

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Singkong

Tanaman singkong merupakan salah satu jenis tanaman dari hasil pertanian yang utama di Indonesia. Keunggulan dari tanaman ini adalah mudah tumbuh sekalipun pada tanah kering dan miskin unsur hara serta tahan terhadap serangan penyakit maupun tumbuhan pengganggu (gulma). Singkong berasal dari benua Amerika, tepatnya dari Brasil. Penyebarannya hampir ke seluruh dunia, antara lain Afrika, Madagaskar, India, dan Tiongkok. Tanaman ini masuk ke Indonesia pada tahun 1852. Singkong berkembang di negara-negara yang terkenal dengan wilayah pertaniannya.

Para petani biasanya menanam tanaman singkong dari golongan singkong yang tidak beracun untuk mencukupi kebutuhan pangan. Sedangkan untuk keperluan industri atau bahan dasar untuk industri biasanya dipilih golongan umbi yang beracun. Karena golongan ini mempunyai kadar pati yang lebih tinggi dan umbinya lebih besar serta tahan terhadap kerusakan, misalnya perubahan warna.

2.1.1 Kandungan yang Terdapat dalam Singkong

Kandungan gizi yang terdapat dalam singkong sudah kita kenal sejak dulu. Umbi singkong merupakan sumber energi yang kaya karbohidrat namun miskin akan protein. Selain kandungan gizi di atas, singkong juga mengandung racun yang dalam jumlah besar cukup berbahaya. Racun singkong yang selama ini kita kenal adalah Asam biru atau Asam sianida. Baik daun maupun umbinya mengandung suatu *glikosida cyanogenik*, artinya suatu ikatan organik yang dapat menghasilkan racun biru atau HCN yang bersifat sangat toksik. Besarnya racun dalam setiap jenis singkong tidak konstan dan dapat berubah. Hal ini disebabkan adanya beberapa faktor yang mempengaruhi yaitu antara lain : keadaan iklim, keadaan tanah, cara pemupukan dan cara budidayanya.

2.1.2 Singkong karet



Gambar 1: Umbi Singkong Karet

Singkong dapat dibedakan menurut warna, rasa, umur dan kandungan sianidanya (HCN). Bila rasa pahit maka kandungan sianidanya tinggi. Berdasarkan kadar Asam Sianida (HCN) dalam singkong, tidak semua jenis singkong dapat dikonsumsi ataupun diolah secara langsung. Singkong dengan kadar HCN kurang dari 100 mg/kg (ditandai dengan adanya rasa manis), merupakan singkong yang layak dan aman dikonsumsi ataupun diolah sebagai bahan makanan secara langsung.

Tabel 1. Kadar HCN dalam Beberapa Jenis Singkong

No	Jenis / Varietas	Rasa	Kadar HCN mg/kg	
			Umbi	Daun
1	Mangi (di tanah subur)	Enak	32	136
2	Mangi (di tanah kering)	Pahit	289	542
3	Betawi	Enak	33	146
4	Valenka	Enak	39	158
5	Singapura	Enak	60	201
6	Basiorao	Agak pahit	82	230
7	Bogor	Agak pahit	90	324
8	Tapi kuru	Pahit	130	230
9	SPP	Pahit	206	468

Sumber: Rahmat Rukmana, 1997

Menurut Departemen perindustrian (1999), berdasarkan kadar HCN dalam umbi, singkong dibedakan menjadi empat kelompok, yaitu :

a. Singkong Manis

Rasa manis singkong disebabkan oleh kandungan asam sianida yang sangat rendah, hanya sebesar 0,04% atau 40 mg HCN/ kg singkong. Jenis singkong manis antara plain adalah Gading, Adira I, Mangi, Betawi, Mentega, Randu Ranting, dan Kaliki.

b. Singkong Agak Beracun

Jenis singkong agak beracun memiliki kandungan HCN antara 0,05 - 0,08% atau 50–80 mg HCN / kg singkong

c. Singkong Beracun Singkong beracun, kandungan HCN antara 0,08 - 0,10% atau 80 – 100 mg HCN / kg singkong.

d. Singkong Sangat Beracun.

Ketela pohon termasuk kategori sangat beracun apabila mengandung HCN lebih dari 0,1 % atau 100 mg/kg singkong. Jenis singkong sangat beracun antara lain adalah Bogor, SPP, dan Adira II.

Singkong karet merupakan salah satu jenis singkong yang kurang dimanfaatkan oleh masyarakat, karena mengandung senyawa beracun berupa asam sianida. Dimana singkong karet ini tidak memiliki nilai jual yang tinggi. Selain itu singkong karet ini mengandung karbohidrat yang lebih tinggi dibandingkan dengan singkong biasa yaitu empat kali lebih besar. Oleh karena itu singkong karet ini singkong karet ini sangat cocok untuk diproses dalam pembuatan bioetanol.

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

Kingdom	: <i>Plantae</i> (Tumbuhan)
Subkingdom	: <i>Tracheobionta</i> (Tumbuhan berpembuluh)
Super Divisi	: <i>Spermatophyta</i> (Menghasilkan biji)
Divisi	: <i>Magnoliophyta</i> (Tumbuhan berbunga)
Kelas	: <i>Magnoliopsida</i> (berkeping dua / dikotil)
Sub Kelas	: <i>Rosidae</i>
Ordo	: <i>Euphorbiales</i>
Famili	: <i>Euphorbiaceae</i>
Genus	: <i>Manihot</i>
Spesies	: <i>Manihot glaziovii</i> M.A

Tabel 2. 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

2.1.3 Asam Sianida (HCN)

Glikosida sianogenetik merupakan senyawa yang terdapat dalam bahan makanan nabati dan secara potensial sangat beracun karena dapat terurai dan mengeluarkan hidrogen sianida. Hidrogen sianida dikeluarkan bila komoditi tersebut dihancurkan, dikunyah, mengalami pengirisan, atau rusak. Zat glikosida ini diberi nama linamarin yang berasal dari aseton sianidrin yang bila dihidrolisis akan terurai menjadi glukosa, aseton dan HCN.

Asam sianida disebut juga Hidrogen sianida (HCN), biasanya terdapat dalam bentuk gas atau larutan dan terdapat pula dalam bentuk garam-garam alkali seperti potasium sianida. Sifat-sifat HCN murni mempunyai sifat tidak berwarna, mudah menguap pada suhu kamar dan mempunyai bau khas.

HCN mempunyai berat molekul yang ringan, sukar terionisasi, mudah berdifusi dan lekas diserap melalui paru-paru, saluran cerna dan kulit. HCN dikenal sebagai racun yang mematikan. HCN akan menyerang langsung dan menghambat sistem antar ruang sel, yaitu menghambat sistem *cytochrome oxidase* dalam sel-sel, hal ini menyebabkan zat pembakaran (oksigen) tidak dapat beredar ketiap-tiap jaringan sel-sel dalam tubuh. Dengan sistem keracunan ini maka menimbulkan tekanan dari alat-alat pernafasan yang menyebabkan kegagalan pernafasan, serta dapat menghentikan pernafasan dan jika tidak tertolong akan menyebabkan kematian. Bila dicerna, HCN sangat cepat terserap oleh alat pencernaan yang masuk ke dalam saluran darah. Tergantung jumlahnya HCN dapat menyebabkan sakit hingga kematian (dosis yang mematikan 0,5 - 3,5 mg HCN/kg berat badan).

2.1.4 Cara Mengurangi Kadar HCN

Racun biasanya berada pada daun dan singkong, racun ini diketahui sebagai senyawa *cyanogenik glycoside* dimana enzim dapat menghasilkan asam sianida, sianida dikenal sebagai pembunuh berdarah dingin dan sulit dideteksi, dia tidak berasa, tidak berbau, dan tak berwarna, satu satunya indikator untuk mengetahui sianida ada pada singkong adalah warna kebiruan yang muncul pada singkong. Bila lama terpapar udara, racun sianida akan jauh berkurang apabila dipanaskan. Banyak korban keracunan akibat salah dalam pengolahan singkong, karena memasak singkong dan daunnya tidak sempurna.

Ada beberapa cara yang dapat dilakukan untuk mengurangi kandungan HCN yang terdapat dalam singkong, yaitu dengan cara perendaman, pencucian, perebusan, pengukusan, penggorengan atau pengolahan lain. Dengan adanya pengolahan dimungkinkan dapat mengurangi kadar HCN sehingga bila singkong dikonsumsi tidak akan membahayakan bagi tubuh.

Pengolahan secara tradisional dapat mengurangi/ bahkan menghilangkan kandungan racun. Pada singkong, kulitnya dikupas sebelum diolah, direndam sebelum dimasak dan difermentasi selama beberapa hari. Dengan perlakuan tersebut linamarin banyak yang rusak dan hidrogen sianidanya ikut terbuang keluar sehingga tinggal sekitar 10- 40 mg/kg. Asam biru (HCN) dapat larut di dalam air maka untuk menghilangkan asam biru tersebut cara yang paling mudah adalah merendamnya di dalam air pada waktu tertentu.

2.2 Sakarifikasi atau Hidrolisis Pati Menjadi Gula-Gula Sederhana

Sakarifikasi merupakan proses pemecahan gula kompleks menjadi gula sederhana. Pada tahap sakarifikasi, selulosa diubah menjadi sukrosa dan selanjutnya menjadi gula-gula sederhana seperti glukosa melalui proses hidrolisis. Sementara itu hasil hidrolisis komponen hemiselulosa adalah campuran gula-gula sederhana seperti glukosa, galaktosa dan xylosa.

a. Hidrolisis dengan Menggunakan Asam

Hidrolisis asam adalah hidrolisis dengan menggunakan asam yang dapat mengubah polisakarida (pati, selulosa) menjadi gula. Asam akan bersifat sebagai katalisator yang dapat membantu dalam proses pemecahan karbohidrat menjadi gula.

b. Hidrolisis Termal

Hidrolisis termal menggunakan tekanan dan temperatur yang tinggi untuk memisahkan komponen organiknya, menghidrolisis hemiselulosa dan mengubah sifat-sifat selulosa dan lignin.

c. Hidrolisis Enzimatik

Proses menggunakan enzim biasanya lebih disukai dari pada proses menggunakan asam karena enzim bekerja lebih spesifik sehingga tidak menghasilkan produk yang tidak diharapkan, dapat digunakan pada kondisi proses yang lebih ringan, dan lebih ramah lingkungan.

Pada proses hidrolisis secara enzimatik dapat digunakan enzim selulase atau enzim lainnya yang dapat memecah selulosa menjadi monomer-monomernya. Aplikasi hidrolisis menggunakan enzim secara sederhana dilakukan dengan mengganti tahap hidrolisis asam dengan tahap hidrolisis enzim. Hidrolisis enzimatis memiliki beberapa keuntungan dibandingkan hidrolisis asam, antara lain tidak terjadi degradasi gula hasil hidrolisis, kondisi proses yang lebih lunak (pH sekitar 4,7 - 4,8 dan suhu 45–50°C), tidak terjadi reaksi samping, lebih ramah lingkungan dan tidak melibatkan bahan - bahan yang bersifat korosif.

Beberapa kelemahan dari hidrolisis enzimatis antara lain adalah membutuhkan waktu yang lebih lama, dan kerja enzim dihambat oleh produk. Selain itu, enzim bekerja secara spesifik dan tidak bisa menembus lignin yang mengikat selulosa dan hemiselulosa. Sehingga sebelum dihidrolisis secara enzimatis, limbah lignoselulosa harus mengalami proses penghilangan lignin atau biasa disebut delignifikasi. Harga enzim yang relatif lebih mahal dibandingkan asam juga menjadi kerugian penggunaan hidrolisis enzimatis.

Enzim merupakan senyawa protein kompleks yang dihasilkan oleh sel-sel organisme dan berfungsi sebagai katalisator suatu reaksi kimia. Kerja enzim sangat spesifik, karena strukturnya hanya dapat mengkatalisis satu tipe reaksi kimia saja dari suatu substrat, seperti hidrolisis, oksidasi dan reduksi. Enzim yang digunakan ada 2, yaitu: *α-amilase* dan *glukoamilase*.

2.2.1 Pengertian Enzim Amilase

Amilase adalah enzim yang mengkatalisis pemecahan pati menjadi gula. Amilase hadir pada manusia air liur, di mana ia memulai proses kimia pencernaan. Makanan yang mengandung pati banyak, tetapi sedikit gula, seperti beras dan kentang, rasa sedikit manis karena dikunyah. Serta beberapa amilase pati yang dikunyah tersebut menjadi gula di dalam mulut. Tumbuhan dan beberapa bakteri juga menghasilkan amilase. Sebagai diastase, amilase adalah enzim pertama yang ditemukan dan diisolasi. Semua amilase adalah hidrolisis glikosida dan bertindak atas α -1, 4 - obligasi glikosidik.

2.2.2 Klasifikasi Enzim Amilase

a. *α-Amilase*

α-amilase (bahasa Inggris: *alpha-amylase*, *1,4-alpha-D-glucan glucanohydrolase*, *pancreatic alpha-amylase*, *α-amilas*) adalah salah satu enzim yang berperan dalam proses degradasi pati, sejenis makromolekul karbohidrat. Struktur molekuler dari enzim ini adalah α -1,4-glukanohidrolase. Bersama dengan enzim pendegradasi pati lain, pululanase, *α-amilase* termasuk ke dalam golongan enzim kelas 13 glikosil hidrolase (E.C.3.2.1.1). *α-amilase* ini memiliki beberapa sisi aktif yang dapat mengikat 4 hingga 10 molekul substrat sekaligus. Alpha-amilase pada umumnya aktif bekerja pada kisaran suhu 25 °C hingga 95 °C. Penambahan ion kalsium dan klorida dapat meningkatkan aktivitas kerja dan menjaga kestabilan enzim ini. Alfa-amilase akan memotong ikatan glikosidik α -1,4 pada molekul pati (karbohidrat) sehingga terbentuk molekul-molekul karbohidrat yang lebih pendek. Hasil dari pemotongan enzim ini antara lain maltosa, maltotriosa, dan glukosa.

b. β -Amilase

β -amilase (E.C 3.2.1.2) merupakan enzim golongan hidrolase kelas 14 yang digunakan dalam proses sakarifikasi pati (sejenis karbohidrat). Sakarifikasi banyak berperan dalam pemecahan makromolekul karbohidrat. Pemecahan makromolekul karbohidrat ini akan menghasilkan molekul karbohidrat rantai pendek (sederhana). β -amilase akan memotong ikatan glikosidik pada gugus amilosa, amilopektin, dan glikogen. Amilosa merupakan struktur rantai lurus dari pati, sedangkan amilopektin merupakan struktur percabangan dari pati. Hasil pemotongan oleh enzim ini akan didominasi oleh molekul maltosa dan beta-limit dekstrin.

c. Enzim Glukoamilase

Glukoamilase merupakan salah satu enzim yang banyak digunakan dalam industri makanan dan minuman, misalnya pada pembuatan sirup glukosa. Enzim Amiloglukosidase (AMG)/glukoamilase adalah salah satu yang berperan dalam proses sakarifikasi pati. Serupa dengan enzim beta-amilase, glukoamilase dapat memecah struktur pati yang merupakan polisakarida kompleks berukuran besar menjadi molekul yang berukuran kecil. Kelebihan enzim ini yaitu selain memutus ikatan α -1,4 glikosida, juga memutus ikatan α -1,6 glikosida. Enzim ini bersifat eksoenzim. Pada umumnya, enzim ini bekerja pada suhu 45-60°C dengan kisaran pH 4,5-5,0. Produk akhir yang dihasilkan dari enzim ini yaitu glukosa. Enzim ini memiliki peranan yang cukup besar di dalam metabolisme energi di berbagai jenis organisme.

Enzim glukoamilase dapat 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.

2.2.3 Sumber Enzim Amilase

Amilase (alfa, beta dan glukoamilase) merupakan enzim yang penting dalam bidang pangan dan bioteknologi. Amilase dapat diperoleh dari berbagai sumber seperti tanaman, binatang dan mikroorganisme.

Produksi enzim amilase dapat menggunakan berbagai sumber karbon. Contoh-contoh sumber karbon yang murah adalah sekam, molase, tepung jagung, jagung, limbah tapioka dan sebagainya. Jika digunakan limbah sebagai substrat, maka limbah tadi dapat diperkaya nutrisinya untuk mengoptimalkan produksi enzim. Sumber karbon yang dapat digunakan sebagai suplemen antara lain: pati, sukrosa, laktosa, maltosa, dekstrosa, fruktosa, dan glukosa. Sumber nitrogen sebagai suplemen antara lain: pepton, tripton, ekstrak daging, ekstrak khamir, amonium sulfat, tepung kedelai, urea dan natrium nitrat.

Di dalam mulut makanan bercampur dengan air ludah yang mengandung Enzim Amilase (ptyalin). Enzim Amilase bekerja memecah karbohidrat rantai panjang seperti amilum dan dekstrin, akan diurai menjadi molekul yang lebih sederhana maltosa. Sedangkan air ludah berguna untuk melicinkan makanan agar lebih mudah ditelan. Hanya sebagian kecil amilum yang dapat dicerna di dalam mulut, oleh karena makanan sebentar saja berada di dalam rongga mulut. Oleh karena itu sebaiknya makanan dikunyah lebih lama, agar memberi kesempatan lebih banyak pemecahan amilum di rongga mulut. Dengan proses mekanik, makanan ditelan melalui kerongkongan dan selanjutnya akan memasuki lambung.

Enzim amilase digunakan dalam pembuatan roti dan untuk memecah gula kompleks seperti pati (ditemukan di tepung) menjadi gula sederhana. Ragi kemudian memakan gula tersebut sederhana dan mengubahnya menjadi produk-produk limbah alkohol dan CO₂. Rasa ini penyuluhan dan menyebabkan roti naik. Sementara enzim Amilase ditemukan secara alami dalam sel ragi, diperlukan waktu untuk ragi untuk menghasilkan cukup dari enzim untuk memecah jumlah yang signifikan dari pati dalam roti. Ini adalah alasan untuk adonan fermentasi panjang

seperti adonan asam. Teknik pembuatan roti modern telah menyertakan enzim amilase ke dalam roti perbaiki sehingga membuat proses pembuatan roti lebih cepat dan lebih praktis untuk penggunaan komersial.

2.2.4 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim

a. Pengaruh Suhu

Semakin jauh suhu optimum, kerja enzim semakin tidak baik. Daerah atau kisaran suhu ketika kerja atau laju reaksi enzim masih baik disebut suhu optimum. Semakin tinggi suhu, semakin naik laju reaksi kimia baik yang tidak dikatalis enzim maupun yang dikatalis oleh enzim.

b. Pengaruh Konsentrasi Enzim

Jumlah enzim menentukan lamanya waktu yang digunakan untuk mencapai keseimbangan. Bila kita menggunakan enzim yang masih murni dan belum rusak, kecepatan reaksi atau aktivitas enzim berbanding lurus dengan konsentrasi enzimnya, walaupun konsentrasi substrat dapat menentukan faktor yang dapat membatasi aktivitasnya.

c. Pengaruh pH

Enzim mempunyai aktivitas maksimum pada suatu kisaran pH yang disebut pH optimum yang umumnya antara 4,5 sampai 8,0. Suatu enzim tertentu mempunyai kisaran pH optimum yang sangat sempit. Di sekitar pH optimum enzim mempunyai stabilitas yang tinggi.

d. Pengaruh Kadar Air

Pada kadar air bebas yang masih rendah terjadi halangan dan rintangan sehingga baik difusi enzim atau substrat terhambat. Akibatnya hidrolisis hanya terjadi pada bagian substrat yang langsung berhubungan dengan enzim.

2.3 Mikroorganisme Fermentasi

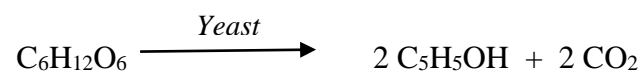
Mikroorganisme yang umum dipergunakan dalam fermentasi adalah bakteri dan fungi. Fungi adalah mikroorganisme yang tidak memiliki butir-butir hijau daun (klorofil). Bakteri, ragi dan jamur memerlukan sumber energi dan

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.

Fermentasi berasal dari kata latin yaitu '*fevere*' yang artinya mendidih. Peristiwa mendidih sebenarnya timbul dari gelembung-gelembung CO₂ yang dihasilkan dari proses katabolisme karbohidrat. Kemudian pengertian fermentasi tersebut berkembang dan didefinisikan sebagai proses penguraian tersebut tidak hanya terdapat karbohidrat tetapi juga terdapat protein, lemak, asam dan zat-zat lainnya karena ada aktivitas enzim.

Fermentasi merupakan proses perubahan-perubahan kimia dalam suatu substrak organik yang berlangsung karena aksi katalisator kimiawi yaitu enzim yang dihasilkan oleh mikroba hidup tertentu. Untuk berlangsungnya proses fermentasi oleh suatu mikroba perlu adanya medium fermentasi yang mengandung nutrient untuk perubahan, bahan pembentuk sel, dan biosintesis produk-produk metabolisme (Rachman, 1991).

Fermentasi untuk menghasilkan etanol oleh ragi merupakan perubahan gula-gula heksos sederhana menjadi etanol dan CO₂ secara anaerob, udara tidak diperlukan selama fermentasi. Menurut Suwahyono (1994) pada fermentasi terjadi pemecahan senyawa induk, dimana 1 molekul glukosa akan menghasilkan 2 molekul etanol. Secara teoritis bahwa 1 gr gula dikonversikan menjadi 0,51 gr etanol (51%) dan 0,49 gr CO₂ (49% CO₂).



Fermentasi etanol dapat dilakukan oleh yeast dan beberapa jenis bakteri. Yeast yang sering berperan dalam industri adalah dari golongan *Saccharomyces* yakni *S. Cerevisiae*, *S. ellipsoideus*, *S. Carlsbergensis*, *S. Fragilis* dan *Schizosaccharomyces Pombe*. Diantara beberapa jenis *Saccharomyces* yang paling sering digunakan dalam industri maupun sebagai jasad inang eukariotik adalah *Saccharomyces cerivisiae*. Fermentasi bioetanol dapat didefinisikan sebagai proses penguraian gula menjadi bioetanol dan karbondioksida yang disebabkan enzim

yang dihasilkan oleh massa sel mikroba. Perubahan yang terjadi selama proses fermentasi adalah : perubahan glukosa menjadi bioetanol oleh sel-sel ragi.

Selain menggunakan *yeast saccharomyces cerivisiae*, dalam proses fermentasi dapat menggunakan *yeast pichia stipitis*. *Pichia stipitis* merupakan *yeast* yang memiliki kemampuan mengubah xilosa menjadi etanol. *Pichia stipitis* merupakan golongan *yeast* yang diisolasi dari kayu lapuk (Yursa dkk, 2010). *pichia stipitis* dapat ditemukan dalam isi perut rayap. Kelebihan dari *pichia stipitis* ini adalah bisa digunakan baik pada proses fermentasi secara aerobik maupun anaerobik. *Yeast* ini tidak tahan terhadap etanol dengan konsentrasi lebih besar dari 30 gr/L.

Pichia stipitis mempunyai bentuk spora yaitu bulat angular, oval, setengah bulat, atau berbentuk topi dengan banyaknya spora, bentuk sel membentuk silinder atau pseudomicelium, reproduksi vegetatif, pertumbuhannya dalam media cair berbentuk partikel.

Fase pertumbuhan mikroorganisme *pichia stipitis* ;

a. Fase adaptasi (log phase)

ketika sel dipindahkan dalam media baru maka sel akan mengalami proses adaptasi. Pada fase ini tidak dijumpai penambahan jumlah sel tetapi terjadi penambahan volume sel (pengecilan sel).

b. Fase perbanyak (exponential phase)

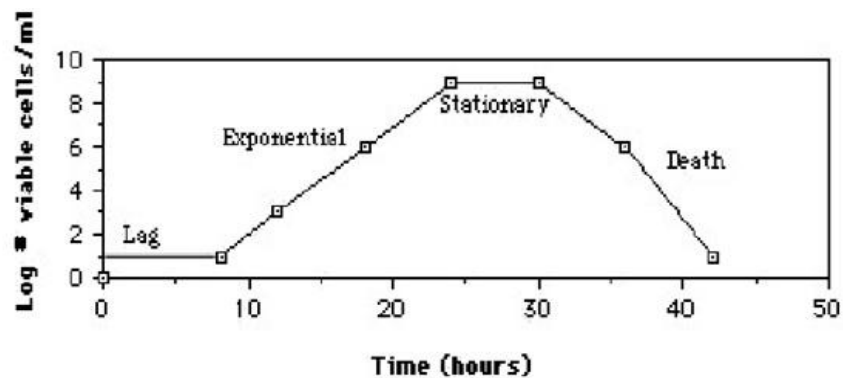
pada fase ini sel akan melakukan pembelahan dan populasi meningkat sampai batas tertentu sampai waktu eksponensial. Jumlah sel di pengaruhi oleh beberapa faktor antara lain : kandungan nutrient, temperatur, kadar cahaya dan oksigen.

c. Fase statis (stationer phase)

fase ini laju pembelahan sel sebanding dengan kematian sel, sehingga jumlah sel hidup konstan. Fase ini terjadi akibat adanya kekurangan nutrient, akumulasi metabolit toksik, penurunan kadar oksigen, dan penurunan ketersediaan air.

d. Fase kematian (death phase)

fase ini terjadi pembelahan sel dan sel kelamaan akan mati apabila tidak dipindahkan pada media baru. Penyebab utama kematian ini adalah autolisis sel dan penurunan energi seluler.



Gambar 2. Fase pertumbuhan mikroba

2.3.1 Faktor-Faktor Fermentasi Bioetanol

a. Media

pada umumnya bahan dasar yang mengandung senyawa organik terutama glukosa dan pati dapat digunakan sebagai substrak dalam proses fermentasi bioetanol (Prescott and Dunn,1959).

b. Suhu

Suhu yang optimum bagi pertumbuhan *pichia stipitis* dan aktivitasnya adalah 25-35°C. Suhu memegang peranan penting, karena secara langsung dapat mempengaruhi aktivitas *pichia stipitis* dan secara tidak langsung akan mempengaruhi kadar bioetanol yang dihasilkan (Prescott and Dunn,1959).

c. Nutrisi

Selain sumber karbon, *pichia stipitis* juga memerlukan sumber nitrogen, vitamin dan mineral dalam pertumbuhannya. Pada umumnya sebagian besar *pichia stipitis* memerlukan vitamin seperti biotin dan tiamin yang diperlukan untuk pertumbuhannya. Beberapa mineral juga harus ada untuk pertumbuhan *pichia stipitis* seperti fospat, kalium, sulfur dan sejumlah kecil senyawa besi dan tembaga (Prescott and Dunn,1959).

d. pH

pH substrak atau media fermentasi merupakan salah satu faktor yang menentukan kehidupan *pichia stipitis*. Salah satu sifat *pichia stipitis* adalah pertumbuhan dapat berlangsung dengan baik pada kondisi pH 4-6 (Prescott and Dunn,1959).

e. Volume strater

Volume starter yang ditambahkan 3-7% dari volume media fermentasi. Jumlah volume starter etrsebut sangat baik dan efektif untuk fermentasi serta dapat menghasilkan kadar alkohol yang relatif tinggi (Monick, J.A, 1968). Penamabahn volume starter yang sesuai pada proses fermentasi adalah 5 % dari volume fermentasi (Prescott and Dunn,1959).

Volume starter yang terlalu sedikit akan mengakibatkan produktivitas menurun karena menjadi lelah dan keadaan ini memperbesar terjadinya kontaminasi. Peningkatan volume starter akan mempercepat terjadinya fermentasi terutama bila digunakan substrak berkadar tinggi. Tetapi jika volume starter berlebihan akan mengakibatkan hilangnya kemampuan bakteri untuk hidup sehingga tingkat kematian bakteri sangat tinggi (Desroir,1988).

f. Waktu fermentasi

Waktu fermentasi yang dilakukan 3-14 hari. Jika waktunya terlalu cepat *pichia stipitis* masih dalam masa pertumbuhan sehingga alkohol yang dihasilkan dalam jumlah sedikit dan jika terlalu lama *pichia stipitis* akan mati maka alcohol yang dihasilkan tidak maksimal (Prescott and Dunn, 1959).

g. Konsentrasi gula

Konsentrasi gula akan berpengaruh terhadap aktifitas *pichia stipitis*. Konsentrasi gula yang sesuai kira-kira 10-18%. Konsentrasi gula yang terlalu tinggi akan menghambat aktivitas *pichia stipitis*, sebaliknya jika konsentrasinya rendah akan menyebabkan fermentasi tidak optimal (Prescott and Dunn, 1959).

h. Alkohol

Alkohol dapat dihasilkan dari tanaman yang banyak mengandung pati dengan menggunakan bantuan dari aktivitas mikroba. Bioethanol merupakan senyawa organik yang mengandung gugus hidroksida dan mempunyai rumus umum $C_nH_{n+1}OH$. Istilah bioethanol dalam industri digunakan untuk senyawa etanol atau etil bioethanol dengan rumus kimia C_2H_5OH . Etanol termasuk bioethanol primer yaitu bioethanol yang gugus hidroksinya terikat pada atom karbon primer. Sifat-sifat bioethanol yang mudah menguap, mudah terbakar, berbau spesifik, cairannya tidak berwarna, dan mudah larut dalam : air, eter, khloroform, dan aseton (Rhonny. A dan Danang J.W., 2003).

2.3.2 Inokulasi Mikroba

Penanaman bakteri atau biasa disebut juga inokulasi adalah pekerjaan memindahkan bakteri dari medium yang lama ke medium yang baru dengan tingkat ketelitian yang sangat tinggi. Inokulasi dilakukan dalam kondisi aseptik, yakni kondisi dimana semua alat yang ada dalam hubungannya dengan medium dan pengerjaan, dijaga agar tetap steril. Hal ini untuk menghindari terjadinya kontaminasi. Ruang tempat penanaman bakteri harus bersih dan keadannya harus steril agar tidak terjadi kesalahan dalam pengamatan atau percobaan.

2.3.2.1 Media Tumbuh

Media ini merupakan media yang dipersiapkan untuk digunakan menumbuhkan mikroba. Komposisi media tumbuh disesuaikan dengan mikroba yang akan ditumbuhkan. Berdasarkan bentuknya, media tumbuh dapat dibagi menjadi cair (broth) dan media padat (agar). Perbedaan dari kedua media ini yaitu penambahan tepung adalah untuk memadatkan media. Sedangkan media padat dibagi menjadi tiga macam, yaitu media agar tegak (deep agar), agar miring (slants agar), dan lempeng agar (plate agar).

2.3.2.2 Peralatan

Peralatan utama yang diperlukan dalam melaksanakan inokulasi dan peremajaan biakan dalam media padat dan media cair ini adalah peralatan sterilisasi, inokulasi, dan inkubasi. Peralatan sterilisasi meliputi oven, alkohol, dan Bunsen. Macam-macam peralatan inokulasi adalah jarum ose, blend glass, tabung reaksi, dan cawan petri. Peralatan inkubasi adalah inkubator.

2.3.2.3 Metode Inokulasi

- a. Media Cair, pada media cair prinsip utama dalam menginokulasikan mikroba atau biakan adalah menumbuhkan mikroba tersebut dan mengamati pola pertumbuhannya.
- b. Media Padat, pada media padat prinsip utama dalam menginokulasikan mikroba atau biakan adalah menumbuhkan mikroba yang sudah ditentukan dalam praktikum dan mengamati karakteristik morfologisnya. Inokulasi pada media padat dilakukan dengan teknik agar miring, teknik agar tegak, dan teknik lempeng agar.

2.4 Bioetanol

Bioetanol adalah etanol yang dibuat dari biomass yang mengandung komponen pati atau selulosa, seperti singkong dan tetes tebu. Dalam dunia industri, etanol umumnya dipergunakan sebagai bahan baku industri turunan alkohol, campuran untuk minuman keras (seperti sake atau gin), serta bahan baku farmasi dan kosmetika.

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, Dedak
4. Kulit kopi, kulit coklat, sabut kelapa.
5. Ampas tebu, ampas biji-bijian yang telah diambil minyaknya.

6. Kotoran binatang
7. Air limbah.
8. Sampah sebagai komponen pupuk
9. Sisa pabrik kertas
10. pabrik susu, dan sebagainya.

Bahan dasar harus memenuhi syarat-syarat sebagai berikut: Mudah didapat, jumlahnya besar, murah harganya dan bila diperlukan ada penggantinya. (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 mikroorganisme di dalamnya tidak diketahui secara pasti. Adanya mikroorganisme 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).

2.4.1 Keunggulan dan Kelemahan bioetanol

1. Keunggulan

- a. Diproduksi dari tanaman yang bersifat renewable
- b. Mengandung kadar O₂ sekitar 32% sehingga dapat terbakar dengan mudah
- c. Dapat menurunkan emisi gas rumah kaca.
- d. Mudah larut dalam air dan tidak mencemari air permukaan dan air tanah.
- e. Nilai oktan yang tinggi menyebabkan campuran bahan bakar terbakar tepat pada waktunya sehingga tidak menyebabkan fenomena knocking
Emisi gas buang tidak begitu berbahaya bagi lingkungan salah satunya gas CO₂ yang dapat dimanfaatkan kembali oleh tumbuhan untuk proses fotosintesa serta emisi NO yang rendah
- f. Efisiensi tinggi dibandingkan bensin
- g. berwarna biru sehingga tidak menghanguskan alat masak.
- h. Serta tidak berbau dan mudah dipadamkan dengan api.

2. Kelemahan

- a. Memerlukan modifikasi mesin jika ingin menggunakan bioethanol murni pada kendaraan.
- b. Bisa terjadi kemungkinan ethanol mengeluarkan emisi polutan beracun.
- c. relatif memakan waktu yang cukup lama sehingga kapasitas produksi untuk skala masyarakat relatif kecil.

2.4.2 Manfaat Bioetanol

- a. Memperbesar basis sumber daya bahan bakar cair.
- b. Mengurangi impor BBM
- c. Sebagai bahan dasar minuman beralkohol
- d. Sebagai bahan kimia dasar senyawa organik, pelarut untuk parfum, cat dan larutan obat, antidote beberapa racun
- e. Sebagai antiseptic, pengobatan untuk mengobati depresi dan obat bius.
- f. Digunakan untuk pembuatan beberapa deodoran

2.5 Destilasi

Kadar etanol hasil fermentasi tidak dapat mencapai level diatas 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).

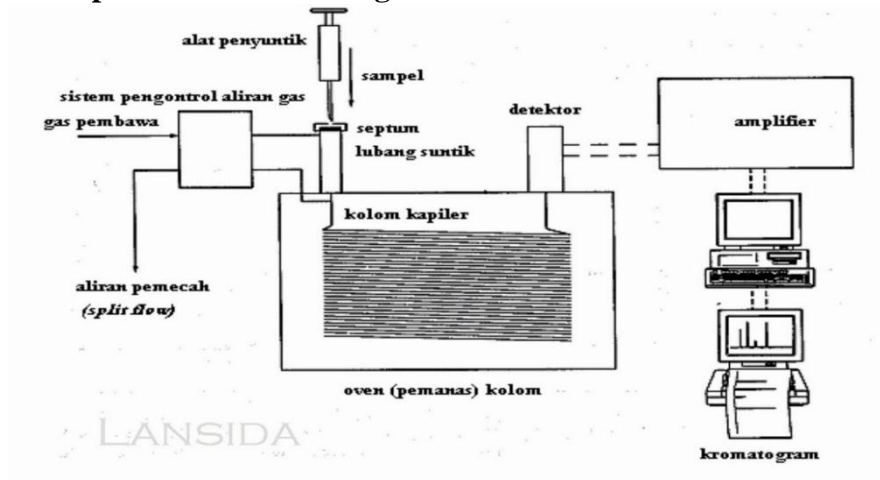
Metode alternatif yang dapat dipergunakan untuk memperoleh etanol dengan kadar 100% dari etanol 96% adalah dengan menggunakan molecular sieve, yakni suatu absorben sintetis berbentuk pellet yang dapat secara selektif mengikat molekul air. Selain murah harganya, metode ini tidak meninggalkan residu pada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

2.6 Kromatografi Gas

Kromatografi adalah suatu cara pemisahan lain yang penting di dalam analisis kimia. Michael Twest, seorang ahli botani dari Rusia, pada tahun 1906 lah yang pertama kali memperkenalkan kromatografi. 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 antara 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.

2.6.1 Komponen Alat Kromatografi Gas



Gambar 3: Komponen alat kromatografi gas

Alat kromatografi gas terdiri atas 7 bagian pokok, yaitu:

- a. Silinder tempat gas pembawa/ pengangkut
Gas pengangkut (Carrier Gas) ditempatkan dalam silinder bertekanan tinggi. Biasanya tekanan silinder sebesar 150 atm. Gas pembawa harus bersifat inert dan murni, seringkali gas pembawa ini harus disaring untuk menahan debu uap air dan oksigen. Gas yang sering digunakan yaitu N₂, H₂, He dan Ar.
- b. Pengatur aliran dan tekanan
- c. Tempat injeksi sampel
Untuk mendapatkan efisiensi maka sampel dimasukkan ke dalam aliran gas dan jumlah yang sedikit dengan waktu yang tepat. Jika sampel berupa cairan, maka harus diencerkan terlebih dahulu dalam bentuk larutan. Injeksi sampel dapat diambil melalui karet silicon ke dalam oven, banyak sampel + 0,1-10 µL.
- d. Kolom
Fungsi kolom merupakan “jantung” kromatografi gas dimana terjadi pemisahan komponen- kmpinen cuplikan kolom terbuat dari baja tahan karat, nikel, kaca.
- e. Detector
Fungsi detektor adalah untuk memonitor gas pembawa yang keluar dari kolom dan merespon perubahan komposisi solut yang terelusi.

f. Pencatat (recorder)

Fungsi recorder adalah sebagai alat untuk mencetak hasil percobaan pada sebuah kertas yang hasilnya disebut kromatogram (kumpulan puncak grafik).

g. Terminal untuk 3, 4 dan 5 (tempat injeksi sampel, kolom dan detector)

2.6.2 Prinsip Kerja Kromatografi Gas

Gas pembawa (biasanya digunakan Helium, Argon atau Nitrogen) dengan tekanan tertentu dialirkan secara konstan melalui kolom yang berisi fase diam. Selanjutnya sampel di injeksikan kedalam injektor (Injection Port) yang suhunya dapat diatur. Komponen- komponen dalam sampel akan segera menjadi uap dan akan dibawa oleh aliran gas pembawa menuju kolom. Komponen- komponen akan teradsorpsi oleh fasa diam pada kolom kemudian akan merambat dengan kecepatan berbeda sesuai dengan nilai K_d masing- masing komponen sehingga terjadi pemisahan. Komponen yang terpisah menuju detektor dan akan terbakar menghasilkan sinyal listrik yang besarnya proporsional dengan komponen tersebut. Sinyal itu diperkuat oleh amplifier dan selanjutnya oleh pencatat (recorder) dituliskan sebagai kromatogram berupa puncak. Puncak konsentrasi yang diperoleh menggambarkan arus detektor terhadap waktu.

2.6.3 Kelebihan dan Kekurangan Kromatografi Gas

Kromatografi Gas memiliki beberapa kelebihan dibanding dengan metode kromatografi lainnya, kelebihanannya antara lain:

- a. Analisis dapat dilakukan dengan cepat
- b. Sensivitasnya tinggi
- c. Mampu mengidentifikasi konstituen renik
- d. Batas deteksi sampai dengan 10^{-9} g/L
- e. Dapat dilengkapi sistem komputer untuk mengontrol bagian- bagian kromatogram dan menyimpan data hasil percobaan dalam memorinya.

Sedangkan kekurangan kromatografi gas di antaranya adalah:

- a. Teknik kromatografi gas terbatas untuk zat yang mudah menguap
- b. Kromatografi gas tidak mudah dipakai untuk memisahkan campuran dalam jumlah besar.

2.6.4 Aplikasi Kromatografi Gas dalam Kehidupan

1. Metode ini digunakan untuk analisis senyawa organik yang mudah menguap seperti hidrokarbon dan ester selain itu juga untuk analisis minyak mentah dan minyak atsiri dalam buah.
2. Gas Liquid Chromatography (GLC) sangat berperan penting dalam upaya memonitor dan mengendalikan distribusi pencemaran dalam lingkungan, misalnya dalam Badan Perlindungan Lingkungan (EPA) USA menjalankan suatu program yang efektif untuk memonitor kadar pestisida dalam tanah diberbagai tempat di negeri itu dengan cara kromatografi gas.