

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Bioenergi

Bioenergi adalah energi alternatif yang berasal dari sumber-sumber biologis. Penggunaan bioenergi memiliki keunggulan dalam hal meningkatkan kualitas lingkungan, meningkatkan pertumbuhan ekonomi, serta mengurangi ketergantungan terhadap bahan bakar fosil. Saat ini pengembangan bioenergi telah memanfaatkan bahan di luar pangan dan pakan diantaranya menggunakan limbah, selulosa dan tanaman yang dikhususkan sebagai bahan baku energi alternatif, misalnya residu biomassa, minyak nabati non-pangan.

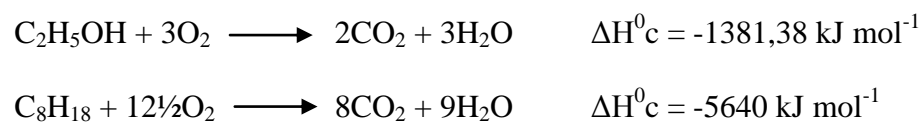
Indonesia sebagai salah satu negara tropis memiliki beragam sumber daya alam yang sangat potensial sebagai bahan baku sumber energi alternatif. Sektor pertanian merupakan usaha yang sangat potensial untuk dikembangkan di Indonesia karena Indonesia memiliki potensi sumber daya lahan, iklim, dan sumber daya manusia yang cukup. Kondisi iklim tropis dengan curah hujan yang cukup, ketersediaan lahan yang masih luas, serta telah berkembangnya teknologi optimalisasi produksi merupakan faktor pendukung untuk pengembangan bioenergi.

Di Indonesia ada beberapa jenis tanaman yang dapat dimanfaatkan sebagai sumber energi diantaranya kelapa sawit (Chantara *et al.*, 2012), kelapa (Leplus, 2003), dan jarak pagar (Antony *et al.*, 2011) untuk pembuatan biodiesel. Sedangkan untuk pembuatan bioetanol diantaranya ubi kayu (Zamora *et al.*, 2010), ubi jalar (Manrique and Roca, 2007), jagung (Nicolíć *et al.*, 2010), dan gandum (Perez *et al.*, 2007). Salah satu bioenergi yang terus dikembangkan dewasa ini adalah bioetanol, karena dapat dibuat dari sumber daya alam terbarukan dengan artian bahwa sumber daya alam tersebut dapat dibudidayakan.

B. Bioetanol

Bioetanol adalah alkohol yang diperoleh dari proses fermentasi gula reduksi. Etanol disebut juga sebagai etil alkohol, mempunyai sifat berupa cairan yang tidak stabil (*volatile*), mudah terbakar dan tidak berwarna dengan rumus molekul C_2H_5OH yang merupakan alkohol berantai lurus. Etanol merupakan bahan bakar alternatif karena dapat diperbaharui, ramah lingkungan, serta menghasilkan gas buangan yang rendah dibandingkan dengan bensin atau sejenisnya.

Sebagai gambaran, reaksi pembakaran 1 mol etanol akan menghasilkan 2 mol gas CO_2 , sementara pembakaran 1 mol isooktana (kandungan utama pada *gasoline*) akan menghasilkan 8 mol CO_2 , seperti terlihat dalam reaksi berikut ini.



Energi yang dihasilkan dari pembakaran 1 mol etanol sebesar adalah 1381,38 kJ, dan energi yang dihasilkan dari pembakaran 1 mol isooktana sebesar adalah 5460 kJ. Jika dilihat dari sisi CO₂, maka pembakaran 4 mol etanol menghasilkan CO₂ dengan jumlah yang setara dengan hasil pembakaran 1 mol isooktana. Energi yang dihasilkan untuk pembakaran 4 mol etanol adalah sebesar 5525,52 kJ.

Artinya dengan jumlah CO₂ yang sama, pembakaran etanol menghasilkan energi yang jauh lebih besar daripada pembakaran isooktana, dengan selisih energi sebesar 65,52 kJ.

Seperti telah dipaparkan di atas, bioetanol dapat dibuat dengan cara fermentasi gula reduksi seperti molase (Gervásio *et al.*, 2005), glukosa (Ubalua, 2007) dan fruktosa (Lin and Tanaka, 2006). Masalahnya adalah gula reduksi merupakan bahan pangan utama, sehingga penggunaannya sebagai bahan baku bioetanol akan berdampak pada ketersediaan bahan pangan.

Untuk menghindari masalah tersebut, dewasa ini pembuatan bioetanol dari polisakarida menjadi fokus penelitian. Dari berbagai polisakarida, yang paling banyak diteliti adalah pati (Srinorakutara *et al.*, 2006) dan selulosa (Yu and Zhang, 2004). Pati dapat diperoleh dari tepung jagung (Shapouri *et al.*, 2002), singkong (Zamora *et al.*, 2010), dan kentang (Fadel, 2000), sedangkan selulosa dapat diperoleh dari kayu (Pimentel and Tad, 2005), dan limbah pengolahan kertas (Sathya and Navaneetha, 2011).

Produksi bioetanol dari bahan baku pati di atas telah banyak dilakukan peneliti. Zamora *et al.* (2010) mengolah pati singkong dengan metode semi-kontinyu dan berhasil mengkonversi 89,84-90,5% pati menjadi etanol dengan konsentrasi etanol

sekitar 49,76 % v/v. Shapouri *et al.* (2002) mengolah pati jagung menjadi bioetanol dan menemukan bahwa dari 3,0-3,2 kg jagung dapat diperoleh 1 L etanol. Dalam penelitian lain, (Fadel, 2000) didapatkan hasil bioetanol dengan konsentrasi alkohol 13,2% v/v dari bahan baku kentang.

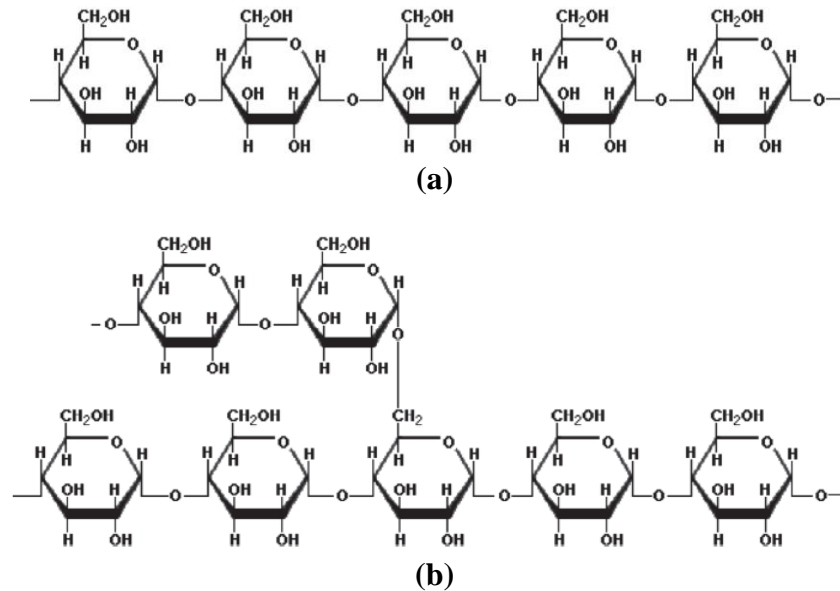
Selain pati, bioetanol juga dapat dibuat dari selulosa. Sebagai contoh Sathya and Navaneetha (2011) mengolah limbah pengolahan kertas menjadi bioetanol dengan rendemen sekitar 0.097 g/g. Dalam penelitian lain, (Pimentel and Tad, 2005), dilaporkan bahwa 1 L etanol dapat dihasilkan dari 2,5 kg kayu.

Meskipun kedua jenis polisakarida di atas telah digunakan sebagai bahan baku pembuatan bioetanol, namun hingga dewasa ini, pati masih merupakan bahan baku yang paling banyak dimanfaatkan. Selain karena jumlahnya yang melimpah, pati lebih mudah dihidrolisis dibanding selulosa sehingga biaya pengolahan lebih rendah.

C. Pati

Pati merupakan homopolimer glukosa dengan ikatan α -glikosidik. Pati dapat digolongkan menjadi dua berdasarkan struktur rantainya yaitu, amilosa dan amilopektin seperti terlihat dalam Gambar 1. Amilosa membentuk struktur heliks dengan ikatan α -(1,4)-D-glikosida, sedangkan amilopektin membentuk struktur rantai heliks ganda dengan ikatan α -(1,6)-D-glikosida. Jumlah amilosa dalam pati adalah sebesar 25-28 % dan amilopektin sebesar 72-75 % (Saunders *et al.*, 2011).

Amilosa memiliki berat molekul sekitar 104-106 Dalton dan amilopektin sekitar 107-108 Dalton (Saunders *et al.*, 2011).



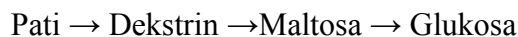
Gambar. 1. (a) struktur amilosa dan (b) struktur amilopektin.

Salah satu perbedaan paling penting antara amilosa dan amilopektin adalah kemudahannya untuk dihidrolisis. Karena ikatan α -(1,4)-D-glikosida lebih mudah diputus dibanding dengan ikatan α -(1,6)-D-glikosida, maka amilosa lebih mudah terhidrolisis dibandingkan dengan amilopektin.

D. Hidrolisis Onggok

Di Indonesia, Provinsi Lampung khususnya, salah satu bahan dasar yang potensial untuk pembuatan bioetanol berbasis pati adalah onggok, yang diketahui mengandung pati dengan kadar cukup tinggi, yakni sekitar 50- 70% (Pandey *et al.*, 2000). Masalahnya adalah pengolahan onggok menjadi bioetanol memerlukan tahapan hidrolisis terlebih dahulu. Untuk tujuan tersebut, dewasa ini telah dikembangkan berbagai metode hidrolisis pati yang secara garis besar dapat

dibedakan menjadi hidrolisis asam dan hidrolisis enzimatis. Adapun tahapan hidrolisis pati baik menggunakan asam maupun enzim dapat dituliskan dalam reaksi sebagai berikut.



Dalam penerapan metode hidrolisis asam, berbagai faktor telah diteliti dan secara umum ditemukan bahwa unjuk kerja metode ini dipengaruhi oleh jenis dan konsentrasi asam, suhu, waktu, serta sumber pati (substrat).

Berdasarkan literatur, dapat diketahui bahwa asam yang paling umum digunakan adalah asam klorida (Solomon *et al.*, 2006), asam posfat (El-Tayeb *et al.*, 2012), dan asam sulfat (Srinorakutara *et al.*, 2006; Zamora *et al.*, 2010; dan Mishra *et al.*, 2011), dengan konsentrasi yang berbeda. Hasil penelitian tentang pengaruh konsentrasi asam secara umum menunjukkan bahwa asam pekat menghasilkan gula reduksi dengan rendemen yang lebih tinggi (Mishra *et al.*, 2011), namun limbahnya bersifat lebih korosif sehingga berbahaya jika dilepaskan ke lingkungan.

Beberapa penelitian menjelaskan tentang faktor-faktor yang mempengaruhi hidrolisis asam seperti yang telah dijelaskan di atas. Sebagai contoh, dalam penelitian sebelumnya (Solomon *et al.*, 2006) dilaporkan bahwa kondisi optimum untuk hidrolisis asam berbahan baku bubur tepung singkong dengan kadar pati 15% adalah suhu 70°C, waktu hidrolisis 1 jam, dan konsentrasi HCl 0,1M. Dalam penelitian lain, Mishra *et al.* (2011), melakukan hidrolisis biji kapas untuk menghasilkan glukosa menggunakan asam sulfat dengan konsentrasi yang berbeda. Pada penelitiannya, jumlah glukosa dalam biji kapas sebelum hidrolisis

diperkirakan 0,52 mg/g sampel. Setelah hidrolisis, ditemukan bahwa kadar glukosa meningkat tajam seiring dengan kenaikan konsentrasi asam yang digunakan. Dengan penggunaan asam sulfat 2%, kadar glukosa naik menjadi 17,68 mg/g sampel, menjadi 17,90 mg/g sampel dengan penggunaan asam sulfat 3%, dan menjadi 18,60 mg/g sampel dengan penggunaan asam sulfat 5% .

El-Tayeb *et al.* (2012) melakukan penelitian untuk membandingkan efektifitas tiga jenis asam, yakni asam klorida, asam posfat, dan asam sulfat, untuk hidrolisis limbah pengolahan gula bit (sugar beet) dengan kandungan gula total sebesar 0,83% w/w. Hidrolisis dilakukan dengan kondisi yang sama, yakni konsentrasi asam sebesar 1 dan 5% v/v, suhu 90 °C, dan waktu 90 menit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa untuk ketiga jenis asam, konsentrasi asam 5% menghasilkan gula reduksi yang lebih tinggi, dan asam sulfat bekerja lebih baik. Dalam penelitian yang sama dipelajari juga pengaruh waktu, dengan melakukan percobaan menggunakan ketiga jenis asam dengan konsentrasi yang sama, yakni 1% v/v, dengan waktu yang berbeda, yakni 15; 30; 60; 90; dan 120 menit. Hasil percobaan menunjukkan bahwa waktu hidrolisis hingga 90 menit menghasilkan gula reduksi dengan kadar yang meningkat, namun turun kembali pada waktu hidrolisis 120 menit. Dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa secara umum, asam sulfat bekerja lebih efektif dibandingkan dengan dua jenis asam lainnya.

Selain hidrolisis asam, banyak penelitian telah dilakukan menggunakan enzim. Metode ini dapat diterapkan karena enzim merupakan biokatalis dan mampu menguraikan molekul substrat secara spesifik. Sebagai gambaran, dalam proses hidrolisis pati menjadi gula reduksi, enzim yang sesuai untuk digunakan adalah α -

amilase, karena enzim α -amilase merupakan enzim yang bekerja dengan memutuskan ikatan α -1,4-D-glikosidik pada molekul pati, baik amilosa maupun amilopektin (Purba, 2001). Enzim α -amilase dapat dihasilkan dari beberapa mikroorganisme, seperti *Bacillus subtilis*, *Rhizopus oligosporus*, *Bacillus species*, *Bacillus licheniformis*, dan *Aspergillus oryzae* (Bemiller and Whistler, 2009)

Dalam bidang bioetanol, metode enzimatik ini telah dipelajari oleh banyak peneliti. Metode ini telah digunakan oleh Leaes *et al.* (2013) untuk menghasilkan gula reduksi dari onggok singkong menggunakan enzim α -amilase dan amiloglukosidase. Hasil penelitian menunjukkan kedua jenis enzim bekerja cukup baik menghasilkan gula reduksi sekitar 21,3-83 g/L dengan enzim α -amilase dan sekitar 32.8-116,1 g/L dengan enzim amiloglukosidase.

Baskar *et al.* (2008) meneliti hidrolisis enzimatik tepung singkong dengan ukuran 80/120 mesh untuk mempelajari pengaruh beberapa variabel seperti konsentrasi pati, suhu, waktu, dan konsentrasi enzim. Dari penelitian tersebut disimpulkan bahwa kondisi optimum adalah konsentrasi pati 4,5% (b/v), suhu 45 °C, waktu 150 menit, dan konsentrasi enzim 1% (b/v) enzim, dengan kadar glukosa dalam hidrolisat sebesar 5,17 mg/mL. Bahan baku yang sama juga telah diteliti oleh Srinorakutara *et al.* (2006) menggunakan campuran enzim selulase dan pektinase dan menemukan bahwa kondisi optimum untuk hidrolisis adalah pada suhu 28 °C, waktu 1 jam, dan pH 4,5. Dalam penelitian yang sama ditemukan juga bahwa kondisi optimum untuk α -amilase adalah pada pH 5,5; waktu 2 jam, dan suhu 100 °C, sementara untuk glukoamilase kondisi optimum adalah pH 4,5; suhu 60°C , dan waktu 24 jam menghasilkan gula reduksi tertinggi sebesar 6,2% (b/v).

Meskipun hidrolisis enzimatis bekerja cukup baik, namun metode ini memiliki beberapa kelemahan praktis, seperti biaya yang relatif mahal, pengerjaannya memerlukan kondisi yang aseptik, dan membutuhkan waktu yang lama. Karena kelemahan tersebut, hingga dewasa ini hidrolisis asam masih lebih umum digunakan dalam industri bioetanol, karena dalam penerapannya lebih cepat dan efisien, tidak memerlukan kondisi aseptik, dan biaya yang digunakan relatif lebih murah. Oleh karena itu dalam penelitian ini digunakan metode hidrolisis asam untuk menghasilkan gula reduksi.

Untuk mengoptimalkan produksi bioetanol dari pati, langkah lain yang sedang dikembangkan adalah praperlakuan agar pati dapat dihidrolisis lebih mudah. Dalam penerapan praperlakuan ini beberapa syarat perlu diperhatikan yakni mampu meningkatkan laju pembentukan gula, tidak mengakibatkan degradasi atau kehilangan karbohidrat, tidak menghasilkan produk samping yang dapat menghambat proses hidrolisis dan fermentasi, serta biaya yang dikeluarkan harus seminimal mungkin (Sun and Cheng, 2002).

Dewasa ini beberapa metode praperlakuan telah dikembangkan dan secara garis besar dapat digolongkan menjadi praperlakuan fisik dan kimia (Sun and Cheng, 2002). Praperlakuan fisik pada dasarnya adalah praperlakuan tanpa melibatkan penggunaan bahan kimia yang dapat mempengaruhi struktur molekul pati. Tiga metode yang paling umum digunakan adalah perebusan, pengecilan ukuran secara mekanik, dan radiasi berenergi tinggi.

Praperlakuan dengan perebusan umumnya dilakukan dengan merebus bahan baku pada suhu dan tekanan tinggi (Brandon *et al.*, 2008). Keuntungan utama metode ini adalah tidak menghasilkan hasil samping berupa inhibitor yang dapat menghambat fermentasi gula (Perez *et al.*, 2007), dan mampu meningkatkan kemudahan hidrolisis hingga mencapai konversi pati menjadi gula reduksi sampai 96 % (Perez *et al.*, 2007).

Pengecilan ukuran secara mekanik dapat dilakukan dengan pencacahan, penumbukan, dan penggilingan yang bertujuan untuk merusak kristalinitas, menurunkan derajat polimerisasi, dan meningkatkan luas permukaan spesifik dari molekul pati sehingga dapat terhidrolisis lebih mudah. Metode ini telah diterapkan oleh Zhang *et al.* (2007) terhadap *hardwood* dengan praperlakuan penggilingan menyebabkan rata-rata ukuran partikel menjadi 21 μm dan meningkatkan luas permukaan spesifik menjadi 0,8 m^2/g setelah 40 kali penggilingan. Penggilingan mekanik juga menyebabkan putusannya ikatan hidrogen, pengurangan kristalinitas, dan indeks kristalinitas bubuk selulosa menurun dari 65 menjadi 22.

Praperlakuan dengan radiasi berenergi tinggi juga telah dikembangkan dengan memanfaatkan beberapa jenis radiasi, antara lain sinar- γ (Yang *et al.*, 2008), ultrasonikasi (Nityavardhana *et al.*, 2008 dan Mojović *et al.*, 2009), radiasi berkas elektron (Bak *et al.*, 2009), dan gelombang mikro (Ma *et al.*, 2009). Praperlakuan sebelum hidrolisis dengan radiasi berenergi tinggi dapat merubah struktur polisakarida termasuk peningkatan luas permukaan, penurunan derajat polimerisasi dan kristalinitas dari molekul polisakarida. Dari berbagai teknik di

atas, praperlakuan dengan metode ultrasonikasi merupakan metode yang paling potensial, karena metode ini telah banyak diterapkan untuk berbagai tujuan.

Sebagai gambaran Mojović *et al.* (2009) mempelajari efek praperlakuan ultrasonikasi pati dengan frekuensi 40 kHz selama 2,5 menit, kemudian sampel diberi perlakuan termal yang berbeda, yakni pada suhu 30; 50, dan 60 °C dalam *water-batch* selama 1 jam dan didinginkan sampai suhu 20 °C untuk kemudian dianalisis kadar total gula fermentasi dan gula tunggal seperti glukosa, maltosa, dan maltotriosa. Hasil analisis menunjukkan bahwa kadar total gula fermentasi dan gula tunggal meningkat seiring dengan meningkatnya suhu perlakuan termal. Pada suhu 60 °C yang merupakan suhu maksimum perlakuan termal, kadar total gula fermentasi diperoleh sebesar 52,70% per berat kering dan untuk tunggal, diperoleh glukosa sebesar 2,65%, maltosa 35,72%, dan 2,89% untuk maltotriosa.

Berbeda dengan praperlakuan fisik, praperlakuan kimia diterapkan dengan menggunakan bahan kimia yang mampu mengubah karakteristik molekul pati hingga lebih mudah diuraikan pada saat hidrolisis. Praperlakuan kimia dapat digunakan karena dapat menurunkan derajat polimerisasi dan kristalinitas komponen polisakarida. Dua contoh praperlakuan kimia yang banyak digunakan adalah pelarutan dalam senyawa organik (*organosolv*) dan perebusan dalam suasana asam.

Pelarutan dalam senyawa organik merupakan proses delignifikasi menggunakan pelarut organik atau campuran pelarut organik dengan atau tanpa katalis asam (Pan *et al.*, 2007; Taherzadeh and Karimi, 2008). Pelarut organik yang umum digunakan antara lain metanol, etanol, aseton, etilen glikol, glikol trietilen,

alkohol tetrahidrofurfuril, gliserol, larutan fenol, dan n-butanol (Taherzadeh and Karimi, 2008). Dari senyawa organik di atas, alkohol seperti etanol dan metanol merupakan pelarut yang paling banyak digunakan karena harga yang relatif murah (Sidiras and Koukios, 2004). Karena pelarut organik umumnya bersifat volatil, penerapan metode ini memerlukan peralatan bertekanan tinggi, sehingga memerlukan teknologi tinggi.

Praperlakuan perebusan dalam suasana asam berbeda dengan praperlakuan perebusan dalam air mendidih, dalam praperlakuan ini dilakukan penambahan bahan kimia sebagai katalis yang memiliki fungsi untuk mempertahankan nilai pH agar konstan di atas 5 dan di bawah 7, sehingga tidak menyebabkan unjuk kerja hidrolisis berkurang untuk menghasilkan monosakarida (Weil *et al.*, 1998). Sebagai gambaran Mosier *et al.* (2005) mempelajari praperlakuan ini berbasis serat jagung pada suhu 160 °C dan pH di atas 4,0. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa dengan praperlakuan pada kondisi tersebut dapat melarutkan serat jagung sekitar 50% selama 20 menit, sehingga praperlakuan ini dapat memudahkan hidrolisis enzimatik untuk mengurai polisakarida menjadi monosakarida.

Dalam penelitian ini upaya peningkatan produksi gula reduksi dari onggok akan dilakukan dengan praperlakuan fisik meliputi penggilingan dan ultrasonikasi. Berdasarkan frekuensinya, gelombang ultrasonik dibagi menjadi tiga yaitu ultrasonik frekuensi rendah (16–100 kHz), ultrasonik frekuensi tinggi (100 kHz–1 MHz), dan ultrasonik diagnostik (1–10 MHz) (Patist and Bates, 2008). Berdasarkan ketiga jenis gelombang ultrasonik tersebut, maka dalam penelitian

ini, gelombang ultrasonik yang digunakan masuk dalam jenis gelombang ultrasonik frekuensi rendah, yakni 40 kHz.

Penggilingan ongkok dimaksudkan merusak kristalinitas pati, menurunkan derajat polimerisasi dan meningkatkan luas permukaan molekul akibat pemecahan menjadi partikel yang lebih kecil. Praperlakuan dengan ultrasonikasi dimaksudkan untuk menimbulkan kavitasi (rongga) pada molekul pati, sehingga lebih mudah diakses oleh asam pada saat dihidrolisis (Nityavardhana *et al.*, 2008; Nikolic' *et al.*, 2010).

E. Analisis Gula Reduksi

Gula reduksi hasil hidrolisis asam dapat dianalisis secara kualitatif untuk mengidentifikasi apakah sampel mengandung gula reduksi atau tidak dan secara kuantitatif untuk menentukan kadar gula reduksi yang terbentuk. Untuk maksud tersebut, analisis gula reduksi secara kualitatif dapat dilakukan dengan uji Benedict, uji Fehling, uji Barfoed, uji Tollens, dan uji Molisch (Mathews *et al.*, 2000), sedangkan analisis gula reduksi secara kuantitatif dapat dilakukan dengan beberapa metode seperti metode Luff Schoorl (Kowalski *et al.*, 2013), Nelson-Somogyi (Woiciechowski *et al.*, 2002), dan DNS (Lone *et al.*, 2012).

Pada penelitian ini, metode Fehling digunakan untuk analisis gula reduksi secara kualitatif. Untuk maksud tersebut digunakan reagen Fehling yang merupakan campuran dari Fehling A dan Fehling B, dimana Fehling A merupakan larutan CuSO_4 , sedangkan Fehling B merupakan larutan yang terdiri dari NaOH dan Na-K-tartrat. Prinsip kerja reagen Fehling ini adalah gula reduksi bereaksi dengan

Fehling B membentuk enediol, kemudian enediol bereaksi dengan Fehling A membentuk ion Cu^{2+} dan campuran asam-asam. Selanjutnya ion Cu^{2+} dalam suasana basa akan mengendap menjadi endapan Cu_2O berwarna hijau, kuning-orang, atau merah bata tergantung jenis gula reduksi yang diuji (Mathews *et al.*, 2000). Adapun mekanisme reaksi antara gula reduksi dan reagen Fehling dapat dilihat dalam persamaan reaksi sebagai berikut.



Metode Luff-Schoorl merupakan metode analisis gula reduksi sebelum dan sesudah inversi. Prinsip metode ini adalah pengurangan ion tembaga (II) oleh gugus karbonil yang terdapat pada gula reduksi. Berkurangnya jumlah tembaga dihitung berdasarkan perbedaan volume tiosulfat yang digunakan sebelum dan sesudah uji (Kowalski *et al.*, 2013).

Srinorakutara *et al.* (2006) mengukur kadar glukosa hasil hidrolisis ongkok secara kuantitatif menggunakan metode Nelson Somogyi. Setelah sampel dicampur dengan reagen uji, absorbansi diukur pada 520 nm terhadap larutan blanko yang tepat dengan menggunakan spektrofotometer UVModel Uvikon-xs. Jumlah gula pereduksi ditentukan dengan kurva kalibrasi yang diperoleh dengan menggunakan D-glukosa sebagai standar.

Dalam penelitian Sadasivam and Manickam (2008) dilakukan analisis gula reduksi menggunakan reagen Dinitrosalisyllic (DNS) dimana 0,5 ml sampel limbah terhidrolisis dan yang belum dihidrolisis dimasukkan dalam tabung reaksi

dan ditambahkan 0,5 mL akuades. Kemudian tabung reaksi diinkubasi pada suhu kamar selama 5 menit, ditambahkan reagen DNS, dihomogenkan dan tabung reaksi dimasukkan dalam *water-bath* pada suhu 70 °C selama 10 menit. Tabung reaksi didinginkan dalam air dingin dan ditambahkan 40% Na-K tartrat untuk menjaga warna. Untuk blanko disiapkan 1 mL akuades dalam tabung reaksi. Larutan standar disiapkan dengan membuat larutan glukosa konsentrasi 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 dan 1 gram per mL. kemudian masing-masing larutan standar glukosa dipreparasi seperti preparasi sampel di atas. Warna merah terang pada sampel setelah preparasi diukur pada panjang gelombang 540 nm. Hasil absorbansi yang diperoleh dibandingkan dengan kurva standar untuk mengetahui konsentrasi gula reduksi dalam sampel. Dengan cara ini kadar gula reduksi sebelum dan sesudah hidrolisis dapat diketahui.

Melihat unjuk kerja beberapa metode analisis kuantitatif gula reduksi di atas, metode analisis dengan reagen DNS terlihat lebih spesifik untuk mengetahui seberapa besar kadar gula reduksi yang terdapat dalam sampel. Selain itu metode analisis kadar gula reduksi menggunakan reagen DNS merupakan metode yang paling banyak digunakan untuk menentukan kadar gula reduksi.

Reagen dinitrosalisilat (DNS) dapat dibuat dengan melarutkan asam 3,5-dinitrosalisilat, NaOH, Na₂SO₃, Na-K-tartarat, fenol, dan akuades. DNS merupakan senyawa aromatis yang jika bereaksi dengan gula reduksi akan membentuk asam 3-amino-5-nitrosalisilat, yakni senyawa yang dapat 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 gula reduksi dengan reagen DNS merupakan reaksi redoks dimana gugus aldehid gula yang bertindak sebagai pereduksi akan teroksidasi menjadi gugus karboksil, sedangkan DNS yang bertindak sebagai oksidator akan tereduksi membentuk asam 3-amino dan 5-nitrosalisilat. Bila terdapat gula reduksi pada sampel, maka larutan DNS yang awalnya berwarna kuning bereaksi dengan gula reduksi dalam suhu tertentu menimbulkan warna jingga kemerahan.

Reaksi ini biasanya berlangsung dalam suasana basa dan suhu tinggi sekitar 90-100 °C (Kusmiati dan Agustini, 2010). Adapun reaksi yang terjadi dapat dilihat dalam persamaan reaksi sebagai berikut.

Setelah sampel dipreparasi menggunakan DNS, warna yang timbul ditentukan serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Spektrofotometer UV-Vis merupakan alat untuk mengukur absorbansi dan transmitansi suatu sampel pada panjang gelombang tertentu.

Spektrofotometer ini menggunakan dua buah sumber cahaya, yakni lampu Hidrogen atau Deuterium sebagai sumber cahaya UV dan lampu Tungsten sebagai sumber cahaya tampak. Larutan sampel yang telah dipreparasi diukur absorbansinya terhadap sinar ultra violet atau sinar tampak yang ada dalam

spektrofotometer UV-vis. Konsentrasi larutan sampel yang dianalisis akan sebanding dengan jumlah sinar yang diserap oleh zat yang terdapat dalam sampel.

Prinsip kerja spektrofotometer UV-Vis ini didasarkan pada Hukum Lambert-Beer yang menyatakan hubungan antara absorbansi cahaya dengan konsentrasi zat dalam larutan 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

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

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

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

Kadar gula reduksi pada sampel dapat ditentukan dengan membuat kurva standar larutan glukosa. Kurva standar dipreparasi dengan reagen DNS seperti preparasi sampel di atas, kemudian absorbansinya diukur pada panjang gelombang maksimum. Dalam penelitian ini panjang gelombang maksimum yang digunakan adalah 550 nm (Kusmiati dan Agustini, 2010). Hasil absorbansi larutan standar glukosa tersebut diplotkan ke dalam kurva dimana y merupakan absorbansi dan x merupakan konsentrasi sampel, sehingga diperoleh persamaan garis $y = ax + b$. Kemudian kadar gula reduksi dalam sampel ditentukan dengan memasukan nilai absorbansi sampel ke dalam persamaan kurva standar yang diperoleh.

F. Fermentasi Alkohol

Fermentasi alkohol merupakan konversi gula reduksi menjadi alkohol oleh mikroorganisme seperti enzim, bakteri, atau jamur. Menurut Gervais (2008) proses fermentasi terjadi melalui serangkaian reaksi biokimiawi yang mengubah bahan kering menjadi energi (panas), molekul air (H₂O) dan CO₂. Perubahan dapat terjadi karena pertumbuhan mikroorganisme (bakteri asam laktat), proses dekomposisi substrat dan perubahan kadar air. Perubahan kadar air terjadi akibat evaporasi, hidrolisis substrat atau produksi air metabolik. Etanol merupakan salah satu jenis alkohol yang dihasilkan dari proses fermentasi. Etanol biasanya terdapat dalam minuman beralkohol. Dalam kehidupan sehari-hari etanol dapat digunakan sebagai bahan bakar yang diperoleh dengan cara fermentasi oleh ragi. Etanol dan gas CO₂ merupakan hasil dari fermentasi gula reduksi secara anaerob. Adapun reaksi yang terjadi adalah sebagai berikut.



Mikroba yang umum digunakan dalam fermentasi adalah bakteri, ragi dan kapang. Beberapa contoh proses fermentasi diantaranya adalah pembuatan tempe, tape, susu fermentasi dan sebagainya. Salah satu mikroba yang terlibat pada fermentasi alkohol adalah *Saccharomyces cerevisiae*. Fermentasi dapat dilakukan dengan menggunakan kultur murni ataupun alami serta dengan kultur tunggal ataupun campuran. Fermentasi dengan menggunakan kultur alami umumnya dilakukan pada proses fermentasi tradisional yang memanfaatkan mikroba yang ada di lingkungan.

Ada beberapa faktor yang dapat mengoptimalkan unjuk kerja proses fermentasi (Subekti, 2006). Adapun faktor- faktor tersebut adalah suhu, pH, oksigen, substrat. Suhu pertumbuhan mikroorganisme yang digunakan dalam proses fermentasi dipengaruhi oleh suhu pada saat proses fermentasi berlangsung. Secara umum suhu optimal untuk proses fermentasi adalah 30-40 °C. Mikroorganisme dapat tumbuh pada kisaran pH tertentu yang sesuai untuk pertumbuhannya. Seperti, *Saccharomyces cerevisiae* memerlukan pH 4-5, agar dapat tumbuh dengan baik. Oksigen merupakan faktor utama dalam pengendalian fermentasi. Dalam proses fermentasi, oksigen yang digunakan harus dalam tekanan yang serendah mungkin, karena jika tekanan oksigen yang diberikan lebih besar, maka pertumbuhan mikroorganisme semakin meningkat sedangkan produksi etanol menurun. Dalam pertumbuhannya, mikroorganisme membutuhkan asupan makanan, makanan yang dibutuhkan mikroorganisme harus mengandung nutrisi dalam porsi yang sesuai untuk pertumbuhannya.

Berdasarkan beberapa faktor yang mempengaruhi proses fermentasi di atas, ada beberapa jenis mikroorganisme yang umum digunakan dalam fermentasi, antara lain *Zymomonas mobilis* (Zhang and Feng, 2010), *Aspergillus niger* (Manikandan and Viruthagiri, 2009), dan *Saccharomyces cerevisiae* (Oyeleke *et al.*, 2012). *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 sangat mudah ditumbuhkan, membutuhkan nutrisi yang sederhana, laju pertumbuhan yang cepat, dan sangat stabil (Walker, 2010).

Saccharomyces cerevisiae merupakan khamir yang termasuk dalam filum *Ascomycota*. Khamir tersebut dalam bidang bioteknologi konvensional telah digunakan untuk memproduksi beberapa pangan tradisional seperti bir, anggur, wiski, sake, pengembangan roti, tape, dan sebagainya. Dalam bidang bioteknologi modern khamir tersebut telah digunakan sebagai jasad inang eukariotik untuk memproduksi protein-protein heterolog seperti vaksin hepatitis B yang telah ada di pasaran, hemoglobin, serum albumin dan glisin betain (Rachmawati, 2004).

Khoridha (2006), berhasil mengkonversi ampas singkong menjadi etanol dengan kadar alkohol terendah 11,70% pada waktu fermentasi 9 hari dan dosis ragi 2g. Sedangkan kadar alkohol tertinggi 41,67% pada waktu fermentasi 15 hari dan dosis ragi 8 g. Dalam penelitian Tatik (2008), hasil fermentasi tepung singkong menjadi etanol diperoleh kadar alkohol tertinggi 30,60 % pada waktu fermentasi 7 hari dengan dosis ragi 100 g, sedangkan kadar alkohol terendah adalah 13,13 % pada waktu fermentasi 7 hari dengan dosis ragi 50 g. Hal ini menunjukkan semakin lama waktu fermentasi dan banyaknya dosis ragi yang diberikan maka semakin banyak kadar alkohol yang didapatkan.

Selain menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* untuk fermentasi alkohol, kulit kayu raru dapat digunakan sebagai alternatif lain dalam fermentasi alkohol. Raru merupakan salah satu jenis kulit kayu yang dapat digunakan untuk pembuatan minuman tradisional Etnis Batak yang disebut tuak, karena dapat meningkatkan cita rasa dan kadar alkohol jika ditambahkan pada nira aren (Pasaribu dan Setyawati, 2011). Hasil ini mengindikasikan bahwa kulit kayu raru memiliki

potensi untuk dimanfaatkan dalam fermentasi gula reduksi menjadi bioetanol. Indikasi inilah yang menjadi dasar penelitian ini sebagai kajian potensi kulit kayu raru menjadi alternatif mikroorganisme yang umum digunakan dalam industri bioetanol.

Dalam penelitian Pasaribu dan Setyawati (2011) disebutkan bahwa ada empat jenis raru yang terdapat di Sumatera Utara dan Riau, antara lain *Cotylelobium melanoxyton* Pierre, *Shorea balanocarpoides* Symington, *Cotylelobium lanceolatum* Craib, dan *Vatica perakensis* King. Dalam penelitian tersebut jenis raru *Cotylelobium melanoxyton* Pierre merupakan salah satu jenis kayu raru yang berasal dari Kabupaten Tapanuli Tengah. Kayu raru jenis ini memiliki komponen kimia kayu antara lain hemiselulosa 29,26%, alphaselulosa 37,35%, lignin 22,26%, dan pentosan 17,31%. Dalam penelitian yang sama, ditemukan kadar ekstraktif kayu raru yang dapat larut dalam air dingin 3,19%, air panas 9,08%, alkohol benzene 1,76%, dan NaOH 1-19,27%. Berdasarkan beberapa jenis kayu raru yang telah disebutkan di atas, maka dalam penelitian ini akan digunakan kulit kayu raru spesies *Cotylelobium melanoxyton* Pierre, yang didapatkan dari daerah Tapanuli Tengah.

G. Analisis Bioetanol dengan Kromatografi Gas

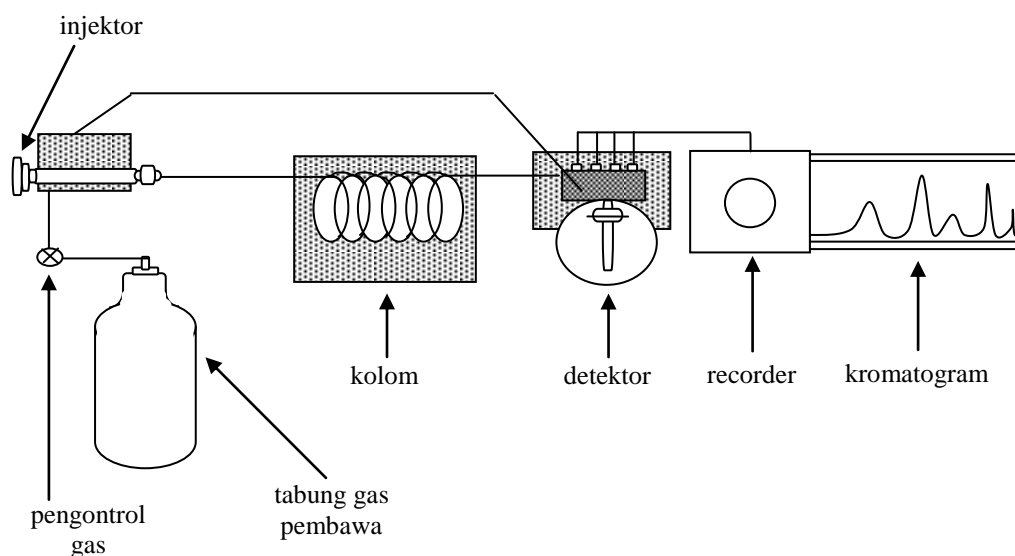
Analisis etanol dapat dilakukan dengan beberapa metode, namun dewasa ini metode yang paling umum digunakan adalah metode kromatografi gas. Metode ini memiliki keunggulan dibanding metode lain, seperti selektivitasnya, sensitifitas, tidak bersifat destruktif, dan mampu menentukan konsentrasi dalam rentang ppm.

Analisis bioetanol dengan kromatografi gas didasarkan pada prinsip kerja kromatografi, yang mampu memisahkan komponen campuran sehingga dapat dideteksi secara individu. Secara garis besar, komponen kromatografi adalah gas pembawa, kolom, injektor, detektor, amplifier, dan recorder. Gas pembawa merupakan fase gerak yang dapat berupa nitrogen, hidrogen, helium, argon. Gas pembawa berfungsi untuk membawa sampel yang akan dianalisis melalui kolom menuju detektor. Syarat yang harus dimiliki gas pembawa antara lain inert, murni, sesuai dengan detektor yang digunakan, murah dan, mudah didapat.

Kolom berfungsi sebagai jalur analit menuju detektor dan sekaligus tempat pemisahan komponen sampel hingga mencapai detektor pada waktu yang berbeda (waktu retensi). Kolom dapat terbuat dari logam tahan karat, gelas atau teflon, kolom yang baik untuk digunakan harus memiliki sifat daya pisah yang tinggi, efisien, analisis cepat, kepekaan tinggi, tidak mengotori detektor, tahan lama, inert, menjamin ketelitian yang tinggi. Di dalam kolom terdapat fase diam, yang berupa zat padat atau cair yang berperan memisahkan sampel menjadi komponennya berdasarkan perbedaan interaksi komponen sampel dengan fase diam.

Injektor merupakan tempat untuk memasukkan sampel ke dalam kolom kromatografi, dimana sampel dalam fase cair diubah menjadi gas yang selanjutnya dibawa oleh gas pembawa menuju detektor. Detektor merupakan pendeteksi senyawa-senyawa yang dipisahkan dari kolom. Syarat yang harus dipenuhi detektor antara lain peka, selektif, responsif, tingkat noise rendah. Amplifier

berfungsi untuk memperbesar respon yang berasal dari detektor. Recorder berfungsi untuk merekam hasil yang diberikan oleh ampliflier dan menampilkan hasilnya dalam bentuk kromatogram. Adapun gambar skematik alat kromatografi gas dapat dilihat pada Gambar 2 sebagai berikut.



Gambar. 2. Skema alat kromatografi gas

Dalam praktiknya, analisis sampel dengan kromatografi gas memerlukan kondisi tertentu sesuai dengan sampel yang akan dianalisis, antara lain kolom, detektor, suhu, laju, dan fasa gerak. Solikhah (2010), mempelajari kromatografi gas untuk analisis kadar etanol pada nira siwalan menggunakan kromatografi gas dengan gas pembawa Helium (He), karena gas ini bersifat inert, murni, tidak mudah terbakar dan mempunyai konduktivitas panas yang tinggi, kolom MS (*molecular sieve*) 5A, dan detektor *thermal conductivity detector* (TCD).

Dalam penelitian lain, Bulan (2004) mempelajari tentang perbandingan metode kromatografi gas dan berat jenis pada penetapan kadar etanol dalam minuman

anggur menggunakan kolom DB-1 (30 m X 0.25 mm) dan detektor FID (*Flame ionization detektor*), dan mendapatkan hasil yang praktis sama.