

BAB III

DASAR TEORI

3.1 Bioetanol

Bioetanol merupakan cairan hasil proses fermentasi gula dari sumber karbohidrat (pati) menggunakan bantuan mikroorganisme. Bahan baku yang dapat digunakan pada pembuatan etanol adalah nira bergula (sukrosa): nira tebu, nira nipah, nira sorgum manis, nira kelapa, nira aren, nira siwalan, sari buah mete, nangka; bahan berpati: tepung-tepung sorgum biji, sagu, singkong, ubi jalar, ganyong, garut, umbi dahlia; bahan berselulosa (lignoselulosa) kayu, jerami, daun kering, batang pisang, bagas dan lain-lain (LIPI, 2008). Dalam perkembangannya, produksi alkohol yang paling banyak digunakan adalah metode fermentasi dan destilasi.

Produksi bioetanol dari tanaman yang mengandung pati atau karbohidrat, dilakukan melalui proses konversi karbohidrat menjadi gula (glukosa). Pada hidrolisis enzimatis dikenal ada dua metode yaitu SHF dan SSF menjadi sangat penting untuk dikembangkan karena dapat mempersingkat proses pembuatan bioetanol (Marques, 2007). etanol (*ethyl* alkohol C_2H_5OH berupa cairan yang tidak berwarna, terurai secara biologis (*biodegradable*), toksitas rendah dan tidak menimbulkan polusi udara yang besar bila mengalami kebocoran. Etanol yang terbakar menghasilkan karbondioksida (CO_2) dan air.

Bioetanol merupakan produk fermentasi yang dapat dibuat dari substrat yang mengandung karbohidrat (gula, pati, atau selulosa). Bioetanol dapat dijadikan sebagai bahan campuran bahan bakar harus memiliki tingkat

kemurnian 96%-100%. Bioetanol memiliki beberapa kelebihan dibandingkan energi alternatif lain. Etanol memiliki kandungan oksigen yang lebih tinggi sehingga terbakar lebih sempurna, bernilai oktan tinggi dan ramah lingkungan. Disamping itu substrat produk bioetanol banyak ditemukan di Indonesia dan keberadaannya cukup melimpah.

Alkohol merupakan cairan yang tidak berwarna, jernih, mudah menguap, mudah terbakar dengan nyala biru yang tidak berasap, rasa panas membakar. Adapun sifat kimia dan fisika dari alkohol antara lain; memiliki berat molekul 46gram/mol, kepadatan 0,791 g/mL, titik didih 78.3°C. Alkohol bersifat memabukkan jika diminum. Larutan ini mampu bercampur dengan air, kloroform, eter, gliserol, dan hampir semua pelarut organik lainnya (Mardoni, 2007).

Penggunaan etanol sebagai minuman atau menyalahgunakan sudah dikenal luas. Karena jumlah pemakaian etanol dalam minuman amat banyak, maka tidak mengherankan keracunan akut maupun kronis akibat etanol sering terjadi.

3.1.1 Manfaat Bioetanol

Bioetanol merupakan energi yang dapat dihasilkan dari proses biologi maupun kimia. Energi yang dihasilkan dari proses ini ialah berupa cairan alkohol. Alkohol adalah senyawa hidrokarbon berupa gugus hidroksil (-OH) dengan dua atom karbon (C). Spesies alkohol yang banyak digunakan adalah $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ yang disebut iso propil alkohol (IPA) atau propanol-2. Dalam

dunia perdagangan disebut alkohol adalah etanol atau etil alkohol atau metil karbinol dengan rumus kimia C_2H_5OH (Rama, 2008)

Bioetanol dapat menjadi campuran dalam bahan bakar, menjadi bahan dasar industri farmasi, dan berbagai industri. Mengingat pemanfaatan bioetanol atau etanol beraneka ragam, sehingga *grade* etanol yang dimanfaatkan harus berbeda sesuai penggunaannya. Etanol yang mempunyai *grade* 90-96,5% dapat digunakan pada industri. Etanol yang memiliki *grade* 96-99,5% dapat digunakan sebagai campuran miras dan bahan dasar industri farmasi. Besarnya *grade* etanol yang dimanfaatkan sebagai campuran bahan bakar untuk kendaraan sebesar 99.5-100%. Perbedaan besarnya *grade* akan berpengaruh terhadap proses konversi karbihidrat menjadi gula (glukosa) larut dalam air (Indyah, 2007). Berikut ini merupakan tabel sifat fisik dari etanol berdasarkan SNI 06-3565-1994:

Tabel 2. Sifat Fisik Etanol

Parameter	Etanol
Rumus kimia	C_2H_5OH
Berat molekul	46
Densitas (g/mL)	0,7851
Titik didih ($^{\circ}C$)	78,4
Titik nyala ($^{\circ}C$)	13
Titik beku ($^{\circ}C$)	-112,4
Indeks bias	1,3633
Panas evaporasi (cal/g)	204
Viskositas pada ($20^{\circ}C$) poise	0,0122

Sumber: Badan Standarisasi Nasional

Tabel 2 merupakan tabel parameter kualitas bioetanol berdasarkan Standar Nasional Indonesia (SNI).

Tabel 3. Standar Nasional Indonesia Kualitas Bioetanol (SNI 7390-2008)

Parameter	Unit, Min/Max	Spesifikasi	Metode Uji (SNI 7390-2008)
Kadar etanol	%-v, min	99,5 (sebelum denaturasi) 94,0 (setelah denaturasi)	Sub 11,1
Kadar metanol	mg/L, max	300	Sub 11,1
Kadar air	%-v, max	1	Sub 11,2
Kadar denaturasi	%-v, min	2	Sub 11,2
	%-v, max	5	Sub 11,3
Kadar Cu	mg/Kg, max	0,1	Sub 11,4
Keasaman CH ₃ COOH	mg/L/max	30	Sub 11,5
Tampakan		Jernih dan tidak ada endapan	Peng. Visual
Ion klorida	mg/L, max	40	Sub 11,6
Kandungan sulfur Getah	mg/L, max	50	Sub 11,7
	mg/100mL, max	5,0	Sub 11,8
Ph		6,5-9,0	Sub 11,9

(Ahmad Budi Junaidi, 2012)

Etanol adalah bahan bakar beroktan tinggi dan dapat menggantikan timbal sebagai peningkat bilangan oktan dalam bensin. Dengan mencampur etanol dengan bensin akan mengoksidasi campuran bahan bakar sehingga dapat terbakar lebih sempurna dan mengurangi emisi gas buang seperti karbon monoksida.

Bioetanol memiliki kelebihan selain ramah lingkungan, penggunaannya sebagai bahan bakar kompor terbukti lebih hemat dan efisien proses pembakarannya. Proses pembuatan bioetanol juga lebih hemat dibandingkan minyak tanah.

3.2 Daun nangka

Daun nangka merupakan tanaman yang banyak ditemukan di wilayah Indonesia khususnya di daerah Jawa. Adapun gambar daun nangka kering sebagai berikut.



Gambar 1. Daun nangka kering

Selama ini belum ada pemanfaatan daun nangka kering. Daun nangka yang sudah kering hanya dibiarkan saja oleh masyarakat atau dibakar sebagai sampah yang menyebabkan pencemaran udara maupun lingkungan. Daun nangka kering secara proposional mengandung unsur-unsur utama seperti yang ditunjukkan pada tabel 4 berikut.

Tabel 4. Kandungan daun nangka kering

Kandungan	Persentase (%)
Air	11,13%
Hemiselulosa	20,79%
Selulosa	33,38%
Lignin	26,54%

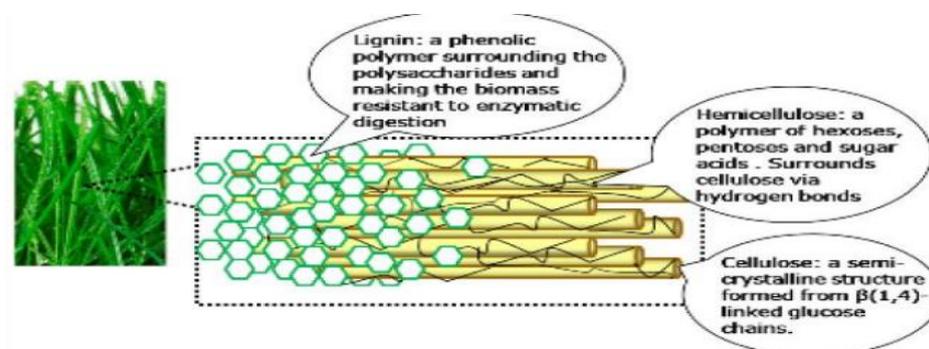
(Megawati, 2009)

Daun nangka kering mengandung banyak selulosa dan hemiselulosa. Lignoselulosa bersifat tidak larut terhadap pelarut asam dan air. Agustriyanto (2012) menjelaskan bahan tanaman yang mengandung selulosa akan mengakibatkan proses penggulaanya menjadi lebih sulit karena dalam tanaman tersebut mengandung lignin. Lignin merupakan “semen” yang mengikat fibril-fibril selulosa dan memberikan stabilitas pada kayu (Stevens, 2007).

Lignin juga merupakan senyawa turunan alkohol kompleks yang menyebabkan dinding sel tanaman menjadi keras. Lignin merupakan hidroksifenilpropana dan semua lignin mengandung koniferil alkohol. Lignoselulosa merupakan bahan yang amat rapat, sehingga pada kondisi biasa bersifat inert dan tidak bisa ditembus air, bahkan enzim. Lignoselulosa tersusun dari mikrofibril-mikrofibril selulosa yang membentuk ruang-ruang, dengan ruang antar mikrofibril terisi dengan hemiselulosa, ruang-ruang terikat kuat oleh lignin.

Material berbasis lignoselulosa (*lignocellulosic material*) memiliki substrat yang cukup kompleks karena didalamnya terkandung lignin, polisakarida, zat ekstraktif, dan senyawa organik lainnya. Bagian terpenting dan yang terbanyak dalam *lignocellulosic material* adalah polisakarida khususnya selulosa yang terbungkus oleh lignin dengan ikatan yang cukup kuat.

Berikut ini merupakan gambar skema dari lignoselulosa:



Gambar 2. Skema lignoselulosa

Harimurti, 2008.

Preparasi nangka kering dilakukan untuk meningkatkan kandungan selulosa yang diperoleh pada saat pelayuan, pengeringan, pengecilan ukuran dan fermentasi. Agustriyanto (2012) menjelaskan kandungan selulosa pada daun kering dapat dihidrolisis secara enzimatik yang terlebih dahulu dilakukan perlakuan awal. Perlakuan awal tersebut yaitu proses delignifikasi agar proses hidrolisis tidak terhambat sehingga selulosa dapat dihidrolisis menjadi glukosa.

Pengecilan ukuran daun biasanya dilakukan pemotongan dan pembubukkan menggunakan blender. Perlakuan ini bertujuan agar luas permukaan bahan menjadi lebih luas sehingga lebih mudah untuk mengeluarkan selulosa dari daun kering.

3.2.1 Taksonomi nangka

Tanaman nangka *Artocarpus heterophyllus* adalah tanaman jenis buah tahunan yang tergolong kedalam famili malveles dan hanya tumbuh didaerah

yang beriklim tropis. Tanaman nangka merupakan tanaman yang berpembuluh dan menghasilkan biji. Biji tanaman ini berkeping dua.

3.2.2 Morfologi tanaman nangka

Daun nangka tergolong daun tunggal yang tumbuh berselang-seling pada bagian ranting tanaman. Permukaan daun nangka bagian atas dan bawah memiliki penampilan yang berbeda. Permukaan bagian atas memiliki warna hijau cerah dengan tekstur yang licin, sedangkan permukaan daun bagian bawah berwarna hijau tua dengan tekstur yang kasar. Pangkal daun memiliki penumpu berbentuk segitiga. Senyawa flavonoid dari ekstrak etanol daun nangka.

Kandungan fitokimia dari daun nangka Wang, *et al.*, (2011) telah melakukan isolasi total senyawa yang terkandung dalam tanaman nangka. Hasil total senyawa flavonoid yang diperoleh sebesar 7,55 mg/g pada kondisi optimasi ekstraksi *ultrasonic-assisted* dengan metodologi respon permukaan.

Penyelidikan fitokimia dari daun nangka dilengkapi 6 senyawa glikosida dari kombinasi yang berbeda-beda dari petroleum eter, kloroform, dan metanol. Struktur senyawa ini ditetapkan dengan metode spektroskopi standar.

3.3 Rayap

3.3.1 Morfologi rayap

Rayap merupakan serangga kecil yang hidup dibawah kayu yang sudah lapuk. Rayap memakan kayu yang sudah lapuk. Hewan ini merupakan hewan parasit namun dapat dimanfaatkan menjadi hewan yang menguntungkan.

Rayap memiliki bakteri dalam ususnya untuk mencerna makanan. Bakteri ini berperan untuk mendekomposisi selulosa menjadi gula.

Perilaku rayap yang sekali-sekali mengadakan hubungan dalam bentuk menjilat, mencium, dan menggosokkan anggota tubuhnya dengan lainnya atau disebut dengan perilaku *trofalaksis* merupakan cara rayap untuk menyampaikan bakteri dan protozoa flagelata bagi individu yang baru saja ganti kulit untuk mengijeksi kembali individu kedalam rayap tersebut. disamping itu, juga merupakan cara rayap dalam menyalurkan makanan ke anggota koloni lainnya.

Secara umum makanan rayap adalah semua bahan yang mengandung selulosa. Bignel dan Eggleton (2000), membagi rayap menjadi beberapa kelompok berdasarkan jenis makanannya. Pertama, rayap pemakan tanah (*soil feeder*) yang mendapatkan makanan dari material tanah. Material yang dicerna sangat heterogen, mengandung banyak bahan organik tanah dan silika. Rayap jenis ini ditemukan pada *Apicotermitinae*, *Termitinae*, *Nasutitermitinae*, dan *indotermitinae*.

Kedua, rayap pemakan kayu (*wood feeder*) yang mendapatkan makanan dengan memakan kayu dan sampah berkayu termasuk cabang ranting yang sudah mati dan masih menempel dibatang pohon. Hampir semua rayap tingkat rendah adalah pemakan kayu, semua subfamily dari *termitinae* kecuali *Apitermitinae*, dan *Nasutitermitinae*.

3.3.2 Sistem Pencernaan dalam Tubuh Rayap

Rayap merupakan salah satu kelompok serangga dengan jumlah keragaman yang besar. Saluran pencernaan rayap terdiri atas usus depan, usus tengah, dan usus belakang. Saluran pencernaan ini menempati sebagian besar dari abdomen.

Penelitian lain mengatakan protozoa yang menghuni usus rayap tidaklah bekerja sendirian tetapi melakukan simbiosis mutualisme dengan sekelompok bakteri yang tertata dengan baik sehingga bentuknya mirip seperti flagella memberikan motilitas pada protozoa umumnya. Biomassa protozoa flagelata ini meliputi sekitar sepertujuh sampai dengan sepertiga berat rayap. Protozoa ini mempunyai peranan penting dalam metabolisme selulosa dan berfungsi menguraikan selulosa dalam proses pencernaan makanannya menghasilkan asetat sebagai sumber energi bagi rayap.

Hasil penelitian Belitz dan Waller, 1998, menunjukkan bahwa defaunasi protozoa dalam usus belakang rayap menggunakan oksigen murni menyebabkan kematian rayap sekitar 2 minggu walaupun diberi kertas saring mengandung selulosa. Namun rayap ini akan hidup lebih lama dengan makanan yang sama dengan adanya kehadiran protozoa.

3.4 Ragi Tape

3.4.1 Pengenalan Ragi Tape

Ragi adalah salah satu organisme hidup yang membutuhkan oksigen dan tidak membutuhkan oksigen untuk menghasilkan energi. *Saccharomyces* adalah genus dalam kerajaan jamur yang mencakup banyak jenis ragi. Dari

bahasa latin *Saccharomyces* berarti gula jamur. Koloni dari *Saccharomyces cerevisiae* tumbuh pesat dalam tempo 3 hari. Ketidak mampunya untuk memanfaatkan nitrat dan kemampuan memfermentasikan karbohidrat adalah karakteristik khas dari *Saccharomyces cerevisiae*. *Saccharomyces cerevisiae* adalah jamur bersel satu yang telah memahat milestones dalam kehidupan dunia. *Saccharomyces cerevisiae* yang penting dalam pembuatan roti memiliki sifat dapat memfermentasikan maltosa secara cepat, memperbaiki sifat osmotolerance, rapid fermentation kinetics, freeze dan thaw tolerance, dan memiliki kemampuan memetabolisme substansi.

Jenis khamir yang paling banyak digunakan adalah *saccharomyces cerevisiae* secara komersial khamir roti telah diproduksi pada tahun 1846 dengan ditemukan proses “wina” oleh Mautner menggunakan bahan dasar malt dan jagung. Biakan *Saccharomyces cerevisiae* khusus digunakan dalam pembuatan khamir roti dan fermentasi alkohol. *Saccharomyces cerevisiae* ini bersifat fermentatif kuat. Tetapi dengan adanya oksigen, *Saccharomyces cerevisiae* ini juga melakukan respirasi yaitu mengoksidasi gula menjadi karbondioksida dan air (Srikandi fardiaz, 1992).

Adapun sifat-sifat dari *Saccharomyces cerevisiae* antara lain; berbentuk bulat, tidak berflagella, tidak mempunyai klorofil, dapat membentuk spora. Ragi ini memerlukan bahan makanan dan keadaan lingkungan tertentu untuk pertumbuhannya dan perkembang biakannya. Unsur-unsur yang diperlukan seperti; karbon, hidrogen, oksigen, fosfor, kalium, nitrogen, belerang, kalsium, besi, dan magnesium (Bahri, 1992).

3.4.2 Mikroorganisme Ragi

Mikroorganisme yang terdapat didalam ragi tape adalah kapang *Amylomyces rouxii*, *Mucor sp*, dan *Rhizopus sp*. Khamir *Saccharomycopsis fibuligera*, *Saccharomycopsis malanga*, *Pichia burtonii*, *Saccharomyces cerevisiae*, dan *Candida Utilis* serta bakteri *Pediococcus sp*, dan *Bacillus sp*. Kedua kelompok mikroorganisme tersebut bekerja sama dalam menghasilkan tape.

Mikroorganisme dari kelompok kapang akan menghasilkan enzim-enzim amilolitik yang akan memecahkan amilum pada bahan dasar menjadi gula-gula yang lebih sederhana (disakarida dan monosakarida). Proses tersebut sering dinamakan sakarifikasi. Kemudian khamir tersebut akan merubah sebagian gula menjadi alkohol.

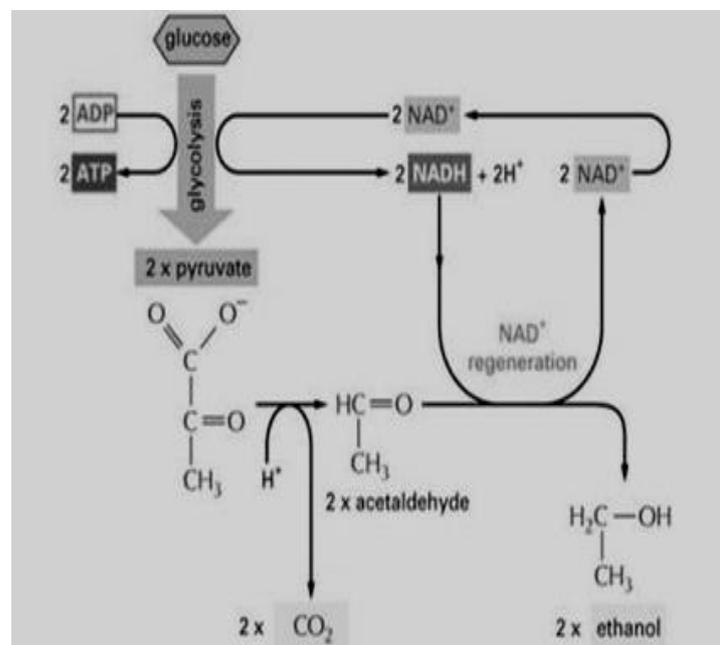
Strain *Saccharomyces cerevisiae* dapat tumbuh secara aerobik pada glukosa, maltosa, dan trehalosa dan lambat tumbuh pada laktosa dan selobiosa hal ini menunjukkan bahwa galaktosa dan fruktosa adalah dua dari gula fermentasi terbaik. Semua strain *Saccharomyces cerevisiae* dapat memanfaatkan amonia dan urea sebagai salah satunya sumber nitrogen, tetapi tidak dapat memanfaatkan nitrat, karna mereka tidak toleran terhadap ion ammonium.

Saccharomyces cerevisiae juga dapat memanfaatkan sebagian besar asam amino, peptida rantai pendek, dan basa nitrogen sebagai sumber nitrogen. Histidin, glisin, sistin, dan lisin merupakan asam amino yang tidak

mereka butuhkan. *Saccharomyces cerevisiae* tidak mengeluarkan protease sehingga perotein ekstraseluler tidak dapat dimetabolisme.

3.5 Pereaksi Jones

Oksidasi alkohol menggunakan kalium permanganat dalam suasana asam, pereaksi jones (kromat) yang akan mengoksidasi alkohol primer menjadi asam karboksilat dan alkohol sekunder menjadi suatu keton



Gambar 3. reaksi jones uji alkohol
(Hermiati, 2010)

Oksidator umum ialah larutan panas kalium permanganat dan ion hidroksida dengan larutan panas inon dikromat dengan asam sulfat yang disebut dengan pereaksi jonnes.

3.6 Proses Hidrolisis

Proses hidrolisis ialah suatu proses yang meliputi pemecahan polisakarida didalam biomassa lignoselulosa, dimana selulosa dan hemiselulosa akan menjadi monomer gula penyusunnya (glukosa dan xilosa). Hidrolisis sering disebut juga proses sakarifikasi. Pada tahap sakarifikasi, selulosa diubah menjadi selobiosa dan selanjutnya menjadi gula-gula seperti glukosa (Hermiati, 2010).

Hidrolisis selulosa dapat dilakukan secara kimia maupun enzimatik yang bersumber dari makhluk hidup seperti rayap (*Cryptotermes spp*) dan jamur (*Aspergillus niger*) (Safaria, 2013). Proses hidrolisis kimia umumnya digunakan pada industri etanol adalah hidrolisis dengan asam (*acid hydrolysis*) dengan menggunakan larutan asam sulfat dan asam klorida. Metode hidrolisis asam ini kurang ramah lingkungan dan biaya cukup mahal dikarenakan penggunaan dari larutan asam yang juga dapat menimbulkan korosif.

Proses hidrolisis pati dengan asam pertama kali ditemukan oleh Kirchoff pada tahun 1812. Pada proses hidrolisis sejumlah pati diasamkan sekitar pH 2 dipanasi dengan uap didalam suatu tangki bertekanan yang disebut konverter sampai suhu 120-140⁰C. Derajat konversi yang diperoleh bergantung pada konsentrasi larutan asam, waktu konversi, suhu dan tekanan selama reaksi. Karena hasil hidrolisis pati menjadi gula pereduksi tersebut dapat dijadikan alat pengontrol kualitas. Hidrolisis yang sempurna ialah jika seluruh

pati terhidrolisis seluruhnya dan terkonversi menjadi dekstrosa. Dekstrosa ekuivalen dari larutan sampel diberi indeks 100, dan pati yang sama sekali belum terhidrolisis memiliki dekstrosa ekuivalen 0 (Yusrin, 2004).

Proses hidrolisis enzimatis merupakan proses penguraian suatu polimer yang kompleks menjadi monomer penyusunnya dengan menggunakan enzim (Perez *et al.*, 2002). Enzim memiliki kemampuan mengaktifkan senyawa lain secara spesifik dan dapat meningkatkan kecepatan reaksi kimia.

Menurut Ikram (2005), Hidrolisis enzimatis yang sempurna memerlukan aksi sinergis dari tiga tipe enzim sebagai berikut: Endo-1,4- β -D-glucanase (endoselulase, karboksimetil selulase atau CMCase) yang mengurai polimer selulosa secara random pada ikatan internal α -1,4-glikosida untuk menghasilkan oligodekstrin dengan panjang rantai yang bervariasi, Exo-1,4- β -D-glucanase (sellobiohidrolase), yang mengurai selulosa dari ujung pereduksi dan non pereduksi untuk menghasilkan selulosa dan glukosa, β -glucosidase (sellobiase), yang mengurai selobiosa untuk menghasilkan glukosa. Selulase merupakan salah satu enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme.

Enzim selulase memegang peran penting dalam proses biokonversi limbah-limbah organik berselulosa menjadi glukosa, protein, sel tunggal, makanan ternak, etanol, dan lain-lain (Chalal, 1983).

Enzim selulase dapat diperoleh dari berbagai sumber diantaranya tanaman, serangga, dan mikroorganisme (rayap, cacing, dan jamur).

Mikroorganisme penghasil selulase secara ekstraseluler tersebar pada jamur dan bakteri (Amstrup, 1979). Enzim yang digunakan untuk menghidrolisis selulosa dari daun nangka kering yaitu enzim selulase. Enzim selulase diperoleh dari cairan dalam perut rayap. Cairan perut rayap mengandung enzim selulase yang berperan aktif untuk mempercepat konversi selobiosa menjadi glukosa dengan cara mengisolasi cairan perut rayap dan menambahkan cairan tersebut ke dalam bahan yang ingin difermentasi.

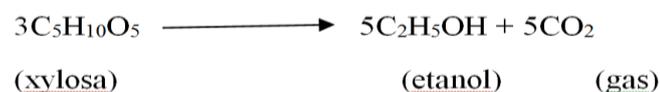
Hidrolisis enzimatis memiliki beberapa keuntungan dibandingkan hidrolisis asam antara lain; tidak terjadi degradasi gula hasil hidrolisis, kondisi proses yang lebih lunak (suhu rendah, pH netral), berpotensi memberikan hasil yang tinggi, dan biaya pemeliharaan peralatan yang relatif rendah karena tidak ada bahan yang korosif (Taherzadeh dan Karimi, 2008). Selain itu sakarifikasi menggunakan asam bersifat tidak spesifik, dan dapat menghasilkan produk samping selain gula seperti furan, fenolik, dan asam asetat (Hermiarti, 2010).

Harga enzim saat ini lebih mahal daripada asam sulfat, namun demikian pengembangan terus dilakukan untuk menurunkan biaya dan meningkatkan efisiensi hidrolisis maupun fermentai (Sanchez *and* Cardona, 2007).

3.7 Fermentasi

Fermentasi adalah penguraian suatu senyawa gula dalam keadaan anaerob untuk menghasilkan produk bioetanol. Istilah fermentasi klasik yaitu upaya penguraian senyawa-senyawa organik kompleks dengan bantuan mikroorganisme pada kondisi anaerob untuk menghasilkan suatu produk. Sedangkan fermentasi modern upaya perubahan substrat dengan bantuan mikroorganisme dalam kondisi terkontrol sehingga menghasilkan bahan yang lebih berguna (Pujaningsih, 2005).

Fermentasi akan merubah satu molekul glukosa menjadi dua etanol dan dua karbondioksida. Larutan fermentasi hanya membentuk larutan etanol encer, karena sel-sel *yeast* akan mati pada kadar etanol yang pekat. Untuk mendapatkan kadar etanol tinggi, larutan yang mengandung glukosa harus didestilasi (Fessenden, 1990). Adapun proses reaksi kimia yang berlangsung selama proses fermentasi adalah sebagai berikut:



Gambar 4. Persamaan reaksi kimia fermentasi

(Makara, 2007)

Untuk menghasilkan hasil fermentasi yang maksimal perlu ada variasi perlakuan yang sesuai. Perlakuan yang dapat digunakan sebagai variasi saat melakukan fermentasi antara lain kondisi derajat keasaman (pH) yang berlainan dan penambahan asam dengan konsentrasi rendah serta

menggunakan sampel yang sudah diberi perlakuan, dan variasi lama waktu fermentasi. Derajat keasaman optimum untuk proses fermentasi adalah antara 4-5. Kondisi pH pada proses fermentasi biasanya dikontrol dengan menambahkan garam sulfat (*Na-sulfate buffer*). Variasi waktu mempengaruhi kualitas etanol yang dihasilkan. Konsentrasi etanol yang dihasilkan cenderung konstan pada waktu inkubasi 6 jam. Hal ini berarti menunjukkan bahwa waktu kinerja *yeast* dan enzim optimum ialah lebih dari 6 jam, dan akan menurun pada waktu 48 jam.

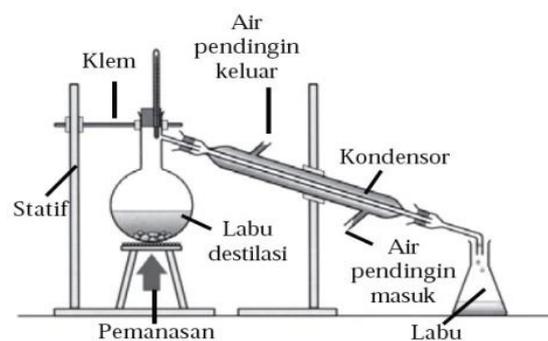
Fermentasi pertumbuhan mikroba dan pembentukan produk bergantung dari permukaan pada substrat padat. Substrat tradisional yang dapat digunakan dalam fermentasi berupa hasil produk agrikultur seperti beras, tepung maizena, tebu, dan lain-lain. Substrat tersebut mendukung organisme miselium untuk tumbuh pada konsentrasi nutrisi yang tinggi, dan menghasilkan berbagai macam enzim ekstraseluler seperti sejumlah filament jamur dan beberapa bakteri (*Actinomycetes* dan satu strain dari *Bacillus*) (Pandey *et al.*, 2008). Enzim merupakan protein yang bersifat katalis, sehingga sering disebut biokatalis. Enzim memiliki kemampuan mengaktifkan senyawa lain secara spesifik dan dapat meningkatkan kecepatan reaksi kimia yang akan berlangsung lama apabila tidak menggunakan enzim. Fermentasi yang melibatkan enzim selulase dan *yeast Saccharomyces cerevisiae* adalah fermentasi fase padat atau sering disebut *Simultaneous Saccharification Fermentation* (SSF).

Fermentasi fase padat pertama kali dikenalkan oleh Takagi *et al.*, (1977), yang telah berhasil mengkombinasikan enzim selulase dan *yeast Saccharomyces cerevisiae* untuk fermentasi gula menjadi etanol. Fermentasi fase padat dapat didefinisikan sebagai proses fermentasi yang melibatkan zat padat dalam suatu fasa cair (Moo-Young *et al.*, 1983). Fermentasi fasa padat memiliki beberapa keuntungan, antara lain biaya lebih murah, media produksi dapat menggunakan residu agroindustry, menggunakan sedikit air, limbah yang dihasilkan sedikit, proses sederhana, menggunakan wadah dalam jumlah kecil tetapi menghasilkan produk tinggi.

3.8 Destilasi

Destilasi sering disebut juga pemurnian larutan yang ingin diperoleh dengan cara memanaskan sesuai titik didih larutan. Zat yang memiliki titik didih rendah akan cepat terdestilasi daripada zat yang bertitik didih tinggi. Uap zat yang bersifat volatil dan memiliki titik didih yang rendah akan masuk kedalam pipa kondensor (terjadi proses pendinginan) sehingga akan turun berupa tetesan-tetesan yang turun kedalam penampung atau disebut juga destilat. Menurut Nurdyastuti (2006), untuk meningkatkan kemurnian bioetanol hasil fermentasi, maka harus melalui proses destilasi. Prinsip kerja destilasi adalah dengan mempertimbangkan titikdidih larutan dengan pelarut. Titik didih etanol murni adalah 78°C sedangkan air adalah 100°C (kondisi standar). Pemanasan larutan pada suhu $78-100^{\circ}\text{C}$ akan mengakibatkan sebagian besar etanol, menguap dan melalui unit kondensasi akan bias menghasilkan etanol dengan, konsentrasi tinggi.

Prinsip pemisahan campuran yang melewati dua fase, yakni gas menjadi fase cair dinamakan dengan proses destilasi. Perbedaan titik didih dan tekanan uap membuat kedua campuran berpisah. Semakin tinggi tekanan uap maka titik didih cairan tersebut semakin tinggi. Penguapan dipengaruhi oleh titik cairan etanol dan air. Cairan yang memiliki titik rendah (etanol) akan lebih cepat untuk mendidih dibandingkan dengan air.



Gambar 5. Alat destilasi

(Basic Concept of Chemistry, 2002)

Labu destilat berisi larutan hasil fermentasi bioetanol akan dipanaskan pada suhu konstan 75°C . Larutan hasil fermentasi akan menguap sesuai titik didih masing-masing larutan. Etanol akan menguap terlebih dahulu dan akan terembunkan oleh kondensor. Hasil etanol yang dihasilkan akan ditampung ke dalam gelas ukur. Larutan hasil fermentasi sebelumnya harus melalui proses penyaringan dengan penyaring vakum agar etanol yang dihasilkan memiliki kemurnian yang tinggi dengan minim pengotor.

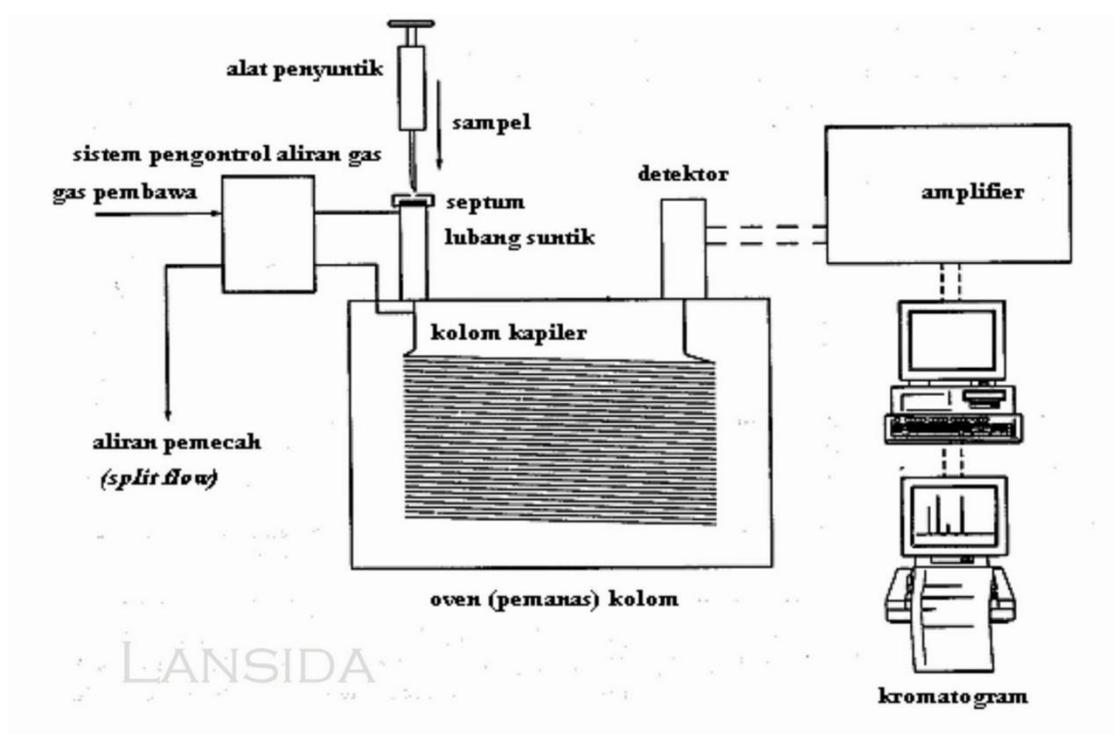
3.9 Analisis Etanol dengan Kromatografi Gas

Kromatografi gas adalah teknik kromatografi yang bisa digunakan untuk memisahkan senyawa organik yang mudah menguap. Senyawa-senyawa organik harus mudah menguap seperti etanol dan stabil pada temperatur pengujian, utamanya dari 50°C-300°C, jika senyawa tidak mudah menguap atau tidak stabil pada temperatur pengujian, maka senyawa tersebut dapat diderivatisasi agar dapat dianalisis dengan kromatografi gas (Mardoni, 2005).

Prinsip kerja dan metode kromatografi gas adalah dengan menyuntikkan sampel ke dalam ujung kolom kromatografi gas, lalu sampel tersebut akan menguap dan melulusi oleh gas inert yang digunakan sebagai fase gerak. Penyiapan instrumen kromatografi gas didahului dengan mengaplikasikan beberapa tombol yang ada pada instrumen. Menekan tombol *on* pada saklar listrik. Mengatur optimasi alat dan didiamkan selama 1 jam. Gas pembawa nitrogen, hidrogen, dan oksigen akan terbawa bersama larutan akibat adanya tekanan. Pengukuran kromatografi gas ada dua cara yaitu pengukuran terhadap standar dan terhadap sampel.

Pengukuran terhadap larutan standar bisa menggunakan larutan standar etanol sebanyak 0.5 mikroliter yang terinjeksikan ke dalam kromatografi gas lalu menunggu hasilnya dari larutan standar etanol. Pengukuran selanjutnya ialah larutan sampel yang teranalisis mengandung etanol dengan cara yang sama seperti mengukur larutan standar etanol.

Kromatografi gas memiliki fase gerak berupa gas mulia seperti; helium, nitrogen, argon, dan hidrogen yang dapat bergerak karena adanya tekanan dari pipa yang berisi fase diam. Tekanan uap memungkinkan komponen akan menguap bersama fase gerak yang berupa gas. Komponen campuran dapat teridentifikasi dengan menggunakan waktuambat (waktu retensi) yang khas pada kondisi yang tepat. Waktuambat ialah waktu yang menunjukkan berapa lama suatu senyawa tertahan dalam kolom (Gritter, 1991).



Gambar 6. Skema kerja alat kromatografi gas
(*Basic Concept of Chemistry*, 2002)

Skema kerja kromatografi gas adalah gas pembawa lewat melalui satu sisi detektor kemudian memasuki kolom. Dalam kolom terdapat suatu alat yang mana larutan sampel yang mengandung alkohol dapat dimasukkan ke dalam gas pembawa yang sering disebut tempat injeksi.

Sampel yang mengandung alkohol yang berupa cairan tidak bewarna dan volatil akan dipanaskan melalui lubang injeksi yang menyebabkan alkohol akan menguap dengan cepat. Aliran gas selanjutnya menemui kolom, kolom berisi suatu padatan halus (tembaga, baja tahan karat, nikel, gelas atau plastik) dengan luas permukaan yang besar dan relatif inert. Sebelum diisi ke dalam kolom, padatan diimpregnasi dengan cairan yang diinginkan berperan sebagai fasa diam atau stationer sesungguhnya, cairan ini harus stabil dan nonvolatil pada temperatur kolom harus sesuai dengan pemisahan tertentu. Aliran gas lewat melalui sisi lain detektor. Maka elusi zat terlarut (larutan sampel yang mengandung alkohol) dari kolom mengatur ketidakseimbangan antara dua sisi detektor yang terekam secara elektrik. Rekorder berfungsi sebagai pengubah sinyal dari detektor yang diperkuat melalui elektrometer menjadi bentuk kromatogram. Kromatogram dihasilkan dari perhitungan kuantitatif dengan menghitung luas area maupun tinggi kromatogram. Hasil rekorder berupa pik-pik dengan pola yang sesuai dengan kondisi sampel alkohol dan jenis detektor yang digunakan.

3.10 Pengukuran Berat Jenis

Pengukuran bobot jenis dan rapat jenis dapat digunakan metode piknometer. Prinsip metode ini didasarkan atas penentuan massa cairan dan penentuan ruang, yang ditempati cairan ini. Penentuan bobot jenis digunakan untuk mengetahui kemurnian dari suatu sediaan khususnya larutan. Bobot jenis menyatakan perbandingan antara massa (gram) dengan volume (mL), jadi satuan bobot jenis adalah g/mL.

Larutan etanol yang dihasilkan dari proses destilasi selanjutnya dapat dianalisa kadarnya menggunakan prinsip pengukuran massa jenis. Metode yang digunakan ialah metode berat jenis (piknometer). Berat jenis untuk penggunaan praktis lebih sering didefinisikan sebagai perbandingan massa dengan suatu zat terhadap massa sejumlah volume air yang sama pada suhu 4°C atau temperatur lain yang tertentu. Notasi berikut sering ditemukan dalam pembacaan berat jenis; 25°C/25°C, 25°C/4°C, dan 4°C/4°C. Angka yang pertama menunjukkan temperatur udara saat zat ditimbang, angka berikutnya menunjukkan temperatur air yang digunakan (Mardoni, 2007).

Berat jenis dapat dirumuskan dengan lambang (ρ) merupakan hasil perbandingan antara massa dengan volume piknometer (mL). Berat jenis dihitung dengan rumus :

$$\rho = \frac{m}{v}$$

Keterangan :

ρ : Berat jenis larutan standar etanol (g/mL)

m: Massa (g)

v: Volume piknometer (mL)

Berat jenis suatu zat adalah perbandingan antara bobot zat disbanding dengan volume zat pada suhu tertentu (biasanya pada suhu 25°C), sedangkan rapat jenis adalah perbandingan antara bobot zat pada suhu tertentu (dalam bidang farmasi biasanya digunakan 25°C/25°C). Pengukuran berat jenis dilakukan dengan mengisi larutan uji kedalam piknometer hingga penuh

tanpa adanya gelembung udara. Adanya gelembung udara dalam piknometer akan mengurangi bobot sampel larutan uji yang diperoleh.