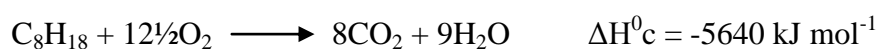
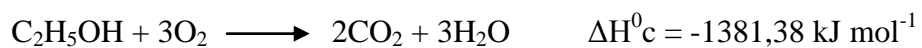


## II. TINJAUAN PUSTAKA

### A. Bioetanol

Bioetanol adalah istilah yang digunakan untuk etanol yang dihasilkan dari proses fermentasi gula reduksi, untuk membedakannya dari etanol yang dihasilkan dengan cara sintesis. 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 dibandingkan bahan bakar fosil. Bioetanol termasuk bahan bakar ramah lingkungan karena gas CO<sub>2</sub> yang dihasilkan dari pembakarannya jauh lebih kecil dibandingkan CO<sub>2</sub> yang dihasilkan dari pembakaran bahan bakar fosil. Sebagai contoh, reaksi pembakaran 1 mol etanol akan menghasilkan 2 mol gas CO<sub>2</sub>, sementara pembakaran 1 mol isooktana (kandungan utama pada *gasoline*) akan menghasilkan 8 mol CO<sub>2</sub>, seperti terlihat dalam reaksi berikut ini.



Energi yang dihasilkan dari pembakaran 1 mol etanol adalah sebesar 1381,38 kJ dan energi yang dihasilkan dari pembakaran 1 mol isooktana adalah sebesar 5460 kJ. Dilihat dari sisi CO<sub>2</sub> yang dihasilkan, pembakaran 4 mol etanol setara dengan pembakaran 1 mol isooktana. Energi yang dihasilkan untuk pembakaran 4 mol etanol adalah sebesar 5525,52 kJ. Artinya dengan jumlah CO<sub>2</sub> yang sama, pembakaran etanol menghasilkan energi yang jauh lebih besar daripada pembakaran isooktana, dengan selisih energi sebesar 65,52 kJ.

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. Tiga diantaranya yang paling banyak dimanfaatkan adalah pati (Zamora *et al.*, 2010; Anozie and Aderibigbe, 2011), selulosa (Yu and Zhang, 2004; Wyman, 2008), dan lignoselulosa (Sun and Cheng, 2002; Mosier *et al.*, 2005).

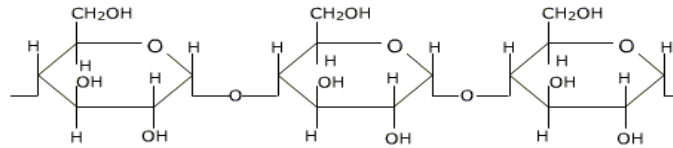
Di Indonesia, industri bioetanol berbahan baku pati memiliki potensi yang sangat besar karena didukung oleh ketersediaan bahan baku yang melimpah, salah satunya adalah onggok. Onggok merupakan limbah padat industri tapioka yang diketahui mengandung pati sebesar 50-70% (Pandey *et al.*, 2000). Di samping itu, pertanian ubi kayu merupakan potensi yang banyak ditemukan di berbagai daerah di Indonesia, termasuk Provinsi Lampung. Sebagai gambaran, data statistik tahun 2011 (BPS Provinsi Lampung, 2012) menunjukkan di Provinsi Lampung terdapat

pertanian ubi kayu dengan luas sekitar 368.000 ha dengan produksi mencapai 9.200.000 ton/tahun. Pengolahan ubi kayu menjadi tepung tapioka menghasilkan onggok sekitar 10-30% (Pandey *et al.*, 2000). Hal ini berarti di Provinsi Lampung tersedia onggok sekitar 920.000-2.700.000 ton/tahun.

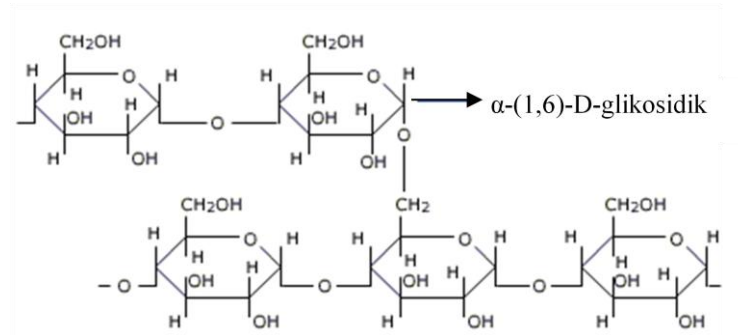
Dalam pemanfaatan onggok sebagai bahan baku bioetanol, langkah pertama adalah proses hidrolisis untuk memecah molekul pati menjadi gula reduksi yang selanjutnya dapat difermentasi menjadi bioetanol. Tahapan hidrolisis ini diperlukan karena onggok tidak dapat difermentasi secara langsung. Hidrolisis pati menghasilkan gula reduksi dapat dilakukan karena pati memiliki struktur yang reaktif terhadap hidrolisis. Reaktifitas terhadap hidrolisis dimiliki oleh pati karena adanya ikatan  $\alpha$ -(1,4)-D-glikosidik, yang dapat dipecah menghasilkan gula reduksi.

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 dan 2. Seperti terlihat dalam Gambar 1 dan 2, kedua jenis pati memiliki ikatan  $\alpha$ -(1,4)-D-glikosidik, namun pada amilopektin terdapat percabangan pada posisi  $\alpha$ -(1,6)-D-glikosidik.

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.



**Gambar 1.** Struktur amilosa



**Gambar 2.** Struktur amilopektin

## B. Metode Hidrolisis Pati

Untuk menghasilkan gula reduksi dari pati, dewasa ini telah dikenal berbagai jenis metode hidrolisis, yang secara umum dibedakan menjadi hidrolisis asam, dan enzimatik. Hidrolisis asam adalah reaksi pemecahan molekul polisakarida dengan air yang dikatalis oleh asam. Jenis asam yang paling banyak digunakan untuk proses ini adalah asam klorida (Barnali *et al.*, 2008; Olorunsola *et al.*, 2011) dan asam sulfat (Zamora *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2012). Selain jenis asam, konsentrasi asam juga sangat penting untuk diperhatikan dalam proses hidrolisis. Hidrolisis dengan asam pekat menghasilkan kadar gula reduksi yang lebih tinggi dibandingkan hidrolisis dengan asam encer (Mishra *et al.*, 2011).

Dari beberapa penelitian ditemukan bahwa hidrolisis asam juga sangat bergantung pada pH, waktu, suhu, dan pengadukan. Anozie and Aderibigbe (2011)

melakukan penelitian tentang hidrolisis pati dari tepung ubi kayu 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%.

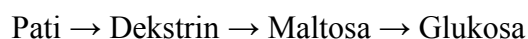
Selain dengan hidrolisis asam, metode lain yang juga banyak dikembangkan dewasa ini adalah hidrolisis enzimatik. Enzim adalah biomolekul berupa protein yang berfungsi sebagai katalis dalam suatu reaksi kimia organik. Enzim bereaksi dengan molekul substrat dan bekerja secara spesifik, artinya setiap enzim hanya dapat bekerja pada suatu reaksi biokimia tertentu dengan substrat yang sesuai. Sebagai contoh, dalam proses hidrolisis pati menjadi glukosa, enzim yang sesuai untuk digunakan adalah  $\alpha$ -amilase dan glukoamilase. Enzim  $\alpha$ -amilase merupakan endo-enzim yang bekerja dengan memutuskan ikatan  $\alpha$ -1,4-D-glikosidik secara acak di bagian dalam molekul pati, baik amilosa maupun amilopektin (Purba, 2001). Enzim  $\alpha$ -amilase berperan pada tahap likuifikasi, yaitu proses hidrolisis pati secara parsial pada suhu tinggi menghasilkan dekstrin dan oligosakarida bermonomer dua hingga enam (Shin *et al.*, 2000). Enzim glukoamilase (amiloglukosidase) merupakan ekso-enzim yang bekerja memutuskan ikatan  $\alpha$ -1,4-D-glikosidik di bagian luar secara berurutan dari ujung gula non-pereduksi rantai amilosa maupun amilopektin, dan mampu memutuskan ikatan  $\alpha$ -1,6-D-glikosidik pada titik percabangan amilopektin. Enzim glukoamilase berperan pada tahap sakarifikasi, yaitu proses lebih lanjut dari hidrolisis pada suhu rendah hingga dihasilkan glukosa (Shin *et al.*, 2000).

Enzim  $\alpha$ -amilase memiliki beberapa sisi aktif yang dapat mengikat 4 hingga 10 molekul substrat sekaligus sehingga proses hidrolisisnya lebih cepat dibanding dengan glukoamilase (Bemiller and Whistler, 2009). Enzim  $\alpha$ -amilase dan glukoamilase banyak terdapat di dalam tanaman, antara lain kedelai, kentang, gandum, dan jagung, juga dapat dihasilkan dari beberapa mikroba, misalnya bakteri *Bacillus subtilis*, kapang *Rhizopus oligosporus*, jamur *Aspergillus oryzae*

dan *Aspergillus niger*, dan ragi *Saccharomyces diastaticus* (Bemiller and Whistler, 2009).

Apar and Özbek (2004) melakukan penelitian hidrolisis pati secara enzimatik dari bahan baku jagung, beras, dan gandum dengan variasi sumber enzim  $\alpha$ -amilase. Tiga jenis enzim  $\alpha$ -amilase yang digunakan berasal dari mikroba *Bacillus species*, *Bacillus licheniformis*, dan *Aspergillus oryzae*. Hidrolisis dilakukan di dalam reaktor curah pada suhu 40 °C selama 90 menit dengan kecepatan rotasi sebesar 300 rpm dan pH  $6,5 \pm 0,05$ . Konsentrasi pati yang digunakan adalah sebesar 10 g/L. Hasil percobaan menunjukkan bahwa enzim yang bekerja paling baik adalah yang diperoleh dari *Bacillus licheniformis*, menghasilkan gula reduksi sebesar 40,4% dari pati jagung, 48,1% dari pati beras, dan 58,1% dari pati gandum. Penelitian lain mengenai hidrolisis pati secara enzimatik juga dilaporkan oleh Rahmasari dan Putri (2011). Dalam penelitian tersebut, sumber pati yang digunakan adalah onggok dan enzim yang digunakan adalah  $\alpha$ -amilase, glukoamilase, selulase, dan pektinase. Percobaan dilakukan dalam *shaker incubator* dengan suhu 30 °C dan kecepatan 150 rpm selama 60 jam. Dari hasil penelitian diperoleh bahwa hidrolisis menggunakan enzim glukoamilase selama 24 jam menghasilkan kadar gula reduksi yang paling tinggi, yaitu sebesar 115,89 g/L.

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 enzimatis 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 enzimatis. Dengan demikian, dalam penelitian ini 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.

### **C. Praperlakuan Hidrolisis**

Berbagai macam metode praperlakuan telah dilakukan untuk mengoptimalkan rendemen hidrolisis. Secara umum, metode praperlakuan dikategorikan menjadi tiga jenis, yaitu metode praperlakuan fisik, fisiko-kimia, dan kimia (Sun and Cheng, 2002; Balat *et al.*, 2008).

Metode praperlakuan fisik dapat dilakukan dengan pengecilan ukuran secara mekanik dengan dicacah, ditumbuk, atau digiling, dan radiasi berenergi tinggi. Metode pengecilan ukuran bahan baku bertujuan untuk merusak kristalinitas pati, menurunkan derajat polimerisasi, dan meningkatkan luas permukaan molekul pati sehingga proses hidrolisis dapat berlangsung lebih cepat dan mudah (Zhang *et al.*,



2007). Metode praperlakuan menggunakan radiasi berenergi tinggi yang pernah dilakukan antara lain dengan sinar- $\gamma$  (Yang *et al.*, 2008), ultrasonikasi (Nityavardhana *et al.*, 2008), radiasi dengan berkas elektron (Shin and Sung, 2008), dan gelombang mikro (Balcu *et al.*, 2011). Praperlakuan dengan radiasi berenergi tinggi ini dapat meningkatkan luas permukaan bahan baku karena dapat merusak struktur polimer polisakarida.

Nicolić *et al* (2010) melakukan penelitian hidrolisis pati jagung untuk memproduksi bioetanol dengan metode praperlakuan fisik, yaitu dengan penggilingan dan ultrasonikasi. Mula-mula jagung digiling sampai ukuran diameter partikelnya menjadi 0,2-1,7 mm. Kemudian sebanyak 100 gram sampel jagung yang telah digiling dicampur dengan 300 mL akuades dan diultrasonikasi pada frekuensi 40 kHz selama 0,5; 1; 3; 5; 10; 20; dan 30 menit pada suhu 30, 60, dan 80 °C. Kadar gula reduksi tertinggi dihasilkan dari hidrolisis sampel dengan praperlakuan ultrasonikasi selama 5 menit pada suhu 60 °C, yaitu sebesar 105 g/L.

Metode praperlakuan fisiko-kimia terdiri dari *steam explosion* (autohidrolisis), *ammonia fiber explosion* (AFEX), *CO<sub>2</sub> explosion*, dan *Liquid Hot Water* (LHW).

Metode *steam explosion* (autohidrolisis) dilakukan dengan cara menyemprotkan sampel dengan uap air pada suhu dan tekanan tinggi, yaitu suhu antara 160-240 °C dan tekanan antara 0,7-4,8 MPa, kemudian tekanannya diturunkan secara cepat sehingga sampel mengalami dekompresi eksplosif (Agbor *et al.*, 2011). Metode praperlakuan dengan *ammonia fiber explosion* (AFEX) memiliki prinsip kerja yang hampir sama dengan *steam explosion*. Bedanya dengan *steam explosion*

adalah proses AFEX menggunakan ammonia cair, sedangkan *steam explosion* menggunakan uap air (Zheng *et al.*, 2009).

Metode lainnya yang juga menggunakan prinsip kerja seperti *steam explosion* dan AFEX adalah *CO<sub>2</sub> explosion*, namun metode ini tidak dilakukan pada suhu tinggi. Ketika terjadi dekompresi secara eksplosif, *CO<sub>2</sub>* akan membentuk asam karbonat dan dapat meningkatkan laju hidrolisis. Metode praperlakuan ini menghasilkan rendemen yang lebih tinggi dibandingkan metode *steam explosion*, biaya yang lebih ekonomis dibandingkan metode AFEX, dan tidak menyebabkan pembentukan inhibitor karena dilakukan pada suhu yang rendah. Akan tetapi, metode ini memiliki kelemahan, yaitu cukup rumit dan prosesnya kompleks (Kumar *et al.*, 2009). Metode praperlakuan fisiko-kimia juga dapat dilakukan tanpa proses dekompresi eksplosif, yakni dengan perebusan sampel dalam air panas pada suhu 150-230 °C selama 5-20 menit. Dalam metode ini, pH larutan harus berada pada rentang 5-7. Biasanya ke dalam larutan sampel perlu ditambahkan suatu basa, misalnya KOH, agar pH tetap terkontrol. Metode perebusan dengan pH terkontrol ini umumnya digunakan untuk bahan baku serat jagung (Mosier *et al.*, 2005)

Dien *et al.* (2008) telah menerapkan metode praperlakuan fisiko-kimia dalam penelitiannya untuk menghidrolisis butir padi yang telah dikeringkan menjadi gula reduksi. Metode fisiko-kimia yang digunakan adalah AFEX dan perebusan dengan pH terkontrol. Rendemen gula reduksi yang dihasilkan dari hidrolisis sampel dengan konsentrasi 20% (w/w) menggunakan metode praperlakuan AFEX

adalah 278 gram dan menggunakan metode perebusan dengan pH terkontrol adalah 261 gram.

Metode praperlakuan kimia umumnya terdiri dari praperlakuan dengan ozonolisis, dan pelarutan dalam pelarut organik (*organosolv*). Ozonolisis merupakan metode praperlakuan dengan menggunakan ozon untuk memutuskan ikatan pada serat selulosa sehingga komponen lignin tereduksi dan menghasilkan molekul yang lebih sederhana (Garcia-Cubero *et al.*, 2009). Ozon merupakan zat pengoksidasi yang kuat, larut dalam air, dan kereaktifannya tinggi terhadap senyawa yang memiliki ikatan rangkap terkonjugasi (Garcia-Cubero *et al.*, 2009). Ozonolisis memiliki keuntungan antara lain prosesnya dilakukan pada suhu dan tekanan yang rendah dan tidak menghasilkan senyawa yang bersifat toksik, namun metode ini memerlukan biaya yang relatif mahal (Sun and Cheng, 2002).

Pelarutan dalam senyawa organik (*organosolv*) merupakan proses delignifikasi menggunakan pelarut organik atau campuran pelarut organik dengan atau tanpa katalis asam/basa (Pan *et al.*, 2007). Pelarut organik yang biasanya digunakan adalah metanol, etanol, butanol, etil glikol, gliserol, fenol, dan aseton (Pan *et al.*, 2007). *Organosolv* ini dilakukan pada rentang suhu 150–200 °C, dan pada suhu di atas 185 °C, proses dapat dilangsungkan tanpa katalis. Metode ini menghasilkan senyawa yang lebih murni dibandingkan dengan metode praperlakuan lainnya, namun prosesnya kompleks dan memerlukan biaya yang mahal (Katzen *et al.*, 1995).

Banyak penelitian yang telah menggunakan metode praperlakuan kimia, salah satunya adalah penelitian yang dilakukan oleh Mesa *et al.* (2011). Dalam

penelitian tersebut, bahan baku ampas tebu dihidrolisis secara enzimatik dengan bantuan praperlakuan organosolv. Pelarut yang digunakan adalah campuran etanol dan larutan NaOH. Proses organosolv dilakukan pada suhu, waktu, dan konsentrasi etanol yang berbeda-beda. Kondisi optimum dari praperlakuan organosolv adalah konsentrasi etanol 30% (v/v), pada suhu 195 °C selama 60 menit dan rendemen gula reduksi yang dihasilkan adalah 29,1 gram/ 100 gram ampas tebu.

Dalam penelitian ini, metode yang digunakan untuk meningkatkan rendemen gula reduksi adalah metode praperlakuan fisik, yaitu dengan metode pengecilan ukuran bahan baku secara mekanik, dan ultrasonikasi. Pengecilan ukuran bahan baku secara mekanik dilakukan dengan cara penggilingan. Pengkajian metode ultrasonikasi ini didasarkan pada penelitian sebelumnya (Trisnawati, 2008; Nicolíc *et al.*, 2010) yang menunjukkan bahwa perlakuan ultrasonikasi mampu mengakibatkan terjadinya kavitasi sehingga molekul pati dapat lebih mudah dihidrolisis.

#### **D. 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 (5000 K pada tekanan 1000 atm dengan laju pemanasan dan pendinginan 10<sup>10</sup> 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, 2008). 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 onggok secara langsung. Artinya, proses hidrolisis dilakukan di bawah pengaruh ultrasonikasi dengan harapan metode ini mampu meningkatkan rendemen gula reduksi secara signifikan.

### **E. 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 merah bata.

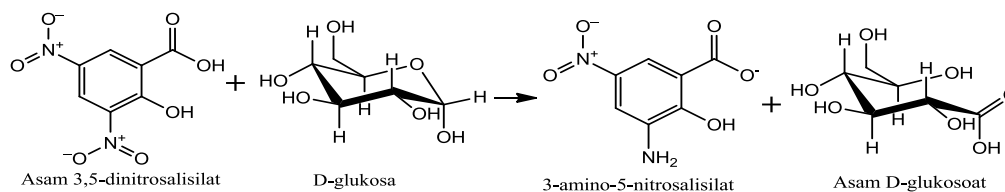
Mekanisme reaksi gula reduksi dan Fehling adalah sebagai berikut.



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 metode DNS digunakan pereaksi dinitrosalisilat (DNS). Bahan-bahan kimia yang diperlukan untuk membuat pereaksi 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 tereduksi membentuk asam 3-amino- 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.



Sampel yang telah direaksikan dengan DNS selanjutnya ditentukan kadar gula reduksinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Spektrofotometer UV-Vis adalah alat untuk mengukur transmitan 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 ( $\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )

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 550 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:

$$y = ax + b$$

dimana  $y$  merupakan absorbansi,  $a$  merupakan slope,  $x$  merupakan konsentrasi sampel, dan  $b$  merupakan 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.

## F. Fermentasi Alkohol

Fermentasi alkohol merupakan proses perubahan 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. Misalnya untuk *Saccharomyces cerevisiae*, pertumbuhan yang optimal berlangsung dalam media dengan pH 4,0-5,0.

Pada hakekatnya, fermentasi merupakan proses anaerobik. Oleh karena itu, kadar oksigen perlu dikendalikan agar proses berlangsung optimal. Pada umumnya, tekanan oksigen yang dianggap masih dapat ditoleransi oleh mikroorganisme adalah antara 0,05–1,0 mmHg. Jika tekanan oksigen yang diberikan lebih besar dari nilai tersebut, maka mikroorganisme lebih cenderung ke arah pertumbuhan sel dibanding dengan memproduksi etanol (Subekti, 2006).

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

*Saccharomyces cerevisiae* adalah khamir bertunas yang termasuk dalam filum *Ascomycota*, dan paling umum digunakan dalam pembuatan roti dan fermentasi bir. Mikroorganisme ini tumbuh dengan baik pada suhu 30 °C dan pH 4,0–5,0. Pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* dipengaruhi oleh adanya penambahan nutrisi yang mengandung karbon dan nitrogen, misalnya urea, ZA, ammonium dan pepton, mineral dan vitamin (Ikram *et al.*, 2003).

Selain menggunakan *Saccharomyces cerevisiae*, alternatif lain yang dapat digunakan untuk fermentasi alkohol adalah kulit kayu raru. Pemilihan jenis tanaman ini didasarkan pada pemanfaatannya secara tradisional oleh masyarakat etnis Batak, untuk memfermentasi air nira menjadi tuak. Tuak merupakan minuman beralkohol yang dibuat dengan cara memasukkan serbuk kulit kayu raru ke dalam nira aren dan dibiarkan selama beberapa jam untuk berlangsungnya proses fermentasi (Wibowo dan Nauli, 2010). Pada penelitian Pasaribu (2009), diketahui ada empat jenis kulit kayu raru yang berasal dari Sumatera Utara dan Riau, yaitu *Cotylelobium melanoxyton* 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 melanoxyton* Pierre.

Pemanfaatan kulit tanaman raru untuk pembuatan minuman tradisional (tuak) mengindikasikan bahwa kulit tanaman ini memiliki potensi untuk dimanfaatkan dalam pengolahan gula reduksi menjadi bioetanol. Namun demikian, potensi ini belum pernah dikaji secara mendalam.

## G. Analisis Kadar Bioetanol dengan Kromatografi Gas

Salah satu metode analisis bioetanol yang umum digunakan adalah kromatografi gas. 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.

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.

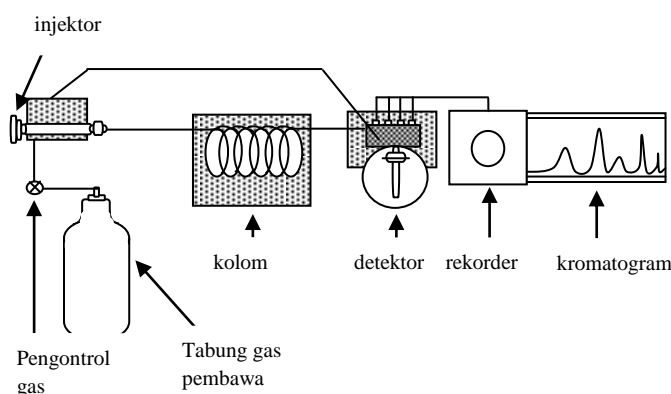
*Thermal Conductivity Detector* (TCD), yaitu detektor yang bekerja dengan prinsip mengukur daya hantar panas dari masing-masing komponen. TCD merupakan detektor yang paling umum digunakan karena semua komponen memiliki daya hantar panas.

*Flame Photometric Detector* (FPD), yaitu detektor khusus untuk mendeteksi senyawa yang mengandung sulfur, posfor, dan organotimah. 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 selanjutnya dicatat oleh *recorder* sebagai kromatogram yang berupa puncak (*peak*). Secara sederhana, komponen-komponen kromatografi gas tersebut dapat digambarkan dalam skema alat kromatografi gas, seperti terlihat pada Gambar 3 berikut ini.



**Gambar 3.** 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%.

Subekti (2006) juga telah melakukan penelitian untuk memproduksi bioetanol dari hidrolisat tongkol jagung dengan bantuan *Saccharomyces cerevisiae*. Subekti menganalisis kadar etanol menggunakan metode kromatografi gas. Jenis kolom yang digunakan adalah kolom FFAP (*crosslinked* FFAP), detektor FID, dan gas pembawa helium. Kondisi perlakuan yang diterapkan yaitu suhu oven sebesar 60 °C selama 1 menit, 60–210 °C selama 5 menit, dan 210 °C selama 10 menit; suhu detektor dan injektor sebesar 250 °C. Volume sampel yang diinjeksikan adalah sebesar 1 µL. Standar yang digunakan adalah etanol dengan konsentrasi 99,8 % (v/v). Kadar bioetanol optimum yang diperoleh dari fermentasi hidrolisat secara enzimatik adalah 14,22 g/L.

Dalam penelitian ini, untuk penentuan kadar etanol digunakan metode kromatografi gas dengan gas pembawa nitrogen (N), detektor FID (*Flame Ionization Detector*), dan kolom Carbowax HP-20M. Kolom Carbowax tipe HP-20M adalah salah satu jenis kolom dalam analisis kromatografi gas yang mengandung polietilen glikol dan memiliki rentang suhu antara 60–220 °C. Kolom ini cocok digunakan untuk penentuan alkohol, eter, glikol, senyawa aromatic, dan juga pelarut polar.