

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ampas Tebu

Tebu merupakan salah satu tanaman hasil perkebunan tropis yang memiliki banyak kegunaan. Daun tebu, nira dan ampas tebu dapat digunakan menjadi berbagai macam bahan yang berguna. Pucuk dan daun tebu dapat dimanfaatkan menjadi makanan ternak atau pupuk. Nira dari tebu dapat menjadi bahan pembuat gula dan bahan kimia lain seperti asam asetat, etanol dan asam glutamat. Sedangkan ampasnya sendiri dapat digunakan sebagai bahan bakar, bahan baku *pulp*, *furfural*, bahan baku pupuk, dan makanan ternak (Deptan, 2003).



Gambar 1. Ampas Tebu

Bagas adalah limbah padat yang berasal dari industri pengolahan tebu menjadi gula (ampas tebu). Ampas ini sebagian besar mengandung bahan-bahan lignoselulosa. Bagas mengandung air 48-52%, gula rata-rata 3,3% dan serat rata-rata 47,7%. Serat bagas tidak dapat larut dalam air dan sebagian besar terdiri dari selulosa, hemiselulosa dan lignin (Idris et al., 1994). Komposisi bagas dapat

dilihat pada tabel 1. Diperkirakan kandungan monosakarida terbesar pada bagas adalah glukosa dan xylosa (Martin et al., 2002).

Tabel 1. Komposisi Penyusun Bagas

Penyusun Lignoselulosa	Komposisi(%)
Selulosa	50
Hemiselulosa	25
Lignin	25

Sumber: Cheung dan Anderson (1997)

Dalam industri pembuatan gula dari tebu, tidak semua tebu dapat dikonversikan menjadi gula, dipercaya masih terdapat residu padat yang memiliki kandungan karbohidrat cukup tinggi khususnya selulosa. Residu padat ini disebut bagas dan masih belum dimanfaatkan secara optimal. Pada proses pengolahan tebu menjadi gula, tidak semua terkonversi menjadi gula, masih ada residu padat yang diyakini masih memiliki kandungan karbohidrat khususnya selulosa cukup tinggi dan hemiselulosa masih belum dimanfaatkan dengan optimal. Potensi bagas yang merupakan residu padat pada industri gula terutama industri-industri besar belum banyak dimanfaatkan. Jika mengacu pada hasil survey di PT. Gunung Plantations, Lampung, minimal bagas yang dihasilkan dari industri gula mencapai 100 ton/tahun. Sedangkan diperkirakan PT. Gula Putih Mataram dan PT. Indo Lampung juga memiliki kapasitas bagas yang sama. Hal ini belum dihitung dengan jumlah yang ada di industri-industri di Pulau Jawa dan Sulawesi. Diperkirakan komposisi bagas ini masih mengandung polisakarida yang cukup tinggi sehingga memungkinkan untuk dimanfaatkan menjadi produk yang memiliki nilai tambah. Pemanfaatan bagas diantaranya sebagai pupuk alami pada tanaman, kertas, makanan ternak, dan papan partikel dan belum banyak pemanfaatan menjadi bahan kimia seperti etanol. Saat ini etanol di dunia umumnya diproduksi dari turunan pati atau lebih spesifik lagi dari sukrosa, *xylosa*, glukosa dan lain-lain. Perkembangan terbaru dari teknologi pembuatan etanol adalah etanol dapat dihasilkan dari biomassa yang memiliki kandungan karbohidrat cukup tinggi. Kandungan karbohidrat dihidrolisis dengan cepat menjadi monomer-monomer gula kemudian difermentasi menggunakan *yeast*

seperti *Saccharomyces cerevisiae* (*S. Cerevisiae*) atau *Pichia stipities* (*P.stipities*) menjadi etanol. Fermentasi etanol umumnya dimanfaatkan untuk bahan minuman seperti *wine* dan *beer*, dan belum banyak dimanfaatkan untuk energi seperti sebagai bahan bakar transportasi atau industri (Wyman, 1994).

Komponen limbah berserat umumnya terdiri dari :

1) Selulosa

Mempunyai bobot molekul tinggi, terdapat dalam jaringan tanaman pada bagian dinding sel sebagai mikrofibril, terdiri dari rantai glukosa yang dilekatkan oleh ikatan hidrogen. Selulosa dicerna oleh enzim selulase menghasilkan asam lemak terbang atau VFA (*Volatile fatty acid*) seperti asetat, propionate dan butirat.

Selulosa adalah zat penyusun tanaman yang terdapat pada struktur sel. Kadar selulosa dan hemiselulosa pada tanaman pakan yang muda mencapai 40% dari bahan kering. Bila hijauan makin tua proporsi selulosa dan hemiselulosa makin bertambah (Tillman,dkk, 1998). Selulosa merupakan suatu polisakarida yang mempunyai formula umum seperti pati. Sebagian besar selulosa terdapat pada dinding sel dan bagian-bagian berkayu dari tumbuhan-tumbuhan. Selulosa tidak dapat dicerna oleh hewan non-ruminansia kecuali non-ruminansia herbivora yang mempunyai mikroba pencerna selulosa dalam sekumnya. Hewan ruminansia mempunyai mikroba pencerna selulosa didalam rumenretikulumnya sehingga selulosa dapat dimanfaatkan dengan baik (Anggorodi, 1994). Lapisan matriks pada tanaman muda terutama terdiri dari selulosa dan hemiselulosa, tetapi pada tanaman tua matriks tersebut kemudian dilapisi dengan lignin dan senyawa polisakarida lain (Tillman,dkk, 1998). Selanjutnya ditambahkan bahwa hemiselulosa adalah suatu nama untuk menunjukkan suatu golongan substansi yang didalamnya termasuk: araban, xilan, heksosa tertentu dan poliuronat yang rentan bila terkena agen kimia dibanding selulosa. Hemiselulosa dihidrolisis oleh jasad relik dalam saluran pencernaan dengan enzim hemiselulase. Komponen utama dan serat kasar yang merupakan penyusun dinding sel tanaman terdiri dari selulosa, hemiselulosa dan lignin (Church dan Pond, 1988). Selulosa merupakan substansi yang tidak

larut dalam air yang terdapat di dalam dinding sel tanaman terutama dari bagian batang, tangkai dan semua bagian yang mengandung kayu. Selulosa merupakan homopolisakarida yang mempunyai molekul berbentuk linear, tidak bercabang dan tersusun atas 10.000 sampai 15.000 unit glukosa yang dihubungkan dengan ikatan β -1,4 glikosidik (Nelson dan Michael, 2000). Polisakarida (selulosa maupun hemiselulosa) agar dapat digunakan sebagai sumber energi harus dirombak terlebih dahulu menjadi senyawa sederhana. Selulosa sebagai fraksi serat kasar akan didegradasi oleh bakteri selulolitik selama proses fermentasi menjadi monomernya yang dapat digunakan sebagai sumber energi. Waktu yang diperlukan mikrobia beradaptasi dengan substrat memperlihatkan kecenderungan dengan urutan selulosa lebih rendah dan hemiselulosa (Prayitno, 1997).

2) Hemiselulosa

Terdapat bersama selulosa, terdiri atas pentosan, pectin, xylan dan glikan. Hidrolisis hemiselulosa oleh enzim hemiselulase menghasilkan asam lemak. Morrison (1986) mendapatkan bahwa hemiselulosa lebih erat terikat dengan lignin dibandingkan dengan selulosa, sehingga selulosa lebih mudah dicerna dibandingkan dengan hemiselulosa. Jung (1989) melaporkan bahwa perubahan pencernaan selulosa dan hemiselulosa diakibatkan oleh keberadaan lignin yang berubah-ubah. Dikatakan pula bahwa kandungan lignin pada rumput lebih tinggi dibandingkan dengan legum. Hemiselulosa rantainya pendek dibandingkan selulosa dan merupakan polimer campuran dari berbagai senyawa gula, seperti xilosa, arabinosa, dan galaktosa. Selulosa alami umumnya kuat dan tidak mudah dihidrolisis karena rantai glukosanya dilapisi oleh hemiselulosa dan di dalam jaringan kayu selulosa terbenam dalam lignin membentuk bahan yang kita kenal sebagai lignoselulosa.

3) Lignin

Suatu substansi yang kompleks dan tidak dapat dicerna, terdapat pada bagian berkayu dari tanaman (kulit gabah, bagian fibrosa akar, batang dan daun). Keberadaan lignin selalu bersama-sama dengan selulosa dan hemiselulosa, lignin dikenal sebagai karbohidrat, namun sesungguhnya lignin

berbeda dengan karbohidrat. Perbedaan terletak pada atom karbon C dimana atom karbon pada lignin lebih tinggi dan tidak proporsional. Semakin tua tanaman kadar lignin semakin tinggi akibatnya daya cerna semakin menurun dengan semakin bertambahnya lignifikasi. Selain mengikat selulosa dan hemiselulosa lignin juga mengikat protein dinding sel. Lignin tidak dapat larut dalam cairan rumen oleh sebab itu lignin merupakan penghambat bagi mikroorganisme rumen dan enzim untuk mencerna tanaman tersebut.

Lignin adalah salah satu komponen penyusun tanaman yang bersama dengan selulosa dan bahan-bahan serat lainnya membentuk bagian struktural dan sel tumbuhan. Pada batang tanaman, lignin berfungsi sebagai bahan pengikat komponen penyusun lainnya, sehingga suatu pohon bisa berdiri tegak. Kalau dianalogikan dengan bangunan, lignin dan serat-serat tanaman itu mirip seperti beton dengan batang-batang besi penguat di dalamnya, yang memegang serat-serat yang berfungsi seperti batang besi, sehingga membentuk struktur yang kuat. Berbeda dengan selulosa yang terutama terbentuk dari gugus karbohidrat, lignin terbentuk dari gugus aromatik yang saling dihubungkan dengan rantai alifatik, yang terdiri dari 2-3 karbon. Pada proses pirolisa lignin, dihasilkan senyawa kimia aromatis yang berupa fenol, terutama kresol (Young, 1986).

Lignin merupakan polimer yang mengandung protein sulit dicerna. Lignin sangat tahan terhadap degradasi kimia dan enzimatik. Lignin sering digunakan sebagai “marker” penanda didalam eksperimen studi pencernaan pada ternak ruminansia karena sifatnya yang tidak larut tersebut. Lignin bukan karbohidrat, tetapi sangat berhubungan erat dengan senyawa-senyawa karbohidrat. Kulit kayu, biji, serat kasar, batang dan daun mengandung lignin yang berupa substansi kompleks oleh adanya lignin dan polisakarida yang lain. Kadar lignin akan bertambah dengan bertambahnya umur tanaman. Tanaman pakan mengandung selulosa 20-30%, hemiselulosa 14-20% dan pektin kurang dari 10% serta lignin 2-12% (Young, 1986). Degradasi bahan organik dipengaruhi adanya lignin dan silika yang terdapat pada dinding sel secara bersama-sama membentuk senyawa kompleks dengan selulosa dan hemiselulosa. Senyawa

kompleks ini sulit ditembus oleh enzim mikroba sehingga akan menghambat pencernaan dinding sel dan selanjutnya menurunkan pencernaan isi sel termasuk bahan organik didalamnya. Lignin merupakan komponen yang tidak dicerna, sehingga mempengaruhi pencernaan serat kasar (Van Soest, 1976). Lignin adalah penyusun jaringan tumbuhan selain selulosa dan hemiselulosa. Senyawa ini merupakan polimer aromatik dari phenilpropanoid, hasil sintesa *conyferyl*, *synaphyl*, *p-coumayl* alkohol (Gold dan Alic, 1993). Lignin adalah senyawa aromatik heteropolimer dan unit *phenil-propanoid* yang memberikan kekuatan pada kayu dan rigiditas struktural pada jaringan tanaman serta melindungi kayu dari serangan mikrobial dan hidrolitik (Saparrat et al. 2002). Fungsi dari lignin untuk memberi kekakuan pada jaringan pengangkut tumbuhan dan melindungi struktur yang tersusun dari polisakarida (selulosa dan hemiselulosa) dari serangan organisme lain sehingga lignin bersifat rekalsitran (Hammel, 1997). Lignin merupakan polimer alami dan tergolong ke dalam senyawa rekalsitran karena tahan terhadap degradasi atau tidak terdegradasi dengan cepat di lingkungan. Molekul lignin adalah senyawa polimer organik kompleks yang terdapat pada dinding sel tumbuhan dan berfungsi memberikan kekuatan pada tanaman.

Untuk menentukan kandungan lignin yang ada di dalam suatu bahan menurut Goering dan Van Soest (1970), diawali dengan penetapan ADF dengan menggunakan dua metode yaitu:

- 1 . Ekstraksi dengan asam $H_2 SO_4$
2. Oksidasi lignin dengan buffer asam asetat dan larutan $KMnO_4$ jenuh .

2.2 Ampas Singkong

Dari proses pengolahan singkong menjadi tepung tapioka, dihasilkan limbah sekitar $2/3$ bagian atau sekitar 75% dari bahan mentahnya. Dimana limbah tersebut berupa limbah padat yang biasa disebut onggok (ampas singkong) dan lindur. Ampas singkong dan lindur dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku pembuatan etanol karena kandungan karbohidrat yang tersisa pada limbah tepung

tapioka tersebut masih banyak. Adapun gambar dari ampas singkong dapat dilihat pada gambar berikut.



Gambar 2. Ampas Singkong

Tabel 2. Komposisi Ubi Kayu/Singkong (per 100 gram bahan)

Komponen	Kadar
Kalori	146,00 kal
Air	63,00 gr
Phosphor	40,00 mg
Karbohidrat	34,70 gr
Kalsium	33,00 mg
Vitamin C	30,00 mg
Protein	1,20 gram
Besi	0,70 mg
Lemak	0,30 gram
Vitamin B1	0,06 mg
Berat dapat dimakan	75,00

Sumber: Anna Poedjiadi, 1994

Tabel 3. Komposisi Onggok (ampas singkong)

komposisi	Nilai kandungan onggok
Air	12,8-15,9
Pati	36-50
Protein	1,3-3,4
Lemak	0,7-1,6
Abu	0,7-1,4
Serat	17,2-23,7
Ca	0,12-0,24
Mg	0,12-0,21
HCN(ppm)	-

Sumber : Nur Richana, 2013

Hidrolisa adalah reaksi zat organik atau anorganik dengan air. Air akan terdekomposisi menjadi dua ion dan bereaksi dengan senyawa lain, ion hidrogen membentuk satu komponen, sedang ion hidroksil membentuk senyawa lain. Hidrolisa dengan air murni berlangsung lambat dan hasil reaksi tidak komplit, sehingga perlu ditambahkan katalis untuk mempercepat reaksi dan meningkatkan selektifitas (Groggins, 1958).

Fermentasi alkohol merupakan pembentukan etanol dan CO₂ dari piruvat hasil glikolisis glukosa secara anaerobik (Lehninger, 1982). Pada tahun 1815, *Gay-Lussac* memformulasikan konversi glukosa menjadi etanol dan karbondioksida.

Formulanya sebagai berikut :



2.3 Etanol

Etanol telah digunakan manusia sejak zaman prasejarah sebagai bahan pemabuk dalam minuman beralkohol. Residu yang ditemukan pada peninggalan keramik yang berumur 9000 tahun dari Cina bagian utara menunjukkan bahwa minuman beralkohol telah digunakan oleh manusia prasejarah dari masa Neolitik. Etanol murni (absolut) dihasilkan pertama kali pada tahun 1796 oleh Johan Tobias Lowitz yaitu dengan cara menyaring

alkohol hasil distilasi melalui arang. Pada tahun 1808 Saussure berhasil menentukan rumus kimia etanol. Lima puluh tahun kemudian (1858), Couper mempublikasikan rumus kimia etanol. Etanol pertama kali dibuat secara sintetik pada tahun 1826 secara terpisah oleh Henry Hennel dari Britania Raya dan S.G. Sérullas dari Perancis. Pada tahun 1828, Michael Faraday berhasil membuat etanol dari hidrasi etilena yang dikatalisis oleh asam.

Adapun kegunaan etanol ialah :

- Biasanya ethanol digunakan sebagai bahan pembuatan minuman beralkohol
- Etanol dapat dibakar untuk menghasilkan karbon dioksida dan air serta bisa digunakan sebagai bahan bakar baik sendiri maupun dicampur dengan petrol (bensin).
- Etanol banyak digunakan sebagai sebuah pelarut. Etanol relatif aman, dan bisa digunakan untuk melarutkan berbagai senyawa organik yang tidak dapat larut dalam air. Sebagai contoh, etanol digunakan pada berbagai parfum dan kosmetik.

Bioetanol adalah sebuah bahan bakar alternatif yang diolah dari tumbuhan, dimana memiliki keunggulan mampu menurunkan emisi CO hingga 18 %. Di Indonesia, minyak bioetanol sangat potensial untuk diolah dan dikembangkan karena bahan bakunya merupakan jenis tanaman yang banyak tumbuh di negara ini dan sangat dikenal masyarakat bioetanol yang merupakan etanol yang dihasilkan dari fermentasi tumbuh- tumbuhan dengan bahan baku yang mudah didapat disekitar lingkungan. Ditinjau dari kebutuhan yang semakin meningkat , dimana hal ini dapat dilihat pada Tabel 4 berikut :

Tabel 4. Jumlah Kebutuhan Etanol Nasional

Tahun	Kebutuhan etanol (liter)
2001	25.251.852
2002	21.076.317
2003	34.063.193
2004	230.613.100

Sumber : BPS, 2005

Hasil yang diinginkan dari fermentasi glukosa adalah etanol, Etanol mempunyai rumus dasar C_2H_5OH . dan mempunyai sifat-sifat fisik sebagai berikut: cairan tidak berwarna, berbau khas menusuk hidung, mudah menguap, dan terjadi dari reaksi fermentasi monosakarida, bereaksi dengan asam asetat, asam sulfat, asam nitrit, asam ionida. Bahan baku yang biasa digunakan untuk memproduksi bioetanol antara lain tetes tebu (molases) yang merupakan by product dari industri gula; gula merah; singkong, ubi jalar, dan kelompok pati-patian lainnya. Bahan-bahan baku ini kemudian difermentasi dengan mikroba seperti *Saccharomyces cerevisiae* dan mikroba penghasil etanol lainnya dan berperan sebagai substrat untuk pertumbuhan mikroba. Dari proses fermentasi tersebut dihasilkan etanol sebagai salah satu produknya. Produk etanol inilah yang paling diperhatikan dalam produksi bioetanol, selain pertumbuhan mikroba penghasilnya. Produk etanol yang dihasilkan dari proses fermentasi ini tentu saja masih tercampur dengan produk lainnya, air, biomassa, dan juga substrat yang masih tersisa. Untuk memisahkannya, diperlukan berbagai teknik pemisahan. Untuk memisahkan antara cairan dan padatan digunakan teknik penyaringan (filtrasi). Untuk memisahkan etanol dari komponen cair lainnya digunakan teknik distilasi (penyulingan) dengan memanfaatkan perbedaan titik uap antara etanol dan komponen-komponen cair lainnya. Dengan distilasi ini dapat dihasilkan etanol yang lebih murni, walaupun tidak 100% murni. Bahan baku pembuatan etanol ini dibagi menjadi tiga kelompok yaitu :

a. Bahan sukrosa

Bahan - bahan yang termasuk dalam kelompok ini antara lain nira, tebu, nira nipati, nira sargum manis, nira kelapa, nira aren, dan sari buah mete.

b. Bahan berpati

Bahan-bahan yang termasuk kelompok ini adalah bahan-bahan yang mengandung pati atau karbohidrat. Bahan-bahan tersebut antara lain tepung-tepung ubi ganyong, sorgum biji, jagung, cantel, sagu, ubi kayu, ubi jalar, dan lain-lain.

c. Bahan berselulosa (lignoselulosa)

Bahan berselulosa (lignoselulosa) artinya adalah bahan tanaman yang mengandung selulosa (serat), antara lain kayu, jerami, batang pisang, dan lain-lain. Berdasarkan ketiga jenis bahan baku tersebut, bahan berselulosa merupakan bahan yang jarang digunakan dan cukup sulit untuk dilakukan. Hal ini karena adanya lignin yang sulit dicerna sehingga proses pembentukan glukosa menjadi lebih sulit.

Tabel 5. Spesifikasi Produk Etanol

sifat	unit	komposisi
Density at 15.5 °C	Gr/ml	0.794
Molecular Weight	Gr/mol	46
Oxygen content	%	34.7
Lower calorific value	kJ/kg	27,723
Energy per unit volume	kJ/l	22,012
Boiling Point	°C	78.3
Viscosity at 20°C	centipoise	1.192
Vapour Pressure at 20°C	atm	0.463

Sumber : Paturau, J.M.; "By-products of The Cane Sugar Industry"; vol. 3; 1st ed; Elsevier; 1982

Tabel 6. Syarat mutu etanol nabati

Uraian	Satuan	Persyaratan Mutu		
		Mutu 1	Mutu 2	Mutu 3
Kadar etanol pada 15 °C	% v/v	Min 96,3	Min. 96,1	Min. 95,0
	% b/b	Min 94,4	Min. 94,1	Min. 92,5

Sumber : SNI 3565:2009

2.4 Pretreatment

Perlakuan awal pada proses pengolahan bahan berlignoselulosa sangat mempengaruhi keberhasilan proses secara keseluruhan, karena kandungan lignin pada bahan sangat mempengaruhi.

Lignin merupakan suatu makromolekul kompleks, suatu polimer aromatik alami yang bercabang – cabang dan mempunyai struktur tiga dimensi yang terbuat

dari fenil propanoid yang saling terhubung dengan ikatan yang bervariasi. Lignin membentuk matriks yang mengelilingi selulosa dan hemiselulosa, penyedia kekuatan pohon dan pelindung dari biodegradasi.

ada beberapa macam cara perlakuan awal untuk mengurangi/memisahkan lignin dari bahan diantaranya :

1. Perlakuan dengan basa

Perlakuan dengan basa bertujuan melarutkan lignin dan sebagian hemiselulosa dengan merendamkan bahan lignoselulosa dalam larutan basa seperti NaOH dan $\text{Ca}(\text{OH})_2$.

2. Perlakuan dengan asam

Perlakuan dengan asam juga bertujuan melarutkan lignin dan sebagian hemiselulosa dengan merendamkan bahan lignoselulosa dalam larutan asam seperti H_2SO_4 atau HCl.

3. Perlakuan dengan *steam explosion*

Perlakuan awal dengan proses ini yaitu mereaksikan bahan dengan steam bertekanan tinggi kemudian diturunkan dengan tiba-tiba. Dari proses ini dapat dihasilkan produk samping berupa vanilin.

Metode isolasi lignin, ada beberapa cara yang dapat digunakan yaitu :

1. Metode klason

Lignin klason diperoleh dengan menghilangkan polisakarida dari bahan yang diekstraksi dengan hidrolisis menggunakan asam sulfat

2. Metode bjorkman

Dilakukan dengan cara menggiling bahan dalam keadaan kering atau dapat menggunakan pelarut yaitu toluene

3. Metode CEL

Isolasi lignin dengan menggunakan enzim.

4. Metode isolasi lignin teknis

Ini adalah metode yang paling banyak digunakan dalam mengisolasi lignin. Ada berbagai teknik untuk mengisolasi lignin yang telah dipelajari sejak lama. Pada prinsipnya semuanya diawali dengan proses pengendapan padatan. Kim et al.(1987) dan Lachenal(2004) mengembangkan teknik

isolasi lignin untuk mendapatkan kemurnian yang tinggi. Adapun tahapan prosesnya sebagai berikut :

- Pengendapan bahan dengan asam sulfat
- Pencucian dengan aquades hangat
- Pelarutan endapan lignin dengan menggunakan NaOH
- Pencucian dengan air hangat
- Pengeringan padatan

2.5 Hidrolisis Asam

Gula merupakan kebutuhan pokok bagi manusia, selama ini kebutuhan gula dipenuhi oleh industri gula (penggilingan tebu). Industri kecil seperti gula merah, gula aren. Gula dapat berupa glukosa, sukrosa, fruktosa, sakrosa. Gukosa dapat digunakan sebagai pemanis dalam makanan, minuman, dan es krim. Glukosa dibuat dengan jalan fermentasi dan hidrolisa. Pada proses hidrolisa biasanya menggunakan katalisator asam seperti HCl, asam sulfat. Bahan yang digunakan untuk proses hidrolisis adalah pati. Di Indonesia banyak dijumpai tanaman yang menghasilkan pati. Tanaman-tanaman itu seperti padi, jagung, ketela pohon, umbi-umbian, aren, dan sebagainya. Hidrolisis merupakan reaksi pengikatan gugus hidroksil / OH oleh suatu senyawa. Gugus OH dapat diperoleh dari senyawa air. Hidrolisis dapat digolongkan menjadi hidrolisis murni, hidrolisis katalis asam, hidrolisis katalis basa, gabungan alkali dengan air dan hidrolisis dengan katalis enzim. Sedangkan berdasarkan fase reaksi yang terjadi diklasifikasikan menjadi hidrolisis fase cair dan hidrolisis fase uap. Hidrolisis adalah reaksi organik dan anorganik yang mana terdapat pengaruh air terhadap komposisi ganda (XY), menghasilkan hydrogen dengan komposisi Y dan komposisi X dengan hidroksil. Hidrolisis asam adalah hidrolisis dengan menggunakan asam yang dapat mengubah polisakarida (pati, selulosa) menjadi gula. Hidrolisis ini biasanya dilakukan dalam tangki khusus yang terbuat dari baja tahan karat atau tembaga yang dihubungkan dengan pipa saluran pemanasan pipa saluran udara untuk mengatur tekanan dalam udara (Isroi, 2008). Di dalam metode hidrolisis asam, biomassa lignoselulosa dipaparkan dengan asam pada

suhu dan tekanan tertentu selama waktu tertentu, dan menghasilkan monomer gula dari polimer selulosa dan hemiselulosa. Beberapa asam yang umum digunakan untuk hidrolisis asam antara lain adalah asam sulfat, 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. Hidrolisis asam pekat merupakan teknik yang sudah dikembangkan cukup lama. Braconnot di tahun 1819 pertama menemukan bahwa selulosa bisa dikonversi menjadi gula yang dapat difermentasi dengan menggunakan asam pekat. Hidrolisis asam pekat menghasilkan gula yang tinggi (90% dari hasil teoritik) dibandingkan dengan hidrolisis asam encer, dan dengan demikian akan menghasilkan ethanol yang lebih tinggi. Hidrolisis asam encer dapat dilakukan pada suhu rendah. Namun demikian, konsentrasi asam yang digunakan sangat tinggi (30-70%). Proses ini juga sangat korosif karena adanya pengenceran dan pemanasan asam. Proses ini membutuhkan peralatan yang mahal atau dibuat secara khusus. Rekaveri asam juga membutuhkan energi yang besar. Di sisi lain, jika menggunakan asam sulfat, dibutuhkan proses netralisasi yang menghasilkan limbah gypsum/kapur yang sangat banyak. Dampak lingkungan yang kurang baik dari proses ini membatasi penggunaan asam perklorat dalam proses ini. Hidrolisis asam pekat juga membutuhkan biaya investasi dan pemeliharaan yang tinggi, hal ini mengurangi ketertarikan untuk komersialisasi proses ini. Hidrolisis asam encer juga dikenal dengan hidrolisis asam dua tahap (two stage acid hydrolysis) dan merupakan metode hidrolisis yang banyak dikembangkan dan diteliti saat ini. Hidrolisis asam encer pertama kali dipatenkan oleh H.K. Moore pada tahun 1919. Potongan (chip) kayu dimasukkan ke dalam tangki kemudian diberi uap panas pada suhu 300 F selama satu jam. Selanjutnya dihidrolisis dengan menggunakan asam fosfat. Hidrolisis dilakukan dalam dua tahap. Hidrolisat yang dihasilkan kemudian difermentasi untuk menghasilkan ethanol. Hidrolisis selulosa dengan menggunakan asam telah dikomersialkan pertama kali pada tahun 1898. Tahap pertama dilakukan dalam kondisi yang lebih 'lunak' dan akan menghidrolisis hemiselulosa (misal 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). Kelemahan dari hidrolisis asam encer adalah degradasi gula hasil di dalam reaksi hidrolisis dan pembentukan produk samping yang tidak diinginkan. Degradasi gula dan produk samping ini tidak hanya akan mengurangi hasil panen gula, tetapi produk samping juga dapat menghambat pembentukan ethanol pada tahap fermentasi selanjutnya. Beberapa senyawa inhibitor yang dapat terbentuk selama proses hidrolisis asam encer adalah furfural, 5-hydroxymethylfurfural (HMF), asam levulinik (levulinic acid), asam asetat (acetic acid), asam format formic acid), asam uronat (uronic acid), asam 4-hydroxybenzoic, asam vanilik (vanilic acid), vanillin, phenol, cinnamaldehyde, formaldehida (formaldehyde), dan beberapa senyawa lain. Proses hidrolisis ini dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya :

1. pH (derajat keasaman)

pH mempengaruhi proses hidrolisis sehingga dapat dihasilkan hidrolisis yang sesuai dengan yang diinginkan, pH yang baik untuk proses hidrolisis adalah 2,3.

2. Suhu

Suhu juga mempengaruhi proses kecepatan reaksi hidrolisis, suhu yang baik untuk hidrolisis adalah sekitar 21 derajat celcius.

3. Konsentrasi

Konsentrasi mempengaruhi laju reaksi hidrolisis, untuk hidrolisis asam digunakan konsentrasi pekat.

2.6 Sterilisasi

Sterilisasi dilakukan terhadap bahan dan alat sehingga terbebas dari kontaminasi mikroorganisme lain. Sterilisasi perlu dilakukan karena kontaminasi mikroba lain akan memberikan dampak yang tidak menguntungkan sebagai berikut:

1. kontaminan meningkatkan persaingan di dalam mengkonsumsi substrat sehingga akan mengurangi perolehan

2. kontaminan dapat menghambat proses metabolisme sel sehingga akan mengurangi perolehan
3. kontaminan meningkatkan turbiditas sehingga dapat mengacaukan pengukuran terhadap jumlah sel setiap saat.

Hal yang perlu ditekankan pada sterilisasi medium ini adalah larutan nutrisi tidak boleh disterilisasi bersamaan dengan larutan glukosa agar tidak terjadi proses karamelisasi. Karamelisasi disebut juga proses reduksi Maillard. Proses ini terjadi karena gugus karbonil pada glukosa bereaksi dengan gugus amonium atau protein dari medium sehingga membentuk nitrogen hitam. Senyawa ini tidak dapat dioksidasi mikroba dan disebut *unfermented substrate*. Akibat reaksi ini glukosa tidak dapat diuraikan oleh sel ragi, bahkan menjadi inhibitor terhadap sel ragi tersebut.

2.7 Fermentasi

Fermentasi merupakan kegiatan mikrobial pada bahan pangan sehingga dihasilkan produk yang dikehendaki. Fermentasi berasal dari bahasa Latin *fervere* yang berarti mendidihkan. Seiring perkembangan teknologi, definisi fermentasi meluas, menjadi semua proses yang melibatkan mikroorganisme untuk menghasilkan suatu produk yang disebut metabolit primer dan sekunder dalam suatu lingkungan yang dikendalikan. Pada mulanya istilah fermentasi digunakan untuk menunjukkan proses perubahan glukosa menjadi alkohol yang berlangsung secara anaerob. Namun, kemudian istilah fermentasi berkembang lagi menjadi seluruh perombakan senyawa organik yang dilakukan mikroorganisme yang melibatkan enzim yang dihasilkannya. Dengan kata lain, fermentasi adalah perubahan struktur kimia dari bahan-bahan organik dengan memanfaatkan agen-agen biologis terutama enzim sebagai biokatalis. Produk fermentasi dapat digolongkan menjadi 4 jenis:

1. produk biomassa
2. produk enzim
3. produk metabolit

4. produk transformasi

Mikrobia yang umumnya terlibat dalam fermentasi adalah bakteri, khamir dan kapang. Contoh bakteri yang digunakan dalam fermentasi adalah *Acetobacter xylinum* pada pembuatan nata decoco, *Acetobacter aceti* pada pembuatan asam asetat. Contoh khamir dalam fermentasi adalah *Saccharomyces cerevisiae* dalam pembuatan alkohol sedang contoh kapang adalah *Rhizopus sp* pada pembuatan tempe, *Monascus purpureus* pada pembuatan angkak dan sebagainya. Proses fermentasi yang dilakukan adalah proses fermentasi yang tidak menggunakan oksigen atau proses anaerob. Cara pengaturan produksi etanol dari gula cukup kompleks, konsentrasi substrat, oksigen, dan produk etanol, semua mempengaruhi metabolisme khamir, daya hidup sel, pertumbuhan sel, pembelahan sel, dan produksi etanol. Seleksi galur khamir yang cocok dan mempunyai toleransi yang tinggi terhadap baik konsentrasi, substrat ataupun alkohol merupakan hal yang penting untuk peningkatan hasil (Isroi, 2008). Fermentasi pertama kalinya dilakukan perlakuan dasar terhadap bibit fermentor. Dimana bibit fermentor yang biasa digunakan adalah *Saccharomyces cerevisiae*. *Saccharomyces cerevisiae* mempunyai ciri-ciri sebagai berikut :

1. Mempunyai bentuk sel yang bulat, pendek oval, atau oval.
2. Mempunyai ukuran sel (4,2-6,6) x (5-11) mikron dalam waktu tiga hari pada 25 C dan pada media agar.
3. Dapat bereproduksi dengan cara penyembulan atau multilateral.
4. Mampu mengubah glukosa dengan baik.
5. Dapat berkembang dengan baik pada suhu antara 20-30 C.
6. Industri fermentasi dalam pelaksanaan proses dipengaruhi oleh beberapa faktor :
 - Mikrobia
 - bahan dasar
 - sifat-sifat proses
 - pilot-plant
 - faktor sosial ekonomi
 - Mikrobia

Mikrobia dalam industri fermentasi merupakan faktor utama, sehingga harus memenuhi syarat-syarat tertentu yaitu : murni, unggul, stabil, bukan patogen

a. Murni

Dalam proses-proses tertentu harus menggunakan biakan murni (dari satu strain tertentu) yang telah diketahui sifat-sifatnya. Untuk menjaga agar biakan tetap murni dalam proses maka kondisi lingkungan harus dijaga tetap steril.

b. Unggul

Pada kondisi fermentasi yang diberikan, mikrobia harus mampu menghasilkan perubahan-perubahan yang dikehendaki secara cepat dan hasil yang besar. Sifat unggul yang ada harus dapat dipertahankan. Hal ini berkaitan dengan kondisi proses yang diharapkan. Proses rekayasa genetik dapat dilakukan untuk memperbaiki sifat jasad dengan maksud mempertinggi produk yang diharapkan dan mengurangi produk-produk ikutan.

c. Stabil

Pada kondisi yang diberikan, mikrobia harus mempunyai sifat-sifat yang tetap, tidak mengalami perubahan karena mutasi atau lingkungan.

d. Bukan Patogen

Mikrobia yang digunakan adalah bukan patogen bagi manusia maupun hewan, kecuali untuk produksi bahan kimia tertentu. Jika digunakan mikrobia patogen harus dijaga, agar tidak menimbulkan akibat samping pada lingkungan. Faktor utama yang mempengaruhi pertumbuhan dan perilaku mikroba dapat digolongkan dalam faktor intraseluler dan faktor ekstraseluler. Faktor intraseluler meliputi struktur, mekanisme, metabolisme, dan genetika. Sedangkan faktor ekstraseluler meliputi kondisi lingkungan seperti pH, suhu, dan tekanan. Proses pertumbuhan mikroba merupakan proses yang memiliki batas waktu tertentu. Pada saat tertentu, setelah melewati saat minimum, mikroba akan mengalami fase kematian.

Reaksi yang berlangsung dalam keadaan anaerobik tersebut adalah sebagai berikut:



Pada percobaan ini digunakan glukosa sebagai substrat utama. Hal ini disebabkan struktur model glikosa yang sederhana sehingga mudah digunakan oleh *Saccharomyces cereviceae*. Glukosa digunakan sebagai sumber energi dan sumber karbon yang digunakan untuk membentuk material penyusun sel baru. Glukosa disebut juga *reducing sugar* sehingga pemanfaatannya oleh *Saccharomyces cereviceae* dilakukan dengan mengoksidasi glukosa yaitu dengan cara pemutusan ikatan rangkap pada gugus karbonil glukosa. Media yang digunakan di dalam fermentasi harus memenuhi syarat-syarat sebagai berikut:

1. mengandung nutrisi yang dibutuhkan bagi pertumbuhan sel *Saccharomyces cereviceae*
2. mengandung nutrisi yang dapat digunakan sebagai sumber energi bagi sel *Saccharomyces cereviceae*
3. tidak mengandung zat yang menghambat pertumbuhan sel
4. tidak terdapat kontaminan yang dapat meningkatkan persaingan dalam penggunaan substrat

Faktor-faktor yang dapat menyebabkan berhentinya pertumbuhan mikroba antara lain :

- Konsentrasi garam

Konsentrasi garam yang dianjurkan adalah 5-15 %. Garam berfungsi untuk menghambat pertumbuhan jenis-jenis mikroorganisme pembusuk yang tidak diinginkan selama proses fermentasi berlangsung. Prinsip kerja garam dalam proses fermentasi adalah untuk mengatur Aw (ketersediaan air untuk kebutuhan mikroorganisme). Mikroorganisme yang diinginkan untuk tumbuh adalah jenis-jenis bakteri penghasil asam. Selain mengatur Aw, garam juga berfungsi untuk menarik keluar cairan sel jaringan yang mengandung sakarida-sakarida, dimana sakarida tersebut merupakan nutrien untuk pertumbuhan mikroorganisme. Kadar garam selama

fermentasi akan berubah karena cairan dalam sel-sel jaringan tertarik keluar sel, karena itu secara periodik harus diadakan penyesuaian kadar garam.

- Suhu

Suhu selama proses fermentasi sangat menentukan jenis mikroorganisme dominan yang akan tumbuh. Umumnya diperlukan suhu 30 °C untuk pertumbuhan mikroorganisme. Bila suhu kurang dari 30 °C pertumbuhan mikroorganisme penghasil asam akan lambat sehingga dapat terjadi pertumbuhan produk.

- Oksigen

Ketersediaan oksigen harus diatur selama proses fermentasi. Hal ini berhubungan dengan sifat mikroorganisme yang digunakan. Contoh khamir dalam pembuatan anggur dan roti biasanya membutuhkan oksigen selama proses fermentasi berlangsung, sedangkan untuk bakteri-bakteri penghasil asam tidak membutuhkan oksigen selama proses fermentasi berlangsung. Dalam proses fermentasi ini, glukosa dari hasil hidrolisis diubah menjadi etanol.

2.8 *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae merupakan khamir sejati tergolong eukariot yang secara morfologi hanya membentuk blastospora berbentuk bulat lonjong, silindris, oval atau bulat telur yang dipengaruhi oleh strainnya. Dapat berkembang biak dengan membelah diri melalui "*budding cell*". Reproduksi dapat dipengaruhi oleh keadaan lingkungan serta jumlah nutrisi yang tersedia bagi pertumbuhan sel. Penampilan makroskopik mempunyai koloni berbentuk bulat, warna kuning mempunyai kemampuan untuk disisipkan dengan gen mikroba lain (Nikon, 2004). Untuk mencapai produk yang diinginkan harus melalui proses teknologi tinggi dan modern, biayanya relatif mahal namun produk yang dihasilkan bermutu tinggi, sehingga jika diperhitungkan secara ekonomi lebih menguntungkan. Selain untuk keperluan pembuatan roti dan bioteknologi untuk manusia secara langsung, juga telah dilakukan berbagai usaha penelitian untuk ternak hingga akhirnya

diperoleh khamir *S. cerevisiae*. Khamir tersebut dipakai untuk meningkatkan kesehatan ternak yaitu sebagai probiotik dan imunostimulan dalam bentuk *feed additive*. Ternak yang dapat mengkonsumsi *S. cerevisiae* adalah golongan ikan, ruminansia dan unggas . Keuntungan penggunaan *S. cerevisiae* sebagai probiotik adalah tidak membunuh mikroba bahkan menambah jumlah mikroba yang menguntungkan, berbeda dengan antibiotika dapat membunuh mikroba yang merugikan maupun menguntungkan tubuh, dan mempunyai efek resistensi . Demikian pula dengan penggunaan *S. Cerevisiae* sebagai bahan imunostimulan. Imunostimulan berfungsi untuk meningkatkan kesehatan tubuh dengan cara meningkatkan sistem pertahanan terhadap penyakit-penyakit yang disebabkan bakteri, cendawan, virus dan muda, permukaan berkilau, licin, tekstur lunak dan memiliki sel bulat dengan askospora 1-8 buah (Nikon, 2004 ; Lander, 1972 ; Lodder, 1970) . Taksonomi *Saccharomyces spp* (menurut Sanger, 2004), sebagai berikut :

Super Kingdom : Eukaryota

Phylum : Fungi

Subphylum : Ascomycota

Class : Saccharomycetes

Order : Saccharomycetales

Family : Saccharomycetaceae

Genus : Saccharomyces

Species : Saccharomyces cerevisiae

Khamir dapat berkembang biak dalam gula sederhana seperti glukosa, maupun gula kompleks disakarida yaitu sukrosa (Marx, 1991). Selain itu untuk menunjang kebutuhan hidup diperlukan oksigen, karbohidrat, dan nitrogen Pada uji fermentasi gulagula mempunyai reaksi positif pada gula dekstrosa, galaktosa, sukrosa, maltosa, raffinosa, trehalosa, dan negatif pada gula laktosa (Lodder, 1970). Komposisi kimia *S. cerevisiae* terdiri atas : protein kasar 50-52%, karbohidrat ; 30-37%; lemak 4-5%; dan mineral 7-8% (Redd dan Nagodawithana, 1991) .

Khamir *S. cerevisiae* dapat dimanfaatkan sebagai probiotik, prebiotik dan imunostimulan dan kegunaan lainnya di dalam meningkatkan produksi ternak. Sehubungan dengan prebiotik lebih banyak dipakai untuk kepentingan manusia secara langsung maka tidak dibahas dalam bagian ini. *S. cerevisiae* sebagai probiotik Menurut definisi Fuller (1992) dan (Karpinska et al, 2001), probiotik adalah imbuhan pakan berbentuk mikroba hidup yang menguntungkan dan mempengaruhi induk semang melalui perbaikan keseimbangan mikroorganisme dalam saluran pencernaan. Sedangkan prebiotik adalah bahan makanan yang tidak tercerna dan memberikan keuntungan pada inang melalui simulasi yang selektif terhadap pertumbuhan aktivitas dari satu atau sejumlah bakteri yang terdapat di dalam kolon (Roberfroid, 2000). Di bidang peternakan penggunaan probiotik bermanfaat untuk kesehatan, produksi dan pencegahan penyakit. Selanjutnya (Soeharsono, 1994) mengemukakan bahwa mikroba yang termasuk dalam kelompok probiotik bila mempunyai ciri sebagai berikut yaitu : dapat diproduksi dalam skala industri, jika disimpan di lapangan akan stabil dalam jangka waktu yang lama, mikroorganisme harus dapat hidup kembali di dalam saluran pencernaan, dan memberikan manfaat pada induk semang (Cole, 1991) menyatakan probiotik merupakan salah satu pilihan pakan tambahan pada ternak yang sehat dan aman bagi lingkungan. (Shin et al, 1989) menyatakan bahwa *S. Cerevisiae* termasuk salah satu mikroba yang umum dipakai untuk ternak sebagai probiotik, bersama-sama dengan bakteri dan cendawan lainnya seperti *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Bacillus pumilus*, *B. centuss*, *Lactobacillus*.

Proses pertumbuhan mikroba sangat dinamik dan kinetiknya dapat digunakan untuk meramal produksi biomassa dalam suatu proses fermentasi. Faktor utama yang mempengaruhi pertumbuhan dan perilaku mikroba dapat digolongkan dalam faktor intraseluler dan faktor ekstraselular. Faktor intraseluler meliputi struktur, mekanisme, metabolisme, dan genetika. Sedangkan faktor ekstraselular meliputi kondisi lingkungan seperti pH, suhu, tekanan. Proses pertumbuhan mikroba merupakan proses yang memiliki batas tertentu. Pada saat tertentu, setelah melewati tahap minimum, mikroba akan mengalami fasa kematian. Faktor-faktor yang dapat menyebabkan berhentinya pertumbuhan mikroba antara lain:

1. Penyusutan konsentrasi nutrisi yang dibutuhkan dalam pertumbuhan mikroba karena habis dikonsumsi.
2. Produk akhir metabolisme yang menghambat pertumbuhan mikroba karena terjadinya inhibisi dan represi. Pertumbuhan kultur mikroba umumnya dapat digambarkan dalam suatu kurva pertumbuhan.

Pertumbuhan mikroba dapat terbagi dalam beberapa tahap seperti antara lain:

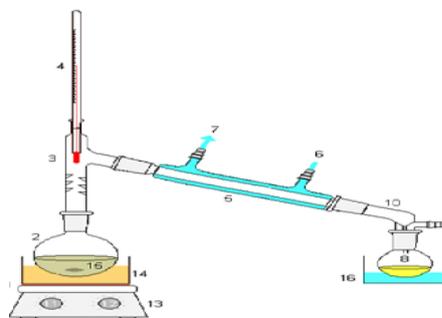
1. Fasa stationer adalah fasa yang disebut fasa adaptasi/ *lag phase*. Pada saat ini mikroba lebih berusaha menyesuaikan diri dengan lingkungan dan medium baru daripada tumbuh ataupun berkembang biak. Pada saat ini mikroba berusaha merombak materi-materi dalam medium agar dapat digunakan sebagai nutrisi untuk pertumbuhannya. Bila dalam medium ada komponen yang tidak dikenal mikroba, mikroba akan memproduksi enzim ekstraselular untuk merombak komponen tersebut. Fasa ini juga berlangsung seleksi. Hanya mikroba yang dapat mencerna nutrisi dalam medium untuk pertumbuhannya lah yang dapat bertahan hidup.
2. Fasa pertumbuhan dipercepat adalah fasa dimana mikroba sudah dapat menggunakan nutrisi dalam medium fermentasinya. Pada fasa ini mikroba banyak tumbuh dan membelah diri sehingga jumlahnya meningkat dengan cepat
3. Fasa eksponensial adalah akhir fasa pertumbuhan dipercepat. Pada fasa ini laju pertumbuhan tetap pada laju pertumbuhan maksimum (μ_{maks}). Nilai μ_{maks} ini ditentukan oleh konstanta jenuh/ saturasi substrat. Nilai μ_{maks} untuk setiap mikroba juga tertentu pada masing-masing substrat.
4. Fasa pertumbuhan diperlambat mulai pada akhir fasa eksponensial. Pertumbuhan mikroba yang begitu cepat tidak diimbangi tersedianya nutrisi yang cukup. Jika fermentasi dilakukan secara *batch*, dimana umpan nutrisi dimasukkan hanya pada awal proses fermentasi, pada waktu tertentu saat jumlah mikroba yang mengkonsumsi nutrisi tersebut melebihi daya dukung nutrisi akan terjadi kekurangan nutrisi. Hal lain yang memperlambat pertumbuhan mikroba adalah terjadinya inhibisi ataupun represi yang terjadi

karena terakumulasinya produk metabolit sekunder hasil aktifitas fermentasi mikroorganismenya.

5. Fasa kematian terjadi apabila nutrisi sudah benar-benar tidak dapat lagi mencukupi kebutuhan mikroorganismenya. Keadaan ini diperparah oleh akumulasi produk metabolit primer dan sekunder yang tidak dipanen sehingga terus menghambat ataupun merepresi pertumbuhan sel mikroorganismenya. Selain itu umur sel juga sudah tua, sehingga pertahanan sel terhadap lingkungan yang berbeda dari kondisi biasanya juga berkurang.

2.9 Distilasi

Distilasi atau penyulingan adalah suatu metode pemisahan bahan kimia berdasarkan perbedaan kecepatan atau kemudahan menguap (volatilitas) bahan. Dalam penyulingan, campuran zat dididihkan sehingga menguap, dan uap ini kemudian didinginkan kembali ke dalam bentuk cairan. Zat yang memiliki titik didih lebih rendah akan menguap lebih dulu. Metode ini termasuk sebagai unit operasi kimia jenis perpindahan massa. Penerapan proses ini didasarkan pada teori bahwa pada suatu larutan, masing-masing komponen akan menguap pada titik didihnya. Model ideal distilasi didasarkan pada Hukum Raoult dan Hukum Dalton. Ada 4 jenis distilasi, yaitu distilasi sederhana, distilasi fraksionasi, distilasi uap, dan distilasi vakum. Selain itu ada pula distilasi ekstraktif dan distilasi azeotropic homogenous, distilasi dengan menggunakan garam berion, distilasi pressure-swing, serta distilasi reaktif.



Gambar 3. Peralatan Distilasi

2.10 Indeks Bias

Indeks bias pada medium didefinisikan sebagai perbandingan antara kecepatan cahaya dalam ruang hampa udara dengan cepat rambat cahaya pada suatu medium. Pengujian indeks bias dapat digunakan untuk menentukan kemurnian bioetanol dan dapat menentukan dengan cepat terjadinya hidrogenasi katalis. Semakin panjang rantai karbon dan semakin banyak ikatan rangkap maka indeks bias semakin besar. Indeks bias juga dipengaruhi factor-faktor proses oksidasi dan suhu. Alat yang digunakan untuk menentukan indeks bias adalah refraktometer.

2.11 Kromatografi Gas

Kromatografi adalah suatu cara pemisahan lain yang penting di dalam analisa kimia. Di dalam kromatografi diperlukan adanya 2 fase yang tidak saling menyampur, yaitu fase diam dan fase gerak. Fase diamnya disini dapat berupa suatu zat padat yang ditempatkan di dalam suatu kolom atau dapat juga berupa cairan terserap (teradsorpsi) berupa lapisan yang tipis pada butir-butir halus 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 ke dalam kolom yang mengandung fase diam. Dengan bantuan fase gerak, komponen-komponen campuran itu kemudian dibawa bergerak melalui fase diam di dalam kolom. Perbedaan antaraksi atau afinitas antara komponen-komponen campuran itu dengan kedua fase, menyebabkan komponen-komponen itu bergerak dengan kecepatan berbeda melalui kolom. Akibat adanya perbedaan kecepatan (differential migration), komponen-komponen itu terpisah satu sama lain. Pada kromatografi gas-cairan (GLC, Gas Liquid Chromatography), fase geraknya berupa gas, fase diamnya berupa cairan. Partisi komponen cuplikan berdasarkan pelarutan uap komponen itu di dalam fase diam. Kromatografi gas-cairan sering disebut juga Kromatografi Gas (GC) saja.