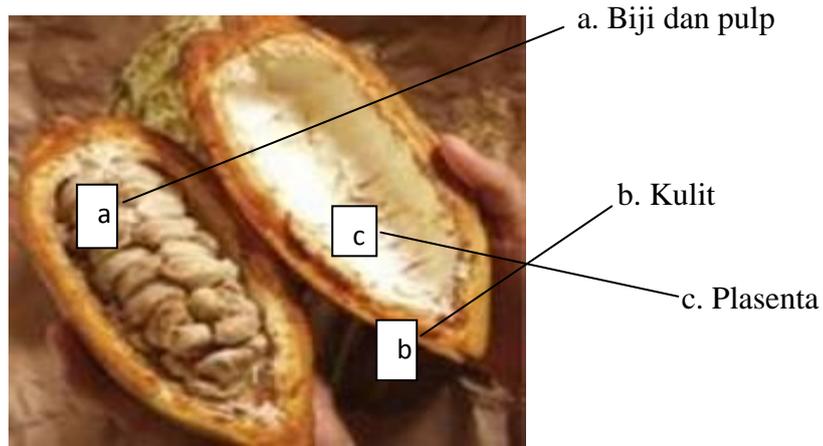


II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Buah Kakao

Buah kakao (Gambar 1) umumnya terdiri dari 73,63% bagian kulit (pod kakao), 24,37% biji (umumnya dalam satu buah kakao terdiri dari 30-40 butir biji kakao) dan 2% plasenta (merupakan kulit ari pembungkus biji kakao) (Siswoputranto, 1983).



Gambar 1. Buah kakao (Anonim, 2008)

Komponen limbah buah kakao terbesar berasal dari kulit buahnya atau biasa disebut dengan kulit kakao. Sama halnya dengan limbah hasil panen dan pengolahan pertanian lainnya, kulit atau cangkang buah kakao belum dimanfaatkan secara optimal. Selama ini, cangkang buah kakao hanya digunakan sebagai pakan ternak setelah melalui tahapan bioproses. Petani kakao belum

terpikir untuk memanfaatkan limbah cangkang kakao untuk dijadikan produk lain, seperti bahan baku energi alternatif.

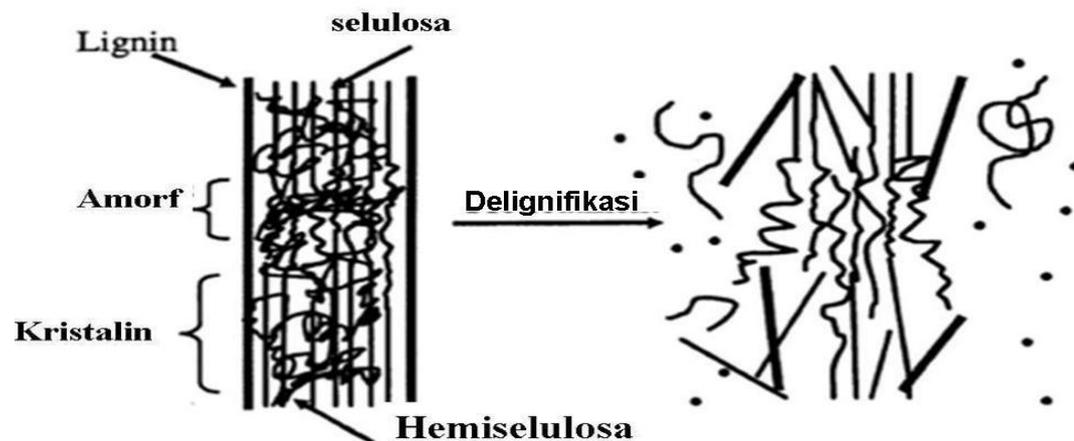
Kulit kakao merupakan bagian mesokarp atau dinding buah kakao yang mencakup kulit terluar sampai daging buah sebelum kumpulan biji. Pod buah kakao merupakan bagian terbesar dari buah kakao. Komposisi kimia pod kakao dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi kimia kulit kakao

No	Komponen	Persen (%)
1	Kadar air	12,96
2	Kadar lemak	1,11
3	Kadar abu	11,10
4	Kadar protein	8,75
5	Kadar karbohidrat	16,27
6	Kadar lignin	20,11
7	Kadar selulosa	31,25
8	Kadar Hemiselulosa	48,64

Sumber : Ashadi, 1988

Kulit kakao merupakan limbah lignoselulosa. Lignoselulosa atau serat kasar terdiri atas tiga penyusun utama, yaitu selulosa (31,25%), hemiselulosa (48,64%), dan lignin (20,11%) (Ashadi, 1988), yang saling terikat erat membentuk satu kesatuan (Gambar 2). Ketiga komponen tersebut diuraikan di bawah ini.



Gambar 2. Skema lignoselulosa (Achmadi, 1989)

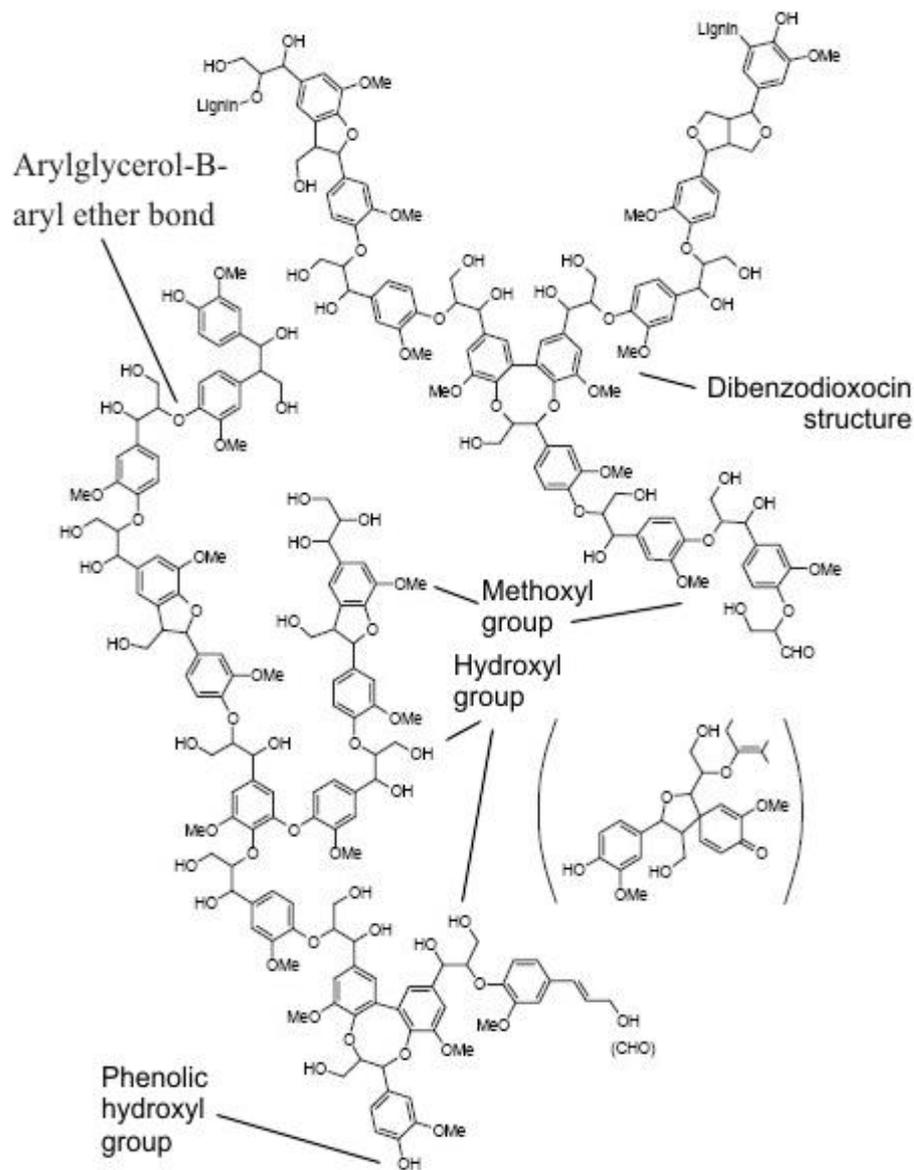
1. Lignin

Lignin adalah senyawa yang tahan terhadap hidrolisis dan menghambat kerja enzim selulase karena membentuk kompleks dengan selulosa dan hemiselulosa sehingga diharapkan serendah mungkin kandungan lignin pada substrat (Apriyantono *et al.*, 1988). Lignin adalah kompleks polimer hidrokarbon dengan komponen senyawa alifatik dan aromatik. Lignin terdiri dari monomer-monomer yang berasal dari beberapa macam cincin substitusi phenil propana. Brown (1979) mengatakan bahwa lignin merupakan polimer aromatik kompleks dengan bobot molekul kira-kira 11.000 yang dibentuk oleh tiga dimensi polimerisasi.

Secara fisis lignin berwujud amorf (tidak berbentuk) sehingga menyebabkan lignin sulit untuk dianalisis dengan sinar-X. Lignin berwarna kuning cerah dengan bobot jenis berkisar antara 1,3-1,4 bergantung pada sumber lignin. Indeks refraksi lignin sebesar 1,6. Lignin bila dipanaskan tidak dapat mencair, tetapi melunak (Kirk and Othmer, 1952). Pada suhu tinggi, lignin dapat mengalami perubahan struktur dengan membentuk asam format, metanol, asam asetat, aseton, vanilin dan lainnya (Judoamidjojo, dkk., 1992).

Lignin bersifat tidak larut dalam kebanyakan pelarut organik. Lignin yang melindungi selulosa bersifat tahan terhadap hidrolisis yang disebabkan oleh adanya ikatan alkali dan ikatan eter (Judoamidjojo, dkk., 1992).

Menurut Kirk and Othmer (1952), lignin terdiri dari 61-65 persen karbon, 5-6,1 persen hidrogen dan sisanya termasuk gugus metoksi dengan panas pembakarannya sebesar 6.280 kal/gram (Gambar 3).

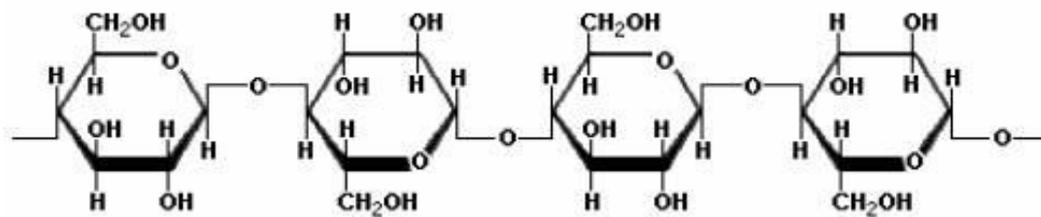


Gambar 3. Struktur lignin (Isro'i, 2008)

2. Hemiselulosa

Hemiselulosa sering diartikan sebagai selulosa dengan bobot molekul rendah. Polisakarida poliosa merupakan istilah untuk membedakan selulosa dengan hemiselulosa. Poliosa adalah polisakarida non selulosa. Hemiselulosa adalah polisakarida yang mempunyai bobot molekul yang lebih kecil dari selulosa dan terdiri dari 2-7 residu gula yang berbeda (Oshima, 1965).

Hemiselulosa selalu dikelompokkan berdasarkan residu gula utama yang menyusun rangkanya, seperti: xylan, mannan, galactan, dan glucan, dengan xylan dan mannan adalah gugus utama dari hemiselulosa (Gambar 4). Molekul hemiselulosa sering bercabang dengan rantai induk $\beta - 1,4$ dan rantai samping yang relatif pendek, tidak membentuk mikrofibril namun membentuk ikatan hidrogen dengan selulosa



Gambar 4. Struktur hemiselulosa (Isro'i, 2008)

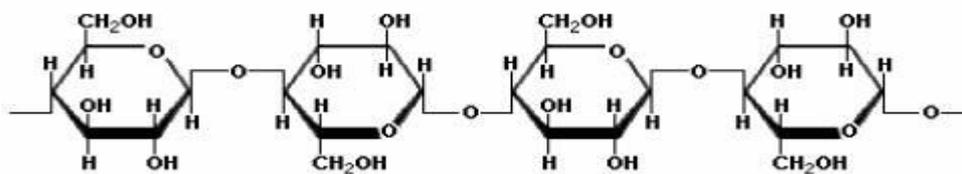
Hemiselulosa mirip dengan selulosa yang merupakan polimer gula, akan tetapi berbeda dengan selulosa yang hanya tersusun dari glukosa. Hemiselulosa tersusun dari bermacam-macam jenis gula, monomer gula penyusun hemiselulosa terdiri dari monomer gula berkarbon 5 (C-5) dan 6 (C-6), misalnya: xylosa, mannose, glukosa, galaktosa, arabinosa, dan sejumlah kecil ramnosa, asam glukoronat dan asam galaturonat.

Hemiselulosa mudah disubstitusi dengan berbagai karbohidrat lain atau residu non karbohidrat. Perbedaan selulosa dengan hemiselulosa yaitu hemiselulosa mempunyai derajat polimerisasi rendah (50-200 unit) dan mudah larut dalam alkali, tetapi sukar larut dalam asam, sedangkan selulosa sebaliknya (Isroi, 2008).

3. Selulosa

Selulosa merupakan komponen utama penyusun dinding sel tanaman dan hampir tidak pernah ditemui dalam keadaan murni di alam melainkan berkaitan dengan lignin dan hemiselulosa membentuk lignoselulosa (Lynd *et al.*, 2005). Beberapa ciri-ciri dari struktur selulosa yang berdasarkan pada karakteristik kimia yang dimiliki adalah dapat mengembang (swelling) jika direaksikan dengan hidroksi logam alkali, garam-garam dalam larutan basa kuat dan senyawa amina. Senyawa amina yang lazim digunakan untuk mengembangkan ikatan selulosa yaitu NaOH (Irawadi, 1990).

Rantai selulosa terdiri dari satuan glukosa anhidrida yang saling berikatan melalui atom karbon pertama dan keempat, Ikatan yang terjadi adalah ikatan β -1,4-glikosidik. Rumus bangun selulosa dapat dilihat pada gambar 5.



Gambar 5. Struktur selulosa (Achamdi, 1989)

Selulosa terdiri atas 15-14.000 unit molekul glukosa Rantai panjang selulosa terhubung secara bersama melalui ikatan hidrogen dan gaya van der Waals (Fessenden, 1990). Panjang molekul selulosa ditentukan oleh jumlah unit glukosa di dalam polimer, disebut dengan derajat polimerisasi. Derajat polimerisasi (DP) selulosa tergantung pada jenis tanaman dan umumnya dalam kisaran 2.000-27.000 unit glukosa.

Selulosa mempunyai bagian yang mudah dihidrolisis disebut bagian amorf dan bagian yang sulit dihidrolisis disebut bagian kristalin. Ikatan β -1,4 glukosida

pada serat selulosa dapat dipecah menjadi monomer glukosa dengan cara hidrolisis asam atau enzimatis. Glukosa yang dihasilkan dari hidrolisis selulosa selanjutnya dapat difermentasi menjadi etanol.

B. Produksi Bioetanol Generasi Kedua

Bioetanol adalah etanol yang dibuat dari *biomass* yang mengandung komponen monosakarida yang didapat dari pati atau selulosa. Bioetanol dapat dibuat dari berbagai bahan hasil pertanian. Secara umum bahan baku bioetanol dapat dibagi dalam 3 golongan yaitu:

- Bahan yang mengandung turunan gula (sakarid): molase (tetes tebu), nira kelapa, nira nipah dan lain-lain.
- Bahan yang mengandung pati: ubi dahlia, tapioka, kentang, gamdum, ganyong dan lain-lain; dan
- Bahan yang mengandung selulosa: jerami padi, batang pisang, ampas tebu dan beberapa limbah pertanian lainnya (Prihandana dkk., 2007)

Bahan lignoselulosa umumnya merupakan limbah hasil pemanenan atau proses pengolahan hasil pertanian yang tertinggal, contohnya kayu, sekam padi, bagas tebu, kulit kakao, jerami, tandan kosong sawit dan lainnya (Soerawidjaya, 2008). Limbah lignoselulosa merupakan bahan baku generasi kedua dalam pembuatan bioetanol. Ketersediaan limbah lignoselulosa yang melimpah di Indonesia dan tidak mengganggu keseimbangan ketersediaan bahan pangan, maka memungkinkan dijadikannya sebagai sumber bahan baku ideal untuk memproduksi etanol.

Proses pembuatan bioetanol dengan bahan baku yang mengandung lignoselulosa melalui empat proses utama; yaitu perlakuan awal, hidrolisis, fermentasi, dan pemisahan serta pemurniaan produk etanol (Mosier, *et al.*, 2005), yang masing-masing akan diuraikan di bawah ini.

1. Perlakuan Awal

Proses perlakuan awal dilakukan untuk mengkondisikan bahan-bahan lignoselulosa baik dari segi struktur dan ukuran dengan menghilangkan kandungan lignin, merusak struktur kristal dari selulosa serta memperluas permukaan substrat (Sun and Cheng, 2002). Delignifikasi dapat dilakukan secara fisik dan kimiawi atau kombinasi dari keduanya.

Menurut Fridia (1989), proses delignifikasi merupakan perlakuan pendahuluan terhadap bahan baku untuk menurunkan kadar lignin sehingga mempermudah pelepasan hemiselulosa. Perlakuan awal yang efisien harus dapat membebaskan struktur kristal dari selulosa dan memperluas daerah amorf serta membebaskan dari kadar lignin. Bahan lignoselulosa yang telah mendapatkan perlakuan awal akan mengalami penyusutan kadar lignin dan meningkatkan kandungan selulosa.

Perlakuan awal dapat dilakukan secara fisik dan kimiawi atau kombinasi dari keduanya. Perlakuan awal lebih efektif dilakukan dengan mengkombinasikan antara perlakuan fisik dan kimia (Foody *et al.*, 1999). Faktor-faktor yang mempengaruhi kecepatan reaksi pelarutan lignin, selulosa dan hemiselulosa yaitu suhu, tekanan, dan konsentrasi larutan pemasak. Selulosa tidak akan rusak saat proses pelarutan lignin jika konsentrasi larutan pemasak yang digunakan rendah dan suhu yang digunakan tidak sesuai.

2. Hidrolisis Enzimatis

Hidrolisis enzimatis adalah proses pemecahan selulosa dan hemiselulosa menjadi monosakarida (glukosa dan xyloza) dengan menggunakan enzim yang selanjutnya akan difermentasi menjadi etanol. Keuntungan hidrolisis enzimatis 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 relatif rendah karena tidak ada bahan yang korosif (Hamelinck, Hooijdonk, and Faaij, 2005).

Faktor-faktor yang mempengaruhi proses hidrolisis enzimatis adalah metode perlakuan awal yang digunakan, aktivitas enzim dan kondisi proses hidrolisis seperti suhu, pH dan adanya inhibitor, kualitas dan konsentrasi substrat (Tahezadeh dan Karimi, 2007).

Enzim adalah katalis yang sangat spesifik yang membantu terjadinya reaksi-reaksi kimia dalam sistem biologis. Selulase merupakan enzim yang memutuskan ikatan glikosidik β -1,4 didalam selulosa, selubiosa dan turunan selulosa lainnya. Tiga enzim utama yang terdapat dalam enzim selulase adalah endoglukonase, eksoglukonase dan selobiase. Mekanisme reaksi yang dikatalisis oleh enzim selulase tersebut adalah :

1. Endoglukonase menghidrolisis ikatan β -1,4-glikosidik secara acak pada daerah amorf selulosa menghasilkan glukosa, selobiosa dan selodekstrin.
2. Hidrolisis serat selulosa menjadi sakarida yang lebih sederhana oleh ekso-selulosa.
3. Hidrolisis disakarida dan tetrasakarida menjadi glukosa oleh enzim β -glukosidase (Fao, 2005).

3. Fermentasi

Fermentasi adalah suatu proses perubahan kimia pada substrat organik, baik karbohidrat, protein, lemak atau lainnya melalui kegiatan katalis biokimia yang dikenal sebagai enzim dan dihasilkan oleh jenis mikroba spesifik (Prescott dan Dunn, 1959). Dalam proses fermentasi, gula akan dikonversi menjadi etanol dan gas karbondioksida. Persamaan reaksi fermentasinya:



Glukosa

Etanol

Karbondioksida

Produksi etanol dari substrat gula oleh khamir *S. cerevisiae* merupakan proses fermentasi dengan kinetika sangat sederhana karena hanya melibatkan satu fasa pertumbuhan dan produksi. Pada fase tersebut glukosa diubah secara simultan menjadi biomasa, etanol dan CO₂. Parameter yang mengendalikan pertumbuhan dan metabolisme khamir dalam keadaan anaerobik yaitu konsentrasi gula dan etanol. Secara kinetik glukosa berperan ganda, pada konsentrasi rendah (kurang dari 1g/l) merupakan substrat pembatas, sedangkan pada konsentrasi tinggi (lebih dari 300g/l) akan menjadi penghambat.

Menurut Kunaepah (2008), fermentasi dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu :

1. Substrat

Substrat merupakan bahan baku fermentasi yang mengandung nutrien-nutrien yang mengandung karbon, nitrogen (urea) dan mineral-mineral yang dibutuhkan oleh mikroba untuk tumbuh maupun menghasilkan produk fermentasi, seperti karbohidrat.

2. Suhu

Suhu fermentasi mempengaruhi lama fermentasi karena pertumbuhan mikroba dipengaruhi suhu lingkungan fermentasi. Menurut Fardiaz (1992), *Saccharomyces cerevisiae* memiliki kisaran suhu pertumbuhan antara 20-30⁰C.

3. pH

Derajat keasaman (pH) merupakan salah satu faktor penting yang mempengaruhi pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae*. Menurut Roukas (1994), kisaran pH untuk pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* yaitu pada pH 3,5-6,5. Sedangkan menurut Elevri dan Putra (2006), pH optimum untuk produksi etanol oleh *Saccharomyces cerevisiae* yaitu pada pH 4,5.

4. Jenis mikroba

Khamir merupakan jenis mikroba yang sering digunakan dalam fermentasi alkohol, seperti *Saccharomyces cerevisiae*. Mikroba/enzym yang digunakan untuk fermentasi harus mempunyai beberapa syarat sebagai berikut :

- Mempunyai kemampuan untuk memfermentasi karbohidrat yang cocok secara cepat.
- Bersifat membentuk flokulasi dan sedimentasi.
- Mempunyai genetik yang stabil (tidak mudah mengalami mutasi)
- Toleran terhadap alkohol yang tinggi (antara 14-15%)
- Mempunyai sifat regenerasi yang cepat.

5. Oksigen

Pada permulaan proses fermentasi, khamir memerlukan oksigen untuk pertumbuhannya. Setelah terjadi akumulasi CO₂, reaksi berubah menjadi anaerob. (Prescott dan Dunn, 1981).

Saccharomyces cerevisiae merupakan mikroorganisme bersel tunggal yang sangat dikenal masyarakat luas sebagai ragi roti. Ragi roti ini selain digunakan dalam pembuatan makanan dan minuman, juga digunakan dalam industri etanol.

Saccharomyces cerevisiae merupakan khamir uniseluler yang memiliki sel berbentuk ellipsoid atau silindris dengan ukuran 5-20 mikron, bersifat nonpatogenik dan nontoksik. *Saccharomyces cerevisiae* merupakan organisme fakultatif anaerob yang dapat menggunakan baik sistem aerob maupun anaerob untuk memperoleh energi dari pemecahan glukosa.

Saccharomyces cerevisiae banyak digunakan dalam produksi etanol dari berbagai sumber bahan berkarbohidrat. *Saccharomyces cerevisiae* dapat memproduksi etanol dalam jumlah besar dan mempunyai toleransi terhadap alkohol yang tinggi dan dapat menghasilkan alkohol dalam jumlah yang besar (Elveri dan Putra, 2006).