

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Nenas

Tanaman nenas mempunyai nama botani *Anenas comosus L. Merr.* Tanaman nenas jika diklasifikasikan termasuk tanaman berbunga. Klasifikasi dari tanaman nenas adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Liliopsida
Ordo	: Farinosae
Subordo	: Comelinidae
Familia	: Bromeliaceae
Genus	: Anenas
Spesies	: Anenas comosus

Nenas sering disebut *bromeliad* dengan lebih dari 2400 kerabat yang memiliki penampilan menarik. Tanaman nenas termasuk familia nenas-nenasan. Tanaman ini adalah tanaman tropis yang berasal dari Brazilia, Bolivia, dan Paraguay di Amerika Selatan. Buah nenas bukan buah sejati, melainkan gabungan buah-buah sejati yang bekasnya terlihat dari setiap sisik pada kulit buah. Dalam perkembangannya tergabung bersama dengan tongkol buah. Nenas merupakan tanaman buah yang buahnya selalu tersedia sepanjang tahun. Buahnya buah buni majemuk dengan bentuk bulat panjang berdaging, dan berwarna hijau. Jika masak, buah berwarna kuning. Rasa buah nenas manis hingga asam manis.

Nenas tumbuh diberbagai agroklimat sehingga tanaman ini tersebar luas. Nenas tumbuh ditempat yang ketinggiannya 100-1000 m dpl dengan suhu rata-rata 21-30 °C. Curah hujan yang dibutuhkan 635-2500 mm per tahun, dengan bulan basah (curah hujan >200 mm) 3-4 bulan. Namun, juga memerlukan pencahayaan matahari 33-71 % dari pencahayaan maksimum dengan angka

tahunan rata-rata 2000 jam. Umumnya nenas toleran terhadap kekeringan. Didaerah beriklim kering dengan 4-6 bulan kering. Tanaman nenas masih mampu berbuah, asalkan daerah tersebut memiliki kedalaman air yang cukup, yakni 50-150 cm. Nenas memiliki akar yang dangkal tetapi mampu menyimpan air (Agromedia, 2009).

Nenas merupakan tanaman *xerofit* dan termasuk dalam golongan *Classulacean Acid Metabolism* sehingga tanaman ini sangat tahan terhadap kondisi kekeringan. Komposisi kimia serat alam dapat dilihat pada tabel di bawah ini.

Tabel 1. Komposisi Kimia Serat Alam

Nama	Selulosa (%)	Hemiselulosa (%)	Lignin (%)	Keterangan
Abaka	60-65	6-8	5-10	Pisang
Coir	43	1	45	Sabut Kelapa
Kapas	90	6	-	Bungkus, Biji
Flax	70-72	14	4-5	-
Jute	61-63	13	3-13	-
Mesta	60	15	10	-
Palmirah	40-50	15	42-45	-
Nenas	80	-	12	Daun, Mahkota
Rami	80-85	3-4	0,5-1	K. Batang
Sisal	60-67	10-15	8-12	Daun

Sumber: <http://buletinlitbang.dephan.go.id>. Tahun 2007

Limbah mahkota nenas dapat dimanfaatkan sebagai salah satu tanaman alternatif penghasil serat yang dapat dikonversikan menjadi bioetanol. Secara struktur serat disusun dari berbagai komponen kimia yaitu selulosa, hemiselulosa, lignin, pectin, lilin, dan lemak, serta zat-zat lain yang bersifat larut dalam air. Komposisi serat kering daun mahkota nenas dapat dilihat tabel 2.

Tabel 2. Komposisi Kering Serat Daun Mahkota Nenas

Komposisi Kimia	Serat Nenas (%)
Selulosa	62,9 – 65,7
Lignin	4,4 – 4,7
Serat Kasar	22,3 – 25,4
Abu	3,7 – 4,1

Sumber: Glory dkk., 2011

2.2 Jenis – jenis nenas

Berdasarkan habitat tanaman, terutama bentuk daun dan buah dikenal 4 jenis golongan nenas, yaitu : *Cayenne* (daun halus, tidak berduri, buah besar), *Queen* (daun pendek berduri tajam, buah lonjong mirip kerucut), *Spanyol/Spanish* (daun panjang kecil, berduri halus sampai kasar, buah bulat dengan mata datar) dan *Abacaxi* (daun panjang berduri kasar, buah silindris atau seperti piramida). Varietas kultivar nenas yang banyak ditanam di Indonesia adalah golongan *Cayenne* dan *Queen*. Golongan *Spanish* dikembangkan di kepulauan India Barat, Puerto Rico, Mexico dan Malaysia. Golongan *Abacaxi* banyak ditanam di Brazilia. Dewasa ini ragam varietas atau kultivar nenas yang dikategorikan unggul adalah nenas Bogor, Subang dan Palembang.

Nama nenas Subang, Bogor, dan Palembang sendiri sebenarnya hanya sebutan varietas yang hanya berdasarkan tempat nenas-nenas itu tumbuh baik, dengan hasil istimewa. Nenas Subang tumbuh dengan baik di Subang. Kemudian muncul kultivar dengan nama baru dari varietas ini, yaitu Si Madu karena rasa manis seperti madu yang disebabkan banyaknya unsur kalium dalam tanah. Dari varietas yang sama juga muncul nenas walungka yang berukuran besar.

Sedangkan yang dikenal masyarakat dengan nenas Bogor, menurut Herbagijondono(2009), kolektor 46 kultivar nenas, merupakan varietas *Queen*. Ada tiga kultivar yang disebut nenas Bogor, yaitu gati, kiara, dan kapas. Ketiganya banyak ditanam di Bogor dan sekitarnya. Nama nenas Bogor yang sama juga dijumpai di beberapa daerah lain seperti Pontianak, Sukamere, dan Probolinggo. Semuanya merupakan varietas *Cayenne*. Di Palembang ada ada varietas nenas, yaitu nenas Palembang (merupakan varietas *Queen*) dan *Cayennelis* (dari varietas *Cayenne lissae*). Yang lebih terkenal di masyarakat adalah nenas Palembang dari varietas *Queen*. Berikut Varietas nenas di Indonesia yaitu:

1. Nenas Varietas *Queen*

Rasanya manis, aromanya harum, dan warna kulitnya menarik, kuning cerah dan kemerahan. Bobotnya sekitar 1 kg. Bentuk buah cenderung memanjang. Empulur buah cukup lunak sehingga dapat dimakan. Kekurangannya, ukuran

buah kecil, dan matanya agak dalam sehingga banyak daging buah yang terbuang ketika dikupas.

Varietas *Queen* yang paling dikenal ialah nenas dari Bogor (gati, kapas, dan kiara), nenas Palembang, serta batu dari Kediri. Daerah lain yang dijumpai varietas ini adalah : Pontianak (nenas cina), Palangkaraya (nenas betawi), Purwokerto (nenas batu), Kediri (nenas bali/jawa), Jember (monserat dan bali), Bondowoso (kidang dan uling), Sumenep (durian), dan Salatiga (nenas bogor). Berikut ini adalah tanaman buah nenas varietas *Queen* yang dapat dilihat pada gambar 1.



Sumber: <http://www.acamedia.edu>. Tahun 2014

Gambar 1. Nenas Palembang Varietas *Queen*

2. Nenas Varietas Cayane

Daun nenas ini tidak berduri. Rasanya manis asam. Diameter buah 11-16 cm dengan bobot 1,8-2,3 kg. Bahkan ada yang mencapai 5-7 kg yang dikenal dengan nama Walungka atau Sarawak. Kandungan airnya cukup tinggi, dan empulur (hatinya) relatif kecil. Matanya tidak dalam. Karena ukuran dan rasanya, nenas ini paling cocok dikalengkan. Selain kelebihan itu, ada juga kekurangannya.

Perubahan warna kulitnya agak lambat, sehingga kadang buah sudah matang tapi kulitnya masih hijau.

Varietas *Cayenne* dikenal di beberapa daerah di Indonesia dengan nama berbeda. Seperti: *Cayennelis* (Palembang dan Salatiga). Suka Menanti (Bukit Tinggi), Serawak (Tanjung Pinang dan Pacitan), Bogor (Pontianak, Probolinggo, dan Purbalingga), dan Paung (Palangkaraya). Namun hanya di Subang pertumbuhan *Cayenne* amat baik sehingga sebutan nenas Subang seolah identik dengan nenas *Cayenne*. Berikut ini adalah tanaman buah nenas varietas *Cayenne* yang dapat dilihat pada gambar 2.



Sumber: <http://www.acamedia.edu>. Tahun 2014

Gambar 2. Nenas Varietas *Cayane*

3. Nenas Varietas Spanish

Waktu matang rasanya manis dan aromanya tajam menyenangkan, namun varietas ini kurang disukai, karena berserat. Nenas ini banyak dimanfaatkan sebagai bahan pembuat kertas dan tekstil. Kertas uang dolar Amerika dibuat dari serat nenas ini yang diambil dari daunnya. Bobot buahnya 0,9-1,8 kg, jadi antara *Cayenne* dan *Queen* diameternya 9-13 cm. Matanya cukup dalam sehingga daging buah banyak terbuang ketika dikupas. Daunnya berduri, sedangkan kulit buahnya

kasar dan kuat sehingga buah tidak mudah rusak dalam pengangkutan. Jenis ini banyak ditanam sebagai tanaman hias karena warna buahnya cukup menarik, merah oranye berkat zat antosianin. Berikut ini adalah tanaman buah nenas varietas *Spanish* yang dapat dilihat pada gambar 3.



Sumber: <http://www.acamedia.edu>. Tahun 2014

Gambar 3. Nenas Varietas *Spanish*

2.3 Selulosa

Selulosa merupakan kandungan utama tanaman merupakan polisakarida yang terdiri atas satuan-satuan gula (glukosa) yang terikat dengan ikatan 1,4- β -D glikosidik. Selulosa adalah polimer dari rantai unit α -D-1-4 anhidroglukosa ($C_6H_{12}O_6$)_n, sebanyak 40-60 % yang terdapat dalam dinding sel pada tumbuhan berkayu. Beberapa ciri-ciri dari struktur selulosa yang berdasarkan pada karakteristik kimia yang dimiliki adalah dapat mengembang dalam air, berbentuk kristalin, adanya kelompok fungsional yang spesifik dan dapat bereaksi dengan enzim selulolitik.

Selulosa tersintesis di alam sebagai molekul individu atau rantai lurus dari residu glukosil, 30 molekul selulosa bergabung membentuk unit yang lebih besar

yaitu fibril dasar. Fibril dasar akan bergabung membentuk unit lebih besar yang disebut dengan mikrofibril, mikrofibril ini bergabung dan membentuk selulosa.

Selulosa sangat erat berasosiasi dengan hemiselulosa dan lignin dalam lignoselulosa. Selulosa merupakan komponen utama penyusun dinding sel tanaman. Kandungan selulosa pada dinding sel tanaman tingkat tinggi sekitar 35-50 % dari berat kering tanaman (Lynd dkk., 2002).

Selulosa merupakan serat-serat panjang yang bersama-sama hemiselulosa, pektin, dan protein membentuk struktur jaringan yang memperkuat dinding sel tanaman. Karakteristik serat selulosa merupakan serat cukuo halus, berstruktur linier, memiliki ikatan hidrogen intramolekul dan antarmolekul yang tinggi. Ikatan ini mengakibatkan selulosa tidak termoplastik dan sulit untuk diuraikan tanpa bahan kimia atau enzim. Adanya ikatan-ikatan molekul glukosa dalam bentuk 1,4- β -D glikosidik yang membentuk rantai-rantai selulosa yang panjang menyebabkan selulosa sukar larut dalam air.

Kristalin alami selulosa adalah struktur di mana semua atom memiliki posisi tetap dengan posisi tersendiri antara atom. Kumpulan kristalin merupakan komponen molekul individu mikrofibril yang tersusun secara kuat untuk mencegah penetrasi dari enzim dan molekul yang lebih kecil seperti air.

Gugus fungsi pada rantai selulosa adalah gugus fungsi hidroksil (OH). Hidroksil ini mampu berinteraksi dengan $-OH$ atau dengan O-, N-, S- membentuk ikatan hidrogen. Ikatan hidrogen terdapat juga pada grup OH dari selulosa dan molekul air. Gugus hidroksil membuat permukaan selulosa menjadi sangat hidrofilik. Rantai selulosa mempunyai gugus OH pada kedua ujungnya dan rantai selulosa sangat stabil karena adanya ikatan hidrogen sepanjang rantainya. Pada tumbuhan, rantai selulosa tersusun bersama-sama untuk membentuk kristalin mikrofibril pada tiap rantai selulosa dan saling berkaitan satu dengan yang lainnya.

Pada proses pematangan, penyimpanan, atau pengolahan, komponen selulosa dan hemiselulosa mengalami perubahan sehingga terjadi perubahan struktur. Selulosa adalah polimer berantai lurus, bila dihidrolisis oleh enzim selobiase akan terhidrolisis dan menghasilkan dua molekul glukosa dari ujung rantai, sehingga

dihasilkan selobiosa (Winarno, 1992). Sedangkan menurut Artati (2009) mengungkapkan bahwa Selulosa mempunyai sifat antara lain berwarna putih, berserat, tidak larut dalam air dan pelarut organik serta mempunyai kuat tarik yang tinggi.

Sifat fisik dan kimia selulosa yaitu tidak larut dalam air dingin, larut dalam asam dan alkali encer serta pelarut organik netral seperti benzene, alkohol, eter, dan kloroform. Selulosa larut dalam asam sulfat 72%, asam klorida 44%, serta asam fosfat 85%. Selulosa juga tahan terhadap oksidasi oleh oksidator seperti klorin, natrium hipoklorit, kalsium hipoklorit, klorin-dioksida, hidrogen peroksida, natrium peroksida, dan oksigen. Proses degradasi selulosa dapat dilakukan oleh mikroorganisme selulolitik yang berasal dari bakteri ataupun jamur. Degradasi selulosa yang sempurna akan melepaskan karbondioksida (CO₂) dan air pada kondisi aerobik. Sedangkan pada kondisi anaerobik, degradasi sempurna akan melepaskan karbondioksida, metana, dan air. Pada proses hidrolisis selulosa yang sempurna akan menghasilkan monomer selulosa yaitu glukosa, dan hidrolisis selulosa yang tak sempurna akan menghasilkan disakarida dari selulosa yang disebut selobiosa.

2.4 Lignin

Lignin merupakan salah satu dari tiga komponen dasar dinding sel selain selulosa dan hemiselulosa. Lignin merupakan bahan organik bukan karbohidrat yang berbentuk anorf dan tersusun atas satuan fenil (Chang dkk., 1981).

Fungsi lignin yaitu mengikat sel tanaman satu dengan lainnya dan mengisi dinding sel, sehingga dinding sel menjadi keras, teguh, dan kaku. Lignin memiliki sifat fisika dan kimiawi yang berbeda dengan selulosa. Menurut Pasaribu (1987), lignin mudah dioksidasi oleh larutan alkali dan bahan oksidatif, tahan terhadap hidrolisis oleh asam mineral, mudah larut dalam larutan sulfit pada keadaan basa dan lignin yang telah dihalogenasi dengan klor akan mudah larut dalam alkali.

Selanjutnya Sofyan (1976), mengatakan bahwa lignin dapat dilarutkan dalam larutan alalkalimetil sulfat, dalam bentuk protolignin (terikat pada karbohidrat) tidak larut, tidak memiliki titik lebur yang pasti, hanya dapat melunakkan dengan

suhu ± 90 °C serta lignin mengandung lebih sedikit grup hidrofilik daripada karbohidrat, sehingga daya serap kelembabannya sedikit.

2.5 Bioetanol

Bioetanol adalah etanol yang dibuat dari biomassa yang mengandung komponen pati atau selulosa, seperti singkong dan tetes tebu. Dalam industri, etanol umumnya digunakan sebagai bahan baku industri turunan alkohol, campuran minuman keras (seperti sake atau gin), serta bahan baku farmasi dan kosmetika. Berdasarkan kadar alkoholnya, etanol terbagi menjadi tiga bagian sebagai berikut:

1. Bagian industri dengan kadar alkohol 90 – 94 %.
2. Netral dengan kadar alkohol 96 – 99,5 %, umumnya digunakan untuk minuman keras atau bahan baku farmasi.
3. Bagian bahan bakar dengan kadar alkohol diatas 99,5 %.

Alkohol dapat dibuat dari berbagai bahan hasil pertanian. Menurut Prihandana (2007), secara umum bahan tersebut dibagi dalam tiga golongan yaitu:

1. Bahan yang mengandung turunan gula (molaases, gula tebu, gula bit, sari buah anggur, dan sari buah lainnya).
2. Bahan yang mengandung pati biji-bijian, kentang, ubi kayu, ubi jalar, tepung sagu, jagung, biji sorgum, gandum, kentang, ganyong, garut, umbi dahlia dan buah sukun.
3. Bahan yang mengandung selulosa (kayu, daun nenas, mahkota buah nenas, ampas tebu, onggok (limbah tapioka), batang pisanng, serbuk gergaji, kayu, kertas bekas, koran bekas, kardus, dan beberapa limbah pertanian lainnya).

Etanol memiliki banyak manfaat bagi masyarakat karena memiliki sifat yang tidak beracun. Selain itu, etanol juga memiliki banyak sifat-sifat, baik secara fisika maupun kimia. Adapun sifat fisika etanol dapat pada tabel 3.

Tabel 3. Sifat-Sifat Fisika Etanol

Sifat – Sifat Fisika Etanol	Keterangan
Berat Molekul	46,07 gr/grmol
Titik Lebur	-112 °C
Titik Didih	78,4 °C
Densitas	0,7893 gr/ml
Indeks Bias	1,36143 cp
Viskositas 20 °C	1,17 cp
Panas Penguapan	200,6 kal/gr
Warna Cairan	Tidak berwarna
Kelarutan	Larut dalam air dan eter
Aroma	Memiliki aroma yang khas

Sumber: perry, dkk., 1999

Etanol dikategorikan dalam dua kelompok utama:

1. Etanol 95 – 96% v/v disebut etanol hidrat yang dibagi dalam:
 - *Technical/raw spit grade*, digunakan untuk bahan bakar spritus, minuman, desinfektan, dan pelarut.
 - *Industrial grade*, digunakan untuk bahan baku industri pelarut.
 - *Potable grade*, untuk minuman berkualitas tinggi.
2. Etanol > 99,5% v/v, digunakan untuk bahan bakar. Jika dimurnikan lebih lanjut dapat digunakan untuk keperluan farmasi dan pelarut di laboratorium analisis. Etanol ini disebut *fuel grade ethanol (FGE)* atau *anhydrous ethanol* atau etanol kering, yakni etanol yang bebas air atau hanya mengandung air minimal.

Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi jumlah etanol yang dihasilkan dari fermentasi adalah mikroorganisme dan media yang digunakan, adanya komponen media yang dapat menghambat pertumbuhan serta kemampuan fermentasi mikroorganisme dan kondisi fermentasi. Selain itu hal yang diperhatikan selama fermentasi adalah pemilihan khamir, konsentrasi gula, keasaman, ada tidaknya oksigen dan suhu dari perasan buah. Khamir yang baik digunakan untuk menghasilkan etanol adalah genus *Saccharomyces*. Kriteria pemilihan khamir untuk produksi etanol adalah mempunyai laju fermentasi dan laju pertumbuhan cepat, perolehan etanol banyak, tahan terhadap konsentrasi etanol dan glukosa

tinggi, tahan terhadap konsentrasi garam tinggi, pH optimum serta fermentasi rendah, temperatur optimum fermentasi sekitar 25-30°C (Astuty, 1991).

2.5.1. Pembuatan Bioetanol

Secara umum produksi bioetanol mencakup tiga rangkaian proses yaitu, persiapan bahan baku, fermentasi dan pemurnian. Bahan baku bioetanol bisa diperoleh dari berbagai tanaman yang menghasilkan gula seperti tebu dan molase dan juga tanaman penghasil pati atau tepung seperti jagung, singkong dan juga sagu.

Pada tahapan persiapan, bahan baku berupa padatan harus dikonversi terlebih dahulu menjadi larutan gula sebelum akhirnya difermentasi untuk menghasilkan etanol, sedangkan bahan-bahan yang sudah dalam bentuk larutan gula seperti molase dapat secara langsung difermentasi. Bahan padatan dikenai perlakuan pengecilan ukuran dan juga tahap pemasakan. Proses pengecilan ukuran dapat dilakukan dengan menggiling bahan (singkong, sagu, dan jagung) sebelum memasuki tahap pemasakan. Tahap pemasakan bahan meliputi proses liquifikasi dan sakarifikasi. Pada tahap ini, tepung/pati dikonversi menjadi gula (Hambali dkk., 2008).

Tahap fermentasi merupakan tahap kedua dalam proses produksi bioetanol. Pada tahap ini terjadi proses pemecahan gula-gula sederhana menjadi etanol dengan melibatkan enzim dan ragi. Fermentasi dilakukan pada suhu sekitar 27 – 32°C . pada tahap ini akan dihasilkan gas CO₂ sebagai *by product* dan *sludge* sebagai limbahnya. Gas CO₂ yang dihasilkan memiliki perbandingan stoikiometri yang sama dengan etanol yang dihasilkan yaitu 1:1. Setelah melalui proses pemurnian, gas CO₂ dapat digunakan sebagai bahan baku gas dalam minuman berkarbonat (Hambali dkk., 2008).

Tahap berikutnya adalah pemurnian bioetanol yang diperoleh. Tahap ini dilakukan dengan metode destilasi. Destilasi dilakukan pada suhu diatas titik didih etanol murni yaitu pada kisaran 78 – 100°C. Produk yang dihasilkan pada tahap ini memiliki kemurnian hingga 96%. Etanol hasil destilasi kemudian dikeringkan melalui metode purifikasi menggunakan *molecular sieve* untuk meningkatkan

kemurnian etanol hingga memenuhi spesifikasi bahan bakar ataupun untuk keperluan industri (Hambali, E., dkk. 2008).

2.5.2 Delignifikasi

Untuk membuat bioetanol dari bahan yang tidak mengandung pati atau bahan yang mengandung selulosa seperti mahkota buah nenas. Mahkota buah nenas ini mengandung selulosa dan lignin. Oleh karena itu perlu dilakukan pengambilan selulosa dari mahkota buah nenas dengan metode delignifikasi atau penghilangan kandungan lignin pada mahkota buah nenas. Adanya senyawa lignin ini menyebabkan bahan selulosa sulit untuk dihidrolisis menjadi glukosa yang akan dimanfaatkan mikroorganisme untuk mengkonversikannya menjadi bioetanol.

Ada beberapa teori yang mengemukakan untuk delignifikasi, teori pertama menyatakan bahwa permukaan serat bagian dalam berlaku sebagai membran semi permeabel, dimana tekanan osmosis terjadi akibat melarutnya rantai-rantai lignin dalam pelarut. Teori lain menyatakan bahwa penurunan berat terjadi penolakan elektrolisis antara partikel-partikel lignin. Melarutnya bahan-bahan lignin oleh pelarut (NH_4OH , NaOH , MnSO_4 , dan Cadoxen) disebabkan terjadinya proses penyabunan dari group-group ester. Larutan pengembang tersebut secara kimia dapat memutuskan ikatan hidrogen dari molekul glukosa yang berdekatan dalam jaringan lignin.

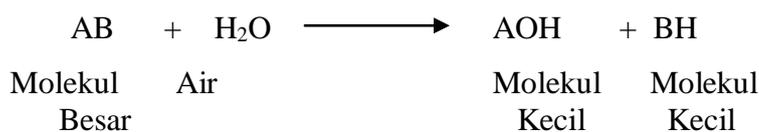
Menurut Darwis dkk., (1995) melaporkan bahwa pengecilan ukuran tongkol jagung dan dilanjutkan dengan proses delignifikasi dengan NH_4OH seperti yang dilakukan dengan penelitian ini, merupakan salah satu upaya untuk meningkatkan efektivitas hidrolisis selulosa dalam proses delignifikasi. Peningkatan efektivitas hidrolisis selulosa pada akhirnya akan meningkatkan produktivitas mikroorganisme dalam memproduksi selulosa.

Pengecilan ukuran dan delignifikasi menyebabkan terputusnya rantai polimer yang panjang menjadi rantai polimer yang lebih pendek, meningkatkan daerah amorf dengan kata lain (menurunkan derajat kristalinitas) dan memisahkan bagian lignin dari selulosa. Perlakuan yang efisien harus dapat membebaskan struktur

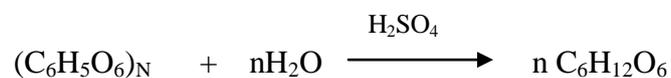
kristal dengan memperluas daerah amorfnya serta membebaskan juga lapisan ligninnya.

2.5.3 Hidrolisis

Hidrolisis adalah pemecahan kimiawi suatu molekul karena pengikatan air, menghasilkan molekul-molekul yang lebih kecil. Proses ini dapat dinyatakan dengan persamaan reaksi berikut:



Sebagai contoh reaksi hidrolisis selulosa dengan H_2SO_4 :



Proses hidrolisis ini bertujuan mengubah selulosa menjadi gula-gula sederhana seperti glukosa. Hidrolisis selulosa dapat dilakukan dengan menggunakan larutan asam, larutan basa, secara enzimatik, maupun termal, masing-masing dengan kelebihan dan kekurangannya (Pejo dkk., 2008).

Beberapa asam yang umum digunakan untuk hidrolisis asam antara lain adalah asam sulfat (H_2SO_4), asam perklorat, dan HCl. Asam sulfat merupakan asam yang paling banyak diteliti dan dimanfaatkan untuk hidrolisis asam. Hidrolisis asam dapat dikelompokkan menjadi hidrolisis asam pekat dan hidrolisis asam encer (Tahezadeh dan Karimi, 2007).

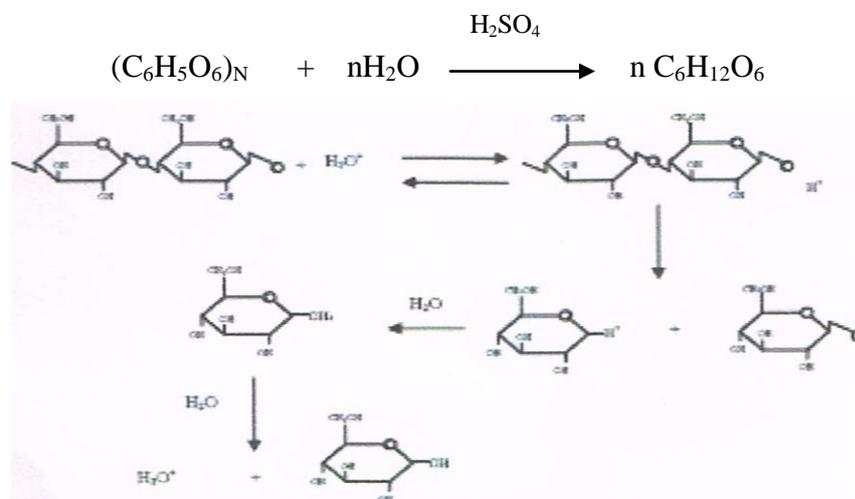
Hidrolisis asam pekat merupakan teknik yang sudah dikembangkan cukup lama. Braconnot di tahun 1819 pertama menemukan bahwa selulosa bisa dikonversi menjadi gula yang tinggi (90% dari hasil teoritik) dibandingkan dengan hidrolisis asam encer, dan dengan demikian akan menghasilkan etanol yang lebih tinggi (Hamelinck dkk., 2005).

Hidrolisis asam dapat dilakukan pada suhu rendah. Namun, jika konsentrasi asam yang digunakan sangat tinggi (30-70%) akan mengakibatkan korosi pada

peralatan sehingga membutuhkan peralatan metal yang dibuat secara khusus dan mahal, sehingga proses ini membutuhkan biaya investasi dan pemeliharaan yang tinggi. Rekaveriasam juga membutuhkan energi yang besar. Jika menggunakan asam sulfat pekat, dibutuhkan proses netralisasi yang menghasilkan limbah *gypsum*/kapur yang sangat banyak (Taherzadeh dan Karimi, 2007).

Hidrolisis asam encer dikenal dengan hidrolisis asam dua tahap dan merupakan metode hidrolisis yang banyak dikembangkan dan diteliti saat ini. Hidroisis asam encer pertama kali dipatenkan oleh Moore pada tahun 1919. Hidrolisis selulosa dengan menggunakan asam telah dikomersilkan pertama kali pada tahun 1898 (Hamelinck dkk., 2005). Tahap pertama dilakukan dalam kondisi yang lebih lunak dan akan menghidrolisis hemiselulosa (missal 0,7% asam sulfat, 190°C). Tahap kedua dilakukan pada suhu yang lebih tinggi, tetapi dengan konsentrasi asam yang lebih rendah untuk menghidrolisis selulosa (215°C, 0,4% asam sulfat) (Hamelinck dkk., 2005).

Keuntungan utama hidrolisis dengan asam encer adalah tidak diperlukannya rekaveri asam, dan tidak adanya kehilangan asam dalam proses (Iranmahboob dkk., 2002). Umumnya asam digunakan adalah H₂SO₄ atau HCl (Mussato dan Roberto, 2004) pada *range* konsentrasi 2-5% (Iranmahboob dkk., 2002; Sun dan Cheng, 2002), dan suhu reaksi ± 160°C. Reaksi hidrolisis selulosa dengna H₂SO₄:



Sumber: Humprey, 1979

Gambar 4. Mekanisme Reaksi Hidrolisis Selulosa Oleh Asam

2.5.4 Fermentasi

Fermentasi merupakan proses perubahan dari glukosa menjadi alkohol (Lee, 1992). Kata fermentasi (*Fermentatio* dalam Bahasa Inggris) berasal dari bahasa latin *ferfere* yang artinya mendidihkan. Ini dianggap masih sangat muda sehingga terbentuknya gas dari suatu cairan kimia hanya dapat dibandingkan dengan keadaan seperti air mendidih atau mulai mendidih.

Proses fermentasi glukosa dari selulosa pada prinsipnya sama dengan yang digunakan pada fermentasi glukosa dari pati atau nira yang tersedia secara komersial. Proses ini, gula-gula sederhana yang terbentuk difermentasi menjadi etanol dengan bantuan khamir seperti *Saccharomyces cerevisiae*. Fermentasi ini biasanya dilakukan pada suhu 30°C, pH 4-5, dan sedikit aerobik.

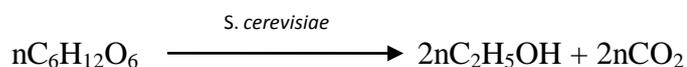
Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi jumlah etanol yang dihasilkan dari fermentasi adalah mikroorganisme dan media yang digunakan, adanya komponen media yang dapat menghambat pertumbuhan serta kemampuan fermentasi mikroorganisme dan kondisi fermentasi. Selain itu hal yang diperhatikan selama fermentasi adalah pemilihan khamir, konsentrasi gula, keasaman, ada tidaknya oksigen, lama fermentasi dan suhu dari perasan buah. Khamir yang baik digunakan untuk menghasilkan etanol adalah genus *Saccharomyces*. Kriteria pemilihan khamir untuk produksi etanol adalah mempunyai laju fermentasi dan laju pertumbuhan cepat, perolehan etanol banyak, tahan terhadap konsentrasi etanol dan glukosa tinggi, tahan terhadap konsentrasi garam tinggi, pH optimum serta fermentasi rendah, temperature optimum fermentasi sekitar 25-30 tahan stress fisika dan kimia. Lama fermentasi biasanya ditentukan pada jenis bahan dan jenis ragi serta gula. Pada umumnya diperlukan waktu 2-12 hari untuk memperoleh hasil fermentasi yang sempurna. Menurut Amerine (1982) fermentasi berlangsung selama 1 sampai 2 minggu dan ditandai dengan tidak diproduksinya CO₂. Pada umumnya pH untuk fermentasi dibutuhkan optimum antara 3-5 jika pH dibawah 3 dan diatas 5, maka pertumbuhan mikroba akan terganggu. Sedangkan kadar gula yang ditambahkan bertujuan untuk memperoleh kadar etanol yang tinggi, tetapi bila kadar gula terlalu tinggi maka aktifitas khamir dapat terhambat. Kadar gula optimum untuk aktifitas pertumbuhan khamir adalah 10-18%. Suhu

untuk tiap-tiap golongan mikroba memiliki pertumbuhan yang optimum yang berbeda-beda, untuk mikroba ini suhu optimumnya 19-32°C.

Reaksi pembentukan etanol terjadi karena adanya aktivitas dari *yeast* yang ada pada substrat. *Yeast* akan menggunakan materi yang mengandung karbon seperti glukosa untuk proses respirasi. Reaksi yang terjadi adalah sebagai berikut:



Dari reaksi di atas dapat dilihat bahwa reaksi tersebut membutuhkan oksigen. Apabila kondisi ini tidak terpenuhi, artinya tidak ada oksigen, maka reaksi yang terjadi adalah reaksi pembentukan etanol berikut:



2.5.5 Destilasi

Produk etanol yang didapatkan dari proses fermentasi akan dimurnikan dengan cara didestilasi. Prinsip dari destilasi yang terdiri dari komponen-komponen yang berbeda nyata suhu dididihnya. Pada tekanan atmosfer, air mendidih pada suhu 100°C dan etanol mendidih pada suhu sekitar 78°C, perbedaan titik didih inilah yang memungkinkan pemisahan campuran etanol air (Lurgi, 1989).

Kadar alkohol setelah proses destilasi hanya dipengaruhi oleh alat destilasi yang digunakan. Alat destilasi yang digunakan merupakan alat destilasi satu tingkat yang hanya mampu menghasilkan etanol dengan kadar alkohol 40% (Shidik, 2011).

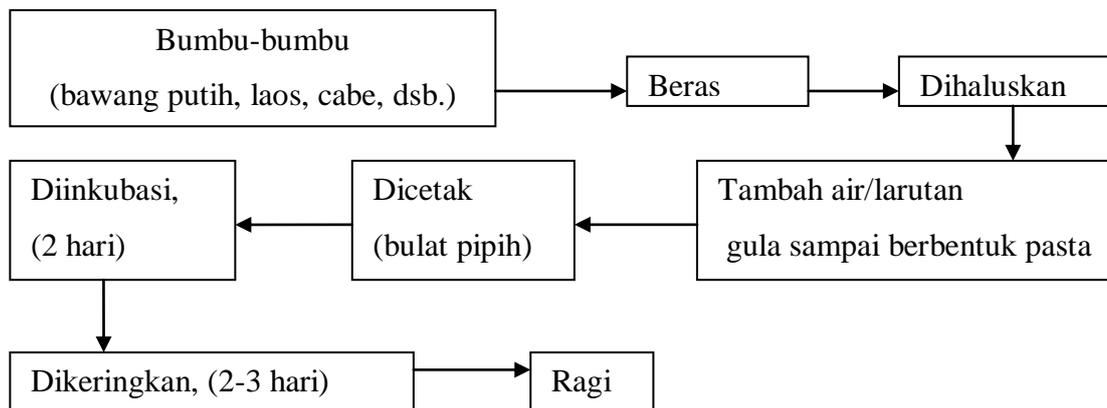
Kadar etanol hasil fermentasi tidak mencapai level di atas 18-21% sebab etanol dengan kadar tersebut bersifat racun terhadap ragi yang memproduksi etanol tersebut sehingga untuk memperoleh etanol dengan kadar yang lebih tinggi perlu dilakukan destilasi. Destilasi adalah proses pemanasan yang memisahkan etanol dengan beberapa komponen cair lain dari substrat fermentasi sehingga diperoleh kadar etanol yang lebih tinggi (Archunan, 2004).

2.6 Ragi

Pengertian ragi di dalam Kamus Besar Bahasa Indonesia (KBBI) merupakan barang atau zat yang dibuat dari beras dan sebagainya untuk membuat tape, arak, adonan roti, dan sebagainya. Istilah ragi digunakan untuk semua preparat mikrobial yang berperan sebagai inokulum dalam penyiapan atau pengolahan makanan dengan fermentasi, sehingga ada istilah ragi tape, ragi roti (gist), ragi tempe (usar atau laru), dan ragi kecap (koji). Pengertian ragi yang lebih dikenal oleh masyarakat lebih ditujukan pada ragi tape.

Ragi telah lama dikenal oleh masyarakat Indonesia terutama di Jawa. Ragi merupakan preparat mikrobial dalam *carrier* tepung beras yang digunakan sebagai agensia sakarifikasi dan fermentasi alkohol terhadap bahan berkarbohidrat menjadi produk yang disebut tape. Ragi tidak untuk dikonsumsi, tetapi digunakan untuk pemecah pati dalam pembuatan tape ketan, brem, tape ketela, dan arak. Pada umumnya, ragi yang digunakan untuk membuat makanan fermentasi, seperti tape dan tempe, mengandung lebih dari satu jenis mikroorganisme yaitu khamir, kapang, dan bakteri.

Ragi tape merupakan bulatan kecil agak rata, kering, berwarna putih, bergaris tengah kira-kira 2,5 cm dengan ketebalan kira-kira 0,5 cm, terbuat dari campuran tepung beras dan bumbu-bumbu. Beberapa bumbu yang digunakan antara lain bawang putih, merica, laos, cabe, kayu manis, dan cabe rawit. Seringkali ditambah pula sepotong kecil tebu dan sedikit air jeruk nipis. Proses pembuatan ragi ditunjukkan pada Gambar 6.



Gambar 5. Diagram Alir Pembuatan Ragi

Komposisi rempah-rempah dalam pembuatan ragi maupun lingkungannya sangat berpengaruh terhadap jenis mikroflora yang ada, yang akhirnya berkembang pada ragi. Rempah-rempah tidak hanya berperan sebagai sumber inokulum dan kontaminan, tetapi juga berperan sebagai inhibitor dan protektor. Penambahan bumbu pada pembuatan ragi akan memacu pertumbuhan mikroorganisme tertentu atau menghambat perkembangan mikroorganisme yang tidak diinginkan. Hal ini disebabkan bahan rempah-rempah kering mengandung variasi mikroorganisme. Minyak atsiri yang terdapat dalam rempah-rempah memiliki sifat atau daya penghambatan. Rempah-rempah dalam kombinasi dengan beberapa bahan lain pada makanan menunjukkan efek yang spesifik. Sebagai contoh kombinasi antara kayu manis dan cengkeh memiliki aktivitas bakteriostatik.

Ada tiga jenis ragi yang umum dikenal yaitu ragi roti, ragi tape, dan ragi tempe. Ragi roti dan ragi tape mengandung jenis mikroba yang sama yaitu *Saccharomyces cerevisiae*, sedangkan ragi tempe adalah jenis *Rhizopus*.

Ragi mengandung enzim *zimase* yang bertindak sebagai katalis untuk mengubah sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa. Fruktosa dan glukosa kemudian beraksi dengan enzim *invertase* yang mengubahnya menjadi alkohol dan karbondioksida. Proses fermentasi berlangsung selama 3-7 hari dan berlangsung pada temperatur 25-30⁰C. Ragi membutuhkan beberapa unsur sebagai nutrisi penunjang pertumbuhannya. Unsur-unsur yang dibutuhkan tersebut yaitu:

1. Karbon sebagai sumber energi utama ragi
2. Hidrogen berfungsi sebagai pengatur pH.
3. Oksigen sebagai faktor terpenting bagi ragi karena tidak ada oksigen akan menghambat pertumbuhan ragi
4. Nitrogen sebagai penyusun sel ragi dan mengisi 10% dari berat kering ragi
5. Belerang merupakan unsur yang berperan pada proses biosintesis pada sel ragi
6. Fosfor berperan penting dalam pembentukan ortofosfat (senyawa yang berfungsi sebagai substrat dan kofaktor enzim
7. Unsur terakhir yaitu K dan Mg yang berperan dalam membangun lingkungan kation di sel ragi.

Fungsi enzim *invertase* selanjutnya mengubah monosakarida menjadi alkohol dengan proses fermentasi. Pada awal fermentasi masih diperlukan oksigen untuk pertumbuhan dan perkembangan *Saccharomyces cerevisiae*, tetapi kemudian tidak dibutuhkan lagi karena kondisi proses yang diperlukan adalah anaerob. Sebelum dilakukan proses fermentasi dilakukan proses sterilisasi dan proses penyiapan inokulum. Proses sterilisasi dilakukan terhadap bahan dan alat sehingga terbebas dari kontaminasi mikroorganisme lain.

Ragi yang paling sering digunakan pada fermentasi glukosa menjadi etanol adalah *Saccharomyces cerevisiae* karena jenis ini mampu menghasilkan produk yang cukup tinggi, toleran terhadap kadar alkohol tinggi (12-20% v/v), dan tahan terhadap kadar gula yang tinggi (Samsuri dkk., 2007- Ramos dan Rojas, 2004).

Mikroorganisme dalam ragi telah diidentifikasi. Mikroorganisme dari ragi teridentifikasi dua spesies khamir, yaitu *Candida lactose* dan *Pichia malanga*. Penelitian lain berhasil mengidentifikasi kapang *Chlamydomucor oryzae*, lima spesies dari genus *Mucor* dan satu spesies *Rhizopus*, serta khamir *Pichia burtonii* dan *Endomycopsis fibuliger* dari ragi tape.

Chlamydomucor oryzae merupakan nama lain dari *Amylomyces rouxii*. *Endomycopsis fibuliger* merupakan nama lain dari *Saccharomycopsis fibuligera*, sedangkan *Pichia malanga* merupakan nama lain dari *Saccharomycopsis malanga*. Penelitian terbaru mengungkapkan spesies-spesies lain yang terdapat

dalam ragi tape, antara lain khamir *Candida utilis*, *S. cerevisiae*, bakteri *Pediococcus* sp. dan *Bacillus* sp. Berdasarkan uraian tersebut, dapat disimpulkan bahwa mikroorganisme yang terdapat dalam ragi tape meliputi kapang *Amylomyces rouxii*, *Mucor* sp., dan *Rhizopus* sp., khamir *S. fibuligera*, *S. malanga*, *Pichia burtonii*, *S. cerevisiae*, *Candida utilis*, dan bakteri *Pediococcus* sp. dan *Bacillus* sp. (Nur, 2010: 28-32).

2.7 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae memiliki sel berbentuk ellipsoid atau silindris (Hidayat *dkk.*, 2006: 21). Ukuran sel antara 5-20 mikron, biasanya 5-10 kali lebih besar dari ukuran bakteri dan merupakan mikroorganisme bersel tunggal, tidak bergerak sehingga tidak memiliki struktur tambahan di bagian luarnya seperti flagella (Buckle *dkk.*, 2007: 95). *Saccharomyces cerevisiae* termasuk khamir uniseluler. Khamir ini bersifat nonpatogenik dan nontoksik, sehingga sejak dahulu banyak digunakan dalam berbagai proses fermentasi seperti pada pembuatan roti, asam laktat, dan alkohol (Lee, 1992 dalam Thontowi *dkk.*, 2007: 253).

Saccharomyces cerevisiae memerlukan kondisi lingkungan yang cocok untuk pertumbuhannya, yaitu nutrisi sebagai sumber energi terutama gula, pH optimum 4-5, temperatur optimum 28 °C - 30°C serta kebutuhan akan oksigen terutama pada awal pertumbuhan (Hidayat *dkk.*, 2006: 181). *Saccharomyces cerevisiae* merupakan organisme fakultatif anaerob yang dapat menggunakan baik sistem aerob maupun anaerob untuk memperoleh energi dari pemecahan glukosa. *Saccharomyces cerevisiae* dapat menghasilkan alkohol dalam jumlah yang besar (Elevri & Putra, 2006: 105). Selain itu juga memiliki toleransi yang tinggi terhadap alkohol, toleransi terhadap alkohol pada variasi strain berbeda (Crueger, 1984: 105).

Saccharomyces cerevisiae sering dipakai pada fermentasi etanol karena menghasilkan etanol yang tinggi, toleran terhadap kadar etanol yang tinggi, mampu hidup pada suhu tinggi, tetap stabil selama kondisi fermentasi dan juga dapat bertahan hidup pada pH yang rendah. *Saccharomyces cerevisiae* juga dapat toleran terhadap alkohol yang cukup tinggi dan tetap aktif melakukan fermentasi

pada suhu 4-32°C. Adapun berbagai spesies dan kondisi *yeast* dalam memproduksi bioetanol dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Berbagai Spesies dan Kondisi *Yeast* dalam memproduksi Bioetanol

Galur-Spesies	temperatur (C°)	pH	Sumber Karbon dan Konsentrasi (g/l)	Sumber Nitrogen dan Konsentrasi (g/l)	Waktu inkubasi (j)	Konsentrasi Etanol yang dihasilkann (g/l)	Refrensi
27817- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30	5,5	Glukosa (50-200)	Pepton (2) dan ammonium sulfat (4)	18-94	5,1-91,8	Vallet dkk., 1996
L-041-S <i>Cerevisiae</i>	30 atau 35	-	Sukrosa (100)	Urea (1) atau amonium suulfat (1-2)	24	25-50	Leticciaa dkk., 1997
181-S <i>Cerevisiae</i> (aerobik)	27	6	Glukosa (10)	pepton (5,0)	40-160	-	Todoor and Tsonka 2002
UO-1-S <i>Cerevisiae</i> (aerobik)	30	5	Sukrosa(20)	Amonium suulfat (1)	60-96	-	Camacho-Ruiz dkk 2003
V5-S <i>Cerevisiae</i>	24	-	Glukosa (250)	-	36	-	Virginie dkk 2001
ATCC24860- <i>S.Cerevisiae</i>	30	4,5	Molasses (1,6-5,0)	Amonium suulfat	24	5-18,4	Ergun
Bakteri yeast- <i>S.Cerevisiae</i>	28	5	Sukrosa (220)	Pepton (5) dan Amonium dihidrogen fospat (1,5)	96	96,71	Caylak dan Vardar 1996
Firo-S <i>Cerevisiae</i>	30	5	Galaktosa (20-150)	pepton, amonium sulfat dan asam casamino (10)	60	4,8-40	da Cruz dkk 2003
A3-S <i>Cerevisiae</i>	30	5	Galaktosa (20-150)	pepton, amonium sulfat dan asam casamino (10)	60	4,8-36,8	da Cruz dkk 2004
GCB-K5- <i>S.Cerevisiae</i>	30	6	Sukrosa (30)	Pepton (5)	72	27	Kiran dkk 2003
GCA-II- <i>S.Cerevisiae</i>	30	6	Sukrosa (30)	Pepton (5)	72	42	Kiran dkk 2004
KR18- <i>S.Cerevisiae</i>	30	6	Sukrosa (30)	Pepton (5)	72	22,5	Kiran dkk 2005
24860- <i>S.Cerevisiae</i>	-	-	Glukosa (150)	Amonium ihidrogen fosfat (2,,25)	27	48 (max)	Ghasem dkk 2004
27774- <i>Kluyveromyces fragilis</i>	30	5,5	Glukosa (20-120)	Pepton (2) dan ammonium sulfat (4)	18-94	48,96 (max)	Vallet dkk 1996
30017-K. <i>Fragilis</i>	30	5,5	Glukosa (20-120)	Pepton (2) dan ammonium sulfat (4)	18-94	48,96 (max)	Vallet dkk 1997

Galur-Spesies	temperatur (C ^o)	pH	Sumber Karbon dan Konsentrasi (g/l)	Sumber Nitrogen dan Konsentrasi (g/l)	Waktu inkubasi (j)	Konsentrasi Etanol yang dihasilkann (g/l)	Refrensi
30016- Kluuveromyces marciannus	30	5,5	Glukosa (100)	Pepton (2) dan ammonium sulfaat (4)	18-95	44,4 (max)	Vallet dkk 1998
Atcc-32691 Pachysolen tannophilus	30	4,5	Glukosa (0-25) dan xilosa (0-25)	Pepton (3,6) dan ammonium sulfaat (3)	100	7,8 (max)	Sanchez dkk 1999

Sumber: Lin, Y. and S. Tanaka, 2006