

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Singkong Karet (*Manihot glaziovii*)

Singkong atau Ubi Kayu (*Manihot utilisima*) adalah tanaman pokok di banyak daerah tropis. Merupakan tanaman yang dapat memberikan hasil yang tinggi walaupun tumbuhnya pada lahan yang kurang subur ataupun lahan dengan curah hujan yang rendah (Kartasapoetra, 1988). Famili *euphorbiaceae* adalah famili tumbuhan berbunga yang terdiri dari 300 genus dan meliputi 7.500 spesies tumbuhan dimana hampir semuanya merupakan tumbuhan herbal namun beberapa diantaranya, terutama yang berada di daerah tropis adalah perdu dan pohon (Watson, L. dan M.J. Dallwitz. 1992). Tumbuhan singkong karet (*Manihot glaziovii*) merupakan tanaman pangan berupa perdu dengan nama lain ketela karet, ubi karet. singkong karet (*Manihot glaziovii*) berasal dari negara amerika latin, atau tepatnya dari Brazil. Penyebarannya hampir ke seluruh dunia, antara lain Afrika, Madagaskar, India, serta China. Singkong karet (*Manihot glaziovii*) diperkirakan masuk ke Indonesia pada tahun 1852.

Sistematika tanaman singkong karet (*Manihot glaziovii*) adalah sebagai berikut:

Kingdom : *Plantae* (Tumbuhan)  
Subkingdom : *Tracheobionta* (Tumbuhan berpembuluh)  
Super Divisi : *Spermatophyta* (Menghasilkan biji)  
Divisi : *Magnoliophyta* (Tumbuhan berbunga)  
Kelas : *Dicotyledonae* (berkeping dua / dikotil)  
Sub Kelas : *Rosidae*  
Ordo : *Euphorbiales*  
Famili : *Euphorbiaceae*  
Genus : *Manihot*  
Spesies : *Manihot glaziovii*  
(Suprapti Lies, 2005)

Ketela pohon/ubi kayu mempunyai banyak nama daerah, yaitu ketela, keutila, ubi kayee (Aceh), ubi parancih (Minangkabau), ubi singkung (Jakarta),

batala kayu (Manado), bistungkel (Ambon), huwi dangdeur, huwi jendral, kasapen, sampeu, ubi kayu (Sunda), bolet, kasawe, kaspas, kaspe, ketela budin, katela jendral, katela kaspe, katela mantri, katela mantri, katela marikan, katela menyong, katela pounng, katela prasman, katela sabekong, katela sarmunah, katela tapah, katela cengkol, tela pohung (Jawa), blandong, manggala menyok, puhung, pohong, sabhrang balandha, sawe, sawi, tela balandha, tengsag (Madura), kesawi, ketal kayu, sabrang sawi (Bali), kasubi (Gorontalo), lame kayu (Makasar), lame aju (Bugis), kasibi (Ternate, Tidore) (Purwono, 2009).

Tabel 1. Kandungan Pati Singkong Karet

No.	Analisa	Kadar 100% Berat Kotor
1	Kadar Abu	0,4734
2	Kadar Lemak Kasar	0,5842
3	Kadar Serat Kasar	0,0067
4	Kadar Protein Kasar	0,4750
5	Kadar Karbohidrat	98,4674

*Sumber:* Laboratorium Ilmu Makan Ternak FP Undip

Singkong karet sebagai bahan baku sumber energi alternatif memiliki kadar karbohidrat sekitar 98,4674 %. Tanaman Singkong karet sebagai bahan baku bioetanol dapat tumbuh di lahan yang kurang subur serta masa panennya tidak tergantung pada musim sehingga panennya dapat berlangsung sepanjang tahun. Oleh karena itu, dikatakan bahwa Singkong karet merupakan bahan baku yang potensial untuk pembuatan bioetanol.

### 2.1.1. Pati

Pati atau amilum adalah karbohidrat kompleks yang tidak larut dalam air, berwujud bubuk putih, tawar dan tidak berbau. Pati merupakan bahan utama yang dihasilkan oleh tumbuhan untuk menyimpan kelebihan glukosa (sebagai produk fotosintesis) dalam jangka panjang. Hewan dan manusia juga menjadikan pati sebagai sumber energi yang penting.

Pati adalah karbohidrat yang merupakan polimer glukosa yang terdiri dari amilosa dan amilopektin dengan perbandingan 1:3 (besarnya perbandingan amilosa dan amilopektin ini berbeda-beda tergantung jenis patinya). Amilosa memberikan sifat keras (pera) sedangkan amilopektin menyebabkan sifat lengket.

Kedua karbohidrat ini juga memiliki kelarutan yang berbeda-beda terhadap air. Fraksi terlarutnya adalah amilosa dengan kadar  $\pm 20\%$  dengan struktur linier, sedangkan fraksi tidak terlarutnya adalah amilopektin dengan kadar  $\pm 80\%$  dengan struktur bercabang (Yazid, *et.al.*, 2006). Selain itu kandungan pati dalam singkong yang tinggi sekitar 25-30% sangat cocok untuk pembuatan energi alternatif.

Pati merupakan homopolimer glukosa dengan ikatan  $\alpha$ -glikosidik. Perbandingan antara amilosa dan amilopektin yang terdapat pada pati dapat mempengaruhi sifat pati. Semakin rendah kadar amilosa maka semakin tinggi kadar amilopektin. Jika kadar amilosa rendah maka pati akan semakin kental dan lekat, begitu pula sebaliknya (Winarno, 2004)

Di dalam pati juga ditemukan komponen lain dalam jumlah yang sedikit, yaitu lipid (sekitar 1%), protein, fosfor dan mineral-mineral. Bagian lipid ada yang berikatan dengan amilosa dan ada yang bebas. Bentuk dan ukuran granula pati berbeda-beda tergantung dari sumber tanamannya. Granula tapioka berukuran lebih besar (sekitar 20  $\mu\text{m}$ ), berbentuk agak bulat dan pada salah satu bagian ujungnya berbentuk kerucut. Pada struktur granula pati, amilosa dan amilopektin tersusun dalam suatu cincin-cincin. Jumlah cincin dalam suatu granula kurang lebih berjumlah 16, dimana sebagian berbentuk lapisan amorf dan sebagian berbentuk lapisan semikristal.

Pati adalah karbohidrat yang berbentuk polisakarida berupa polimer anhidro monosakarida dengan rumus umum  $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$ . (Kerk and Othmer, 1969). Secara kimia, karbohidrat adalah senyawa yang tersusun oleh unsur karbon, hidrogen dan oksigen dengan rumus empirik  $\text{C}_n(\text{H}_2\text{O})_n$ . Karbohidrat merupakan senyawa polihidroksi yang memiliki gugus berupa aldehida atau keton. Karbohidrat yang kita kenal sehari-hari sebagai tepung dan gula banyak terdapat di alam. Ada yang terdapat pada jaringan tubuh hewan maupun dalam tumbuhan. Berdasarkan jumlah karbohidrat sederhana yang dihasilkan pada proses hidrolisis, karbohidrat dapat digolongkan menjadi monosakarida, disakarida dan polisakarida. Monosakarida merupakan satuan karbohidrat paling sederhana.

Berdasarkan jumlah atom C dalam molekulnya, monosakarida dapat dikelompokkan menjadi:

- 1) Triosa, monosakarida yang mengandung 3 atom C;
- 2) Tetrosa, monosakarida yang mengandung 4 atom C;
- 3) Pentosa, monosakarida yang mengandung 5 atom C;
- 4) Heksosa, monosakarida yang mengandung 6 atom C.

Monosakarida dapat berikatan satu sama lainnya membentuk dimer, trimer, dan seterusnya dan akhirnya membentuk polimer. Dimer dari monosakarida disebut disakarida. Monosakarida dan disakarida larut dalam air dan umumnya berasa manis. Karbohidrat yang tersusun dari dua sampai delapan monosakarida biasa disebut oligosakarida, sedangkan yang tersusun dari lebih delapan monosakarida disebut polisakarida.

Berdasarkan gugus fungsi yang dikandungnya, karbohidrat dapat dikelompokkan menjadi:

- 1) Aldosa, karbohidrat yang mengandung gugus fungsi aldehyd;
- 2) Ketosa, karbohidrat yang mengandung gugus fungsi keton.

Penamaan gabungan (berdasarkan jumlah atom C dan gugus fungsi) biasa dilakukan terhadap karbohidrat. Sebagai contoh, glukosa adalah heksosa yang mengandung gugus fungsi aldehida sehingga merupakan suatu aldoheksosa (aldosa enam karbon) sedangkan ribosa merupakan suatu aldopentosa (aldosa lima karbon). Sementara itu untuk ketosa diberi nama akhiran -ulosa sehingga fruktosa yang merupakan heksosa yang mengandung gugus fungsi keton merupakan heksosa yang mengandung gugus fungsi keton merupakan suatu heksulosa (ketosa enam karbon).

Selain sebagai sumber energi, karbohidrat juga berfungsi sebagai cadangan makanan, pemberi rasa manis pada makanan, membantu pengeluaran feses dengan cara mengatur peristaltik usus, penghemat protein karena bila karbohidrat makanan terpenuhi, protein terutama akan digunakan sebagai zat pembangun. Karbohidrat juga berfungsi sebagai pengatur metabolisme lemak karena karbohidrat mampu mencegah oksidasi lemak yang tidak sempurna.

Berikut ini macam-macam bentuk karbohidrat.

- 1) Monosakarida, macam-macam monosakarida antara lain: glukosa, fruktosa, galaktosa dan mannososa;
- 2) Disakarida, macam-macam disakarida antara lain: maltosa, sellobiosa, sukrosa (gula pasir) dan laktosa;
- 3) Polisakarida, macam-macam polisakarida antara lain: amilum, glikogen dan selulosa.

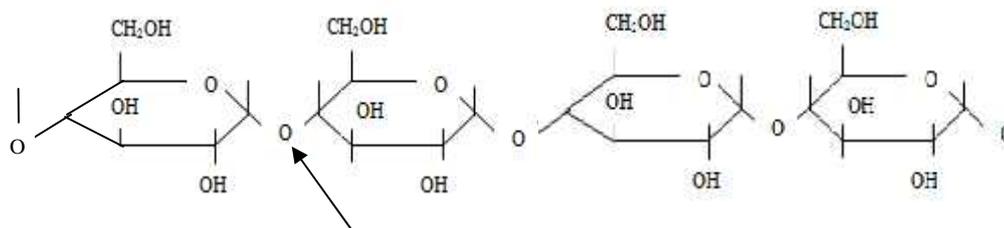
### **2.1.2. Amilosa**

Amilosa merupakan polisakarida berantai lurus bagian dari butir-butir pati yang terdiri atas molekul-molekul glukosa yang terikat satu sama lain melalui ikatan  $\alpha$ -1,4-glikosidik. Amilosa merupakan bagian dari pati yang larut dalam air, yang mempunyai berat molekul antara 50.000-200.000, dan bila ditambah dengan iodium akan memberikan warna biru (Indriyanti, 2010).

Amilosa ditambahkan dengan iodium akan memberikan warna khas, warna tersebut bermacam-macam tergantung pada panjang ikatan glikosida yang terdapat pada pati. Pati bila berikatan dengan iodium akan menghasilkan warna biru karena struktur molekul pati yang berbentuk spiral, sehingga akan mengikat molekul iodium dan membentuk warna biru. Pati akan merefleksikan warna biru bila polimer glukosanya lebih besar dari 20 (seperti amilosa). Bila polimer glukosanya kurang dari 20, seperti amilopektin, akan menghasilkan warna merah atau ungu-coklat. Sedangkan polimer yang lebih kecil dari lima, tidak memberi warna dengan iodium (Koswara, 2009). Rantai polimer yang terdapat pada amilosa berbentuk pilinan atau heliks.

Fraksi amilosa dalam pati memberikan kontribusi dalam karakteristik gel pada pemasakan atau pendinginan campuran pati. Amilosa dapat dipisahkan dari dispersi pati dalam air dengan gelatinisasi dan pencampuran larutan pati panas dengan butanol sebagai bahan pengompleks. Dalam fraksi rantai lurus, monomer glukosa disambungkan dengan ikatan glikosida  $\alpha$ -1,4. Jumlah monomer glukosa yang disambungkan sangat beragam tergantung pada jenis pati.

Struktur amilosa dapat dilihat pada gambar 1.



### -1,4-glycosidic bonds

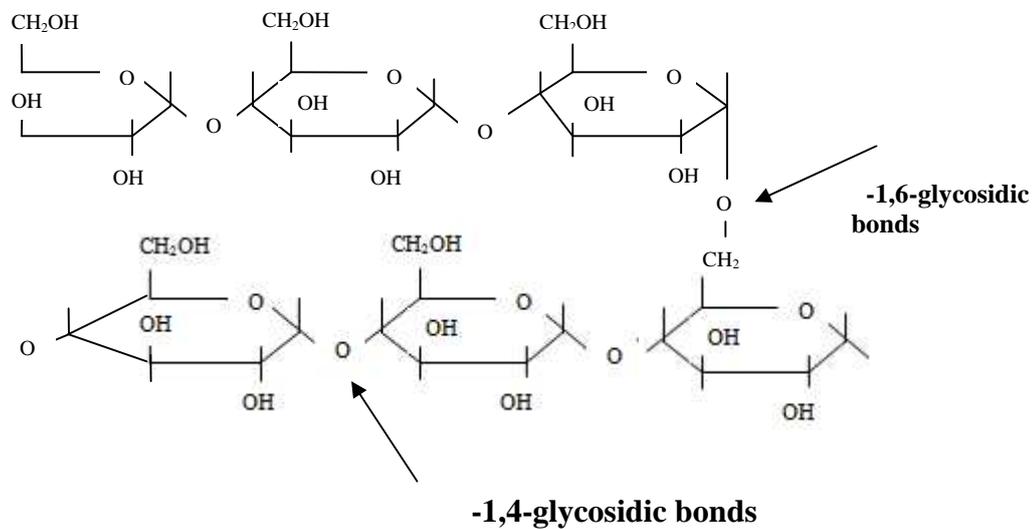
Gambar 1. Struktur Amilosa

Sumber: <http://www.smartkitchen.com/resources/amylose> diakses tanggal 21 Mei 2015

Setelah dilarutkan dengan butanol dalam keadaan panas kemudian campuran didinginkan. Pada saat pendinginan terbentuk kristal kompleks amilosa-butanol yang kemudian dipisahkan dengan cara sentrifugasi. Pemisahan dengan cara rekristalisasi kompleks amilosa-butanol akan menghasilkan amilosa murni. Amilosa dapat dilarutkan dalam air dengan penambahan basa kuat, formaldehid, atau dengan pemanasan dalam air pada suhu 150-160°C pada tekanan lebih daripada satu atmosfer. Pada saat pendinginan atau netralisasi, dispersi amilosa dengan konsentrasi lebih besar daripada 2% akan membentuk gel dan pada konsentrasi kurang dari 2% amilosa akan mengendap. Fraksi amilosa tidak dapat benar-benar terlarut dalam air dan pada waktu tertentu akan membentuk kumpulan kristal dengan ikatan hidrogen. Proses ini dikenal dengan nama *retrogradation* atau *set back*.

#### 2.1.3. Amilopektin

Amilopektin merupakan polisakarida bercabang bagian dari pati, terdiri dari molekul-molekul glukosa yang terikat satu sama lain melalui ikatan 1,4 glikosidik dengan percabangan melalui ikatan 1,6-glikosidik pada setiap 20-25 unit molekul glukosa. Amilopektin merupakan bagian dari pati yang tidak larut dalam air dan mempunyai berat molekul antara 70.000 sampai satu juta. Tingkat percabangan pada amilopektin sangat tinggi, yaitu 4-6% ikatan -1,4-glikosidik, serta memiliki panjang rantai 20-25 unit molekul (Indriyanti, 2010). Struktur amilopektin dapat dilihat seperti pada gambar 2 dibawah ini.



Gambar 2. Struktur Amilopektin,

Sumber: <http://www.smartkitchen.com/resources/amylopectin> diakses tanggal 21 Mei 2015

Rantai cabang amilopektin mempunyai sifat seperti amilosa yaitu dapat membentuk struktur heliks diperkirakan 4-6% ikatan dalam setiap molekul amilopektin adalah ikatan -1,6. Nilai tersebut walaupun kecil tetapi mempunyai dampak sekitar lebih dari 20.000 percabangan untuk tiap molekul amilopektin. Sifat amilopektin berbeda dengan amilosa karena banyak percabangan seperti retrogradasi lambat dan pasta yang terbentuk tidak dapat membentuk gel tetapi bersifat lengket (kohesif) dan elastis (*gummy texture*) (Estiasih, 2006).

Dalam produk makanan amilopektin bersifat merangsang terjadinya proses mekar (*puffing*) dimana produk makan yang berasal dari pati yang kandungan amilopektinnya tinggi akan bersifat ringan, garing, dan renyah. Kebalikannya pati dengan kandungan amilosa tinggi cenderung menghasilkan produk yang keras, pejal, karena proses mekarnya terjadi secara terbatas (Koswara, 2009).

## 2.2. Enzim

Enzim adalah biomolekul berupa protein yang berfungsi sebagai katalis (senyawa yang mempercepat proses reaksi tanpa habis bereaksi) dalam suatu reaksi kimia. Molekul awal yang disebut substrat akan dipercepat perubahannya menjadi molekul lain yang disebut produk. Jenis produk yang akan dihasilkan bergantung pada suatu kondisi atau zat, yang disebut promoter. Semua proses

biologis sel memerlukan enzim agar dapat berlangsung dengan cukup cepat dalam suatu arah lintasan metabolisme yang ditentukan oleh hormon sebagai promotor

Hal yang berkaitan dengan enzim dipelajari dalam enzimologi. Enzimologi terutama dipelajari dalam kedokteran, ilmu pangan, teknologi pengolahan pangan dan cabang-cabang ilmu pertanian. Pengetahuan tentang enzim telah dirintis oleh Berzelius pada tahun 1837. Ia mengusulkan nama “katalis” untuk zat-zat yang dapat mempercepat reaksi tetapi zat itu sendiri tidak ikut bereaksi. Namun, proses kimia yang terjadi dengan pertolongan enzim telah dikenal sejak zaman dahulu, misalnya pembuatan anggur dengan cara fermentasi atau peragian dan pembuatan asam cuka. Louis Pasteur salah seorang yang banyak bekerja dalam fermentasi ini dan ketika mengkaji fermentasi gula menjadi alkohol oleh ragi, Louis Pasteur menyimpulkan bahwa fermentasi ini dikatalisasi oleh gaya dorong vital yang terdapat dalam sel ragi, disebut sebagai *ferment* dan diperkirakan hanya berfungsi dalam tubuh organisme hidup. Ia menulis bahwa “fermentasi alkoholik adalah peristiwa yang berhubungan dengan kehidupan dan organisasi sel ragi, dan bukannya kematian sel tersebut” Pada tahun 1878, ahli fisiologi Jerman Wilhelm Kühne (1837-1900) pertama kali menggunakan istilah “*enzyme*”, yang berasal dari bahasa Yunani  $\nu\mu\omicron\nu$  yang berarti “dalam bahan pengembang” (ragi), untuk menjelaskan proses ini, kata “*enzyme*” kemudian digunakan untuk merujuk pada zat mati seperti pepsin, dan kata *ferment* digunakan untuk merujuk pada aktivitas kimiawi yang dihasilkan oleh mikroorganisme hidup.

([id.wikipedia.org/wiki/Enzim](http://id.wikipedia.org/wiki/Enzim), diakses tanggal 7 Juni 2015)

Biasanya enzim mempunyai akhiran –ase. Di depan –ase digunakan nama substrat dimana enzim itu bekerja, atau nama reaksi yang dikatalis. Misal: selulase, dehidrogenase, urease dan lain-lain. Tetapi pedoman pemberian nama tersebut di atas tidak selalu digunakan. Hal ini disebabkan nama tersebut digunakan sebelum pedoman pemberian nama diterima dan nama tersebut telah umum digunakan. Misalnya pepsin, tripsin, dan lain-lain. Dalam Daftar Istilah Kimia Organik (1978), akhiran –ase tersebut diganti dengan –asa.

Dalam mempelajari mengenai enzim, dikenal beberapa istilah diantaranya holoenzim, apoenzim, kofaktor, gugus prostetik, koenzim, dan substrat. Apoenzim

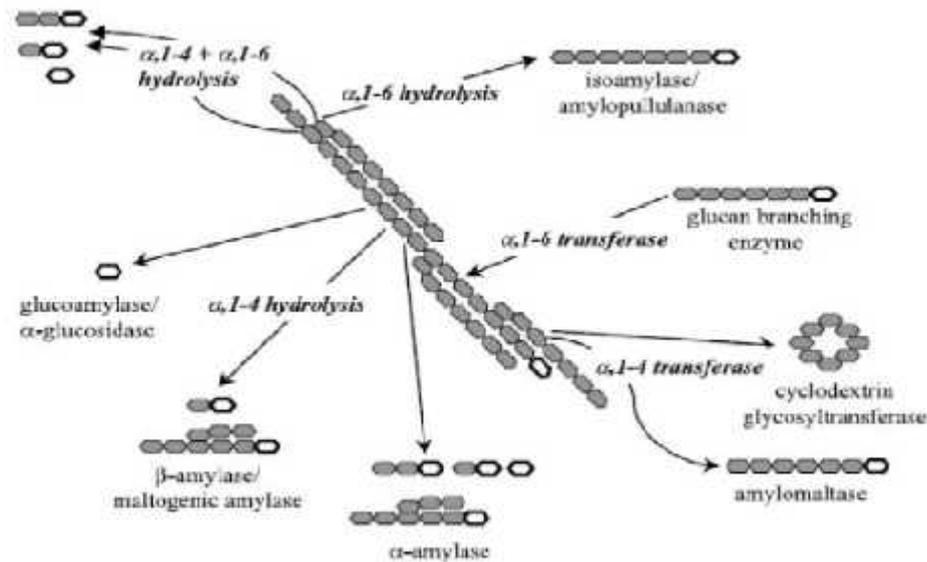
adalah suatu enzim yang seluruhnya terdiri dari protein, sedangkan holoenzim adalah enzim yang mengandung gugus protein dan gugus non protein. Gugus yang bukan protein tadi dikenal dengan istilah kofaktor. Pada kofaktor ada yang terikat kuat pada protein dan sukar terurai dalam larutan yang disebut gugus prostetik dan ada pula yang tidak terikat kuat pada protein sehingga mudah terurai yang disebut koenzim. Baik gugus prostetik maupun koenzim, keduanya merupakan bagian yang memungkinkan enzim bekerja pada substrat. Substrat merupakan zat-zat yang diubah atau direaksikan oleh enzim (Poedjadi, 2006).

Enzim yang memerlukan ion logam sebagai kofaktornya dinamakan metaloenzim. Ion logam ini berfungsi untuk menjadi pusat katalis primer, menjadi tempat untuk mengikat substrat dan sebagai stabilisator supaya enzim tetap aktif. Enzim meningkatkan laju sehingga terbentuk kesetimbangan kimia antara produk dan pereaksi. Pada keadaan kesetimbangan, istilah pereaksi dan produk tidaklah pasti dan bergantung pada pandangan kita. Dalam keadaan fisiologi yang normal, suatu enzim tidak mempengaruhi jumlah produk dan pereaksi yang sebenarnya dicapai tanpa kehadiran enzim. Jadi, jika keadaan kesetimbangan tidak menguntungkan bagi pembentukan senyawa, enzim tidak dapat mengubahnya (Salisbury, 1995).

Reaksi-reaksi enzimatik dibutuhkan agar bakteri dapat memperoleh makanan/ nutrien dalam keadaan terlarut yang dapat diserap ke dalam sel, memperoleh energi kimia yang digunakan untuk biosintesis, perkembangbiakan, pergerakan dan lain-lain.

*Debranching Enzyme* (enzim pemotong percabangan) yaitu enzim yang mampu menghidrolisis ikatan  $\alpha$ -1,6 glikosidik pada pati dan glikogen (Hizkuri, dkk, 1996). Ada beberapa enzim yang dapat mengdegradasi pati, diantaranya adalah  *$\alpha$ -amilase, glucoamylase, glukosa isomerase, Pullulanase*, dan *isoamilase*.

Enzim yang digunakan pada penelitian ini adalah  *$\alpha$ -amilase, glucoamylase* yang mana proses pemotongan rantai oleh enzim dapat dilihat pada gambar 3.

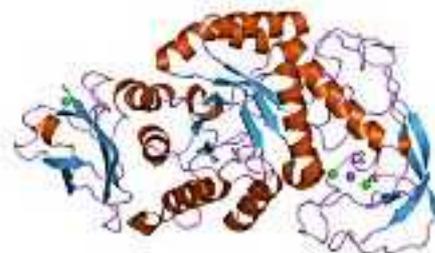


Gambar 3. Lokasi Pengdegradasian Pati Oleh Enzim

Sumber: Hizkuri, dkk, 1996

Mekanisme kinerja enzim pengdegradasi pati dapat diklasifikasikan menjadi dua, yaitu secara ekso dan endo. Enzim  $\alpha$ -amilase dengan kerja endo mampu menghidrolisis ikatan dalam molekul pati secara acak sehingga terbentuk oligosakarida yang linier dan bercabang dengan panjang rantai yang bervariasi (Winarno, 2004)

### 2.2.1. $\alpha$ -amilase



Gambar 4. Struktur  $\alpha$ -amilase

Sumber: [id.wikipedia.org/wiki/Alfa-amilase](https://id.wikipedia.org/wiki/Alfa-amilase)

Sebagian kecil enzim diproduksi di kelenjar liur di bagian mulut. Namun kebanyakan enzim pencernaan diproduksi oleh kelenjar pankreas. Ada dua golongan enzim, yaitu enzim pencernaan yang berfungsi sebagai katalisator, dan

enzim metabolisme yang bertanggung jawab untuk menyusun, memperbaiki dan membentuk kembali sel-sel dalam tubuh. Enzim pencernaan yang utama terdiri dari enzim protease (merombak protein), enzim lipase (merombak lemak) dan enzim amilase (merombak hidrat arang). Enzim amilase dapat memecah ikatan pada amilum hingga terbentuk maltosa. Ada tiga macam enzim amilase, yaitu  $\alpha$ -amilase,  $\beta$ -amilase dan  $\gamma$ -amilase. Yang terdapat dalam saliva (ludah) dan pankreas adalah  $\alpha$ -amilase. Enzim ini memecah ikatan 1-4 yang terdapat dalam amilum dan disebut endo amylase sebab enzim ini memecah bagian dalam atau bagian tengah molekul amilum (Poedjiadi, 2006).

Enzim alfa-amilase, atau yang biasa disebut juga 1,4-alpha-D-glucan glucanohydrolase (karena hanya memotong pada ikatan  $\alpha$ -1,4 pada ikatan glikosida), biasa juga disebut *pancreatic alpha-amylase* adalah salah satu enzim yang berperan dalam proses degradasi pati, sejenis makromolekul karbohidrat. Struktur molekuler dari enzim ini adalah  $\alpha$ -1,4-glukanohidrolase. Bersama dengan enzim pendegradasi pati lain, pululanase,  $\beta$ -amilase termasuk ke dalam golongan enzim kelas 13 glikosil hidrolase. Alpha-amilase ini memiliki beberapa sisi aktif yang dapat mengikat 4 hingga 10 molekul substrat sekaligus sehingga proses hidrolisisnya lebih cepat (BeMiller dan Whistle, 2009).

Menurut Judoamidjojo *et al.* (1989),  $\alpha$ -amilase termasuk enzim pemecah dari dalam molekul, bekerja menghidrolisa dengan cepat ikatan  $\alpha$ -1,4 glukosida pati yang telah mengalami gelatinisasi. Pada proses pemecahan amilosa,  $\alpha$ -amilase akan memecah ikatan  $\alpha$ -1,4 dan menghasilkan dekstrin. Aktivitas  $\alpha$ -amilase pada amilopektin menghasilkan oligosakarida dengan jumlah monomer dua sampai enam.

Mekanisme kerja enzim ini pada amilosa dibagi dalam dua tahap, yaitu:

- 1) Degradasi secara cepat molekul amilosa menjadi maltosa dan maltotritosa yang terjadi secara acak. Pada tahap pertama ini, kekentalan menurun dengan cepat.
- 2) Pembentukan glukosa dan maltosa dengan laju lebih lambat tidak secara acak. Degradasi  $\alpha$ -amilase pada amilopektin akan menghasilkan glukosa, maltosa dan berbagai jenis  $\alpha$ -limit dekstrin. Sumber enzim  $\alpha$ -amilase sangat

beragam, mulai dari tanaman, jaringan mamalia sampai mikroorganisme. Saat ini sumber enzim  $\alpha$ -amilase yang paling potensial dan banyak digunakan di industri berasal dari mikroorganisme. Salah satu bakteri penghasil enzim  $\alpha$ -amilase adalah yang berasal dari spesies *Bacillus*.

$\alpha$ -amilase pada umumnya bekerja pada kisaran suhu 25 hingga 95°C. penambahan ion kalsium dan klorida dapat meningkatkan aktivitas kerja dan mendapat kestabilan enzim  $\alpha$ -amilase ini.  $\alpha$ -amilase akan memotong ikatan glikosidik  $\alpha$ -1,4 pada molekul pati (karbohidrat) sehingga terbentuk molekul-molekul karbohidrat yang lebih pendek. Hasil dari pemotongan enzim ini antara lain maltosa, maltotritosa dan glukosa (Nungky, 2011)

Enzim  $\alpha$ -amilase dapat diperoleh dari berbagai macam sumber diantaranya:

1. Bisa dalam bentuk tepung malt, gandum yang berkecambah;
2. Bisa berasal dari bakteri bacilus *Bacillus subtilis*;
3. Disintesa kapang *Rhizopus oligosporus* dan *Rhizopus oryzae*;
4. Pakai cendawan *Aspergillus sp*;
5. Bisa berasal dari pankreas sapi dan babi;
6. Banyak terdapat di air ludah dan pencernaan manusia.  
(Colby S.D., 1985)

### 2.2.2. Glukoamilase



Gambar 5. Struktur Glukoamilase  
Sumber: Pedro M. Coutinho, 2008

Glukoamilase merupakan salah satu enzim yang banyak digunakan dalam industri makanan dan minuman, misalnya pada pembuatan sirup glukosa (Wiseman, 1985). Enzim ini dihasilkan oleh mikroorganisme baik dari jenis bakteri, ragi, dan kapang (Perlman dan Tsao, 1978). Enzim glukoamilase (E.C. 3.2.1.3) atau sering disebut amiloglukosidase atau  $\alpha$ -1,4-glukano glukohidrolase merupakan enzim ekstraselular (eksoamilase) yang mampu menghidrolisa ikatan  $\alpha$ -1,4 secara beruntun dari ujung nonreduksi rantai amilosa, amilopektin, glikogen, dan pullulan dengan melepaskan glukosa (Fogarty dan Kelly, 1979). Enzim glukoamilase juga dapat menyerang ikatan  $\alpha$ -1,6 pada titik percabangan, walaupun dengan laju yang lebih rendah (Naiola, 2006). Hal ini berarti bahwa pati dapat terurai secara sempurna menjadi glukosa (Azwar D dan R. Erwanti, 2000).

Glukoamilase (E.C 3.2.1.3) adalah salah satu enzim kelas 15 yang berperan dalam proses sakarifikasi pati (sejenis karbohidrat. Serupa dengan enzim  $\alpha$ -amilase, glukoamilase dapat memecah struktur pati yang merupakan polisakarida kompleks berukuran besar menjadi molekul yang berukuran kecil. Pada umumnya enzim ini bekerja pada suhu 45-60°C dengan kisaran pH 4,5 – 5,0.

Enzim glukoamilase dapat juga diproduksi dalam skala industri melalui fermentasi kultur cair maupun fermentasi padat. Fermentasi dengan media cair maupun media padat mempunyai keunggulan dan kelemahan masing-masing. Dalam menjaga kondisi proses fermentasi sesuai dengan apa yang diinginkan seperti pH, aerasi, kehomogenan media, fermentasi dengan media cair lebih menguntungkan tetapi biaya operasional dan alat yang digunakan lebih mahal. Fermentasi dengan media padat mempunyai keunggulan lebih sederhana dalam pelaksanaannya, biaya operasional dan peralatan fermentasi lebih murah, tetapi untuk menjaga kondisi fermentasi sesuai dengan apa yang diinginkan seperti kehomogenan media, aerasi sangat sulit untuk dilakukan (Muhiddin *et al.*, 2001)

Untuk menumbuhkan enzim glukoamilase dapat digunakan pati sebagai substrat. Pati dapat diperoleh dari ubi kayu (Broto dan Richana, 2005). Menurut Sunaryanto R dan Kaseno (2004), pemurnian enzim termasuk glukoamilase dapat dilakukan dengan beberapa cara antara lain dengan cara pengendapan dalam garam organik (*salting out*) atau pelarut organik (aseton), dan melalui membran

ultrafiltrasi. Penggunaan ammonium sulfat untuk *salting out* memiliki keuntungan antara lain harga relatif lebih murah, kelarutan tinggi, pH larutan tidak berubah secara ekstrem, dan tidak bersifat toksik. Kerugiannya adalah konsentrasi garam yang tertinggal dalam produk tinggi dan kurang efisien dalam menghilangkan pencemar.

Enzim glukoamilase dapat diperoleh dari beberapa sumber, antara lain:

- 1) Dari cendawan *Saccharomyces sp*;
- 2) Pakai cendawan *Aspergillus sp*;
- 3) Bisa berasal dari bakteri *Penicillium sp*, *Mucor sp*, dan *Clostridium sp*.  
(Colby S.D., 1985)

### **2.3. Mikroorganisme Fermentasi**

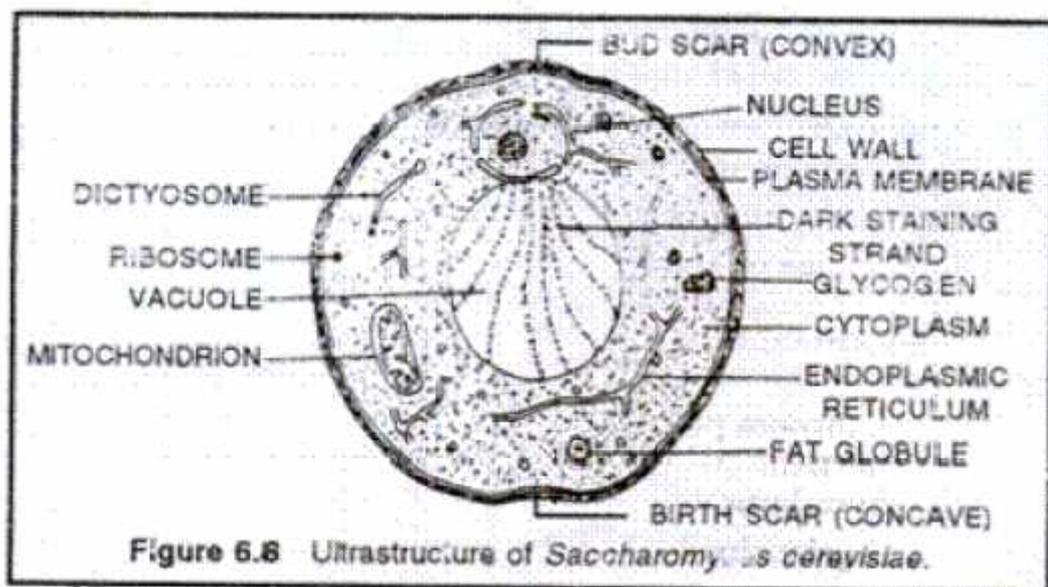
Mikroorganisme yang umum dipergunakan dalam fermentasi adalah bakteri dan fungi. Fungi adalah mikroorganisme yang tidak memiliki butir-butir hijau daun (klorofil). Contoh fungi antara lain adalah ragi/yeast dan jamur/molds. Bakteri, ragi dan jamur memerlukan sumber energi dan nutrien untuk tumbuh, berkembang biak dan menghasilkan senyawa kimia. Bakteri dan ragi adalah makhluk hidup uniseluler dan sangat kecil ukurannya sedangkan jamur adalah makhluk hidup multiseluler (Suharto, 1995).

#### **2.3.1. Ragi *Saccharomyces cerevisiae***

Ragi adalah kelompok jamur uniseluler berukuran lima hingga dua puluh mikron yang umum dipergunakan untuk fermentasi roti dan minuman beralkohol, lebih dari seribu spesies ragi telah teridentifikasi hingga saat ini dan yang paling umum dipergunakan adalah *Saccharomyces cerevisiae*. *Saccharomyces cerevisiae* adalah mikroorganisme yang anaerob fakultatif. Ragi memproduksi energi dalam kondisi ketiadaan oksigen dengan mengubah gula menjadi etanol dan karbon dioksida. Etanol adalah produk yang diinginkan dalam pembuatan minuman beralkohol namun dalam pembuatan roti, yang diinginkan adalah peran karbon dioksida sehingga roti dapat mengembang sedangkan etanol yang terbentuk dibiarkan menguap (European Bioinformatics Institute, 1996).

Sebuah sel ragi mampu memfermentasi glukosa dengan massa yang sama dengan massa selnya sendiri dalam jangka waktu satu jam. Ragi dapat bereproduksi secara aseksual dengan membentuk tunas ataupun secara seksual dengan pembentukan ascospora. Selama proses reproduksi aseksual, sebuah tunas baru tumbuh dari ragi dengan kondisi tertentu dan saat mencapai ukuran dewasa ia akan melepaskan diri dari sel induknya. Reproduksi seksual ragi umumnya berlangsung pada kondisi kekurangan nutrisi pertumbuhan dengan cara pembentukan ascospora (European Bioinformatics Institute, 1996).

*Saccharomyces cerevisiae* adalah ragi dari famili *saccharomycetaceae*. Famili *Saccharomycetaceae* adalah famili ragi dari ordo *saccharomycetales* yang bereproduksi dengan pembentukan tunas. *Saccharomyces cerevisiae*. telah lama dimanfaatkan dalam pembuatan roti dan minuman beralkohol. Ragi *Saccharomyces cerevisiae* diperoleh dari hasil isolasi mikroorganisme pada kulit anggur. *Saccharomyces cerevisiae* dapat tumbuh secara aerob pada substrat glukosa, maltosa, laktosa dan selobiosa. Fruktosa dan galaktosa merupakan substrat terbaik untuk pertumbuhan ragi ini.



Gambar 6. Struktur *Saccharomyces cerevisiae*

Sumber: <http://www.biologydiscussion.com/>

Untuk memperjelas mengenai ragi *Saccharomyces cerevisiae*, berikut ini ditampilkan sistematika ragi *Saccharomyces cerevisiae*.

Sistematika Ragi *Saccharomyces cerevisiae* adalah sebagai berikut:

Kingdom : *Fungi*  
Filum : *Ascomycota*  
Kelas : *Saccharomycetes*  
Ordo : *Saccharomycetales*  
Famili : *Saccharomycetaceae*  
Genus : *Saccharomyces*  
Spesies : *Saccharomyces cerevisiae*  
(E.C. Hansen, 1838)

Ragi *Saccharomyces cerevisiae* selain dipergunakan dalam fermentasi juga dimanfaatkan sebagai suplemen nutrisi karena ragi tersebut mengandung mineral seperti selenium dan chromium serta vitamin B complex yang meliputi vitamin B1 (thiamine), B2 (riboflavin), B3 (niacin), B5 (asam pantotenat), B6 (piridoxin), B7 (biotin) dan B9 (asam folat). Ragi *Saccharomyces cerevisiae* tidak mengandung vitamin B12 (cyanocobalamine). Sebagai sumber vitamin B lengkap dan mineral, Ragi *Saccharomyces cerevisiae* berfungsi untuk menunjang kerja sistem saraf dan otot-otot saluran pencernaan serta memelihara kesehatan kulit, mata dan hati (UMMC, 2009).

Sumber ragi dapat berasal dari buah-buahan, bunga dan daun. Ragi adalah mikroorganisme yang bersifat saprofit dan umumnya serangga adalah yang berperan memindahkan ragi dari satu tanaman ke tanaman ke tanaman lain (Suharto. 1995).

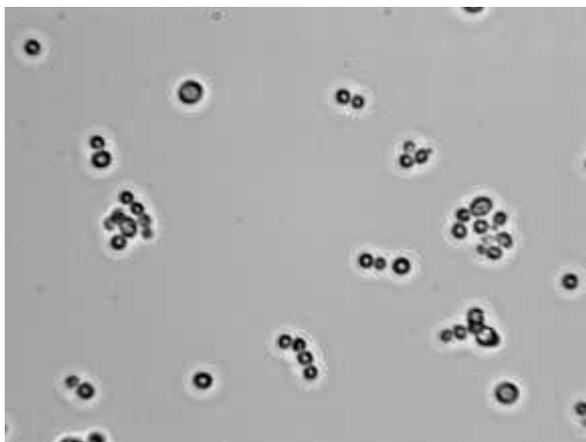
### **2.3.2. Ragi *Debaryomyces hansenii***

*Debaryomyces* adalah genus dari *Saccharomycetaceae*. Sel *Debaryomyces* berbentuk bulat atau oval dinding bergerigi, dan sering tumbuh dan membentuk partikel pada larutan garam dalam daging kering. Biasanya terdapat di tanah, air, tumbuhan, makanan dan spesimen yang berasal dari klinik.

*Debaryomyces hansenii* adalah jenis spesies yang paling signifikan dan sering terdapat dalam produk susu dan juga pada produk hewan yang lain seperti sosis, ham, *frankfurters*, *bacon* dan produk lainnya (Balla, 2007).

Sistematika Ragi *Debaryomyces hansenii* adalah sebagai berikut:

Kingdom : Fungi  
 Filum : *Ascomycota*  
 Kelas : *Saccharomycetes*  
 Ordo : *Saccharomycetales*  
 Famili : *Saccharomycetaceae*  
 Genus : *Debaryomyces*  
 Spesies : *Debaryomyces hansenii*  
 (Lodder and Kreger- van Rij, (1984))



Gambar 7. Struktur *Debaryomyces hansenii*  
 Sumber: <http://wineserver.ucdavis.edu/>

Keberadaan khamir ini pada produk makanan (daging dan susu) sangat special karena *Debaryomyces hansenii* termasuk kelompok khamir yang nonfermentative sehingga metabolisme pada gula-gula hingga pyruvate melalui jalur EMP (Embden-Meyerhof-Parnas) dan oksidasi pada *pyruvate* melalui siklus tricaboxylic acid (TCA cycle). Asam organik seperti sitrat, laktat dan suksinat di asimilasi melalui siklus TCA, dan juga bekerja pada siklus pentose phosphate. Khamir ini pada umumnya berasal dari kontaminasi alam pada produk fermentasi dan merupakan kontaminan yang paling sering pada industri susu. Salah satu sifat dari *Debaryomyces hansenii* adalah *cryotolerant* (tahan dibekukan), termasuk *marine yeast*, dan bisa toleran tingkat salinitas sampai 24%.

*Debaryomyces hansenii* menunjukkan performa yang baik pada konsentrasi garam yang cukup tinggi. Misalkan dibandingkan dengan jenis khamir

yang lain, yaitu *S. cerevisiae*, pertumbuhannya akan terhambat pada konsentrasi 1,5 M NaCl. Namun *Debaryomyces hansenii* masih dapat tumbuh pada konsentrasi 2,5 M NaCl. Kedua khamir ini sama-sama dapat tumbuh pada konsentrasi 50  $\mu$ M KCl. Namun pertumbuhan *S. cerevisiae* terhambat oleh konsentrasi 0,6 M NaCl, sedangkan pertumbuhan *Debaryomyces hansenii* distimulasi oleh konsentrasi NaCl sampai 1 M. Pada penelitian lainnya ditemukan bahwa meningkatnya konsentrasi kation alkali yang berbeda akan mempengaruhi pertumbuhan *S. cerevisiae* dan *Debaryomyces hansenii*. Pertumbuhan *S. cerevisiae* dihambat oleh  $\text{Li}^+$  atau  $\text{Na}^+$ , sedangkan *Debaryomyces hansenii* dihambat oleh  $\text{Li}^+$  tetapi tidak oleh  $\text{Na}^+$ , malah konsentrasi NaCl yang relatif tinggi akan meningkatkan laju pertumbuhan *Debaryomyces hansenii*. Begitu pula pengukuran level ATP menunjukkan bahwa level metabolit *Debaryomyces hansenii* lebih tinggi pada sel yang tumbuh pada konsentrasi 1M NaCl daripada sel yang tumbuh pada konsentrasi 1M KCl.

Bukti lain bahwa *Debaryomyces hansenii* bersifat tahan garam yaitu kapasitasnya untuk mengakumulasi konsentrasi garam yang tinggi tanpa membuat dirinya sendiri keracunan. Karena alasan itulah khamir ini disebut sebagai *Na<sup>+</sup> include organism*. Peneliti lainnya juga setuju bahwa dalam konsentrasi garam yang tinggi *Debaryomyces hansenii* dapat hidup dengan baik dan mengakumulasi  $\text{Na}^+$  lebih banyak daripada *S. cerevisiae*. Begitu pula ketika konsentrasi kation tersebut dibandingkan dengan air laut yang mengandung  $\text{Na}^+$  tinggi dan rendah  $\text{K}^+$ , *Debaryomyces hansenii* akan tumbuh optimum, sementara pertumbuhan *S. cerevisiae* akan terhambat. Hal ini dikarenakan  $\text{Na}^+$  yang melindungi sel *Debaryomyces hansenii* dari faktor tekanan tambahan. Perbandingan pengaruh faktor tekanan menunjukkan perbedaan antara pertumbuhan *S. cerevisiae* dan *Debaryomyces hansenii*. *S. cerevisiae* tumbuh lebih baik pada pH asam atau pada suhu tinggi, sedangkan *Debaryomyces hansenii* memiliki performa yang baik pada pH tinggi dan terdapat konsentrasi garam yang tinggi.

Dalam sebuah penelitian yang bertujuan untuk mengetahui seberapa jauh ketahanan hidup dan toleransi dari *Debaryomyces hansenii* pada produk-produk makanan yang mengandung asam organik dan garam konsentrasi tinggi.

*Debaryomyces hansenii* menunjukkan jumlah populasi tetap tinggi yaitu 104-105 cfu/ml pada media yang hipertonis seperti larutan glukosa, asam sitrat dan laktat masing-masing konsentrasi 2% ditambah garam dari 0 dan 15%. Hal ini disebabkan oleh adanya produksi poliol dari intra maupun ekstraseluler (gliserol, eritritol dan arabitol) yang gunanya sebagai penyeimbang (osmoregulator) bagi sel yeast yang mengalami stres tersebut. Sel ini beradaptasi dalam larutan yang hipertonis hingga waktu adaptasinya mencapai 48 jam pada larutan tersebut. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa poliol yang dihasilkan oleh sel tersebut adalah merupakan faktor kunci yang disebut sebagai osmoregulator yang dapat berakibat *Debaryomyces hansenii* tetap dapat bertahan pada lingkungan yang hipertonis.

### **2.3.3. Faktor-faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan Ragi**

Dalam menggunakan jamur dan ragi, sebaiknya kita memperhatikan juga kondisi yang baik untuk jamur dan ragi agar dapat tumbuh dan berkembang dengan baik. Ada berbagai faktor yang mempengaruhi pertumbuhan jamur dan ragi yaitu :

#### **A. Nutrisi**

Dalam kegiatannya, ragi memerlukan penambahan nutrisi untuk pertumbuhan dan perkembangbiakan, yaitu: Unsur C dari senyawa karbohidrat, Unsur N dan P dari senyawa protein, Mineral, Vitamin

#### **B. Keasaman (pH)**

Untuk fermentasi alkohol, ragi memerlukan media dengan suasana asam yaitu antara 4,8 – 6,0. Pengaturan pH dapat dilakukan dengan penambahan asam sulfat encer bila substrat fermentasinya bersifat alkalis dan penambahan natrium bikarbonat jika substratnya terlalu asam.

Menurut Wood (1998), *yeast* pada umumnya dapat tumbuh pada kisaran pH4–4,5.

#### **C. Suhu**

Suhu optimum untuk pertumbuhan *yeast* adalah 24-26°C dan suhu untuk menghasilkan produk optimum adalah 28-32°C. (Anonim, 2005)

*Yeast* aktif pada kisaran suhu 0-50°C sedangkan suhu optimum pertumbuhan dan aktivitas selnya adalah 28-35°C. (Daulay dan Rahman, 1992)

Pada suhu 10-30°C terbentuk alkohol lebih banyak karena ragi bekerja optimal pada suhu itu. (Winarno, 1984). Sedangkan suhu optimum untuk fermentasi pada umumnya adalah pada suhu 25 – 30°C.

#### D. Oksigen

Oksigen selama proses fermentasi harus diatur sebaik mungkin untuk memperbanyak atau menghambat pertumbuhan mikroba tertentu. Setiap mikroba membutuhkan oksigen yang berbeda jumlahnya untuk pertumbuhan atau membentuk sel-sel baru, dan untuk fermentasi. Misalnya ragi roti (*Saccharomyces cerevisiae*) akan tumbuh lebih baik pada keadaan aerobik tetapi akan melakukan fermentasi terhadap gula jauh lebih cepat pada keadaan anaerobik. (Fessenden, 1982)

Dikarenakan fermentasi etanol berlangsung anaerobik, dalam kondisi tanpa oksigen tersebut ragi akan menggunakan glukosa sebagai sumber energinya dan membentuk etanol dan karbon dioksida sebagai metabolitnya. (Hidayat N., dkk. 2006).

#### E. Kandungan Gula

Kandungan gula akan sangat mempengaruhi proses fermentasi, kandungan gula optimum yang diperlukan untuk fermentasi adalah 10-25 % (w/v), untuk permulaan, kadar gula yang digunakan adalah 10-15% (w/v). (Wood, 1998)

### 2.4. Bioetanol

Bioetanol merupakan salah satu sumber energi terbarukan yang dapat menggantikan atau sebagai campuran bahan bakar fosil, banyak digunakan pada minuman, kosmetik, pada bidang kesehatan sebagai zat antiseptik, solven, serta sebagai bahan baku industri. Kebutuhan etanol di dunia untuk berbagai penggunaan semakin bertambah beberapa tahun belakangan ini. Pada tahun 2010, konsumsi etanol di dunia diperkirakan mencapai 82,13 juta liter dan ditahun 2015 diperkirakan meningkat 171,23 juta liter (Raya Industrial, 2010). Bioetanol adalah etanol yang diproduksi dari bahan baku nabati. Bioetanol merupakan cairan hasil

proses fermentasi gula dari sumber karbohidrat dengan menggunakan bantuan mikroorganisme. Bioetanol dapat dibuat dari tiga kelompok bahan baku yaitu bahan yang mengandung gula seperti tebu dan nira, bahan berpati seperti jagung dan ubi ubian, serta bahan berserat berupa limbah pertanian yang saat ini terus dikembangkan di negara maju (Humasristek, 2006).

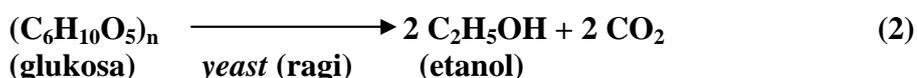
Pembuatan bioetanol dari bahan yang mengandung gula relatif lebih mudah dan murah dibandingkan bahan berpati dan berselulosa, hal ini disebabkan karena pada bahan yang mengandung gula tidak perlu perlakuan pendahuluan (*Pretreatment*) seperti proses liquifikasi, pemasakan, sakarifikasi dan hidrolisis. Tetapi jika ditinjau dari segi harga bahan baku, bahan yang mengandung gula lebih mahal dari bahan berpati dan berselulosa. Bioetanol mempunyai empat karakteristik yang sesuai sebagai bahan bakar yaitu: bentuknya cairan sehingga mudah bergerak, nilai kalor 2/3 nilai kalor gasolin, dapat dicampurkan sampai 10% pada bensin untuk meningkatkan angka oktan, dan dapat meningkatkan angka oktan bensin tanpa timbal.

Etanol (etil alkohol) merupakan senyawa hidrokarbon dengan gugus hidroksil (-OH) dengan 2 atom karbon (C) dengan rumus kimia  $C_2H_5OH$ . Etanol tidak berwarna dan tidak berasa tapi memiliki bau yang khas. Bahan ini dapat memabukkan jika diminum. Karena sifatnya yang tidak bercun, bahan ini banyak dipakai sebagai pelarut dalam dunia farmasi dan industri makanan dan minuman. Etanol digunakan sebagai bahan anti beku. Etanol mudah larut dalam air dan merupakan pelarut yang baik untuk pewangi dan cat.

(<http://id.wikipedia.org/wiki/bioetanol>)

Reaksi yang terjadi pada proses produksi etanol/ bioetanol secara sederhana ditunjukkan pada reaksi 1 dan 2 berikut:

### Proses produksi ethanol



Sumber: Fardiaz, 1992

Berdasarkan kadar alkoholnya, etanol terbagi menjadi tiga grade sebagai berikut:

- A. Grade industri dengan kadar alkohol 90-94%
- B. Netral dengan kadar alkohol 96-99,5%, umumnya digunakan untuk minuman keras atau bahan baku obat dalam industri farmasi
- C. Grade bahan bakar dengan kadar alkohol diatas 99,5% (Prihardana, R., dkk., 2008).

#### **2.4.1. Karakteristik bioetanol**

##### A. Sifat fisika bioetanol

- 1. Mudah menguap;
- 2. Tidak berwarna;
- 3. Titik didih 78,4°C;
- 4. Larut dalam air;
- 5. Bersifat nonelektrolit;
- 6. Titik beku -112,3°C;
- 7. Berat molekul 46,07 gr/mol.

##### B. Sifat kimia bioetanol

- 1. Dapat bereaksi dengan logam-logam natrium menghasilkan natrium alkanoat. Atom H pada gugus OH disubstitusi oleh atom Na;
- 2. Dapat bereaksi dengan fosfor trihalida akan menghasilkan senyawa alkil halida. Gugus OH akan disubtitusikan oleh atom halogen;
- 3. Etanol dapat dioksidasi dan akan membentuk aldehid dengan penambahan air dan katalisator  $\text{KMnO}_4$ .

##### C. Bioetanol standar 96% memiliki karakteristik sebagai berikut:

- 1. Titik didih : 78,4°C;
  - 2. Berat molekul : 46,07 gr/mol;
  - 3. Viskositas : 0,0087 Cp;
  - 4. Entalpi pada 77°C : 275 kcal/gr;
  - 5. Spgr : 0,789 gr/ml.
- (Asri Kusuma, 2011)

## 2.5. 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 E., 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  $27 - 32^{\circ}\text{C}$ . Pada tahap ini akan dihasilkan gas  $\text{CO}_2$  sebagai *by product* dan *sludge* sebagai limbahnya. Gas  $\text{CO}_2$  yang dihasilkan memiliki perbandingan stoikiometri yang sama dengan etanol yang dihasilkan yaitu 1:1. Setelah melalui proses pemurnian, gas  $\text{CO}_2$  dapat digunakan sebagai bahan baku gas dalam minuman berkarbonat (Hambali E., dkk., 2008).

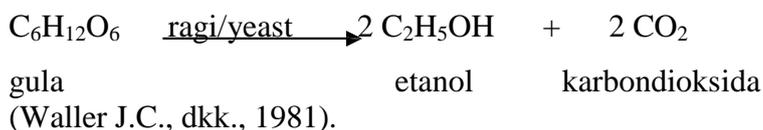
Tahap berikutnya adalah pemurnian bioetanol yang diperoleh. Tahap ini dilakukan dengan metode destilasi. Destilasi dilakukan pada suhu diatas titik didih etanol murni yaitu pada kisaran  $78 - 100^{\circ}\text{C}$ . Produk yang dihasilkan pada tahap ini memiliki kemurnian hingga 96%. Etanol hasil destilasi 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).

### 2.5.1. Sakarifikasi

Ragi tidak dapat langsung memfermentasikan pati. Oleh karena itu diperlukan tahap sakarifikasi, yakni perubahan pati menjadi maltosa atau glukosa dengan menggunakan enzim atau asam. Dengan memanfaatkan enzim pengurai pati dari mikroorganisme, konversi pati untuk menghasilkan maltose dan dekstrin yang tidak terfermentasi terjadi karena hidrolisis enzimatis. Komposisi kimia dari pati adalah amilosa dan amilopektin. Amilosa merupakan polimer dari glukosa yang merupakan rantai lurus dan secara kuantitatif amilosa dapat dihidrolisis menghasilkan maltose sedangkan amilopektin hanya akan terhidrolisis sebagian. Pati jagung yang disakarifikasi akan menghasilkan 80% maltose dari total pati dan sisanya disebut limit dekstrin (Hidayat N., dkk., 2006).

### 2.5.2. Fermentasi

Tahap inti dari produksi bioetanol adalah fermentasi gula sederhana, baik yang berupa glukosa, sukrosa, maupun fruktosa dengan menggunakan ragi/yeast terutama *Saccharomyces sp.* atau bakteri *Zyomonas mobilis*. Dalam proses ini, gula akan dikonversi menjadi etanol dan gas karbon dioksida .



Fermentasi dapat didefinisikan sebagai perubahan gradual oleh enzim beberapa bakteri, ragi, dan jamur. Contoh perubahan kimia dari fermentasi meliputi pengasaman susu, dekomposisi pati dan gula menjadi alkohol dan karbon dioksida, serta oksidasi senyawa nitrogen organik. Bahan dasar untuk kebutuhan fermentasi dapat berasal dari hasil pertanian, perkebunan, maupun limbah industri.

Bahan dasar yang umum dipergunakan di negara berkembang adalah:

1. Molase ( karena banyaknya tebu di negara tersebut).
2. Pati (gandum, jagung, beras, dll.)
3. Jerami
4. Dedak

5. Kulit kopi, kulit coklat, sabut kelapa.
6. Ampas tebu, ampas biji-bijian yang telah diambil minyaknya.
7. Kotoran binatang
8. Air limbah.
9. Sampah sebagai komponen pupuk
10. Sisa pabrik kertas, pabrik susu, dan sebagainya.

Bahan dasar harus memenuhi syarat-syarat sebagai berikut: Mudah didapat, jumlahnya besar, murah harganya dan bila diperlukan ada pengantinya. (Hidayat N., dkk. 2006).

Penggunaan inokulum murni dalam fermentasi akan memperbaiki mutu produk dan mengurangi kontaminasi. Inokulum tradisional yang umum dipakai masyarakat awam adalah sumber kontaminan karena mikroorganismenya di dalamnya tidak diketahui secara pasti. Adanya mikroorganismenya penghasil pigmen, terutama kapang akan menyebabkan produk fermentasi menjadi berwarna, berasa asam dan memiliki bau yang asing. Inokulum atau ragi yang ditambahkan dalam fermentasi biasanya kurang dari 1%. Umumnya jumlah ragi yang dipakai adalah 0,2 – 0,5% (Hidayat N., dkk., 2006).

## **2.6. Destilasi**

Kadar etanol hasil fermentasi tidak dapat mencapai level di atas 18 hingga 21 persen, sebab etanol dengan kadar tersebut bersifat toxic 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 dan beberapa komponen cair lain dari substrat fermentasi sehingga diperoleh kadar etanol yang lebih tinggi (Archunan G, 2004).

Tujuan proses destilasi adalah untuk memisahkan etanol dari campuran etanol-air. Titik didih etanol adalah 78°C dan titik didih air adalah 100°C sehingga dengan pemanasan pada suhu 78°C dengan metode destilasi maka etanol dapat dipisahkan dari campuran etanol-air. Konsentrasi maksimum etanol yang dapat diperoleh dengan cara destilasi biasa adalah 96%. Etanol anhidrat (99,5%-100%) dapat diperoleh dengan menggunakan metode destilasi azeotrop

menggunakan benzen (Waller J.C., dkk. 1981). Campuran azeotrop etanol-air dapat dipisah dengan penambahan benzen dimana akan terbentuk campuran azeotrop benzen-etanol-air dengan titik didih 64,9°C. Titik didih campuran tersebut lebih rendah dari campuran etanol-air (78,2°C) sehingga etanol dapat dipisahkan dari air dengan destilasi bertingkat, namun pemisahan etanol dengan metode ini akan menyisakan beberapa ppm residu benzene di dalam etanol yang diperoleh. Benzen adalah bahan yang toxic bagi manusia, selain itu penggunaan metode ini juga menghasilkan etanol yang tidak murni sehingga metode ini tidak banyak dipergunakan (Graham S, 2003).

Metode alternatif yang dapat dipergunakan untuk memperoleh etanol dengan kadar 100% dari etanol 96% adalah dengan menggunakan molecular sieve, yakni suatu absorben sintesis berbentuk pelet yang dapat secara selektif mengikat molekul air. Selain murah harganya, metode ini tidak meninggalkan residu pada etanol yang diperoleh. *Molecular sieve* yang telah terpakai juga dapat dipakai kembali setelah dikeringkan (Mathewson S.W., 1980).

## **2.7. Kromatografi Gas**

Kromatografi adalah suatu cara pemisahan lain yang penting di dalam analisis kimia. Di dalam kromatografi diperlukan adanya dua fase yang tidak saling mencampur, yaitu fase diam dan fase bergerak. Fase diam disini dapat berupa suatu zat padat yang ditempatkan dalam suatu kolom, atau dapat juga berupa cairan terserap (teradsopsi) berupa lapisan yang tipis pada butir-butir halus pada suatu zat padat pendukung (*solid support material*) yang ditempatkan di dalam kolom. Fase geraknya dapat berupa gas (gas pembawa) atau cairan.

Campuran yang akan dipisahkan komponen-komponennya, dimasukkan kedalam kolom yang mengandung fase diam. Dengan bantuan fase gerak, komponen-komponen campuran itu kemudian dibawa bergerak melalui fase diam di dalam kolom. Perbedaan ataraksi atau afinitas atara komponen-komponen campuran itu dengan kedua fase, menyebabkann komponen-komponen itu bergerak dengan kecepatan berbeda melalui kolom. Akibat adanya perbedaan

kecepatan (*differential migration*), komponen-komponen itu terpisah satu sama lain.

## 2.8. Penelitian Terdahulu

Bioetanol adalah salah satu sumber energi alternatif yang saat ini mulai banyak diteliti dan dikembangkan oleh masyarakat baik individu maupun industri. Ini dikarenakan bioetanol lebih ramah lingkungan karena berasal dari sisa sumber-sumber alami. Seperti Hapsari (2013) dalam penelitiannya terhadap Singkong karet (*Manihot glaziovii*) menyatakan bahwa jenis singkong ini merupakan singkong beracun yang mengandung CN- yang bersifat racun dengan kandungan karbohidrat mencapai 98,5% yang dapat dikonversi menjadi etanol pada destilasi ke 2. Fermentasi yang dilakukan menggunakan khamir *Saccharomyces cerevisiae* secara anaerob dan menghasilkan kadar etanol paling tinggi yaitu sebesar 94% pada kondisi waktu optimum 168 jam dari tiga variable waktu yaitu 144 jam, 168 jam dan 192 jam. Sementara untuk variabel masa ragi diperoleh kadar alkohol etanol tertinggi pada massa ragi sebanyak 15 g dari variable 5 g, 10 g dan 15 g. Enzim yang digunakan dalam penelitian ini adalah enzim amilase dalam mengubah pati menjadi glukosa.

Heppy Rikana dan Rizky Adam (2007) dalam penelitiannya melakukan untuk mendapatkan bioetanol dari singkong secara fermentasi menggunakan ragi tape. Pada penelitian ini variabel yang digunakan adalah rasio ragi (80 gr, 90 gr, 100 gr), penambahan nutrien NPK ( 10 gr, 15 gr, 20 gr), dan lama fermentasi (10 hari, 14 hari, 18 hari). Pada penelitian ini diperoleh hasil bahwa pada variabel ragi penambahan ragi 90 gr diperoleh hasil yang paling tinggi yaitu 5,33 % v/v, untuk variabel nutrien penambahan NPK 20 gr diperoleh hasil paling tinggi yaitu 4,98 % v/v, sedangkan untuk variabel lama fermentasi diperoleh hasil tertinggi pada lama fermentasi 14 hari yaitu 4,14 % v/v. dengan persen error rata-rata untuk variabel ragi adalah 96,33%, untuk variabel nutrien adalah 96,66%, dan untuk variabel lama fermentasi adalah 97,24%, pada fermentasi ini menggunakan substrat singkong dengan kadar pati 21,6 %.

Sementara itu peneliti lain seperti Arnata (2009) mengungkapkan bahwa Penggunaan kultur campuran *T. viride*, *A. niger* dan *Saccharomyces cerevisiae* pada proses fermentasi substrat hidrolisat enzim secara SFS selama 4 hari dapat meningkatkan konsentrasi etanol dari  $5,36 \pm 0,63\%$  (b/v) menjadi  $7,41 \pm 1,79\%$  (b/v) atau meningkat 38,29% dibandingkan dengan menggunakan kultur tunggal *S. cerevisiae*, sedangkan penggunaan kultur campuran yang ditambahkan secara bertahap pada proses fermentasi hanya mampu meningkatkan konsentrasi etanol dari  $5,36 \pm 0,63\%$  (b/v) menjadi  $6,38 \pm 0,83\%$  (b/v) atau meningkat 19,06% terhadap penggunaan kultur tunggal *Saccharomyces cerevisiae*. Adanya penambahan AMG dengan selulase kasar dan komersial pada tahap sakarifikasi juga dapat meningkatkan konsentrasi etanol dari  $5,36 \pm 0,63\%$  (b/v) menjadi  $9,29 \pm 1,76\%$  (b/v).

M. Samsuri, dkk. (2007) dalam penelitiannya tentang pemanfaatan selulosa bagas untuk produksi bioetanol melalui sakarifikasi dan fermentasi serentak dengan enzim *xylanase* menunjukkan kandungan lignoselulosa pada bagas sebesar lebih kurang 52,7% selulosa, 20% hemiselulosa, dan 24,2% lignin. Hemiselulosa merupakan polisakarida yang dapat dihidrolisis oleh enzim *xylanase* dan kemudian akan difermentasikan oleh yeast *S. cerevisiae* menjadi etanol melalui proses Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak (SSF). Beberapa parameter yang dianalisis pada penelitian itu antara lain kondisi pH (4, 4,5, dan 5), untuk meningkatkan kuantitas etanol dilakukan penambahan HCl berkonsentrasi rendah (0,5% dan 1% (v/v)) dan bagas dengan perlakuan jamur pelapuk putih (*L. edodes*) selama 4 minggu. Proses SSF dilakukan dengan waktu inkubasi selama 24, 48, 72, dan 96 jam. Perlakuan dengan pH 4, 4,5, dan 5 menghasilkan konsentrasi etanol tertinggi berturut-turut 2,357 g/L, 2,451 g/L, 2,709 g/L. Perlakuan penambahan HCl konsentrasi rendah mampu meningkatkan produksi etanol, penambahan dengan konsentrasi HCL 0,5 % dan 1 % berturut-turut menghasilkan etanol 2,967 g/L, 3,249 g/L. Perlakuan dengan menggunakan jamur pelapuk putih juga dapat meningkatkan produksi etanol yang dihasilkan. Setelah bagas diberi perlakuan *L. edodes* 4 minggu mampu menghasilkan etanol dengan hasil tertinggi 3,202 g/L.