

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### A. Bahan Baku Bioetanol

Bioetanol adalah etanol yang diproduksi dari bahan baku nabati. Bioetanol merupakan cairan hasil proses fermentasi gula dari sumber karbohidrat dengan menggunakan bantuan mikroorganisme (Dahlan, dkk., 2009). Bioetanol telah dikenal sejak lama, dan dewasa ini senyawa ini menarik perhatian yang sangat besar karena selain manfaat tradisionalnya, senyawa ini juga merupakan bahan bakar alternatif dan terbarukan. Sebagai bahan bakar, bioetanol dapat digunakan langsung atau dicampur dengan bahan bakar lain, terutama *gasoline*, dan campurannya dikenal sebagai gasohol. Selain cara pemanfaatan di atas, bioetanol juga memiliki sejumlah keunggulan dibanding bahan bakar fosil. Bioetanol termasuk bahan bakar ramah lingkungan karena gas CO<sub>2</sub> yang dihasilkan dari pembakarannya jauh lebih kecil dibanding CO<sub>2</sub> yang dihasilkan dari pembakaran bahan bakar fosil. Dari sisi bahan bakar, bioetanol memiliki kemiripan dengan bensin, sehingga penggunaannya tidak memerlukan modifikasi mesin. Di samping itu, bioetanol mempunyai beberapa kelebihan dibanding dengan bahan bakar fosil berbasis minyak bumi. Bioetanol mudah terbakar dan memiliki kalor pembakaran netto yang besar, yaitu sekitar 2/3 dari kalor pembakaran netto bensin. Pada suhu 25 °C dan tekanan 1 bar, pembakaran bioetanol menghasilkan

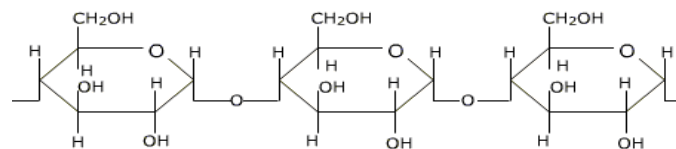
energi sebesar 21,03 MJ/liter sedangkan bensin menghasilkan 30 MJ/liter (Elander, 1996). Bioetanol murni juga dapat larut sempurna dalam bensin dalam segala perbandingan. Bioetanol juga memiliki keunggulan dari sudut pandang lingkungan, yakni jumlah gas CO<sub>2</sub> hasil pembakarannya yang jauh lebih sedikit dibanding dengan bahan bakar fosil, sehingga bahan bakar alternatif ini dikenal juga sebagai bahan bakar ramah lingkungan (Giancoli, 1998). Keuntungan lain dari bioetanol adalah bersifat terbarukan, artinya dapat dihasilkan dari bahan baku atau sumber yang dapat dibudidayakan, misalnya ubi kayu (Collares *et al.*, 2012), jagung (Nicolíć *et al.*, 2010), gandum (Perez *et al.*, 2007), dan sorgum (Herrera *et al.*, 2003). Faktor lain yang sangat mendukung produksi bioetanol adalah perkembangan teknologi yang telah memungkinkan bioetanol dapat diproduksi dari karbohidrat yang bukan merupakan bahan pangan utama. Pada dasarnya bahan baku yang digunakan untuk produksi bioetanol adalah bahan baku yang mengandung pati. Di Indonesia, industri bioetanol berbahan baku pati memiliki potensi yang sangat besar karena didukung oleh ketersediaan bahan baku yang melimpah.

## **1. Pati**

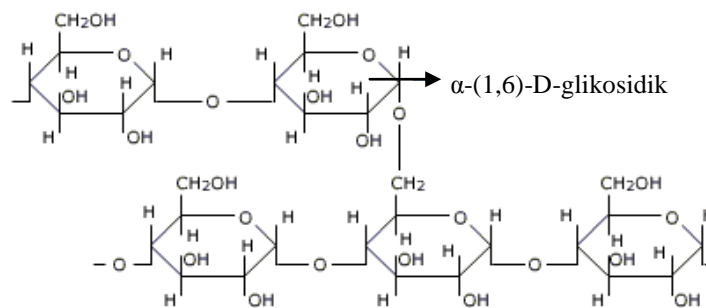
Pati merupakan salah satu jenis polisakarida terpenting dan tersebar luas di alam. Pati disimpan sebagai cadangan makanan bagi tumbuh-tumbuhan antara lain di dalam biji buah (padi, jagung, gandum, jemawut, sorghum), di dalam umbi (ubi kayu, ubi jalar, talas, ganyong, kentang) dan pada batang (aren dan sagu). Bentuk pati digunakan untuk menyimpan glukosa dalam proses metabolisme. Berat

molekul pati bervariasi tergantung pada kelarutan dan sumber patinya (Hart dan Schmetz, 1972).

Berdasarkan struktur kimianya, pati dapat digolongkan menjadi dua jenis, yakni amilosa, dengan ciri utama memiliki rantai lurus, dan amilopektin, dengan ciri utama memiliki struktur bercabang, seperti ditunjukkan dalam Gambar 1. Seperti terlihat dalam Gambar 1, kedua jenis pati memiliki ikatan  $\alpha$ -(1,4)-D-glikosidik, namun pada amilopektin terdapat percabangan pada posisi  $\alpha$ -(1,6)-D-glikosidik.



(a)



(b)

**Gambar 1.** Struktur pati (a) amilosa (b) amilopektin

Pati alami biasanya mengandung amilopektin lebih banyak daripada amilosa. Butiran pati mengandung amilosa berkisar antara 15-30%, sedangkan amilopektin berkisar antara 70-85%. Perbandingan antara amilosa dan amilopektin akan berpengaruh terhadap sifat kelarutan dan derajat gelatinisasi pati (Jane dan Chen, 1992). Adanya perbedaan struktur mengakibatkan perbedaan kelarutan pati dalam

air. Amilosa dapat larut dalam air, sedangkan amilopektin tidak dapat larut dalam air (Aiyer, 2005), sehingga amilosa lebih mudah dihidrolisis daripada amilopektin.

Salah satu metode yang digunakan untuk menentukan kadar pati adalah dengan metode spektroskopi UV-Vis. Pati tidak larut dalam air dan dalam analisis pati, memberikan warna biru dengan iodium ( $I_3$ ). Reaksi pati dengan iodium ( $I_3$ ) akan terbentuk kompleks pati dan iodium kompleks, semakin tinggi kadar pati, maka kompleks iodium yang tersisa semakin menurun. Berdasarkan prinsip tersebut penentuan kadar pati didasarkan pada sisa iodium ( $I_3$ ) yang berlebih menggunakan metode spektroskopi UV-Vis (Ghazali, 2012).

## **2. Talas Taro**

Selain tanaman yang sudah umum digunakan sebagai sumber pati untuk industri bioetanol, di Indonesia sebenarnya terdapat tanaman lain yang sangat berpotensi karena memiliki kandungan pati yang cukup tinggi, yakni talas. Talas merupakan tanaman sekulen yaitu tanaman yang umbinya banyak mengandung air (Rukmana, 1998). Sifat fisik dari tanaman talas adalah talas banyak mengandung asam perusai (asam biru atau HCN), sistem perakaran serabut, liar dan pendek, umbi dapat mencapai 4 kg atau lebih, berbentuk silinder atau bulat, berukuran 30 cm x 15 cm, berwarna coklat, daunnya berbentuk perisai atau hati, lembaran daunnya 20-50 cm panjangnya, dengan tangkai mencapai 1 meter panjangnya, warna pelepah bermacam-macam. talas mengandung banyak senyawa kimia yang

dihasilkan dari metabolisme sekunder seperti alkaloid, glikosida, saponin, minyak essensial, resin, gula dan asam-asam organik. Keuntungan dari umbi talas adalah kemudahan patinya untuk dicerna. Umbi talas mengandung pati yang mudah dicerna kira-kira sebanyak 18,2%, sukrosa serta gula preduksinya 1,42% dan karbohidrat sebesar 23,7%. Kadar karbohidrat dari talas menunjukkan potensinya sebagai bahan baku bioetanol. Keuntungan lain adalah talas tidak mengandung selulosa maupun lignin, sehingga secara prinsip akan lebih mudah dihidrolisis menghasilkan gula reduksi.

Berbagai macam tanaman talas mudah ditemukan di Indonesia seperti, talas sutrera, talas taro, talas bogor, talas semir, talas ketan hitam, talas timpul, talas balitung, talas sente dan talas banten. Pada penelitian ini jenis talas yang digunakan sebagai bahan baku bioetano adalah talas taro. Talas taro atau *Colocasi esculenta* merupakan salah satu jenis talas yang mudah dijumpai dan merupakan salah satu tanaman monokotil dari famili *Araceae*, dengan data taksonomi sebagai berikut:

Kingdom : Plantae  
Divisi : Spermatophyta  
Class : Monocotyledoneae  
Ordo : Arecales  
Famili : *Araceae*  
Genus : *Colocasia esculenta*

Talas taro seringkali dibudidayakan pada daerah tropis dengan curah hujan cukup (175-250 mm/tahun) serta tanah yang subur di daerah lembab dengan temperatur sekitar 21-27<sup>0</sup>C. Tanaman ini dapat hidup pada dataran rendah sampai ketinggian 2700 m di atas permukaan laut namun tidak tahan terhadap temperatur sangat rendah.



**Gambar 2.** Tanaman talas taro

Sebagai tanaman pangan, bagian tanaman yang paling banyak dimanfaatkan adalah umbi, meskipun daun dan tangkai daunnya dapat digunakan sebagai sayuran. Umbi tersebut terdiri dari umbi primer dan umbi sekunder. Kedua umbi tersebut berada di bawah permukaan tanah. Hal yang membedakannya adalah umbi primer merupakan umbi induk yang memiliki bentuk silinder dengan panjang 30 cm dan diameter 15 cm, sedangkan umbi sekunder merupakan umbi yang tumbuh di sekeliling umbi primer dengan ukuran yang lebih kecil. Umbi sekunder ini digunakan oleh talas untuk melakukan perkembangbiakannya secara vegetatif (Lingga *et al.*, 1986).



**Gambar 3.** Umbi talas taro

## **B. Pengolahan Bioetanol**

### **1. Hidrolisis Pati**

Hidrolisis adalah proses dekomposisi kimia dengan menggunakan air untuk memisahkan ikatan kimia dari substansinya. Hidrolisis merupakan tahap awal dalam proses pembuatan bioetanol. Hidrolisis pati merupakan proses pemecahan molekul amilum menjadi bagian-bagian penyusunnya yang lebih sederhana seperti dekstrin, isomaltosa, maltosa dan glukosa (Purba, 2009). Proses hidrolisis pati menjadi glukosa dapat menggunakan katalis enzim, asam atau gabungan keduanya. Hidrolisis secara enzimatik memiliki perbedaan mendasar dengan hidrolisis secara asam. Hidrolisis secara asam memutus rantai pati secara acak, sedangkan hidrolisis secara enzimatik memutus rantai pati secara spesifik pada percabangan tertentu. Secara garis besar, tahap hidrolisis pati adalah gelatinisasi, liquifikasi dan sakarifikasi. Hidrolisis dibagi menjadi dua macam, yaitu hidrolisis asam dan hidrolisis enzim. Menurut Purba (2009) proses hidrolisis enzimatik dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu: jenis enzim, ukuran partikel, suhu, pH, waktu hidrolisis, perbandingan cairan terhadap bahan baku (volume substrat), dan

pengadukan. Enzim yang dapat digunakan adalah  $\alpha$ -amilase,  $\beta$ -amilase, amiloglukosidase, glukosa isomerase, dan isoamilase. Enzim yang biasa digunakan untuk proses pembuatan sirup glukosa secara sinergis adalah enzim  $\alpha$ -amylase dan enzim glukoamilase. Enzim  $\alpha$ -amilase akan memotong ikatan amilosa dengan cepat pada pati kental yang telah mengalami gelatinisasi. Kemudian enzim glukoamilase akan menguraikan pati secara sempurna menjadi glukosa pada tahap sakarifikasi.

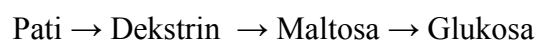
Dari beberapa penelitian ditemukan bahwa hidrolisis asam juga sangat bergantung pada suhu, pH, waktu, dan pengadukan. Anozie and Aderibigbe (2011) melakukan penelitian tentang hidrolisis pati dari tepung singkong menggunakan katalis asam klorida encer. Dalam penelitian tersebut dilakukan percobaan pada suhu yang berbeda, yakni 60, 70, dan 80 °C, selama 20, 40, dan 60 menit, dengan dibantu agitasi menggunakan pengaduk magnetik dengan kecepatan 200, 250, dan 300 rpm. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kondisi optimum hidrolisis adalah suhu 80 °C selama 60 menit dengan kecepatan 200 rpm, dan menghasilkan kadar gula reduksi sebesar 46,12 g/L atau setara dengan konversi pati sebesar 30,75%. Penelitian lain yang juga mempelajari kondisi optimum hidrolisis pati dilakukan oleh Barnali *et al.* (2008). Dalam penelitian tersebut, pati dari tepung gandum dihidrolisis menggunakan asam klorida encer selama 10 menit, dengan variasi suhu 75, 85, dan 95 °C, dan variasi pH 2; 3; 4; dan 5. Kondisi optimum dicapai pada suhu 95 °C dan pH 3, dengan konversi sebesar 42%. Selain dengan asam klorida, beberapa penelitian juga telah dilakukan menggunakan asam sulfat. Srinorakutara *et al.* (2006) melakukan percobaan hidrolisis pati dari limbah ubi kayu (onggok) menggunakan asam sulfat dengan konsentrasi 0,2–5,0 M pada



suhu 60, 100, 110, dan 120 °C selama 30 menit. Kondisi optimum dicapai pada suhu 120 °C dengan konsentrasi asam sulfat 0,6 M menghasilkan kadar gula reduksi sebesar 6,1% (w/v). Zamora *et al.* (2010) juga melakukan percobaan hidrolisis pati dari ubi kayu menggunakan asam sulfat 30% (w/w) pada suhu 98 °C, pH 0,8 selama 4,5 jam, dengan variasi konsentrasi pati sebesar 150, 170, dan 190 g/L, dan kecepatan agitasi 200, 400, dan 600 rpm. Hasil percobaan menunjukkan bahwa kondisi optimum diperoleh pada konsentrasi pati sebesar 190 g/L dan kecepatan agitasi 600 rpm, dengan konversi pati menjadi gula reduksi sebesar 90,5%.

Beberapa penelitian tentang proses hidrolisis pati menjadi glukosa telah banyak dilakukan. Pada proses hidrolisis pati secara enzimatik (Baskar, 2008; Chamsart *et al.*, 2006; Morales *et al.*, 2008; Wojciechowski *et al.*, 2002), proses hidrolisis pati secara asam (Putri dan Sukandar, 2008; Soeroso *et al.*, 2008; Yoonan dan Kongkiattikajorn, 2004), dan proses hidrolisis asam dan enzimatik (Yetti *et al.*, 2007)

Proses hidrolisis ini akan mengubah pati menjadi glukosa. Dalam prakteknya, hidrolisis pati menjadi gula reduksi baik menggunakan asam ataupun secara enzimatik, berlangsung secara bertahap, seperti disajikan dalam reaksi di bawah ini.



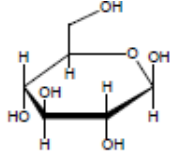
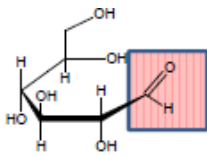
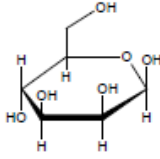
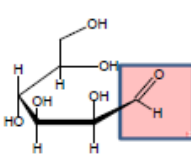
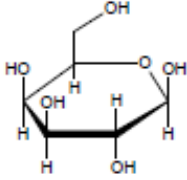
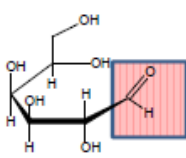
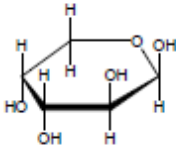
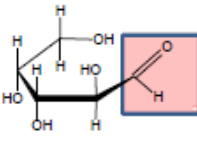
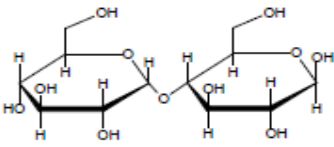
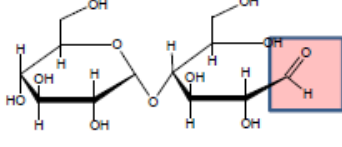
Dari kedua metode hidrolisis yang telah dijelaskan di atas, dapat disimpulkan bahwa hidrolisis enzimatik bekerja dengan cukup baik, namun metode ini memiliki beberapa kelemahan praktis, yaitu prosesnya lama, pengerjaannya harus

dalam kondisi yang steril, dan biaya yang relatif mahal. Oleh karena itu, hingga dewasa ini metode hidrolisis asam masih lebih banyak diterapkan baik dalam penelitian maupun industri, dibanding dengan hidrolisis enzimatik. Dengan demikian, maka dalam penelitian ini akan digunakan metode hidrolisis asam. Untuk meningkatkan rendemen gula reduksi dan bioetanol, dewasa ini telah banyak dikembangkan metode praperlakuan sebagai perlakuan awal terhadap bahan baku sebelum tahap hidrolisis dilakukan. Metode praperlakuan ini dimaksudkan untuk mengubah karakteristik bahan baku sehingga lebih mudah dihidrolisis. Salah satu metode praperlakuan yang umum digunakan adalah ultrasonikasi.

## **2. Gula Reduksi**

Gula reduksi adalah gula yang mempunyai kemampuan untuk mereduksi. Hal ini dikarenakan adanya gugus aldehid atau keton bebas (Lehninger, 1993), seperti ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1 Contoh Gula Reduksi

Contoh Gula Reduksi	Bentuk siklik	Bentuk cincin terbuka
Glukosa		
Mannosa		
Galaktosa		
Arabinosa		
Maltosa		

Monosakarida yang mengandung gugus aldehyd dapat mereduksi senyawa-senyawa pengoksidasi seperti, ferisianida, hidrogen peroksida dan ion kupro. Pada reaksi ini gula direduksi pada gugus karbonilnya oleh senyawa pengoksidasi. Aldosa mudah teroksidasi menjadi asam aldolat, sedangkan ketosa hanya dapat bereaksi dalam suasana basa (Fennema, 1996).

### 3. Analisis Gula Reduksi

Gula reduksi yang dihasilkan dari proses hidrolisis dianalisis dua cara, yaitu analisis secara kualitatif dan kuantitatif. Analisis gula reduksi secara kualitatif digunakan untuk mengidentifikasi apakah sampel mengandung gula reduksi atau tidak, sedangkan analisis gula reduksi secara kuantitatif digunakan untuk menentukan kadar gula reduksi. Adapun metode analisis gula reduksi secara kualitatif yang banyak digunakan adalah uji Benedict, uji Fehling, uji Barfoed, uji Tollens, dan uji Molisch (Mathews, 2000). Dalam penelitian ini, metode yang digunakan untuk analisis gula reduksi secara kualitatif adalah uji Fehling. Pada uji Fehling digunakan reagen Fehling yang merupakan oksidator lemah dan terdiri dari Fehling A dan Fehling B. Larutan Fehling A mengandung  $\text{CuSO}_4$ , sedangkan Fehling B mengandung campuran alkali  $\text{NaOH}$  dan  $\text{Na-K-tartrat}$ . Gula reduksi akan bereaksi dengan Fehling B membentuk enediol, kemudian enediol ini bereaksi dengan Fehling A membentuk ion  $\text{Cu}^{2+}$  dan campuran asam-asam. Selanjutnya ion  $\text{Cu}^{2+}$  dalam suasana basa akan mengendap menjadi endapan  $\text{Cu}_2\text{O}$  berwarna hijau, kuning-*orange*, atau merah bergantung dari jenis gula reduksinya. Mekanisme reaksi gula reduksi dan Fehling adalah sebagai berikut.

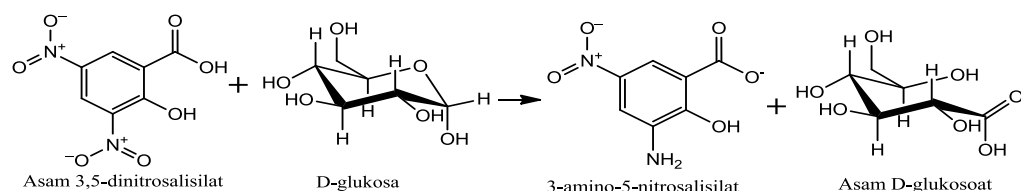


**Gambar 4.** Mekanisme reaksi gula reduksi dan Fehling

Analisis gula reduksi secara kuantitatif dapat dilakukan dengan berbagai cara, antara lain dengan metode Luff Schoorl (Kowalski *et al.*, 2013), Nelson-Somogyi (Woiciechowski *et al.*, 2002), dan DNS (Lone *et al.*, 2012). Metode DNS

merupakan metode yang paling banyak digunakan untuk menentukan kadar gula reduksi. Dalam penelitian ini metode yang digunakan adalah metode DNS. Dalam metode DNS digunakan reagen dinitro salisilat (DNS). Bahan-bahan kimia yang diperlukan untuk membuat reagen DNS adalah asam 3,5-dinitrosalisilat, NaOH, Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, Na-K-tartarat, fenol, dan akuades. DNS merupakan senyawa aromatis yang dapat bereaksi dengan gula reduksi membentuk asam 3-amino-5-nitrosalisilat, suatu senyawa yang mampu menyerap radiasi gelombang elektromagnetik pada panjang gelombang maksimum 550 nm (Kusmiati dan Agustini, 2010). Semakin tinggi kadar gula reduksi yang terdapat dalam sampel, maka akan semakin banyak pula molekul asam 3-amino-5-nitrosalisilat yang terbentuk, sehingga absorbansi sampel akan semakin tinggi. Reaksi antara gula reduksi dengan DNS merupakan reaksi redoks pada gugus aldehyd gula dan teroksidasi menjadi gugus karboksil. Sementara itu, DNS sebagai oksidator akan tereduksi membentuk asam 3-amino dan 5-nitrosalisilat. Reaksi ini berlangsung dalam suasana basa dan suhu tinggi sekitar 90-100 °C. Bila terdapat gula reduksi pada sampel, maka larutan DNS yang awalnya berwarna kuning akan bereaksi dengan gula reduksi sehingga menimbulkan warna jingga kemerahan (Kusmiati dan Agustini, 2010).

Reaksi antara DNS dengan glukosa adalah sebagai berikut.



**Gambar 5.** Reaksi antara DNS dengan glukosa

Sampel yang telah direaksikan dengan DNS selanjutnya ditentukan kadar gula reduksinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Spektrofotometer UV-Vis adalah alat untuk mengukur transmittansi atau absorbansi suatu sampel sebagai fungsi panjang gelombang. Alat ini menggunakan dua buah sumber cahaya yang berbeda, yaitu sumber cahaya UV menggunakan lampu Hidrogen atau Deuterium dan sumber cahaya tampak menggunakan lampu Tungsten. Larutan sampel yang akan dianalisis diukur absorbansi sinar ultra violet atau sinar tampaknya.

Konsentrasi larutan sampel yang dianalisis akan sebanding dengan jumlah sinar yang diserap oleh zat yang terdapat dalam larutan tersebut. Prinsip kerja spektrofotometer UV-Vis ini didasarkan pada Hukum Lambert-Beer yang menyatakan hubungan antara absorbansi cahaya dengan konsentrasi zat dalam larutan. Secara sistematis, Hukum Lambert-Beer dapat dinyatakan dengan persamaan berikut.

$$A = -\log T = \log \frac{I_0}{I_t} = \epsilon \cdot b \cdot c$$

Dimana:

A = absorbansi

T = transmitansi

$I_0$  = intensitas cahaya masuk

$I_t$  = intensitas cahaya yang diteruskan oleh larutan sampel

$\epsilon$  = absorbtivitas molar ( $L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )

b = ketebalan lapisan larutan sampel (panjang jalur absorpsi) (cm)

c = konsentrasi sampel ( $\text{mol L}^{-1}$ )

Agar dapat menentukan kadar gula reduksi pada sampel, terlebih dahulu dibuat kurva standar menggunakan larutan glukosa. Kurva standar dibuat dengan mengalurkan absorbansi pada panjang gelombang 510 nm dengan konsentrasi larutan standar (Kusmiati dan Agustini, 2010). Dari kurva standar tersebut akan

didapatkan persamaan garis, yang menunjukkan hubungan antara konsentrasi dan absorbansi dengan persamaan umum:

$$y = ax + b, \text{ dimana } y \text{ merupakan absorbansi, } a \text{ merupakan slope, } x$$

konsentrasi sampel, dan  $b$  intersep. Dengan mensubstitusi nilai absorbansi sampel ke persamaan tersebut dan kemudian diplotkan terhadap kurva standar, maka dapat diketahui konsentrasi atau kadar gula reduksi pada sampel.

#### 4. Fermentasi

Fermentasi alkohol merupakan proses pengubahan gula reduksi menjadi bioetanol dengan bantuan mikroorganisme seperti bakteri atau jamur. Reaksi pembentukan etanol secara umum dapat dituliskan sebagai berikut.



Dalam prakteknya, proses fermentasi dipengaruhi oleh berbagai faktor yang harus dikontrol agar proses berlangsung optimal, antara lain suhu, pH, oksigen, dan substrat (Subekti, 2006). Dalam proses fermentasi, suhu perlu dikontrol karena sangat mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme yang berperan dalam proses fermentasi. Secara umum suhu optimal untuk proses fermentasi adalah 30-40 °C (Subekti, 2006). Di samping suhu, pH juga merupakan variabel pertumbuhan mikroorganisme yang sangat penting, karena mikroorganisme hanya dapat tumbuh pada kisaran pH tertentu. Untuk *Saccharomyces cerevisiae*, pertumbuhan yang optimal berlangsung dalam media dengan pH 4,0-5,0.

Selanjutnya proses fermentasi ini terdiri atas 2 tahap (Fardiaz 1989), yaitu:

1. Pemecahan rantai karbon dari glukosa dan pelepasan paling sedikit 2 pasang atom hidrogen menghasilkan senyawa karbon lainnya yang lebih mudah teroksidasi dibandingkan glukosa.
2. Senyawa yang teroksidasi akan dieduksi oleh hidrogen yang terlepas pada tahap pertama dengan membentuk senyawa yang merupakan hasil fermentasi.

Bahan pangan yang difermentasi prosesnya dikontrol oleh aktivitas dari mikroorganisme yang digunakan untuk mengubah bahan pangan tersebut, mengawetkan bahan pangan dengan memproduksi asam atau alkohol, atau memproduksi aroma yang dapat meningkatkan kualitas bahan pangan tersebut (Fellows 2000). Seperti halnya makhluk hidup lain, mikroorganisme juga membutuhkan asupan nutrisi yang cukup sebagai sumber energi untuk pertumbuhannya. Dengan kata lain, mikroorganisme memerlukan substrat yang mengandung nutrisi sesuai dengan kebutuhan yang diperlukan untuk pertumbuhannya.

Dalam bidang bioetanol, ada beberapa jenis mikroorganisme yang umum digunakan, antara lain *Zymomonas mobilis* (Zhang and Feng, 2010), *Aspergillus niger* (Ado *et al.*, 2009), dan *Saccharomyces cerevisiae* (Hong *et al.*, 2013).

Dewasa ini, *Saccharomyces cerevisiae* merupakan jenis mikroorganisme yang paling banyak digunakan untuk fermentasi alkohol karena mampu menghasilkan etanol dengan rendemen yang lebih tinggi dibandingkan jenis mikroorganisme lainnya. Selain itu, mikroorganisme ini mudah ditumbuhkan, membutuhkan



nutrisi yang sederhana, laju pertumbuhan yang cepat, dan sangat stabil (Walker, 2011).

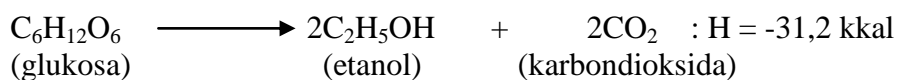
Khamir mampu mengkonsumsi berbagai substrat gula, tergantung spesies yang digunakan. Secara umum, mikroorganisme ini dapat tumbuh dan memfermentasi etanol secara efisien pada pH 3,5-6,0 dan suhu 28-35 °C. Walaupun laju awal produksi etanol meningkat pada suhu lebih tinggi, produktifitas keseluruhan menurun karena efek penghambatan etanol meningkat (Ratledge, 1991). Menurut Paturau (1969), fermentasi etanol memakan waktu 30-72 jam. Frazier dan Westhoff (1978) menambahkan bahwa suhu optimum untuk fermentasi antara 25-30 °C dan kadar gula antara 10-18 persen. Jika konsentrasi gula terlalu tinggi, aktivitas khamir dapat terhambat dan waktu fermentasi menjadi lebih lama serta tidak semua gula dapat difermentasi.

*Saccharomyces cerevisiae* adalah salah satu spesies khamir yang memiliki daya konversi gula menjadi etanol sangat tinggi. Mikroba ini biasanya dikenal dengan *baker's yeast* dan metabolismenya telah dipelajari dengan baik. Produk metabolik utama adalah etanol, CO<sub>2</sub> dan air, sedangkan beberapa produk lain dihasilkan dalam jumlah sangat sedikit. Khamir ini bersifat fakultatif anaerobik.

*Saccharomyces cerevisiae* memerlukan suhu 30 °C dan pH 4,0-4,5 agar dapat tumbuh dengan baik. Selama proses fermentasi akan timbul panas. Bila tidak dilakukan pendinginan suhu akan terus meningkat sehingga proses fermentasi terhambat (Oura, 1983).

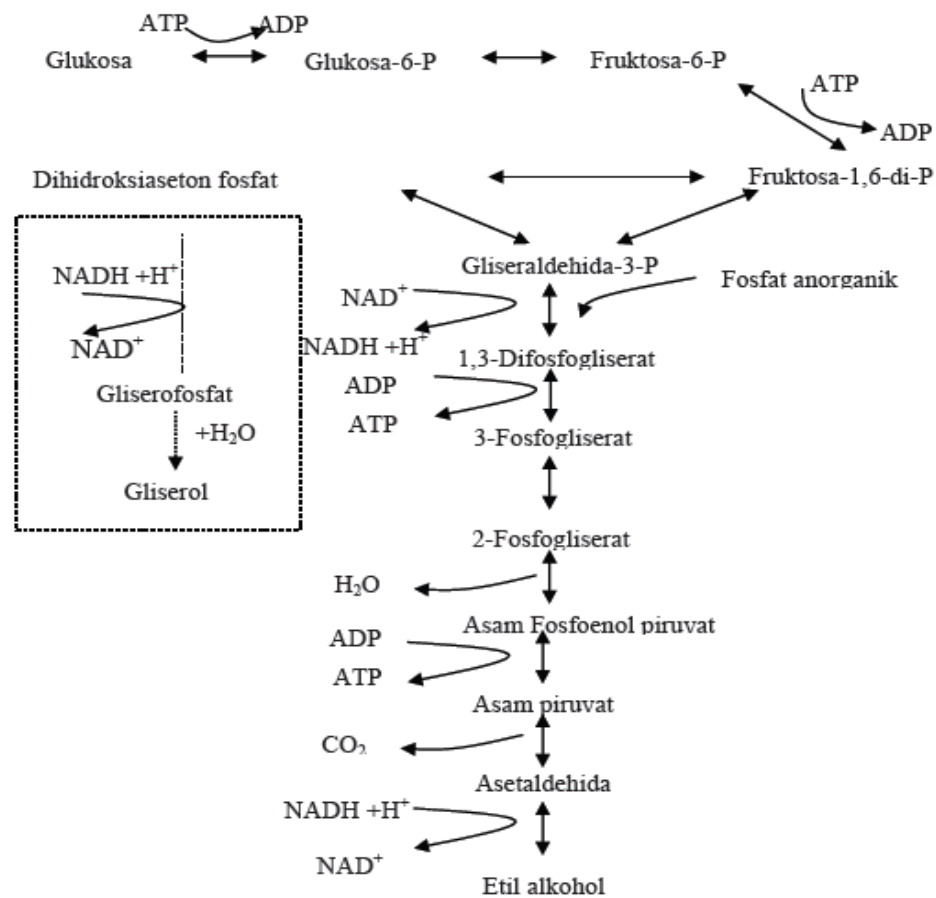
Di samping kondisi lingkungan seperti suhu dan pH, kebutuhan nutrien dan kofaktor juga memegang peranan penting bagi kehidupan khamir. Sejumlah kecil oksigen harus disediakan pada proses fermentasi oleh khamir karena oksigen merupakan komponen yang diperlukan dalam biosintesis beberapa asam lemak tidak jenuh. Biasanya diberikan tekanan oksigen 0,05- 0,10 mmHg. Lebih besar dari nilai tersebut, konversi akan cenderung ke arah pertumbuhan sel (Kosaric *et al.*, 1983). Pada permulaan proses, khamir memerlukan oksigen untuk pertumbuhannya, oleh karena itu perlu diberikan oksigen. Sesudah terjadi akumulasi CO<sub>2</sub> dan reaksi berubah menjadi anaerob, alkohol akan menghalangi fermentasi lebih lanjut setelah tercapai konsentrasi antara 13-15 persen volume dan biasanya maksimum 13 persen volume. Konsentrasi alkohol akan menghambat fermentasi tergantung pada suhu dan jenis khamir yang digunakan (Prescott dan Dunn, 1981).

Pada kondisi anaerobik, khamir memetabolisme glukosa menjadi etanol sebagian besar melalui jalur Embden Meyerhof-Parnas. Secara ringkas pembentukan etanol dari glukosa sebagai berikut.



Setiap mol glukosa terfermentasi menghasilkan dua mol etanol, CO<sub>2</sub> dan ATP.

Oleh karena itu, secara teoritis setiap g glukosa memberikan 0,51 g etanol. Pada kenyataannya etanol biasanya tidak melebihi 90-95 persen dari hasil teoritis. Hal ini dikarenakan sebagian nutrisi digunakan untuk sintesa biomassa dan memelihara reaksi. Reaksi samping juga dapat terjadi, yaitu terbentuknya gliserol dan suksinat yang dapat mengkonsumsi 4-5 persen substrat (Oura, 1983).



Keterangan : ATP = Adenin trifosfat  
 ADP = Adenin difosfat  
 NAD = Nikotinamida adenin dinukleotida  
 NADP = Nikotinamida adenin dinukleotida fosfat  
 NADH = Nikotinamida adenin dinukleotida tereduksi

**Gambar 6.** Skema fermentasi glukosa menjadi alkohol (Embden Meyerhof-Parnas Pathway) (Paturau, 1969).

Selain dengan menggunakan *Saccharomyces cerevisiae*, dapat juga digunakan kulit kayu raru untuk fermentasi alkohol. Tanaman ini dipilih didasarkan pada pemanfaatannya yaitu untuk memfermentasi air nira menjadi tuak atau minuman beralkohol. Tuak dibuat dengan cara memasukkan serbuk kulit kayu raru ke dalam nira aren dan dibiarkan selama beberapa jam untuk proses fermentasi (Wibowo dan Nauli, 2010). Berdasarkan penelitian Pasaribu (2009), diketahui

ada empat jenis kulit kayu raru yang berasal dari Sumatera Utara dan Riau, yaitu *Cotylelobium melanoxylon* Pierre, *Cotylelobium lanceolatum* Craib, *Shorea balanocarpoides* Symington, dan *Vatica perakensis* King. Dari keempat jenis kayu raru tersebut, yang paling umum dimanfaatkan sebagai tuak adalah jenis *Cotylelobium melanoxylon* Pierre.

### C. Ultrasonikasi

Ultrasonikasi adalah metode yang menggunakan gelombang ultrasonik yaitu gelombang akustik dengan frekuensi lebih besar dari 20 kHz. Ultrasonik bersifat *non-destructive* dan *non-invasive*, sehingga dapat dengan mudah diadaptasikan ke berbagai aplikasi, terutama dalam proses biologi dan kimia (McClements, 1995). Berdasarkan rentang frekuensinya, ultrasonikasi dibagi menjadi tiga, yaitu *power* ultrasonikasi (16–100 kHz), ultrasonikasi frekuensi tinggi (100 kHz–1 MHz), dan ultrasonikasi diagnostik (1–10 MHz) (Patist and Bates, 2008).

Gelombang ultrasonik lebih tinggi dibandingkan panjang gelombang molekul-molekul sehingga dapat terjadi interaksi di dalam medium cairan. Intensitas gelombang ultrasonik yang menjalar di dalam medium cair akan menurun karena adanya penyerapan energi terhadap medium dan menimbulkan adanya perbedaan tekanan sehingga dapat menimbulkan gelembung kecil dalam cairan. Ketika gelembung mencapai volume yang maksimal dan tidak mampu menyerap energi lagi, maka akan terjadi peristiwa kavitasi. Kavitasi adalah peristiwa pembentukan, pertumbuhan, dan meledaknya gelembung di dalam cairan yang terjadi pada rentang frekuensi antara 20 kHz–10 MHz, dan melibatkan sejumlah

energi yang sangat besar. Peristiwa meledaknya gelembung menghasilkan efek panas yang menyebar secara konveksi dalam medium akibat kenaikan temperatur yang sangat tinggi (5.000 K pada tekanan 1.000 atm dengan laju pemanasan dan pendinginan 1.010 K/s). Pada kondisi tertentu, tekanan yang dihasilkan pun meningkat dan peristiwa ini terjadi berulang dalam waktu yang sangat singkat (dalam skala nano detik) seiring dengan bertambahnya waktu ultrasonikasi (Camarena and Martinez, 2006).

Beberapa keunggulan dari metode ultrasonikasi adalah tidak membutuhkan penambahan bahan kimia lainnya, prosesnya cepat, mudah, dan murah, serta tidak mengakibatkan perubahan yang signifikan pada struktur kimia, partikel, dan senyawa-senyawa bahan yang digunakan (Lida, 2002). Penggunaan ultrasonikasi sebagai metode praperlakuan hidrolisis telah banyak dipelajari dan menghasilkan kesimpulan yang sama bahwa perlakuan ultrasonikasi dapat meningkatkan rendemen gula reduksi. Pada penelitian ini ultrasonikasi tidak dilakukan sebagai metode praperlakuan, tetapi dimanfaatkan untuk menghidrolisis umbi talas taro secara langsung. Artinya, proses hidrolisis dilakukan di bawah pengaruh ultrasonikasi dengan harapan metode ini mampu meningkatkan rendemen gula reduksi secara signifikan.

#### **D. Analisis Bioetanol**

Salah satu metode yang dapat digunakan untuk analisis bioetanol adalah kromatografi gas. Kromatografi gas adalah teknik kromatografi yang dapat digunakan untuk memisahkan senyawa organik yang mudah menguap. Metode

ini umum digunakan karena prosesnya mudah, cepat, sensitivitas tinggi, dan mampu memisahkan komponen-komponen dengan efisiensi yang tinggi, bahkan komponen dengan titik didih yang berdekatan dapat dipisahkan.

Prinsip dasar kromatografi yaitu didasarkan pada pemisahan senyawa berdasar fasa diam dan fasa bergerak. Suatu komponen dalam satu campuran dibawa melewati fasa diamnya oleh aliran fasa bergerak, baik itu gas maupun cairan, dimana pemisahan terjadi didasarkan pada perbedaan laju perpindahan komponen sampel (Skoog, dkk., 1998).

Secara garis besar, perangkat kromatografi gas terdiri dari beberapa komponen dengan fungsi yang berbeda. Untuk membawa sampel dari pangkalan injeksi melalui kolom menuju detektor diperlukan suatu gas pembawa. Gas pembawa harus bersifat inert, memiliki kemurnian yang tinggi, dan cocok dengan detektor yang digunakan. Gas pembawa yang biasanya digunakan adalah hidrogen, nitrogen, helium, dan argon. Gas pembawa ditempatkan dalam sebuah silinder yang bertekanan tinggi, umumnya 150 atm.

Komponen kromatografi gas yang berfungsi untuk memasukkan sampel adalah injektor. Injektor juga berfungsi untuk menguapkan sampel dan mencampurkan uap sampel dengan gas pembawa. Injektor dilengkapi dengan blok pemanas (*heater block*) yang digunakan untuk mengatur suhu injektor. Setelah sampel diinjeksikan, sampel tersebut dialirkan oleh gas pembawa menuju kolom. Kolom berfungsi sebagai fase diam dan merupakan tempat terjadinya proses pemisahan komponen-komponen dalam campuran berdasarkan perbedaan interaksi komponen sampel dengan fasa diam. Ada 3 jenis kolom pada kromatografi gas

yaitu kolom kemas (*packing column*), kolom kapiler (*capillary column*); dan kolom preparatif (*preparative column*). Komponen-komponen yang meninggalkan kolom selanjutnya dideteksi menggunakan detektor. Ada beberapa jenis detektor yang sering digunakan dalam kromatografi gas, antara lain *Flame Ionization Detector* (FID), *Thermal Conductivity Detector* (TCD), *Flame Photometric Detector* (FPD), *Flame Photometric Detector* (FPD), dan *Mass Spectrometer* (MS).

*Flame Ionization Detector* (FID), yaitu detektor yang digunakan untuk mengukur komponen-komponen sampel yang memiliki gugus alkil. Di dalam FID komponen-komponen sampel akan terionisasi, dan ion-ion yang dihasilkan akan dikumpulkan oleh ion pengumpul, kemudian arus yang dihasilkan akan dikonversi menjadi satuan tegangan. Semakin tinggi konsentrasi komponen, semakin banyak pula ion yang dihasilkan sehingga responnya juga akan semakin besar.

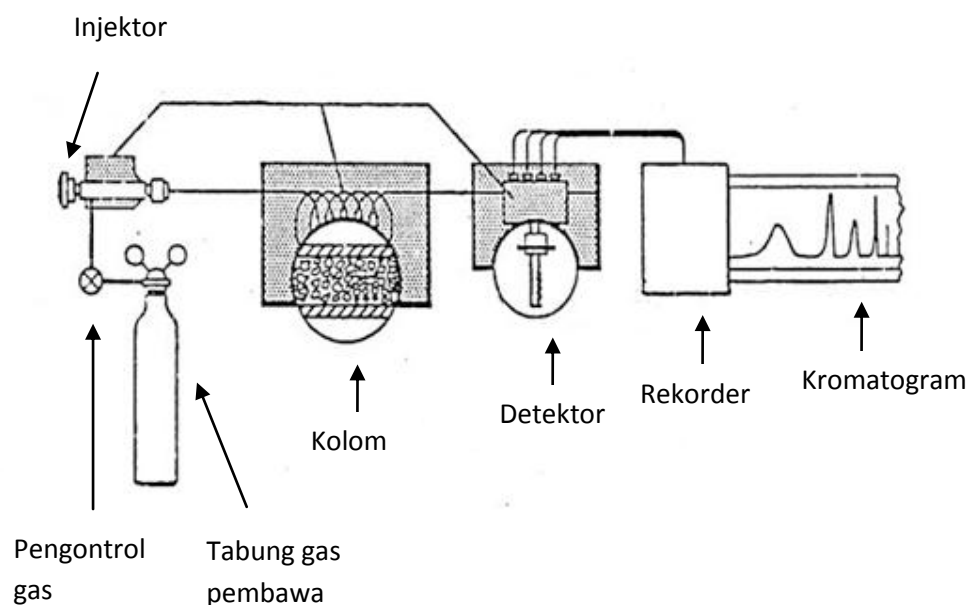
*Thermal Conductivity Detector* (TCD), yaitu detektor yang bekerja dengan prinsip mengukur daya hantar panas dari masing-masing komponen. TCD merupakan detektor yang paling umum digunakan karena semua komponen memiliki daya hantar panas.

*Flame Photometric Detector* (FPD), yaitu detektor khusus untuk mendeteksi senyawa yang mengandung sulfur, posfor, dan organo timah. Prinsip kerja jenis detektor ini adalah energi yang diemisikan dari pembakaran senyawa komponen akan dilewatkan pada filter tertentu, kemudian dideteksi oleh *photomultiplier*.

*Flame Thermionic Detector* (FTD), yaitu detektor khusus untuk mendeteksi senyawa yang mengandung nitrogen atau organo-posfor. Prinsipnya adalah hasil pembakaran senyawa komponen akan direaksikan dengan garam Rubidium dan respon listrik yang dihasilkan akan dikonversi dalam satuan tegangan.

*Mass Spectrometer* (MS), jenis detektor yang prinsip kerjanya berdasarkan pemecahan komponen-komponen sampel menjadi ion-ion fragmen, lalu ion-ion fragmen tersebut dilewatkan pada *Mass Analyzer* untuk dipisahkan berdasarkan perbedaan massa/muatan. Selanjutnya diteruskan ke ion detektor untuk mendeteksi jumlah ion yang dihasilkan.

Hasil deteksi akan dicatat oleh *recorder* sebagai kromatogram yang berupa puncak (*peak*). Secara sederhana, komponen-komponen kromatografi gas di atas dapat digambarkan dalam skema alat kromatografi gas, seperti terlihat pada Gambar 7 berikut ini.



**Gambar 7.** Skema alat kromatografi gas



Dewasa ini telah banyak penelitian yang menggunakan kromatografi gas untuk menentukan kadar etanol hasil fermentasi. Najafpour *et al.* (2004) melakukan penelitian menggunakan kromatografi gas untuk menentukan kadar etanol yang dihasilkan dari proses fermentasi glukosa menggunakan *Saccharomyces cerevisiae*. Dalam penelitian tersebut, gas pembawa yang digunakan adalah nitrogen, detektor yang digunakan adalah FID dan kolom yang digunakan adalah kolom Porapak QS 100/120 mesh. Suhu oven pada kolom diatur sebesar 175 °C dan suhu detektor adalah 185 °C. Standar yang digunakan adalah isopropanol. Etanol yang diperoleh dari fermentasi gula reduksi sebanyak 150 g/L adalah sebesar 57 g/L atau setara dengan konversi gula reduksi sebesar 38%.

Merujuk pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Najafpour *et al.* (2004), maka dalam penelitian ini akan digunakan kromatografi gas dengan gas pembawa nitrogen (N), detektor FID, dan kolom Porapak QS 100/120 mesh. Kondisi analisis dalam penelitian ini juga dibuat sama dengan penelitian tersebut.

Penentuan kadar etanol dapat juga dilakukan dengan cara yang sederhana, yaitu dengan penggunaan spektrometer UV-Vis pada  $\lambda$  (panjang gelombang) 414 nm. Pada  $\lambda$  ini merupakan serapan maksimum dari hasil oksidasi etanol dengan menggunakan  $K_2Cr_2O_7$  dalam suasana asam, dengan demikian absorbansi etanol pada  $\lambda$  diatas dapat digunakan untuk analisis kuantitatif dengan memanfaatkan hukum Lambert-Beer (Supriyanto, 1999; Day dan Underwood, 2002).

Prinsip analisis ini, didasarkan pada besarnya absorbansi yang terjadi pada perubahan warna pada  $K_2Cr_2O_7$  dalam suasana asam yang berwarna jingga menjadi hijau pada kadar alkohol yang terkandung dalam larutan. Prinsip ini dapat

dimanfaatkan dengan bantuan kurva kalibrasi yang dapat dibuat dengan mengukur absorbansi larutan etanol dengan kadar etanol yang berbeda pada  $\lambda$  414 dengan menggunakan spektrometer UV-Vis, dengan absorbansi ini didapat kurva kalibrasi dan persamaan garis yang menunjukkan hubungan antara absorbansi hasil oksidasi etanol dengan kadar etanol, sehingga dapat digunakan untuk menentukan kadar etanol dalam sampel (Day dan Underwood, 2002). Selain menggunakan mikroorganisme ada proses fermentasi digunakan juga serbuk kayu raru. Serbuk kayu raru ini biasanya pemanfaatannya secara tradisional oleh masyarakat batak untuk memfermentasi air nira menjadi tuak.