENGGUNAKAN ISOLAT *INDIGENOUS*
*COMPOST Actinomyces***

Oleh

MUHAMAD RAIFAR GUNAWAN

Skripsi

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar
SARJANA SAINS**

Pada

**Jurusan Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2023**

Judul : **BIOKONVERSI BIOMASSA SELULOSA DARI
Nannochloropsis sp. MENJADI BIOETANOL
MENGUNAKAN ISOLAT *INDIGENOUS*
*COMPOST Actinomycetes***

Nama : **Muhamad Raifar Gunawan**

No Pokok Mahasiswa : **1817011041**

Jurusan : **Kimia**

Fakultas : **Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**



1. **Komisi Pembimbing**

Dr. Eng. Heri Satria, M.Si.
NIP. 197110012005011002

Dr. Dian Herasari, S.Si., M.Si.
NIP. 197108062000032001


2. **Ketua Jurusan Kimia
FMIPA Universitas Lampung**

Mulyono, Ph.D.
NIP. 197406112000031002

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

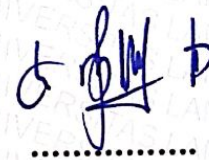
Ketua : **Dr. Eng. Heri Satria, M.Si.**



Sekretaris : **Dr. Dian Herasari, S.Si., M.Si.**



Penguji
Bukan Pembimbing : **Dr. Mita Rilyanti, S.Si., M.Si.**



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Dr. Eng. Supto Dwi Yuwono, M.T.
NIP. 197407052000031001

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : **20 Januari 2023**

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini :
Nama : Muhamad Raifar Gunawan
Nomor Pokok Mahasiswa : 1817011041
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Dengan ini menyatakan bahwa skripsi yang berjudul **Biokversi Biomassa Selulosa dari *Nannochloropsis* sp. Menjadi Bioetanol Menggunakan Isolat *Indigenous Compost Actinomycetes*** adalah benar karya saya sendiri. Selanjutnya saya juga tidak keberatan jika sebagian atau seluruh data di dalam skripsi tersebut digunakan oleh dosen atau program studi untuk kepentingan publikasi, sepanjang nama saya disebutkan dan terdapat kesepakatan sebelum dilakukan publikasi. Demikian pernyataan ini saya buat dengan sadar dan sebenarnya untuk digunakan sebagaimana mestinya

Bandar Lampung, 07 Februari 2023
Yang Menyatakan



Muhamad Raifar Gunawan
NPM. 1817011041

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Bandung, Jawa Barat pada tanggal 28 Februari 2000, sebagai anak ke empat dari lima bersaudara, putra dari Bapak Asep Gunawan dan Ibu Nia Kurniasih.

Jenjang pendidikan diawali dari sekolah Dasar (SD) di SDN 1 Padasuka Bandung diselesaikan pada tahun 2012. Penulis melanjutkan 2 tahun sekolah menengah pertama (SMP) di Pesantren Persatuan Islam 24 Cibegol Kec. Soreang Kab. Bandung dan 1 tahun di Sekolah Menengah Pertama Islam Terpadu (SMPIT) Ayatul Husna Kec. Cikarang Kab. Bekasi yang diselesaikan pada tahun 2015. Penulis melanjutkan pendidikan di Sekolah Menengah atas Negeri 26 Bandung dan selesai pada tahun 2018. Tahun 2018 penulis terdaftar sebagai mahasiswa Kimia FMIPA Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SBMPTN).

Selama menjadi mahasiswa penulis pernah menjadi asisten praktikum Biokimia di jurusan Kimia dan Jurusan Biologi prodi Biologi Terapan pada tahun 2021.

Penulis juga mengikuti organisasi kemahasiswaan dimulai menjadi Kader Muda HIMAKI (KAMI) periode 2018. Pada tahun 2019, penulis menjadi anggota pengurus Himpunan Mahasiswa Kimia (HIMAKI) di bidang Sains dan Penalaran Ilmu Kimia (SPIK), menjadi anggota di divisi kajian dan keumatan (KAUM) di ROIS FMIPA dan menjadi anggota divisi perlengkapan dalam kegiatan Karya Wisata Ilmiah. Pada tahun 2020 penulis menjadi anggota di Unit Kegiatan

Mahasiswa Sains dan Teknologi Universitas Lampung (UKM U SAINTEK UNILA) dan pada tahun 2021, penulis menjadi ketua departemen kesekretariatan UKM U SAINTEK UNILA.

Pada tahun 2021 penulis melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di desa Sukabakti Kecamatan Palas Kabupaten Lampung Selatan. Penulis juga melakukan Praktik Kerja Lapangan pada tahun 2021 di Laboratorium Biokimia FMIPA Universitas Lampung. Pada tahun 2022 penulis menyelesaikan penelitian yang dilakukan di Laboratorium Biokimia FMIPA Universitas Lampung dengan judul “Biokonversi Biomassa Selulosa dari *Nannochloropsis* sp. menjadi Bioetanol menggunakan Isolat *Indigenous Compost Actinomycetes*”.

MOTTO

"Amor fati"
(Friedrich Nietzsche)

PERSEMBAHAN

Dengan mengucapkan

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Alhamdulillah Puji Syukur Kehadirat Allah SWT Yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang atas Rahmat, Karunia, dan Hidayah-Nya

Dengan segala kerendahan hati, kupersembahkan karya kecil ini sebagai tanda cinta, hormat, tanggung jawab, dan baktiku

Kepada :

Kedua Orang Tuaku

Bapak Asep Gunawan dan Ibu Nia Kurniasih

Yang telah menjadi sumber kebahagiaan dan kekuatan untukku, yang telah memberikan kasih sayang, do'a, kesabaran, dukungan, serta nasihat untuk senantiasa tetap berpegang teguh pada agama Allah SWT.

Kakak dan adikku tersayang,

Rasva Dimerviana, Putri Dwi Oktaviani, Wulan Trilantika dan Muhammad Rafi Syapiq Ramdhani

Atas dukungan dan Semangat yang diberikan.

Bapak Dr. Eng Heri Satria, M.Si., dan Ibu. Dr. Dian Herasari, M.Si., dan Bapak Ibu Dosen Jurusan Kimia

Yang telah membimbingku selama menempuh pendidikan sarjana di Jurusan Kimia Universitas Lampung.

Seluruh sahabat dan teman-teman terdekatku yang selama ini telah memberikan banyak dukungan, bantuan dan motivasi kepadaku

Serta

Almamaterku Tercinta
Universitas Lampung

SANWACANA

Segala puji dan syukur atas kehadiran Allah SWT. yang telah memberikan kesehatan bagi penulis sehingga atas rahmat dan hidayah-Nya skripsi ini dapat diselesaikan. Shalawat beriring salam selalu tercurah kepada baginda Muhammad SAW. beserta para pengikutnya yang semoga mendapatkan syafaatnya di yaumul akhir kelak, Aamiin.

Alhamdulillahillobbil'aalamiin, penulis telah menyelesaikan skripsi ini dengan judul "*Biokonversi Biomassa Selulosa Dari Nannochloropsis sp. Menjadi Bioetanol Menggunakan Isolat Indigenous Compost Actinomycetes*" sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana Ilmu Sains di Universitas Lampung.. Penulis mengucapkan terima kasih kepada seluruh pihak yang telah memberikan bantuan baik berupa, arahan, masukan, informasi, serta dukungan moril maupun materiil. Oleh karena itu, pada kesempatan kali ini penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Allah SWT atas kenikmatan dan karunia yang telah diberikan sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.
2. Ibu, kakak dan adik dari penulis yang selalu memberi semangat serta dukungan.
3. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, M.Si. selaku pembimbing I atas segala nasihat, bimbingan, bantuan, dan saran sehingga penelitian dan skripsi ini dapat diselesaikan dengan baik.
4. Ibu Dr. Dian Herasari, M.Si. selaku pembimbing II atas bimbingan dan saran sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
5. Ibu Dr. Mita Rilyanti, M.Si. selaku penguji yang telah membimbing, memberi arahan dan semua ilmu yang telah diberikan.

6. Ibu Rinawati, Ph.D. selaku pembimbing akademik yang telah memberikan nasihat serta saran hingga penulisan skripsi ini selesai.
7. Bapak Mulyono, Ph.D. selaku Ketua Jurusan Kimia yang telah menyetujui skripsi; Bapak dan Ibu Staf administrasi FMIPA Unila.
8. Bapak Dr. Eng. Suropto Dwi Yuwono, M.T. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.
9. Nafisah Nasution dan Olivia Novianti selaku rekan yang selalu membantu, menasehati dan memberikan semangat kepada penulis.
10. Teman-teman Kimia Angkatan 2018 yang telah membantu dan memberi dukungan hingga terselesainya skripsi ini.
11. Dan seluruh pihak terkait yang tidak bisa penulis sebutkan satu per satu yang secara langsung atau tidak langsung telah memberikan dukungan dan bantuannya, baik secara moril dan materiil sehingga pelaksanaan penelitian dapat terlaksana dengan baik.

Bandar Lampung, Februari 2023
Penulis,

Muhamad Raifar Gunawan

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	i
DAFTAR TABEL	iii
DAFTAR GAMBAR	iv
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian	4
1.3 Manfaat Penelitian	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Selulosa	6
2.2 <i>Nannochloropsis</i> sp.....	8
2.3 Bakteri <i>Indigenous</i>	9
2.4 <i>Actinomyces</i>	10
2.5 Enzim Selulase	11
2.6 Fermentasi Glukosa Menjadi Bioetanol.....	12
2.7 Karakterisasi Substrat dan Analisis kadar Bioetanol	17
III. METODE PENELITIAN	21
3.1 Waktu dan Tempat penelitian	21
3.2 Alat dan Bahan.....	21
3.3 Prosedur Penelitian.....	22
3.3.1. Analisis Komposisi dan Karakteristik Substrat.....	22
3.3.2 Isolasi <i>Actinomyces Indigenous</i>	23
3.3.3 Produksi dan Uji Aktivitas Enzim Selulase	24
3.3.4 Sakarifikasi Biomassa	25
3.3.5 Produksi Bioetanol.....	26
3.3.6 Analisis Kadar Etanol	27

3.4 Diagram Alir	28
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	29
4.1 Analisis Komposisi dan Karakteristik Substrat.....	29
4.2 Isolasi <i>Actinomyces Indigenus</i>	32
4.3 Produksi dan Uji Aktivitas Enzim Selulase	35
4.4 Sakarifikasi Biomassa	36
4.5 Produksi Bioetanol	41
4.6 Analisis Kadar Etanol	43
V. SIMPULAN DAN SARAN	46
5.1 Simpulan	46
5.2 Saran.....	46
DAFTAR PUSTAKA	47
LAMPIRAN.....	52

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Analisis Proksimat <i>Nannochloropsis</i> sp	9
2. Analisis kandungan glukosa <i>Nannochloropsis</i> sp.....	30
3. Indeks Selulolitik terhadap Isolat Unggul.....	35
4. Data absorbansi hasil pengukuran larutan standar glukosa menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 540 nm.....	53
5. Data absorbansi hasil pengukuran larutan standar etanol menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 590 nm.....	54
6. Analisis kandungan selulosa pada <i>Nannochloropsis</i> sp.....	56
7. Analisis fasa kristalin pada substrat <i>Nannochloropsis</i> sp. menggunakan XRD	57
8. Analisis fasa total (kristalin dan amorf) substrat <i>Nannochloropsis</i> sp. menggunakan XRD	57
9. Data indeks aktivitas selulolitik <i>Actinomyces</i>	59
10. Data perhitungan waktu optimum produksi glukosa tertinggi menggunakan substrat <i>Carboxymethyl Cellulose</i> (CMC)	64
11. Data perhitungan aktivitas unit enzim selulase Act-11	65
12. Data perhitungan kondisi optimum produksi glukosa tertinggi menggunakan substrat <i>Nannochloropsis</i> sp	67
13. Data perhitungan berat glukosa yang dihasilkan dari hidrolisis <i>Nannochloropsis</i> sp. menggunakan Act-11	69
14. Data perhitungan berat glukosa apabila selulosa terhidrolisis sempurna.....	69
15. Data perhitungan waktu optimum proses fermentasi menggunakan <i>S. cerevisiae</i>	71
16. Data perhitungan kadar etanol pada fermentasi sempurna	71
17. Efisiensi etanol dalam penentuan waktu optimum fermentasi.....	72

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur selulosa.....	6
2. Struktur bagian kristalin dan amorf pada selulosa	7
3. Morfologi <i>Nannochloropsis</i> sp di bawah mikroskop cahaya (A, 400x) dan <i>Scanning Electron Microscope</i> (B)	8
4. Penampakan <i>Actinomyces</i> pada media SCA (<i>Starch Casein Agar</i>) (a) dan (c) isolat pada cawan petri (b) dan (d) morfologi koloni	10
5. Siklus metabolisme etanol.....	17
6. Pola difraktogram XRD dari tepung mikrokrystalin selulosa.....	19
7. Diagram alir penelitian ini.	28
8. Kadar total (selulosa) pada <i>Nannochloropsis</i> sp.....	30
9. Perbandingan pola difraktogram hasil analisis XRD biomassa <i>Nannochloropsis</i> sp.(bagian kiri) dengan standar selulosa (bagian kanan).....	31
10. Hasil kultivasi <i>Actinomyces</i> dengan berbagai pengenceran.....	33
11. Aktivitas selulolitik isolat <i>Actinomyces</i> Act-11.	36
12. Optimasi pH dan waktu aktivitas selulolitik isolat <i>Actinomyces</i>	37
13. Perbandingan berat glukosa sampel dan berat glukosa teoritis.....	40
14. Perbandingan persen rendemen glukosa sampel (hasil hidrolisis) dengan rendemen glukosa teoritis	40
15. Optimasi waktu fermentasi menggunakan <i>S. cerevisiae</i>	43
16. Efisiensi etanol dalam penentuan waktu optimum fermentasi.....	44
17. Persen efisiensi fermentasi etanol pada waktu optimum.	45
18. Kurva standar glukosa.....	53
19. Kurva standar etanol.	54

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kebutuhan sumber bahan bakar fosil dari tahun ke tahun selalu mengalami peningkatan, khususnya konsumsi energi. Konsumsi energi berbahan bakar fosil di Indonesia dari tahun 2015 sampai 2020 tumbuh rata-rata 2,2 % per tahun dan mencapai 118,3 juta *Tonne of Oil Equivalent* (TOE) atau setara dengan pembakaran 118,3 juta ton minyak mentah pada tahun 2020. Hal tersebut didominasi penggunaannya oleh sektor transportasi dan industri. Sementara itu, produksi minyak bumi di Indonesia mengalami penurunan yang signifikan dalam dua dekade, dari rata-rata sebesar 1,5 juta barel per hari menjadi rata-rata 710,3 ribu barel per hari pada tahun 2020. Sejalan dengan jumlah cadangan minyak di Indonesia mengalami penurunan menjadi 4,2 Miliar Barel pada tahun 2020 dibandingkan tahun 2015 yaitu sebesar 7,3 Miliar Barel. Hal tersebut menimbulkan ketidakseimbangan antara konsumsi dan ketersediaan energi bahan bakar fosil di Indonesia (Sekretariat Jenderal Dewan Energi Nasional, 2021).

Sumber energi terbarukan merupakan sumber energi yang dapat digunakan tanpa batas waktu dan tidak akan pernah habis karena dapat dipulihkan dalam waktu relatif singkat. Sumber energi terbarukan ini dibutuhkan sebagai upaya mengurangi penggunaan berbahan bakar fosil dan mewujudkan energi bersih dan ramah lingkungan (Jaelani *et al.*, 2017). Potensi energi terbarukan di negara Indonesia sangat besar karena pengaruh astronomis dan geografis, seperti energi panas bumi, air laut, ataupun bioenergi yang sangat melimpah (Azhar dan Satriawan, 2018). Salah satu energi terbarukan yang dapat digunakan adalah bioetanol. Bioetanol dapat dijadikan sebagai alternatif penggunaan minyak bumi. Selain memiliki kesamaan sifat, baik sifat fisik maupun kimia dengan minyak

bumi, bioetanol juga dapat diperoleh dari gula atau pati melalui proses fermentasi (Naik *et al.*, 2010).

Bioetanol dapat dibedakan menjadi 3 generasi berdasarkan sumbernya. Generasi pertama mengandung sumber gula yang berasal dari bahan-bahan yang mengandung pati. Generasi pertama ini memiliki kelemahan karena adanya rivalitas pemanfaatan pati untuk pangan dan untuk energi. Generasi kedua memiliki sumber gula yang berasal dari limbah-limbah dengan kandungan lignoselulosa yang tinggi. Namun generasi ini memiliki kelemahan dalam upaya mendegradasi struktur lignoselulosa karena strukturnya yang kompleks dan rapat sehingga memerlukan biaya yang cukup besar (Chaudhary *et al.*, 2014). Generasi ketiga menggunakan alga yang memiliki kandungan selulosa yang cukup tinggi dan memiliki kandungan lignin yang sangat minim atau bahkan tidak ada sama sekali (Tan *et al.*, 2020).

Penggunaan mikroalga memiliki banyak keunggulan untuk produksi biofuel, karena memiliki pertumbuhan yang cepat, mampu tumbuh dalam berbagai kondisi termasuk dalam air limbah, dan tidak memerlukan lahan subur untuk proses budidayanya (Silva and Bertucco, 2016). Salah satu mikroalga potensial yang dapat digunakan adalah *Nannochloropsis* sp karena umum dijumpai di air tawar maupun air laut yang tersebar di seluruh dunia, khususnya di Indonesia yang memiliki wilayah perairan sebesar 67% dari total wilayah di Indonesia (Noor, 2000; Nursalim dkk., 2019). Besarnya wilayah perairan laut di Indonesia ini dapat menjadi potensi utama pengembangan bioetanol berbahan baku mikroalga, baik dengan mengeksplorasi kekayaan keragaman mikroalga di laut Indonesia, maupun mengembangkan mikroalga yang memiliki keunggulan tertentu dalam pemanfaatannya. *Nannochloropsis* sp. memiliki kandungan karbohidrat sebesar 19,79 % yang menunjang potensi penggunaan mikroalga sebagai bahan baku produksi bioetanol (Jati dkk., 2019).

Produksi bioetanol dari mikroalga *Nannochloropsis* sp. ini menggunakan metode hidrolisis dan fermentasi secara enzimatik. Metode ini memiliki keunggulan, karena menghasilkan tingkat efisiensi yang tinggi dalam mengubah biomassa

menjadi bioetanol. Metode hidrolisis dan fermentasi diawali dengan hidrolisis biomassa selulosa yang terdapat dalam mikroalga menjadi monomer-monomer penyusunnya secara enzimatik. Biomassa yang telah diolah kemudian difermentasi dengan ragi untuk mendapatkan etanol (Silva *and* Bertucco, 2016). Adapun proses hidrolisis untuk mendegradasi selulosa yang terkandung dalam *Nannochloropsis sp.* dapat dilakukan menggunakan *Actinomyces*.

Actinomyces merupakan bakteri gram positif yang memiliki morfologi berbeda dari bakteri lainnya dan termasuk dalam komponen penting dari populasi mikroba di sebagian besar tanah. Pada pupuk kompos terdapat *Actinomyces* yang mempunyai kemampuan dalam dekomposisi tanaman dan bahan lainnya, terutama dalam degradasi polimer kompleks. Mereka mendegradasi lignin, selulosa dan lignoselulosa. Ada bukti bahwa *Actinomyces* terlibat dalam degradasi banyak polimer alami lainnya di tanah seperti hemiselulosa, pektin, keratin, dan kitin (Dilip *et al.*, 2013). Dengan kemampuan degradasi terhadap polimer kompleks, *Actinomyces* memungkinkan untuk digunakan dalam degradasi selulosa pada *Nannochloropsis sp.*

Kompos telah lama dikenal sebagai sumber utama *Actinomyces*, dan ditemukan bahwa banyak spesies dalam bahan ini bersifat termofilik dan mampu tumbuh pada suhu hingga 70 °C. Temperatur yang tinggi seperti itu dihasilkan dari aktivitas mikroba yang kuat, bahkan jika ada air, nutrisi, dan oksigen yang cukup, melepaskan energi melalui respirasi lebih cepat daripada yang dapat dihamburkan (Do *et al.*, 2021). Umumnya isolasi *Actinomyces* selulolitik dari pupuk kompos disiapkan dengan 3 tahapan yaitu isolasi, pemurnian dan penapisan (Utarti dkk., 2020). Isolat *Actinomyces* yang memiliki aktivitas selulolitik dapat digunakan sebagai agen hidrolisis polimer selulosa pada *Nannochloropsis sp.* menjadi monomer penyusunnya.

Beberapa penelitian mengenai pemanfaatan mikroalga *Nannochloropsis sp.* telah dilakukan. Ashour *et al.* (2019) memanfaatkan mikroalga *Nannochloropsis oceanica* sebagai bahan baku pakan budidaya air dan bahan baku produksi biodiesel, Onay (2018) memproduksi bioetanol dari *Nannochloropsis gaditana*

melakukan hidrolisis biomassa menggunakan pemanasan dengan autoklaf dan Nursalim dkk. (2019) yang memproduksi bioetanol dari *Nannochloropsis oculata* menggunakan metode hidrolisis asam. Berdasarkan uraian tersebut, untuk meningkatkan efisiensi bioetanol maka dilakukan penelitian produksi bioetanol dari biomassa selulosa pada *Nannochloropsis* sp. menggunakan metode hidrolisis dan fermentasi secara enzimatik. Proses produksi bioetanol ini terdiri dari dua tahapan. Tahap pertama yaitu sakarifikasi selulosa pada *Nannochloropsis* sp. menjadi monomer glukosa, menggunakan *Actinomyces* yang diinokulasikan ke dalam media fermentasi yang mengandung *Nannochloropsis* sp. Tahapan kedua yaitu fermentasi glukosa hasil hidrolisis selulosa secara anaerob menggunakan bantuan khamir *Saccharomyces cerevisiae*.

1.2 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dilakukannya penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mendapatkan isolat *Actinomyces* yang memiliki aktivitas hidrolitik selulase.
2. Mendapatkan kondisi optimum *Actinomyces* dalam menghidrolisis biomassa selulosa pada *Nannochloropsis* sp.
3. Mempelajari fermentasi hidrolisat *Nannochloropsis* sp. menggunakan *S. cerevisiae* menjadi bioetanol.

1.3 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Memberikan informasi tentang isolat *Actinomyces* terpilih yang memiliki aktivitas hidrolitik tertinggi terhadap selulosa.
2. Memberikan informasi tentang proses dan kondisi optimum hidrolisis substrat menggunakan enzim yang dihasilkan *Actinomyces* dalam hidrolisis biomassa selulosa.

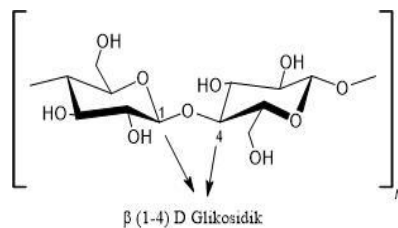
3. Meningkatkan potensi pemanfaatan mikroalga *Nannochloropsis* sp. sebagai sumber energi terbarukan.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Selulosa

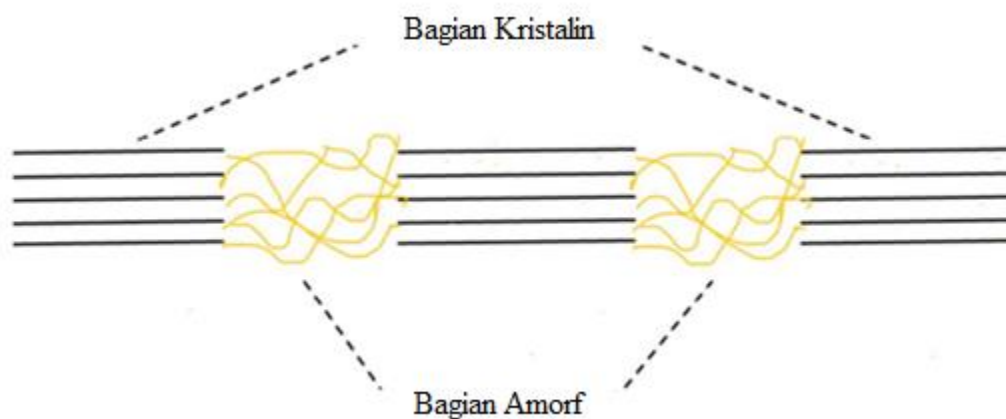
Selulosa merupakan polimer alam yang paling melimpah, biokompatibel, dan ramah lingkungan karena mudah terdegradasi, tidak beracun, serta dapat diperbaharui. Selulosa umumnya digunakan sebagai bahan baku alternatif dalam industri dan menyebabkan permintaan selulosa terus meningkat. Hal ini disebabkan oleh semakin berkurangnya cadangan bahan baku yang berasal dari sumber daya alam tak terbarukan. Namun, selulosa masih belum dapat dimanfaatkan diberbagai bidang karena kesukaran dalam pemrosesan akibat adanya ikatan hidrogen intra- dan antarmolekul yang kuat pada struktur selulosa (Song *et al.*, 2008).

Selulosa terdiri dari unit D-glukosa yang dihubungkan melalui ikatan β 1,4-glikosidik dan memiliki gugus aktif hidroksil yang melimpah yang membentuk ikatan intra molekul dan inter molekul antara rantai polimer yang menghasilkan jaringan ikat hidrogen yang kuat. Pembentukan ikatan hidrogen dalam selulosa dianggap memiliki pengaruh yang kuat terhadap sifat-sifat selulosa. Kelarutan yang terbatas dalam pelarut biasa, reaktivitas gugus hidroksil dan kristalinitas selulosa berasal dari sistem ikatan hidrogen yang kuat (Heinze *and* Koschella, 2018). Struktur selulosa ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Struktur selulosa (Salimi *et al.*, 2019).

Secara umum, selulosa merupakan zat berserat dan tidak larut dalam air yang berperan dalam menjaga struktur dinding sel tanaman. Selulosa mengandung 50 – 90 % bagian kristal (ikatan antara beberapa molekul selulosa melalui jembatan hidrogen) dan sisanya bagian amorf yang lebih mudah dihidrolisis baik secara kimiawi maupun enzimatik (Razie dkk., 2011). Bagian kristal dan amorf pada selulosa ditunjukkan pada Gambar 2.

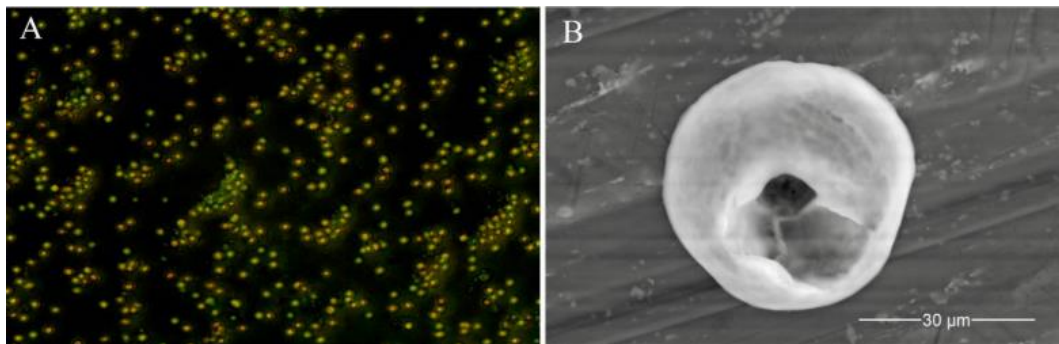


Gambar 2. Struktur bagian kristalin dan amorf pada selulosa (Rajinipriya *et al.*, 2018).

Selulosa hampir tidak pernah ditemui dalam keadaan murni di alam, melainkan selalu berikatan dengan bahan lain seperti lignin dan hemiselulosa. Selulosa terdapat dalam tumbuhan sebagai bahan pembentuk dinding sel dan serat tumbuhan. Molekul selulosa merupakan mikrofibril dari glukosa yang terikat satu dengan lainnya membentuk rantai polimer yang sangat panjang (Usman dkk., 2020). Oleh karenanya selulosa dapat diisolasi dari beberapa sumber selulosa antara lain dinding sel tanaman, bahan berkayu, rambut biji, kulit pohon, dan tanaman laut. Serat kapas mengandung 95% selulosa, sedangkan kayu 40-50% selulosa. Jumlah selulosa dalam serat bervariasi menurut sumbernya dan biasanya berkaitan dengan bahan-bahan seperti air, lilin, pektin, protein, lignin dan substansi-substansi mineral (Bhimte *and* Tayade, 2007).

2.2 *Nannochloropsis* sp.

Nannochloropsis adalah genus dari mikroalga uniseluler yang termasuk dalam kelas Eustigmatophyceae dan terdiri dari 6 spesies; yaitu *N. oceanica*, *N. oculata*, *N. salina*, *N. limnetica*, *N. granulata* dan *N. gaditana*. Beberapa spesies dianggap sebagai salah satu mikroalga laut yang paling menarik yang dapat dimanfaatkan dalam budidaya karena ukuran sel yang kecil dan nilai gizi yang tinggi (Ashour *et al.*, 2019). *Nannochloropsis* sp memiliki morfologi berwarna kehijauan, tidak motil dan memiliki dua flagel. *Nannochloropsis* sp memiliki sel yang berbentuk bulat memanjang dan berukuran sel 2 - 4 mikron serta memiliki dua flagel yang salah satu flagela berambut tipis. *Nannochloropsis* sp. dapat berfotosintesis karena memiliki kloroplas yang terdapat stigma (bintik mata) yang bersifat sensitif terhadap cahaya dan mengandung klorofil A dan C serta pigmen *fucoxanthin*. *Nannochloropsis* sp. bersifat kosmopolit, dapat tumbuh pada salinitas 0-35 ppt. Dinding sel pada *Nannochloropsis* sp. tersusun dari serat dengan komponen utama selulosa (Yanuhar, 2016). Morfologi *Nannochloropsis* sp. ditunjukkan pada Gambar 3.



Gambar 3. Morfologi *Nannochloropsis* sp di bawah mikroskop cahaya (A, 400x) dan *Scanning Electron Microscope* (B) (Ashour *et al.*, 2019).

Nannochloropsis sp. serbuk memiliki komposisi kadar air sebesar 18,96%, kadar abu sebesar 46,16%, lemak total sebesar 6,23%, protein sebesar 8,83% dan karbohidrat sebesar 19,79%. Hampir semua metode ekstraksi lemak alga mempersyaratkan agar alga yang diekstraksi dalam keadaan kering dengan kadar

air tidak lebih dari 10%. Oleh karena itu penelitian yang dilakukan oleh Jati dkk., tahun 2019 memiliki kadar lemak total yang rendah. Kandungan *Nannochloropsis* sp. dapat dilihat ada Tabel 1.

Tabel 1. Analisis Proksimat *Nannochloropsis* sp

Parameter	Kadar (%)
Kadar air	18,96
Kadar abu	46,19
Lemak total	6,23
Protein	8,83
Karbohidrat	19,79

Sumber : (Jati dkk., 2019).

2.3 Bakteri *Indigenous*

Bakteri *indigenous* atau digunakan sebagai salah satu mikroorganisme potensial yang memiliki kemampuan bioaktivitas terhadap reaksi spesifik tertentu.

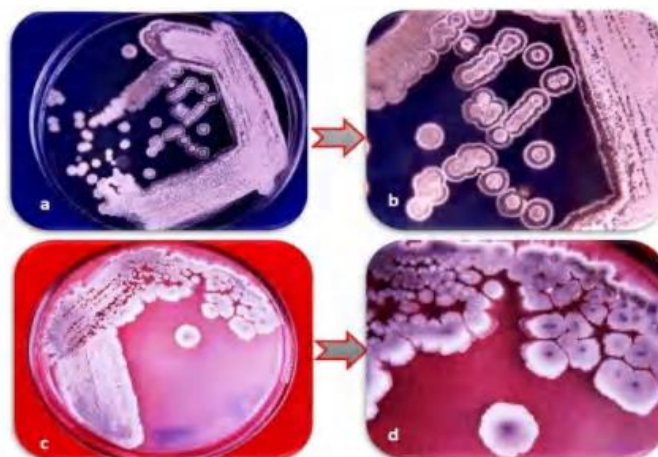
Fidiastuti dan Suarsini, (2017) telah menggunakan bakteri *indigenous* sebagai pendegradasi limbah cair pabrik kulit yang dikultur secara murni di dalam laboratorium untuk dipakai sebagai *starter* dalam pengolahan limbah. Novianty dkk., (2020) juga menggunakan bakteri *indigenous* ataupun biota lokal yang berasal dari lingkungan tercemar untuk mendegradasi hidrokarbon minyak bumi dan Noor dkk., (2021) juga menggunakan bakteri *indigenous* untuk mendegradasi bahan organik limbah cair nanas yang diperoleh dari limbah tersebut.

Berdasarkan penelitian tersebut dapat diasumsikan bahwa bakteri *indigenous* merupakan bakteri yang secara alami dapat tumbuh dan berkembang pada limbah tertentu, dan berpotensi memiliki kemampuan bioaktivitas penghasil produk intermediet enzim yang bekerja spesifik terhadap suatu reaksi.

2.4 *Actinomycetes*

Actinomycetes adalah bakteri gram positif dengan morfologi jamur dan memiliki jumlah basa nitrogen Guanin (G) dan Sitosin (C) yang tinggi pada komponen genetiknya. Mereka kaya akan sumber metabolit sekunder dengan aktivitas biologis yang beragam. Kandungan GC adalah ukuran kasar dari keterkaitan mikroorganisme, tetapi masih berguna untuk membedakan divisi filogenetik yang besar. Mereka menunjukkan berbagai siklus hidup, yang unik di antara prokariota (Dilip *et al.*, 2013).

Pada media padat agar, *Actinomycetes* dapat dibedakan dengan mudah dengan bakteri pada umumnya. Tidak seperti koloni bakteri pada umumnya yang berlendir dan tumbuh dengan cepat, koloni *Actinomycetes* muncul secara perlahan dan menunjukkan konsistensi berbutuk serta melekat erat pada permukaan agar. Pengamatan yang diteliti pada suatu koloni di bawah mikroskop yang membentuk spora aseksual untuk perkembangbiakannya (Dhanasekaran *and* Jiang, 2016). Adapun morfologi *Actinomycetes* pada media agar ditunjukkan pada Gambar 4.



Gambar 4. Penampakan *Actinomycetes* pada media SCA (*Starch Casein Agar*) (a) dan (c) isolat pada cawan petri (b) dan (d) morfologi koloni (Dhanasekaran *and* Jiang, 2016).

Umumnya *Actinomycetes* mesofilik berada pada pupuk kompos dan memainkan peran penting dalam dekomposisi tanaman dan bahan lainnya terutama dalam degradasi polimer kompleks. Mereka mendegradasi lignin, selulosa dan lignoselulosa. Ada bukti bahwa *Actinomycetes* terlibat dalam degradasi banyak polimer alami lainnya di tanah seperti hemiselulosa, pektin, keratin, dan kitin (Dilip *et al.*, 2013). *Actinomycetes* termasuk mikroba heterotrof dan bersifat aerob. Keasaman tanah (pH) yang sesuai untuk pertumbuhannya antara 6,5-8,0 dan populasinya akan menurun seiring dengan menurunnya derajat keasaman tanah. Kelembaban tanah yang sesuai untuk pertumbuhan *Actinomycetes* adalah 85%, bila kondisi tanah kering akan membentuk konidium (Sastrahidayat *et al.*, 2011).

2.5 Enzim Selulase

Enzim selulase merupakan suatu enzim yang mampu menguraikan selulosa dengan cara menghidrolisis ikatan β -1,4 glikosidik menjadi bentuk yang lebih sederhana yaitu monomer glukosa (Lehninger, 1998). Selulase diklasifikasikan menjadi tiga tipe berdasarkan aktivitasnya terhadap berbagai substrat, yaitu :

- a. Endo- β -1,4-D-glukanase yang memecah ikatan internal glukosidik yang berada di antara glukosa yang utuh.
- b. Exo- β -1,4-D-glukanase/Exo- β -1,4-D-selobiohidrolase yang memecah dimer selubiosa dari rantai glukosa dan melepaskan ke dalam larutan.
- c. β -glukosidase yang menyempurnakan hidrolisis selulosa menjadi glukosa dengan memecah selubiosa menjadi monomer glukosa untuk mengeliminasi penghambatan selubiosa (Gozan, 2014).

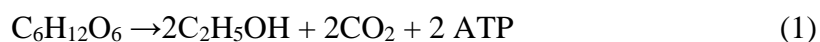
Aktivitas enzim endoglukanase pada umumnya dapat diuji dengan substrat CMC (*Carboxymethyl cellulose*) sehingga enzim endoglukanase disebut dengan istilah CMCase, sedangkan aktivitas enzim selobiohidrolase atau eksoglukanase seringkali diuji dengan substrat avisel sehingga enzim eksoglukanase disebut dengan aviselase (Zhang *et al.*, 2016). Tiga enzim tersebut berperan dalam

mendegradasi selulosa menjadi gula sederhana. Salah satu enzim yang dibutuhkan untuk menghidrolisis selulosa menjadi glukosa adalah endo-1,4 β -glukonase yang dapat dideteksi dengan hidrolisis CMC dari nilai indeks selulolitik. Nilai indeks selulolitik menggambarkan kemampuan isolat bakteri selulolitik dalam mengekskresikan enzim endoglukanase (CMCase), semakin besar nilai indeks selulolitik maka semakin besar kemampuan dalam mengekskresikan CMCase. Endoglukanase merupakan komponen selulase yang selalu ditemukan pada bakteri selulolitik. Pertumbuhan dan kemampuan bakteri merombak bahan organik ditandai dengan terbentuknya zona bening pada medium CMC. Zona bening yang timbul menunjukkan terjadinya hidrolisis bahan organik dalam substrat yang diakibatkan oleh enzim selulase dari bakteri selulolitik (Shuangqi *et al.*, 2011).

2.6 Fermentasi Glukosa Menjadi Bioetanol

2.6.1 Fermentasi

Fermentasi adalah peruraian senyawa organik menjadi senyawa sederhana dengan bantuan mikroorganisme sehingga menghasilkan energi. Glukosa yang merupakan gula paling sederhana, melalui fermentasi akan menghasilkan etanol. Dengan persamaan reaksi gula pada Persamaan 1 :



Secara teori 100 gram glukosa akan menghasilkan 51,4 gram etanol dan 48.8 gram CO_2 (Nugroho dkk., 2016). Dalam proses fermentasi, perlu ditambahkan *starter* untuk menunjang proses fermentasi pada substrat tertentu. *Starter* adalah populasi mikroba dalam jumlah dan kondisi yang fisiologis yang siap diinokulasikan pada media fermentasi (Prabowo, 2011).

Pada proses fermentasi akan terjadi perombakan gula sederhana menjadi alkohol melalui serangkaian reaksi glikolisis dan metabolisme karbohidrat lainnya. Enzim

invertase yang dihasilkan oleh mikroba tertentu akan mengubah glukosa menjadi alkohol. Semakin besar populasi mikroba dalam media fermentasi dan semakin lama proses fermentasi, maka semakin banyak gula sederhana yang dirombak menjadi alkohol dan senyawa lainnya. Alkohol yang dihasilkan dari proses fermentasi biasanya masih mengandung gas-gas antara lain CO₂ yang timbul dari pengubahan gula sederhana menjadi etanol. Fermentasi bioetanol dapat didefinisikan sebagai proses penguraian gula menjadi bioetanol dan karbondioksida yang disebabkan enzim yang dihasilkan oleh massa sel mikroba (Bestari dkk., 2013).

2.6.2 Bioetanol

Bioetanol merupakan salah satu biofuel yang telah dikembangkan sebagai bahan bakar nabati karena bersumber dari sumber biologis umumnya biomassa. Bioetanol ini dihasilkan berdasarkan reaksi yang menghasilkan metabolit sekunder dari beberapa jenis khamir yang memanfaatkan glukosa sebagai sumber makanannya (Nursalim dkk., 2019).

Bioetanol yang dihasilkan dari makroalga melalui proses fermentasi oleh ragi atau bakteri. Berbagai spesies makroalga memiliki karakteristik kimia dan fisik yang berbeda sehingga memerlukan parameter proses yang spesifik. Oleh karena itu, penting untuk memahami karakteristiknya sebelum produksi bioetanol. Penilaian lengkap dari proses fermentasi umumnya mengacu pada profil pertumbuhan sel, konsumsi gula pereduksi oleh mikroorganisme dan laju produksi bioetanol. Ada banyak metode fermentasi yang digunakan untuk mengubah gula pereduksi yang dihasilkan dari makroalga menjadi bioetanol. Proses-proses tersebut dilambangkan sebagai berikut: (1) hidrolisis dan fermentasi terpisah (SHF); (2) sakarifikasi dan fermentasi simultan (SSF); (3) sakarifikasi dan ko-fermentasi simultan (SSCF); dan (4) bioproses terkonsolidasi (CBP) (Tan *et al.*, 2020).

Berdasarkan sumber bahan bakunya, bioetanol dibedakan menjadi beberapa generasi yaitu sebagai berikut :

a. Bioetanol Generasi Pertama (G1)

Bioetanol generasi pertama adalah bioetanol yang diproduksi dari bahan baku yang mengandung pati seperti ubi kayu, nira, tebu, jagung, dan sebagainya. Namun bahan baku tersebut masih banyak dimanfaatkan sebagai bahan pangan sehingga terjadi persaingan antara pangan dan *biofuel*.

b. Bioetanol Generasi Kedua (G2)

Bioetanol generasi kedua adalah bioetanol yang diproduksi dari limbah yang mengandung lignoselulosa tinggi seperti *bagasse*, jerami padi, tandan kosong kelapa sawit, tongkol jagung, dan lain sebagainya. Produksi dari generasi kedua ini memiliki kendala yaitu tingginya kandungan lignin, memerlukan teknologi yang mahal, dan tidak ekonomis dalam produksi skala besar.

c. Bioetanol Generasi Ketiga (G3)

Bioetanol generasi ketiga merupakan bioetanol yang menggunakan bahan baku dari kelompok alga, baik mikroalga maupun makroalga (rumput laut). Kelompok alga dipilih karena terbukti dapat tumbuh dan tahan pada berbagai lingkungan, memiliki persediaan yang cukup dan aman karena pertumbuhannya yang cepat dan pemanenan yang mudah, sedikit mengandung lignin atau tidak ada sama sekali, pertumbuhannya cepat, dan berperan dalam pengurangan efek rumah kaca. Alga mampu tumbuh pada air limbah dan mengkonversi CO₂ menjadi biomassa yang berguna tanpa mengganggu persediaan pangan dan tanaman pertanian (Chaudhary *et al.*, 2014).

Menurut Silva *and* Bertucco (2016) metode produksi bioetanol dari mikroalga terbagi menjadi 3 yaitu metode *dark fermentation*, metode *photofermentation* dan metode hidrolisis dan fermentasi:

- a. *Dark fermentation* disebut juga sebagai konversi substrat organik menjadi biohidrogen. Mikroorganisme fermentasi dan hidrolitik menghidrolisis polimer organik kompleks menjadi monomer, yang kemudian diubah menjadi

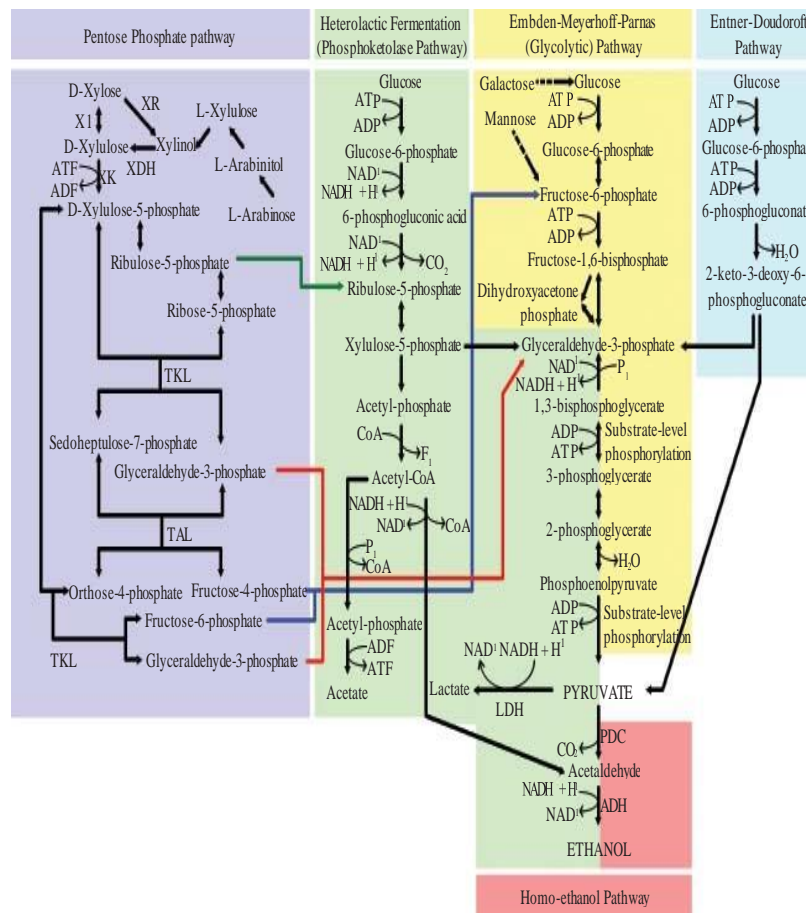
campuran asam organik dengan berat molekul rendah dan alkohol, terutama asam asetat dan etanol. Berbagai mikroalga dan *cyanobacteria* yang mampu mengeluarkan etanol melalui dinding sel melalui proses intraseluler tanpa adanya cahaya antara lain *C. reinhardtii*, *Chlamydomonas moewusii*, *C. vulgaris*, *Oscillatoria limnetica*, *Oscillatoria limosa*, *Gleocapsa alpicola*, *Cyanothece sp.*, *Chlorococcum littorale*, dan *Spirulina sp.* e *Synechococcus sp.* Namun, fermentasi gelap tidak menguntungkan dalam hal produktivitas hidrogen, karena sekitar 80-90% dari *Chemical Oxygen Demand* (COD) tetap dalam bentuk asam dan setelah alkohol terproduksi. Bahkan di bawah kondisi operasi yang optimal, hasil tipikal hanya bervariasi antara 1 dan 2 mol H₂ per mol glukosa. Produksi etanol didukung oleh akumulasi karbohidrat dalam sel mikroalga melalui fotosintesis, dan kemudian mikroalga dipaksa untuk mensintesis etanol melalui metabolisme fermentasi langsung dari cadangan karbohidrat dan lipidnya ketika mengubah pertumbuhan ke kondisi gelap. Dapat disimpulkan bahwa fermentasi gelap mikroalga bukanlah proses yang efisien untuk produksi bioetanol.

- b. *Photofermentation* adalah metode produksi etanol yang menggunakan mekanisme alami untuk mengubah sinar matahari menjadi produk fermentasi melalui jalur metabolisme yang sangat efisien. Photanol tidak hanya terbatas pada produksi etanol, tetapi juga digunakan untuk sejumlah besar produk alami yang dihasilkan dari fermentasi berbasis glikolisis. Dengan demikian, beberapa spesies *cyanobacteria* dapat dimodifikasi secara genetik dengan memperkenalkan kaset fermentasi spesifik melalui prosedur rekayasa molekuler, dan kemudian diuji sebagai organisme fermentatif.
- c. Hidrolisis dan fermentasi merupakan metode yang didasarkan pada produksi biomassa mikroalga dalam fotobioreaktor yang dilanjutkan dengan tahap pra-perawatan (penguraian struktur sel dan hidrolisis biomassa), dan seringkali dengan penambahan enzim. Biomassa yang telah diolah kemudian difermentasi dengan ragi atau bakteri untuk mendapatkan etanol. Kelemahan utama dari rute ini adalah proses yang diperlukan, yang menuntut lebih

banyak energi, dan penggunaan enzim dan ragi, yang menyumbang sebagian besar biaya. Sebaliknya, proses hidrolisis/fermentasi mengubah biomassa pada tingkat tertinggi, karena efisiensi tinggi yang terkenal dari enzim dan ragi dalam mengubah biomassa menjadi produk.

2.6.3 Mikroorganisme Penghasil Bioetanol

Etanol dapat diproduksi melalui beberapa cara, yaitu secara kimiawi dengan bahan baku dari bahan bakar fosil atau melalui proses biologi dengan cara fermentasi gula yang hasilnya berupa bioetanol (Hill *et al.*, 2006). Beberapa mikroba yang dapat digunakan untuk produksi bioetanol salah satunya adalah *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Clostridium thermochelum* dan *Thermoanaerobacter* spp. Mikroba yang dapat menghasilkan bioetanol paling tinggi adalah *Saccharomyces cerevisiae* karena dapat menghasilkan etanol yang paling tinggi, sekitar 12-14% dan *Zymomonas mobilis* sekitar 12%. *Saccharomyces cerevisiae* memecah molekul gula melalui siklus Meyerhoff-Parnas (EMP) yang menghasilkan 2 mol ATP sedangkan *Zymomonas mobilis* memecah molekul gula melalui siklus Enterner Doudoroff (ED) menghasilkan 1 mol ATP (Riyanti, 2009). Adapun siklus metabolisme etanol ditunjukkan pada Gambar 5.



Gambar 5. Siklus metabolisme etanol (Riyanti, 2009).

2.7 Karakterisasi Substrat dan Analisis kadar Bioetanol

2.7.1 Karakterisasi Substrat Menggunakan *X-Ray Diffraction (XRD)*

Karakterisasi XRD bertujuan untuk mengidentifikasi derajat kristalinitas selulosa yang terdapat dalam substrat (Segal *et al.*, 1959). Kristalinitas merupakan sifat penting polimer yang menunjukkan ikatan antara rantai molekul sehingga menghasilkan susunan molekul yang lebih teratur. Kristalinitas yang tinggi pada selulosa dapat menghambat proses sakarifikasi. Semakin tinggi kristalinitas maka kemampuan enzim dalam mendegradasi substrat selulosa menjadi glukosa semakin rendah. Umumnya untuk menurunkan derajat kristalinitas selulosa yang

tinggi digunakan NaOH. Karena NaOH dapat memutuskan ikatan hidrogen terutama ikatan inter-molekul selulosa. Putusnya ikatan hidrogen ini menyebabkan air yang diserap lebih banyak sehingga nilai retensi air meningkat. Hal ini meningkatkan penyerapan enzim selulase ke dalam substrat selulosa karena penyerapan air lebih banyak (Wayan dkk., 2011).

Analisis XRD didasarkan pada pola difraksi dari paduan atau senyawa yang dihasilkan oleh proses difraksi, ukuran panjang gelombang sinar-X tidak berbeda jauh dengan jarak antar atom di dalam kristal. Ketika seberkas sinar-X berinteraksi dengan sampel kristal, maka bidang kristal itu akan membiaskan sinar-X yang memiliki panjang gelombang yang sama dengan jarak antar kisi dalam kristal tersebut. Sinar yang dibiaskan akan ditangkap oleh detektor, kemudian diterjemahkan sebagai puncak difraksi. Semakin banyak bidang kristal yang sama terdapat dalam sampel, semakin kuat intensitas pembiasan yang dihasilkan (Mahliani, 2022). Untuk sampel selulosa diuji pada sudut $2\theta = 0^\circ - 70^\circ$. Kemudian diukur indeks kristalinitas (% CrI) dari selulosa menggunakan perhitungan Segal *et al* (1959) pada Persamaan 2 :

$$\% CrI = \frac{I_{200}}{I_{200} + I_{am}} 100\% \quad (2)$$

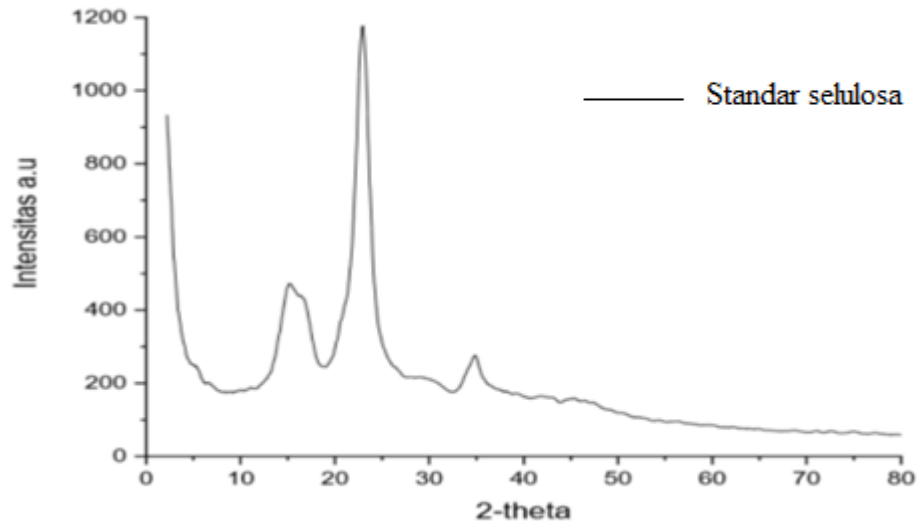
Keterangan :

% CrI = Indeks kristalinitas (%)

I_{200} = Intensitas difraksi dengan puncak maksimum yang memiliki indeks Miller 200

I_{am} = Intensitas dari bagian amorf, yaitu intensitas yang tidak memuncak.

Adapun pola difraktogram dari selulosa menggunakan analisis XRD ditunjukkan pada Gambar 6.



Gambar 6. Pola difraktogram XRD dari tepung mikrokristalin selulosa (Dareda *et al.*, 2020).

2.7.2 Analisis Kadar Bioetanol menggunakan Spektrofotometer UV-Vis.

Etanol merupakan alkohol primer dimana gugus OH pada etanol hanya terikat dengan 1 atom karbon. Analisis kadar bioetanol dilakukan untuk mengetahui konsentrasi etanol yang dihasilkan dari proses fermentasi menggunakan *S. cerevisiae*. Etanol yang dihasilkan ditambahkan pereaksi dikromat yang diasamkan untuk analisis alkohol primer dan alkohol sekunder. Dalam reaksinya, ion-ion kromium dalam dikromat mengoksidasi alkohol primer menjadi aldehida dan alkohol sekunder menjadi keton, sedangkan alkohol tersier tidak teroksidasi. Ketika alkohol teroksidasi, ion-ion kromium dalam dikromat tereduksi dari bilangan oksidasi +6 menjadi +3 yang memberikan warna oranye menjadi hijau. (Seo *et al.*, 2009). Untuk menganalisis kadar etanol dapat digunakan metode analisis secara destilasi, hidrometer, metode enzim, kromatografi gas, kromatografi cair bertekanan tinggi, spektrofotometer UV-Vis dan sebagainya.

Spektrofotometri merupakan metode pengukuran suatu penyerapan energi cahaya pada panjang gelombang tertentu dengan menggunakan alat yang disebut spektrofotometer. Spektrofotometer mempunyai interaksi antara radiasi dan materi di dalamnya. Adapun tujuan dari penggunaan spektrofotometri yaitu mengidentifikasi suatu senyawa baik tunggal maupun multikomponen (Day and Underwood, 2002). Setiap metode analisis memiliki kekurangan dan kelebihan masing-masing. Menurut Perdana (2018), spektrofotometer UV-Vis digunakan dalam analisis kadar etanol karena memiliki akurasi, kemudahan, kecepatan, dan biaya analisis yang lebih baik bila dibandingkan dengan metode analisis lain.

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat penelitian

Penelitian ini telah dilakukan pada bulan Mei sampai September 2022. Analisis komposisi, aktivitas enzim selulase dan kadar bioetanol dengan metode Spektrofotometri UV-Vis dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung. Analisis karakterisasi substrat menggunakan metode *X-Ray Diffraction* (XRD) dilakukan di Institut Teknologi Sepuluh November.

3.2 Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah peralatan gelas laboratorium, mikropipet, gunting, *hot plate*, timbangan analitik, lemari pendingin, *magnetic stirrer*, autoklaf, jarum ose, *Laminar air flow* model CURMA 9005-FL, inkubator, pH meter, bunsen, *cork borer*, tabung *ependorf*, *oven*, spektrofotometer UV-Vis Cary Win UV 32, dan *X-Ray Diffractometer* (XRD) merk PanAnalytical tipe Xpert Multi Purpose Diffractometer .

Bahan-bahan yang digunakan adalah pupuk kompos, bubuk *Nannochloropsis sp.* yang diperoleh dari Balai Besar Perikanan Budidaya Laut (BBPBL) Lampung, khamir *S. Cerevisiae*, akuades, asam sulfat (H_2SO_4), kalsium karbonat ($CaCO_3$), asam dinitrosalisilat (DNS), bubuk agar, *yeast extract*, ekstrak malt, dekstrosa, karboksimetil selulosa (CMC), etanol 70%, ammonium sulfat ($(NH_4)_2SO_4$), magnesium sulfat heptahidrat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), dan kalium dikromat ($K_2Cr_2O_7$).

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1. Analisis Komposisi dan Karakteristik Substrat

3.3.1.1 Analisis Komposisi

Analisis komposisi dari bubuk *Nannochloropsis sp.* yang digunakan sebagai substrat, dilakukan berdasarkan metode standar *Technical Association of the Pulp and Paper Industry* (TAPPI) (Sluiter *et al.*, 2008). *Nannochloropsis sp.* dalam bentuk serbuk ditimbang sebanyak 300 mg kemudian ditambahkan 4 mL asam sulfat 72% dan diaduk menggunakan *stirrer* selama 1,5 jam pada suhu ruang. Campuran diencerkan hingga 4% dan dipanaskan menggunakan autoklaf selama 1 jam pada suhu 121°C pada tekanan 1,5 atm. Dilakukan pemisahan endapan dari larutannya menggunakan kertas saring. Endapan yang diperoleh dibilas dengan akuades hingga bebas asam dan dipanaskan menggunakan oven pada suhu 80 °C sampai kadar airnya hilang lalu ditimbang hingga konstan. Filtrat hasil hidrolisis dinetralkan menggunakan kalsium karbonat hingga diperoleh pH 7. Filtrat dilakukan analisis spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 540 nm dengan metode Mandels. Kemudian dilakukan pembuatan larutan standar glukosa untuk menentukan kadar glukosa substrat.

3.3.1.2 Analisis Karakteristik Substrat

Substrat *Nannochloropsis sp.* diukur kristalinitas selulosanya menggunakan *X-Ray Diffraction* (XRD) tipe *PA analytical XPert Multi-Purpose Diffractometer* dengan radiasi Cu-K α . Sampel diradiasi dengan tegangan 40 kV dan arus sebesar 30 mA pada sudut 2θ : 0° – 70°. Hamburan elektron dikumpulkan oleh Detektor X'Celerator. Indeks kristalinitas selulosa dihitung dengan metode dekonvolusi XRD (Park *et al.*, 2010).

3.3.2 Isolasi *Actinomyces Indigenus*

3.3.2.1 Pembuatan NaCl Fisiologis 0,85%

Garam NaCl ditimbang sebanyak 0,85 g lalu dimasukkan kedalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan akuades hingga tera kemudian dihomogenkan. Selanjutnya dilakukan proses sterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121 °C.

3.3.2.2 Pembuatan Media *International Streptomyces Medium 2 (ISP-2)*

Media *International Streptomyces Medium 2 (ISP-2)* digunakan sebagai tempat bertumbuhnya *Actinomyces* hasil isolasi. Media dibuat dengan cara menimbang *yeast extract* 0,4 g, dekstrosa 0,4 g, agar 2 g, dan ekstrak malt 0,4 g dalam 100 mL akuades. Media tersebut disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121 °C. Media kemudian dilakukan penuangan pada cawan petri steril dan didiamkan pada suhu ruang hingga media memadat dan siap digunakan (Utarti dkk., 2020).

3.3.2.3 Kultivasi *Actinomyces Indigenus*

Isolasi *Actinomyces* dilakukan dengan metode *spread plate*. Sampel pupuk kompos yang diperoleh dari bahan organik dilakukan perlakuan awal, yaitu dengan pengeringan pada suhu 60 °C selama 2 jam. Sebanyak 1 gram sampel tanah disuspensikan pada 10 mL larutan garam fisiologis (0,85% NaCl) steril dan diinkubasi dengan *shaker* inkubator pada kecepatan 120 rpm dalam suhu ruang selama 2 jam. Pengenceran terhadap suspensi sampel dilakukan secara bertingkat hingga pengenceran 10^{-7} . Masing-masing pengenceran diambil 0,1 mL dan diinokulasikan ke media ISP-2 dengan metode *spread plate* lalu media diinkubasi pada suhu 37 °C selama 7 hari. Kemudian koloni tunggal *Actinomyces* dimurnikan menggunakan metode *streak plate* pada medium ISP-2. Isolat murni yang diperoleh dilakukan penapisan untuk mengetahui aktivitas selulolitiknya.

3.3.2.4 Penapisan Aktivitas Selulolitik dari Isolat *Actinomyces*

Penapisan aktivitas selulolitik dari isolat *Actinomyces* dilakukan untuk memperoleh *Actinomyces* yang memiliki aktivitas selulolitik. Penapisan dilakukan dengan menggunakan media yang mengandung *yeast extract* 0,4 %, dekstrosa 0,4 %, agar 2 %, dan ekstrak malt 0,4 % dan 0,5% CMC dalam 100 mL akuades yang disterilkan pada suhu 121 °C selama 15 menit. Media yang telah disterilkan dituang ke cawan petri steril secara aseptis dan didiamkan 15 menit untuk memadatkan media. Isolat murni yang diperoleh dari hasil isolasi ditotolkan pada media yang telah disiapkan dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 7 hari (Utarti dkk., 2020). Aktivitas selulolitik didasarkan kepada zona bening yang terbentuk oleh penguangan 0,1% *Congo red* selama 30 menit diikuti dengan penguangan 1M NaCl pada permukaan media pertumbuhan *Actinomyces* untuk memperjelas zona bening (Pirzadah *et al.*, 2014).

3.3.3 Produksi dan Uji Aktivitas Enzim Selulase

3.3.3.1 Produksi Enzim Selulase dari Isolat *Actinomyces*

Produksi enzim selulase dari isolat *Actinomyces* diperoleh dengan cara menginokulasikan isolat tersebut pada media fermentasi. Pembuatan media dilakukan dengan cara melarutkan *yeast extract* 0,4 %, dekstrosa 0,4 %, agar 2 %, dan ekstrak malt 0,4 % dan 1% CMC dalam akuades. Bahan tersebut dilarutkan dengan bantuan pemanasan menggunakan *hot plate* kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121 °C dengan tekanan 1 atm. Isolat *Actinomyces* diinokulasikan pada media fermentasi tersebut, diinkubasi pada *shaker* dan dilakukan pemanenan enzim setiap 24 jam selama 96 jam. Enzim selulase yang diperoleh dipisahkan dengan selnya dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm selama 15 menit.

3.3.3.2 Uji Aktivitas Enzim Selulase dari Isolat *Actinomyces*

Uji aktivitas enzim selulase dilakukan menggunakan metode Mandels. Metode ini didasarkan kepada jumlah gula pereduksi yang terbentuk (Mandels *et al.*, 1981). Sebanyak 0,5 mL media CMC 0,1% ditambahkan dengan 0,5 mL ekstrak kasar enzim selulase dan dimasukkan kedalam tabung. Kemudian diinkubasi pada suhu 55 °C selama 15 menit dengan *waterbath*. Sebanyak 1 mL reagen DNS ditambahkan untuk menghentikan reaksi dan dididihkan dalam *waterbath* pada suhu 100 °C selama 10 menit. Selanjutnya, tabung reaksi didinginkan dan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 540 nm.

3.3.4 Sakarifikasi Biomassa

Sakarifikasi biomassa ini dilakukan untuk menghidrolisis selulosa pada biomassa *Nannochloropsis* sp. menjadi glukosa. Hal ini dilakukan dengan cara menambahkan isolat *Actinomyces* yang memiliki kemampuan menghasilkan produk intermediet enzim sebagai pendegradasi polimer selulosa.

3.3.4.1 Pembuatan Inokulum

Pembuatan media inokulum dilakukan dengan cara melarutkan *yeast extract* 0,4 %, dekstrosa 0,4 %, ekstrak malt 0,4 % dan 1% CMC dalam akuades. Kemudian media dipanaskan menggunakan *hot plate* dan dilakukan sterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121 °C dan tekanan 1 atm. Pembuatan inokulum dilakukan dengan menambahkan 2 ose *Actinomyces* dalam media tersebut dan diinkubasi pada shaker selama 72 jam.

3.3.4.2 Optimasi Hidrolisis

Optimasi hidrolisis dari isolat *Actinomyces* meliputi optimasi pH dan waktu. Optimasi hidrolisis ini dilakukan dengan menambahkan 2 % inokulum pada media hidrolisis yang telah ditambahkan buffer fosfat pH 6, 7 dan 8. Pembuatan

media dilakukan dengan cara melarutkan *yeast extract* 0,4 %, dekstrosa 0,4 %, ekstrak malt 0,4 % dan 4 % serbuk *Nannochloropsis sp* dalam buffer. Kemudian media dipanaskan menggunakan *hot plate* dan dilakukan sterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121 °C dan tekanan 1 atm. Media yang telah diinokulasikan isolat *Actinomyces* kemudian diinkubasi pada *shaker* dan dilakukan pemanenan setiap 24 jam sekali selama 96 jam. Sampel hasil pemanenan disentrifugasi pada laju 6000 rpm selama 15 menit, kemudian diukur gula yang terbentuk menggunakan metode Mandels dengan alat spektrofotometer UV-Vis.

3.3.4.3 Produksi Glukosa

Produksi glukosa dilakukan dengan menambahkan 2% media inokulum pada media fermentasi yang telah menggunakan buffer pada pH dan waktu optimum yang telah dilakukan pada prosedur optimasi hidrolisis. Sampel disentrifugasi pada laju 6000 rpm selama 15 menit, dilanjutkan pengukuran aktivitas ekstrak kasar enzim menggunakan metode Mandels dan glukosa hasil sakarifikasi digunakan untuk fermentasi glukosa menjadi bioetanol.

3.3.5 Produksi Bioetanol

3.3.5.1 Kultivasi *S. cerevisiae*

Media biakan *S. cerevisiae* dibuat dengan melarutkan 2 % agar, 2 % ekstrak kentang, dan 2 % dekstrosa dengan akuades. Media dipanaskan menggunakan *hot plate*, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121 °C dan tekanan 1 atm. Lalu media dimiringkan dan dibiarkan hingga mengeras. Biakan murni *S. cerevisiae* diambil 1 tarikan ose dan digores zig-zag pada permukaan agar miring (Sari, 2013). Biakan ditumbuhkan di dalam inkubator dan siap digunakan setelah 1 – 2 hari (Hadioetomo, 1993).

3.3.5.2 Pembuatan Inokulum

Pembuatan media inokulum untuk *S. cerevisiae* dilakukan dengan cara melarutkan 0,01% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,01% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01% KH_2PO_4 dan 0,1% *yeast extract* dengan akuades kemudian dipanaskan menggunakan *hot plate* lalu disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm. Media tersebut didiamkan dalam kondisi aseptis selama 12 jam, kemudian sebanyak 2 ose biakan *S. cerevisiae* diinokulasikan ke media inokulum secara aseptis. Lalu inokulum diinkubasi selama 24 jam pada *shaker* (Elevri dan Putra, 2006).

3.3.5.3 Fermentasi

Filtrat hasil sakarifikasi biomassa menjadi selulosa ditambahkan 0,01% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,01% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01% KH_2PO_4 dan 0,1% *yeast extract* untuk pembuatan media fermentasi *S. cerevisiae* (Elevri dan Putra, 2006). Media lalu dipanaskan menggunakan *hot plate* lalu di sterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm. Kemudian media didiamkan pada keadaan aseptis selama 12 jam. Sebanyak 2 % media inokulum *S. cerevisiae* diinokulasikan ke dalam media fermentasi dan diinkubasi pada kondisi anaerob. Pemanenan dilakukan pada waktu optimum proses fermentasi. Sampel hasil fermentasi selanjutnya dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

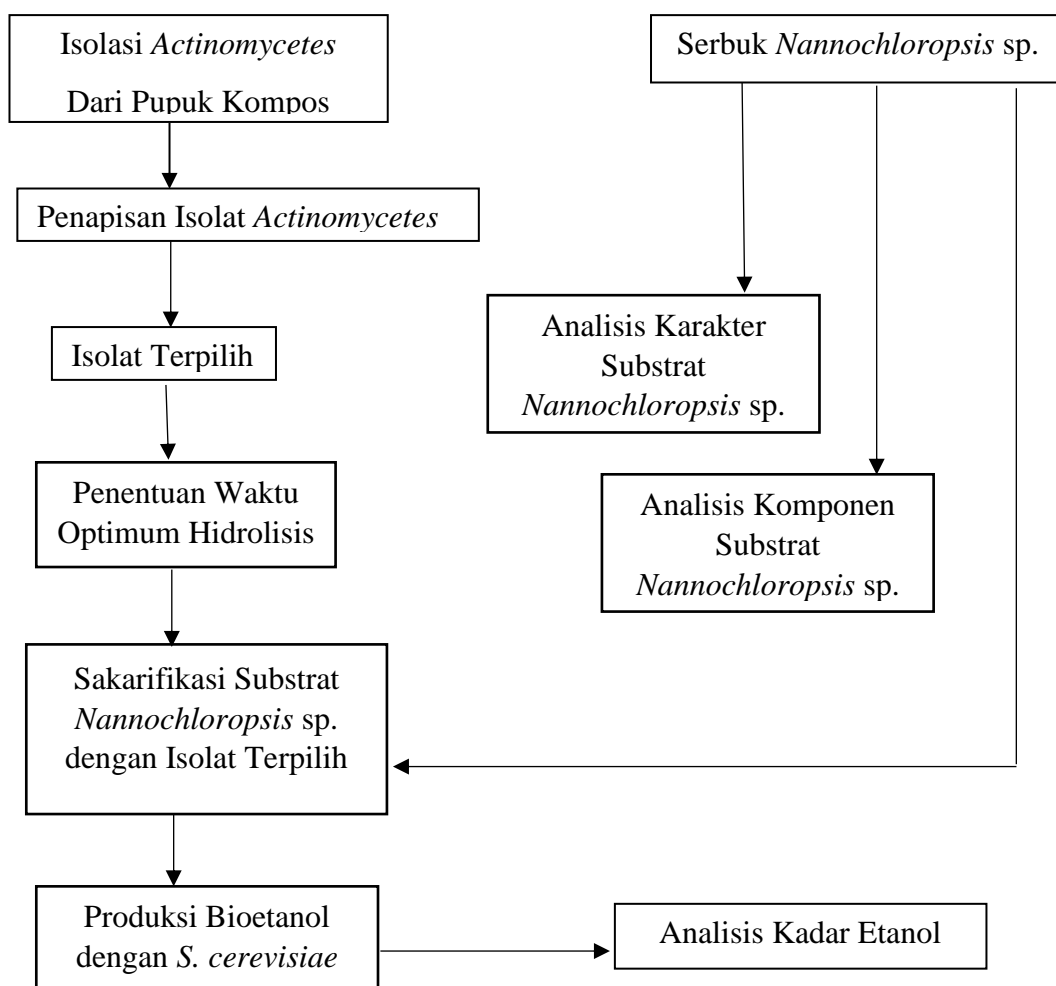
3.3.6 Analisis Kadar Etanol

Analisis kadar Etanol dilakukan dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Analisis kadar etanol menggunakan spektrofotometer UV-Vis dilakukan dengan menambahkan reagen dikromat asam pada larutan etanol dan diukur pada panjang gelombang maksimum kompleks dikromat asam dengan etanol menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Kadar etanol hasil fermentasi ditentukan menggunakan kurva standar etanol. Larutan standar dibuat dengan konsentrasi

10, 20, 30, 40, dan 50 gL⁻¹. 0,5 mL larutan bioetanol hasil fermentasi dimasukkan ke dalam tabung tertutup lalu ditambahkan 3 mL dikromat asam dan dipasang penutup tabung lalu dipanaskan pada suhu 90 °C selama 20 menit. Selanjutnya larutan diuji serapan dengan panjang gelombang maksimum yang diperoleh.

3.4 Diagram Alir

Langkah-langkah yang telah dilakukan pada penelitian ini memiliki diagram alir pada Gambar 7.



Gambar 7. Diagram alir penelitian ini.

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan diperoleh simpulan sebagai berikut:

1. Isolat Act-11 teridentifikasi sebagai isolat penghasil enzim selulase dengan indeks selulolitik tertinggi sebesar 1,77 dan aktivitas unit sebesar $0,296 \text{ U.mL}^{-1}$.
2. Kondisi optimum aktivitas selulase dari Act-11 terhadap substrat biomassa *Nannochloropsis* sp. berada pada pH 6 dan waktu inkubasi 72 jam.
3. Fermentasi hidrolisat hasil hidrolisis *Nannochloropsis* sp. dengan Act-11 menggunakan *S. cerevisiae* menghasilkan bioetanol dengan kadar sebesar $2,53 \text{ gL}^{-1}$ dengan persen efisiensi sebesar 49,92% selama 24 jam.

5.2 Saran

Adapun saran terhadap penelitian selanjutnya terkait produksi bioetanol dari substrat *nannochloropsis* sp. adalah sebagai berikut:

1. Melakukan eksplorasi mengenai hidrolisis karbohidrat menggunakan asam sulfat pada proses karakterisasi substrat sehingga diperoleh hasil yang lebih akurat.
2. Melakukan pengambilan sampel setiap 6 jam pada proses optimasi hidrolisis sehingga terlihat kurva pertumbuhannya.
3. Melakukan eksplorasi mengenai kondisi anaerobik pada proses fermentasi glukosa menggunakan *S. cerevisiae*.

DAFTAR PUSTAKA

- Ashour, M., Elshobary, M.E., El-Shenody, R., Kamil, A.W., and Abomohra, A.E.F. 2019. Evaluation of a native oleaginous marine microalga *Nannochloropsis oceanica* for dual use in biodiesel production and aquaculture feed. *Biomass and Bioenergy*. **120**: 439–447.
- Azhar, M., dan Satriawan, D.A. 2018. Implementasi Kebijakan Energi Baru dan Energi Terbarukan Dalam Rangka Ketahanan Energi Nasional. *Administrative Law and Governance Journal*. **1** (4): 398–412.
- Badger, P.C. 2002. 'Ethanol from cellulose: a general review'. *Trends in new crops and new uses*. (1): 17–21.
- Bestari, A., Sutrisno, E., dan Sumiyati, S. 2013. Pengaruh Lama Fermentasi Terhadap Kadar Bioetanol dari Limbah Kulit Pisang Kepok dan Raja. 1–6.
- Bhimte, N.A., and Tayade, P.T. 2007. Evaluation of microcrystalline cellulose prepared from sisal fibers as a tablet excipient. *A Technical Note from American Association of Pharmaceutical scientist*. **8** (1): 1–7.
- Chaudhary, L., Pradhan, P., Soni, N., Singh, P., and Tiwari, A. 2014. Algae as a feedstock for bioethanol production: New entrance in biofuel world. *International Journal of ChemTech Research*. **6** (2): 1381–1389.
- Day, R.A., and Underwood, A.L. (2002). *Analisis Kimia Kuantitatif Edisi Keenam*. Erlangga. Jakarta.
- Dhanasekaran, D., and Jiang, Y. (2016). *Actinobacteria*. IntechOpen. Rijeka.
- Dilip, C. V, S, M.S., and Chavan, D. V. 2013. A Review on Actinomycetes and Their Biotechnological Application. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. **4** (5): 1730.
- Do, T.T., Cao, C.N., Do, T.T.H., Dang, T.H.P., and others. 2021. Biological characteristics and classification of thermophilic actinomycetes showed extracellular hydrolytic enzymes producing ability isolated from compost. **265**: 1-7.
- Elevri, P.A., dan Putra, S.R. 2006. Produksi Etanol Menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* yang Diamobilisasi dengan Agar Batang. *Akta Kimindo*. **1** (2): 105–114.
- de Farias Silva, C.E., and Bertucco, A. 2016. Bioethanol from microalgae and cyanobacteria: A review and technological outlook. *Process Biochemistry*. **51** (11): 1833–1842.

- Fidiastuti, H.R., dan Suarsini, E. 2017. Potensi Bakteri Indigen Dalam Mendegradasi Limbah Cair Pabrik Kulit Secara in Vitro. *Bioeksperimen: Jurnal Penelitian Biologi*. **3** (1): 1.
- Gozan, M. 2014. *Teknologi Bioetanol Generasi Kedua*. Erlangga. Jakarta.
- Hadioetomo, dan Siri, R. (1993). *Mikrobiologi dasar dalam praktek*. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Heinze, T., and Koschella, A. 2018 *Structure and Properties of Cellulose and Its Derivatives*. Springer International Publishing.
- Hermanto, M.B., Sumardi, Hawa, L.C., and Fiqtinovri, S.M. 2011. Bioreactor Design for Microalgae Cultivation. *Jurnal Teknologi Pertanian*. **12** (3): 153–162.
- Hernández, D., Riaño, B., Coca, M., & García-González, M. C. 2015. Saccharification of Carbohydrates in Microalgal Biomass by Physical, Chemical and Enzymatic Pre-Treatments as a Previous Step for Bioethanol Production. *Chemical Engineering Journal*. **262**: 939-945.
- Hill, J., Nelson, E., Tilman, D., Polasky, S., and Tiffany, D. 2006. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. **103** (30): 11206-11210.
- Jaelani, A., Firdaus, S., and Jumena, J. 2017. Renewable energy policy in Indonesia: The Quranic scientific signals in Islamic economics perspective. *International Journal of Energy Economics and Policy*. **7** (4): 193–204.
- Jati, B.N., Yunilawati, R., Nuraeni, C., Oktarina, E., Aviandharie, S.A., dan Rahmi, D. 2019. Ekstraksi dan Identifikasi Fitosterol pada Mikroalga *Nannochloropsis oculata*. *Jurnal Kimia dan Kemasan*. **41** (1): 31.
- Lee, J. H., Lee, H. U., Lee, J. H., Lee, S. K., Yoo, H. Y., Park, C., & Kim, S. W. 2019. Continuous Production of Bioethanol Using Microalgal Sugars Extracted from *Nannochloropsis gaditana*. *Korean Journal of Chemical Engineering*. **36** (1): 71-76.
- Lehninger, A.L. 1998. *Dasar-Dasar Biokimia Jilid 1*, Erlangga. Jakarta.
- Mahliani, E. 2022. *Konversi Nanoselulosa dari Limbah Kulit Pisang Kepok Menjadi Gula Alkohol Menggunakan Nanokatalis $LaCr(1-x)Fe_xO_3$ yang Diradiasi Sinar UV*. Skripsi. University of Lampung.
- Mandels, M., Medeiros, J.E., Andreotti, R.E., and Bissett, F.H. 1981. Enzymatic hydrolysis of cellulose: Evaluation of cellulase culture filtrates under use conditions. *Biotechnology and Bioengineering*. **23** (9): 2009–2026.
- Meryandini, Anja, Wahyu Widosari, Besty Maranatha, Titi Candra Sunarti, Nisa Rachmania, dan Hasrul Satria. 2009. Isolasi Bakteri Selulolitik dan Karakterisasi Enzimnya. *Makara Sains*. (13) : 33-38.
- Naik, S.N., Goud, V. V., Rout, P.K., and Dalai, A.K. 2010. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable and*

Sustainable Energy Reviews. **14** (2): 578–597.

- Ngili, Y. (2009). *Biokimia: metabolisme dan bioenergetika*. Graha Ilmu. Yogyakarta.
- Noor, A. 2000. Program Buginesia (Upaya Mengisi Matriks Pengetahuan Kelautan Indonesia) Dan Gagasan Pengembangan Riset Kelautan KTI. *Makalah Konggres dan Seminar Kelautan Nasional KTI III*. Lombok.
- Noor, R., Sutanto, A., Widowati, H., Zen, S., and Rifai, M.R. 2021. Uji Antagonis Isolat Bakteri Indigen Limbah Cair Nanas (Lcn) Dengan Isolat Bakteri Tanah Di Kebun Percobaan Karang Rejo Metro Utara. *BIOEDUKASI (Jurnal Pendidikan Biologi)*. **12** (1): 109.
- Novianty, R., Saryono, Awaluddin, A., dan Pratiwi, Wahyu, N. 2020. Jurnal Teknik Kimia USU Bakteri Indigen Pendegradasi Hidrokarbon Minyak Bumi. *Jurnal Teknik Kimia USU*. **09** (1): 34–40.
- Nugroho, A., Effendi, E., dan Novaria, T. 2016. Pengolahan Limbah Padat Tapioka Menjadi Etanol dengan Menggunakan *Aspergillus niger*, *Bacillus licheniformis* dan *Saccharomyces cerevisiae*. *Indonesian Journal of Urban and Environmental Technology*. **7** (1): 17.
- Nurkanto A. 2007. Identifikasi Actinomicetes Tanah Hutan Pasca Kebakaran Bukit Bingkirai Kalimantan Timur dan Potensinya Sebagai Pendegradasi Selulosa dan Pelarut Fosfat. *Biodiversitas*. **8** (4) : 314-319.
- Nursalim, N., Herliany, N.E., Studi, P., Kelautan, I., Bengkulu, U., dan Limun, K. 2019. Potensi *Nannochloropsis oculata* dan *Tetraselmis chuii* Sebagai Bahan Baku Bioetanol. *Jurnal Ilmu Kelautan*. **1**: 23–31.
- Onay, M. 2018. Bioethanol production from *Nannochloropsis gaditana* in municipal wastewater. *Energy Procedia*. **153**: 253–257.
- Park, S., Baker, J.O., Himmel, M.E., Parilla, P.A., and Johnson, D.K. 2010. Cellulose crystallinity index : measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. *Biotechnology for Biofuels* **3**: 1–10.
- Perdana, A.I. 2018. Optimasi Dan Validasi Metode Analisis Kadar Alkohol Pada Produk Pangan Dengan Spektrofotometer UV-Vis. *Jurnal Inovasi dan Pengelolaan Laboratorium*. **2** (1): 28–37.
- Pirzadah, T., Garg, S., Singh, J., Vyas, A., Kumar, M., Gaur, N., Bala, M., Rehman, R., Varma, A., Kumar, V., and Kumar, M. 2014. Characterization of Actinomycetes and *Trichoderma* spp. for cellulase production utilizing crude substrates by response surface methodology. *SpringerPlus*. **3** (1): 1–12.
- Prabowo, A. 2011. Pengawetan Dedak Padi dengan Cara Fermentasi. *Prosiding Seminar Nasional Balai Pengkajian Teknologi Pertanian*. Sulawesi Selatan. **6**: 112-116.
- Rajinipriya, M., Nagalakshmaiah, M., Robert, M., and Elkoun, S. 2018. Importance of Agricultural and Industrial Waste in the Field of

- Song, Y., Zhou, J., Zhang, L., and Wu, X. 2008. Homogenous modification of cellulose with acrylamide in NaOH / urea aqueous solutions. *Carbohydrate Polymers*. **73**: 18–25.
- Suryanto, H. 2017. Analisis Struktur Serat Selulosa dari Bakteri. In *Seminar Nasional Teknologi Terapan (MESIN)*. **3** (1): 17-22.
- Taherzadeh, M.J. and Karimi, K. 2007. Acidbased Hydrolysis Processes for Ethanol from Lignocellulosic Materials. *Bioresource*. **2** (3): 472-499.
- Tan, I.S., Lam, M.K., Foo, H.C.Y., Lim, S., and Lee, K.T. 2020. Advances of macroalgae biomass for the third generation of bioethanol production. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. **28** (2): 502–517.
- Teather, R. M., & Wood, P. J. (1982). Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied and environmental microbiology*. **43** (4): 777-780.
- Usman, A., Novieta, I.D., Irmayani, dan Fitriani. 2020. Kandungan Selulosa , Hemiselulosa Dan Lignin Silase Batang Pisang (*Musa paradisiaca*) Kombinasi Daun Indigofera (*Indigofera* sp) Sebagai Pakan Ternak Ruminansia. *Agromedia*. **39** (1): 61–67.
- Utarti, E., Suwanto, A., Suhartono, M.T., dan Meryandini, A. 2020. Identifikasi Aktinomiset Selulolitik dan Xilanolitik Indigenous (Identification of Cellulolytic and Xylanolytic Indigenous Actinomycetes). *Berkala Sainstek*. **VIII** (1): 1–5.
- Wayan, G.I.B., Made, W.N., Dewi, A.A.A.M., dan Made, S.P. 2011. Delignifikasi Ampas Tebu dengan Larutan Natrium Hidroksida Sebelum Proses Sakarifikasi Secara Enzimatis Menggunakan Enzim Selulase Kasar dari *Aspergillus niger* FNU 6018. *Teknologi*. **34**: 1–9.
- Yanuhar, U. (2016). *Mikroalga Laut Nannochloropsis oculata*. Universitas Brawijaya Press. Malang.
- Zhang, M., Xie, L., Yin, Z., Khanal, S.K., and Zhou, Q. 2016. Biorefinery approach for cassava-based industrial wastes: Current status and opportunities. *Bioresource Technology*. **215**: 50–62.