

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ampas Tebu

Tanaman tebu (*Saccharum officinarum*) dimanfaatkan sebagai bahan baku utama dalam industri gula. Pengembangan industri gula mempunyai peranan penting bukan saja dalam rangka mendorong pertumbuhan perekonomian di daerah serta penambahan atau penghematan devisa, tetapi juga langsung terkait dengan pemenuhan kebutuhan pokok rakyat dan penyediaan lapangan kerja (Farid, 2003).

Bagian lain dari tanaman seperti daunnya dapat pula dimanfaatkan sebagai pakan ternak dan bahan baku pembuatan pupuk hijau atau kompos. Ampas tebu digunakan oleh pabrik gula itu sendiri untuk bahan bakar selain itu biasanya dipakai oleh industri pembuat kertas sebagai campuran pembuat kertas.

Daun tebu yang kering (dalam bahasa Jawa, *dadhok*) adalah biomassa yang mempunyai nilai kalori cukup tinggi. Di pedesaan *dadhok* sering dipakai sebagai bahan bakar untuk memasak; selain menghemat minyak tanah yang makin mahal, bahan bakar ini juga cepat panas. Dalam konversi energi pabrik gula, daun tebu dan juga ampas batang tebu digunakan untuk bahan bakar *boiler*, yang uapnya digunakan untuk proses produksi dan pembangkit listrik (Anonim, 2007).



Gambar 1. Tanaman 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).



Gambar 2. Ampas Tebu

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)

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 termanfaatkan 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 renik 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

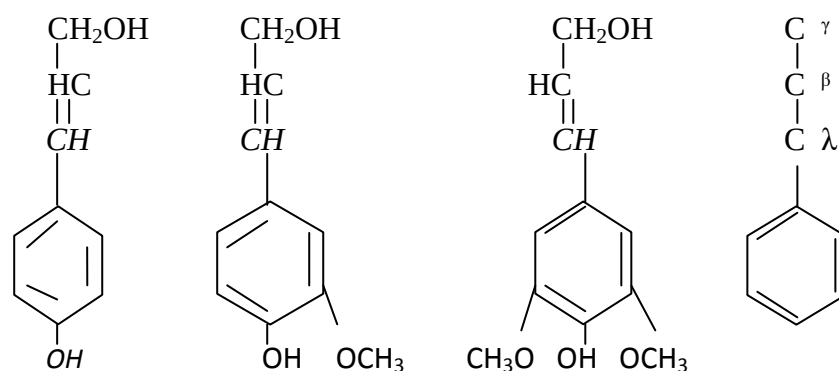
Terdapat bersama selulosa, terdiri atas pentosan, pectin, xylan dan glikan. Hidrolisis hemiselulosa oleh enzim hemiselulase menghasilkan asam lemak. Morrison (1986) mendapatkan bahwa hemiselulosa lebih erat terikat dengan lignin dibandingkan dengan selulosa, sehingga selulosa lebih mudah dicerna dibandingkan 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

Lignin adalah bagian utama dari dinding sel tanaman yang merupakan polimer terbanyak setelah selulosa. Lignin yang merupakan polimer aromatik berasosiasi dengan polisakarida pada dinding sel sekunder tanaman dan terdapat sekitar 20-40 %. Komponen lignin pada sel tanaman (monomer guasil dan siringil) berpengaruh terhadap pelepasan dan hidrolisis polisakarida.

Satuan Penyusun Lignin, dapat dilihat pada Gambar 2.



Para KumarilAlkohol Koniferil Alkohol Sinapil Alkohol Model Kerangka C

Sumber : Steffen, 2003

Gambar 3. Satuan Penyusun Lignin

Lignin adalah molekul kompleks yang tersusun dari unit *phenylpropane* yang terikat di dalam struktur tiga dimensi. Lignin adalah material yang paling kuat di dalam biomassa. Lignin sangat resisten terhadap degradasi, baik secara biologi, enzimatik, maupun kimia. Karena kandungan karbon yang relatif tinggi dibandingkan dengan selulosa dan hemiselulosa, lignin memiliki kandungan energi yang tinggi.

Pembuatan bahan-bahan lignoselulosa hingga menjadi etanol melalui empat proses utama yaitu pretreatment, hidrolisa, fermentasi, dan terakhir adalah pemisahan serta pemurnian produk etanol (Mosier dkk., 2005). Bahan-bahan lignoselulosa umumnya terdiri dari selulosa, hemiselulosa dan lignin. Selulosa secara alami diikat oleh hemiselulosa dan dilindungi oleh lignin. Adanya senyawa pengikat lignin inilah yang menyebabkan bahan-bahan lignoselulosa sulit untuk dihidrolisa (Iranmahboob dkk., 2002).

Dari beberapa unsur yang terkandung didalamnya, telah banyak masyarakat yang tertarik untuk memanfaatkannya dan meneliti kegunaannya. Tetapi sejauh ini belum ada yang meneliti untuk membuat bioetanol dari Rumput Ilalang. Dibanding dengan sumber nabati lain, Rumput Ilalang paling ekonomis menghasilkan bioetanol. Karena, Rumput Ilalang kaya lignoselulosa, tak memerlukan perawatan khusus, dan mudah tumbuh.

2.2 Ampas Singkong

Onggok adalah limbah dari pabrik tapioka (singkong) yang kering, padat dan keras, biasanya berukuran satu kepal atau pecahan lebih kecil tergantung dari hasil pemerasan saat menyadap tapioka menjadi singkong. Onggok mengandung serat kasar dan karbohidrat. Pengolahan umbi kayu menjadi tapioka menghasilkan limbah cair dan limbah padat dalam bentuk onggok. Limbah cair berasal dari proses pengendapan yaitu filtrate (hasil saringan) yang dipisahkan dari endapan patinya.

Limbah padat dari produksi tapioka disebut ampas singkong atau onggok yang merupakan hasil sampingan industri tapioka berbentuk padat yang berasal dari unit ekstraksi. Pada proses ekstraksi ini hasil parutan ketela pohon

ditambahkan air lalu disaring dengan menggunakan kain saring, sehingga diperoleh suspensi pati sebagai filtratnya dan ampas yang tertinggal di kain saring. Komponen penting yang terdapat dalam onggok adalah kandungan zat organik berupa pati dan serat kasar. Kandungan ini berbeda untuk setiap daerah asal, jenis dan mutu umbi kayu, teknologi yang digunakan dan penanganan ampas itu sendiri (Sumantri et al, 2003).

Onggok sebagai limbah padat dari pabrik tapioka apabila dibiarkan akan mengganggu masyarakat, terutama yang ada disekitar lokasi pabrik. Onggok merupakan limbah padat dari industry yang masih mengandung kadar pati yang cukup tinggi.



Gambar 4. 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.

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)	-

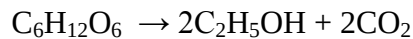
Sumber : Nur Richana, 2013

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.

Hasil yang diinginkan dari fermentasi glukosa adalah etanol, Etanol mempunyai rumus dasar $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 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.

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

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 ⁰ 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	⁰ C	78.3
Viscosity at 20 ⁰ C	Centipoise	1.192
Vapour Pressure at 20 ⁰ C	Atm	0.463

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

Pretreatment merupakan faktor yang paling signifikan mempengaruhi baik glukosa enzimatis dan hasil xilosa setelah *pretreatment* termal ringan maksimum 140°C selama 10 menit.

The maksimal glukosa enzimatis dan hasil xylose dari padat, pretreated gandum fraksi jerami diperoleh setelah *pretreatment* pada nilai pH yang paling ekstrim (pH 1 atau pH 13) pada suhu *pretreatment* maksimum 140°C.

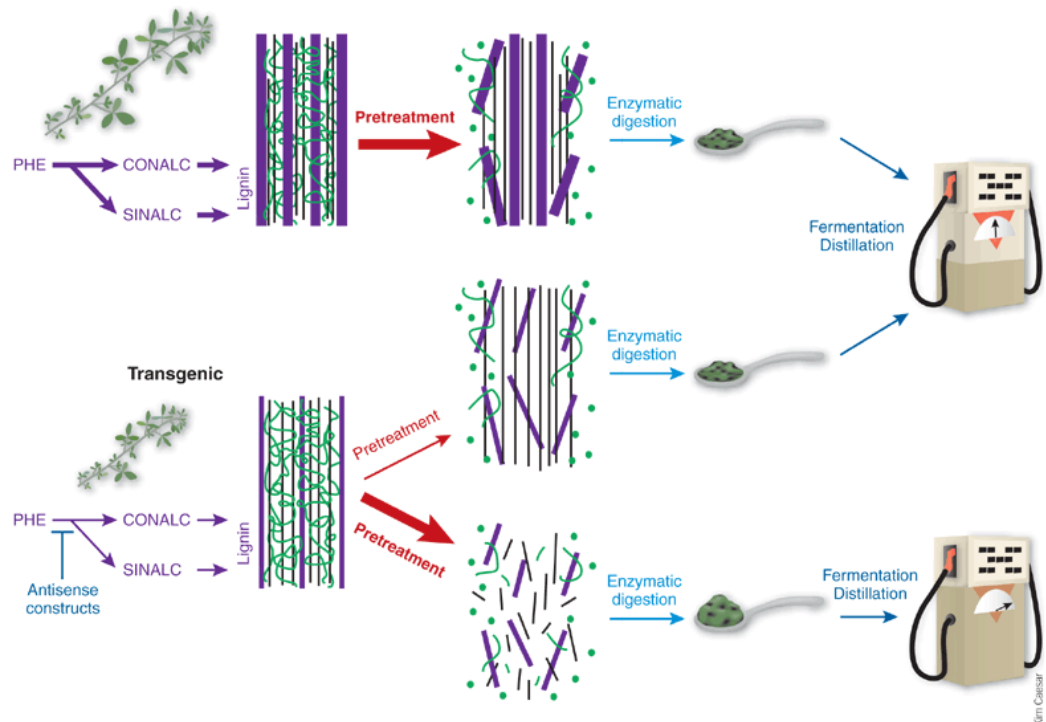
Model respon permukaan mengungkapkan secara signifikan korelasi interaksi pH dan suhu *pretreatment* pada pembebasan enzimatis dari kedua glukosa dan xylose dari pretreatment, jerami gandum padat.

Pengaruh suhu paling menonjol dengan pretreatments asam, tetapi hasil tertinggi monosakarida enzimatis diperoleh setelah pretreatments alkali. *Pretreatment Alkaline* juga dilarutkan sebagian besar lignin.

Pretreatment mengubah struktur selulosa biomassa untuk membuat selulosa lebih mudah diakses enzim yang mengkonversi polimer karbohidrat. Selanjutnya, ketika lignoselulosa adalah dipisahkan menjadi komponen-komponennya, dapat dihidrolisis menjadi gula difermentasi (Monosakarida) dengan menggunakan asam mineral atau enzim. Monosakarida kemudian dapat lebih dikonversi ke bahan kimia berbasis bio yang berharga (Kamm dan Kamm, 2004).

Tujuan dari *pretreatment* adalah untuk memecahkan perisai lignin dan struktur kristal selulosa sementara meningkatkan porositas selulosa.

Tujuan *pretreatment* secara skematis ditunjukkan oleh Gambar 5.



Gambar 5. Skema Tujuan *Pretreatment* Biomassa Lignoselulosa

Sumber : Mosier, dkk., 2005

Pretreatment dapat dianggap sangat penting untuk proses konversi selulosa praktis. Metode *Pretreatment* biasanya dikategorikan menjadi fisik, kimia, dan biologi *physiochemical* (Zhao dkk., 2009). Namun masing-masing metode ini memiliki kelemahan mereka sendiri yang spesifik.

Efektivitas *lignoselulosa pretreatment* adalah salah satu faktor kunci untuk sukses konversi bahan berselulosa menjadi gula dan selanjutnya menjadi biofuel atau bahan bakar nabati *intermediet*. *Pretreatment* bahan selulosa dapat mempengaruhi sifat fisik seperti sebagai derajat polimerisasi, kristalinitas dan bahkan luas permukaan substrat diakses dalam kasus enzimatik hidrolisis lebih lanjut (Olivier dan Bourbigou, 2010).

Metode *Pretreatment* (Tabel 6) juga bertujuan untuk meningkatkan luas permukaan dari selulosa yang diharapkan dapat menghasilkan perbaikan dalam kinetika hidrolisis dan konversi selulosa menjadi glukosa.

Proses *pretreatment* yang sekaligus proses hidrolisa meliputi : perlakuan secara fisik, fisik-kimiawi, kimiawi dan enzimatik (Mosier dkk., 2005; Sun dan Cheng, 2005)

Tabel 7. Metode *Pretreatment*

Metode	Contoh
Mekanik panas	Digerus, digiling, digunting, ekstruder
Autohydrolysis	Super critical, carbon dioxide explosion
Perlakuan asam	Asam sulfat dan asam klorida encer, asam sulfat dan asam klorida pekat
Perlakuan alkali	Sodium hidroksida, ammonia, alkali hydrogen peroksida
Perlakuan larutan organik	Methanol, etanol

Sumber : Mosier dkk., 2005; Sun and Cheng, 2005

Perlakuan awal pada proses pengolahan bahan berlignoselulosa sangat mempengaruhi keberhasilan proses secara keseluruhan.

Cara perlakuan awal untuk mengurangi/memisahkan kadar lignin, diantaranya:

1. Perlakuan dengan basa

Perlakuan dengan basa bertujuan melarutkan lignin dan sebagian hemiselulosa dengan merendamkan bahan lignoselulosa dalam larutan basa seperti NaOH dan Ca(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.

4. Metode isolasi lignin

Ada beberapa cara yang dapat digunakan yaitu :

- **Metode klason**

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

- **Metode bjorkman**

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

- **Metode CEL**

Isolasi lignin dengan menggunakan enzim.

- **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 dkk. (1987)* mengembangkan teknik isolasi lignin untuk mendapatkan kemurnian yang tinggi. Adapun tahapan prosesnya sebagai berikut :

- Pengendapan bahan dengan asam sulfat 0,2 M selama 3 hari
- Pencucian asam sulfat
- Pelarutan lignin dengan menggunakan NaOH 0,3M selama 2 hari
- Pencucian dengan air
- Pengeringan padatan

2.5 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:

- Kontaminan meningkatkan persaingan di dalam mengkonsumsi substrat sehingga akan mengurangi perolehan

- Kontaminan dapat menghambat proses metabolisme sel sehingga akan mengurangi perolehan
- 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.

2.6 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. Glukosa 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 pemanas dan 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 etanol.

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 etanol pada tahap fermentasi selanjutnya.

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°C.

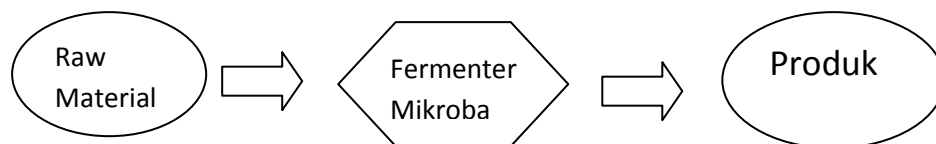
3. Konsentrasi

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

2.7 Fermentasi

Fermentasi merupakan suatu cara untuk mengubah substrat menjadi produk tertentu yang dikehendaki dengan menggunakan bantuan mikroba. Produk-produk tersebut biasanya dimanfaatkan sebagai minuman atau makanan. Fermentasi suatu cara telah dikenal dan digunakan sejak lama sejak jaman kuno. Sebagai suatu proses fermentasi memerlukan:

- 1) Mikroba sebagai inokulum
- 2) Tempat (wadah) untuk menjamin proses fermentasi berlangsung dengan optimal.
- 3) Substrat sebagai tempat tumbuh (medium) dan sumber nutrisi bagi mikroba.



Gambar 6. Skema Proses Fermentasi

Bioteknologi fermentasi menyangkut hal-hal yang berkaitan dengan proses industri fermentasi yang meliputi:

1. Sifat Fermentasi
2. Prinsip Kultivasi Mikroba dalam Sistem Cair
3. Desain Bioreaktor (fermenter)
4. Desain Media
5. Instrumentasi dan Pengendalian Proses dalam Bioreaktor
6. Teknik Pengukuran
7. Pemindahan Massa dan Energi
8. Peningkatan Skala
9. Fermentasi substrat padat

- Sifat Fermentasi

1. Aerob memerlukan adanya oksigen.
2. Anaerob tidak memerlukan adanya oksigen.

- **Prinsip-prinsip Fermentasi**

Agar fermentasi dapat berjalan dengan optimal, maka harus memperhatikan faktor-faktor berikut ini:

1. Aseptis: bebas kontaminan.
2. Komposisi medium pertumbuhan.
3. Penyiapan inokulum
4. Kultur
5. Tahap produksi akhir.

Fermentasi adalah proses produksi energi dalam sel dalam keadaan anaerobik (tanpa oksigen). Secara umum, fermentasi adalah salah satu bentuk respirasi anaerobik, akan tetapi, terdapat definisi yang lebih jelas yang mendefinisikan fermentasi sebagai respirasi dalam lingkungan anaerobik dengan tanpa akseptor elektron eksternal.

Gula adalah bahan yang umum dalam fermentasi. Beberapa contoh hasil fermentasi adalah etanol, asam laktat, dan hidrogen. Akan tetapi beberapa komponen lain dapat juga dihasilkan dari fermentasi seperti asam butirat dan aseton.

Ragi dikenal sebagai bahan yang umum digunakan dalam fermentasi untuk menghasilkan etanol dalam bir, anggur dan minuman beralkohol lainnya. Respirasi anaerobik dalam otot mamalia selama kerja yang keras (yang tidak memiliki akseptor elektron eksternal), dapat dikategorikan sebagai bentuk fermentasi yang menghasilkan asam laktat sebagai produk sampingannya. Akumulasi asam laktat inilah yang berperan dalam menyebabkan rasa kelelahan pada otot.

Hasil akhir dari fermentasi dibedakan menjadi fermentasi asam laktat/ asam susu dan fermentasi alkohol.

a. Fermentasi Asam Laktat

Yaitu fermentasi yang hasil akhirnya berupa asam laktat. Peristiwa ini dapat terjadi di otot dalam kondisi anaerob.

b. Fermentasi alcohol

Merupakan suatu reaksi pengubahan glukosa menjadi etanol (etil alkohol) dan karbondioksida. Organisme yang berperan yaitu *Saccharomyces cerevisiae* (ragi) untuk pembuatan tape, roti atau minuman keras.

c. Fermentasi asam cuka

Merupakan suatu contoh fermentasi yang berlangsung dalam keadaan aerob. Fermentasi ini dilakukan oleh bakteri asam cuka (*Acetobacter Aceti*) dengan substrat etanol. Energi yang dihasilkan 5 kali lebih besar dari energi yang dihasilkan oleh fermentasi alkohol secara anaerob.

Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Fermentasi Etanol

Etanol merupakan produk metabolisme primer yang proses pembentukannya berlangsung bersamaan dengan fase pertumbuhan yang dihasilkan secara ekstraseluler. Menurut Madigan *et al.*, (2000), hubungan produksi etanol dengan pertumbuhan sel berjalan secara paralel dan berbanding terbalik dengan jumlah gula pada medium. Pembentukan etanol meningkat bersamaan dengan pertumbuhan jumlah sel diiringi dengan penurunan gula akibat penggunaan oleh mikrobial dalam medium fermentasi.

Kuswanto (1994) menjelaskan bahwa dalam proses fermentasi terjadi pengubahan gula menjadi etanol sehingga menyebabkan penurunan gula seiring dengan meningkatnya produksi etanol.

Kondisi fisiologi inokulum, meliputi

- pH,
- suhu,
- faktor tumbuh,
- alkohol.

Kualitas substrat pertumbuhan yang terdiri dari sumber karbon, sumber nitrogen, oksigen, dan CO₂ juga berpengaruh terhadap hasil yang diperoleh serta efisiensi fermentasi. Kondisi fisiologi inokulum tergantung pada faktor-faktor lingkungan, adanya mikrobial kontaminan akan sangat berpengaruh terhadap

produk metabolit yang dihasilkan dan menghambat proses fermentasi (Najafpour *et al.*, 2004).

Untuk fermentasi etanol, mikrobial membutuhkan media dengan suasana pH yang optimal, pengaturan pH dapat dilakukan dengan penambahan asam sulfat jika substratnya alkalis atau dengan natrium bikarbonat jika substratnya asam. Waluyo (2004) menjelaskan, nilai pH medium sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan mikrobial tersebut maksimum sekitar pH 6,5-7,5 dan pH dibawah 5,0 atau diatas 8,5 bakteri tidak dapat tumbuh dengan baik kecuali bakteri asam asetat. Garrity (2005), *Zymomonas mobilis* mampu tumbuh dan melakukan fermentasi dengan baik pada pH 3,85 dan 7,55 sedang dibawah pH 3,05, fermentasi agak terhambat.

Menurut Kosaric (1982), *Saccharomyces cerevisiae* dapat tumbuh dengan baik dan secara efisien melakukan fermentasi etanol pada pH 3-8,5 begitu pula dengan *Rhizopus oryzae* memiliki pH optimal adalah 2,5-7. Suhu merupakan salah satu faktor yang sangat mempengaruhi pertumbuhan, perbanyakan, dan daya tahan hidup jasad renik, sehingga dibutuhkan suhu yang optimal untuk dapat digunakan dalam fermentasi etanol.

Masing-masing mikrobial memiliki suhu optimal, minimum dan maksimum untuk pertumbuhannya maupun untuk memproduksi metabolit. Hal ini disebabkan apabila suhu dibawah minimum dan diatas maksimum aktivitas enzim akan berhenti bahkan pada suhu yang terlalu tinggi akan menyebabkan terjadinya denaturasi enzim (Waluyo, 2004). Pertumbuhan terbaik *Zymomonas mobilis* pada medium fermentasi yaitu pada suhu 25°C dan 30°C. Namun umumnya proses fermentasi dilakukan pada suhu 10-30°C (Rahayu, 1991). Untuk *Rhizopus oryzae* dan *Saccharomyces cerevisiae* memiliki suhu pertumbuhan optimum yang sama yaitu $\pm 30^{\circ}\text{C}$ (Rahmi, 2008).

Faktor pertumbuhan adalah senyawa-senyawa organik yang sangat dibutuhkan oleh jasad renik, tidak dapat disintesis oleh sel itu sendiri, dan dibutuhkan dalam jumlah sedikit. Senyawa-senyawa organik yang berfungsi sebagai faktor pertumbuhan dapat digolongkan dalam tiga golongan yaitu : asam amino, purin, pirimidin, dan vitamin. Fungsi dalam faktor tumbuh adalah sebagai

koenzim, atau prekursor enzim atau senyawa lain yang penting dalam metabolisme.

Kualitas substrat pertumbuhan yang terdiri dari sumber karbon, nitrogen, oksigen dan CO₂. Kebutuhan jasad renik akan karbon dapat dibagi dalam dua golongan, yaitu : karbon anorganik (misalnya karbondioksida dan karbonat) dan karbon organik contoh sumber C adalah sukrosa. Senyawa-senyawa karbon umumnya berfungsi sebagai sumber energi. Sumber nitrogen diperlukan dalam jumlah besar, kira-kira 10-15 % dari berat kering sel mikrobia, senyawa nitrogen organik yang biasanya digunakan adalah asam amino dan protein, contoh sumber N adalah ekstrak taoge, ekstrak sawi dan air kelapa.

Pada umumnya fermentasi alkohol berlangsung secara anaerobik (tanpa udara). Namun demikian O₂ diperlukan pada proses pembibitan sebelum fermentasi untuk perkembangbiakan mikrobia aerob.

Produksi etanol metabolit primer dipengaruhi oleh pertumbuhan sel mikrobia yang digunakan. Nutrien digunakan untuk kehidupan dan pertumbuhan sel termasuk faktor pertumbuhan seperti vitamin dan mineral. Nutrien dibutuhkan untuk membentuk energi dan menyusun komponen-komponen sel. Komponen organik yang mengandung sumber karbon digunakan sebagai sumber energi bagi mikrobia dan kebanyakan menggunakan komponen organik yang mengandung protein sebagai sumber nitrogen maupun sumber nitrogen organik (Waluyo,2004).

2.8 *Saccharomyces cerevisiae*

Nama ilmiah *Saccharomyces cerevisiae* berarti jamur yang melakukan fermentasi gula pada sereal (*Saccharo-mocus cerevisiae*) untuk menghasilkan alkohol dan karbon dioksida (Anonim, 2002).

Saccharomyces cerevisiae merupakan salah satu jenis khamir. Khamir adalah fungi uniseluler yang eukariotik. Sel khamir yang termasuk jenis *Saccharomyces* berbentuk bulat, oval atau memanjang dan dapat membentuk pseudomiselium. Sel *Saccharomyces cerevisiae* berukuran $(3-10) \times (4,5-21) \mu\text{m}$.

Reproduksi *Saccharomyces* dilakukan dengan membentuk tunas dan spora seksual (Fardiaz, 1992; Jutono dkk., 1980). Khamir dan bakteri telah digunakan

untuk produksi etanol. Bakteri yang paling banyak digunakan adalah *Zymomonas mobilis*. Khamir yang umum digunakan adalah *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvarum* (Carlsbergensis), *Schizosacchanomyces pombe* dan *Kluyveromyces fragilis* (Crueger and Crueger, 1990). Menurut Anonim (2008c) Klasifikasi *Saccharomyces cerevisiae* adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Fungi
Division	: Ascomycota
Subdivision	: <i>Saccharomycetes</i>
Ordo	: <i>Saccaromycetales</i>
Familia	: <i>Saccharomycetaceae</i>
Genus	: <i>Saccharomyces</i>
Spesies	: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* dipengaruhi oleh kondisi lingkungan sebagai tempat tumbuhnya, berupa temperatur, pH dan medium.

Strain mesofilik *Saccharomyces* dapat tumbuh secara optimum pada temperature 28-35°C (Atkinson & Mavituno, 1991). Khamir pada umumnya dapat tumbuh dan secara efisien melakukan fermentasi etanol pada pH 3-8,5 dan bersifat fakultatif aerobik (Kosaric *et al*, 1983). *Saccharomyces cerevisiae* memiliki kemampuan untuk menggunakan berbagai jenis gula yaitu : glukosa, fruktosa, galaktosa, sukrosa, maltosa, manosa, rafinosa, treholusa, dan malfotriosa (Kosaric *et al.*, 1982).

Gula dalam medium yang masih dalam bentuk sukrosa dihidrolisis terlebih dahulu oleh enzim invertase menjadi glukosa dan fruktosa. *Saccharomyces cerevisiae* dapat menghasilkan invertase. Selanjutnya glukosa dan fruktosa masuk dalam sel melalui difusi dengan perantara dan transport aktif (Kosaric *et al.*, 1982). Setelah itu glukosa akan difermentasi oleh *Saccharomyces cerevisiae* menjadi etil alkohol melalui jalur *Embden–Meyerhof*. Khamir *Saccharomyces cerevisiae* menggunakan jalur *Embden–Meyerhof* dalam memfermentasi glukosa menjadi etanol pada kondisi netral atau sedikit asam dan dalam kondisi anaerob (Purwoko, 2007).

Jalur *Embden – Meyerhof* (EMP) dibagi menjadi 3 tahapan utama, yaitu:

- Tahap I merupakan tahap perubahan glukosa C6 menjadi 2 molekul gliseraldehid-3-fosfat (C3) menggunakan ATP.
- Tahap II terjadi reaksi oksidasi-reduksi dan pelepasan energy. Energi yang dihasilkan berupa ATP. Piruvat sebanyak 2 molekul juga dihasilkan dalam tahap ini.
- Tahap III merupakan tahap terjadinya reaksi oksidasi-reduksi yang ke-2 dan pembentukan produk fermentasi (Madigan *et al.*, 2000). Etanol yang dihasilkan pada tahap III bersifat ekstraseluler karena dikeluarkan dari sel melalui membrane sel (Guarzoni *et al.*, 1997).



Gambar 7. Jalur *Embden-Meyerhof* (Sumber: Madigan *et al.*, 2000)

2.9 Distilasi

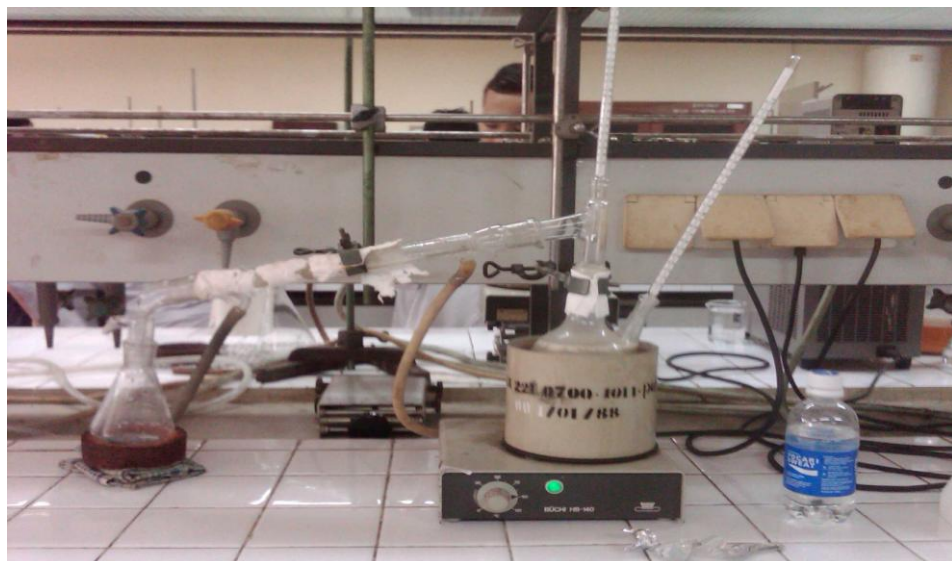
Distilasi atau penyulingan adalah suatu metode pemisahan bahan kimia berdasarkan perbedaan kecepatan atau kemudahan menguap (volatilitas) bahan. Dalam penyulingan, campuran zat dididihkan sehingga menguap, dan uap

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.

Kolom distilasi adalah sarana melaksanakan operasi pemisahan komponen-komponen dari campuran fasa cair, khususnya yang mempunyai perbedaan titik didih dan tekanan uap yang cukup besar.

Perbedaan tekanan uap tersebut akan menyebabkan fasa uap yang ada dalam kesetimbangan dengan fasa cairnya mempunyai komposisi yang perbedaannya cukup signifikan. Fasa uap mengandung lebih banyak komponen yang memiliki tekanan uap rendah, sedangkan fasa cair lebih banyak mengandung komponen yang memiliki tekanan uap tinggi.



Gambar 8. Peralatan distilasi

Kolom distilasi dapat berfungsi sebagai sarana pemisahan karena system perangkat sebuah kolom distilasi memiliki bagian-bagian proses yang memiliki fungsi-fungsi:

1. menguapkan campuran fasa cair (terjadi di *reboiler*)
2. mempertemukan fasa cair dan fasa uap yang berbeda komposisinya (terjadi di kolom distilasi)
3. mengondensasikan fasa uap (terjadi di kondensor)

Konsep pemisahan dengan cara distilasi merupakan sintesa pengetahuan dan peristiwa-peristiwa:

1. Keseimbangan fasa
2. Perpindahan massa
3. Perpindahan panas
4. Perubahan fasa akibat pemanasan (penguapan)
5. Perpindahan momentum

2.10 Kromatografi Gas

Kromatografi Gas (Gambar 9) adalah teknik kromatografi yang bisa digunakan untuk memisahkan senyawa organik yang mudah menguap. Senyawa-senyawa tersebut harus mudah menguap dan stabil pada temperatur pengujian, utamanya dari 50 – 300°C. Jika senyawa tidak mudah menguap atau tidak stabil pada temperatur pengujian, maka senyawa tersebut bisa diderivatisasi agar dapat dianalisis dengan kromatografi gas (*Mardoni , 2005*).



Gambar 9. Kromatografi Gas

Sumber : Laboraturium Kimia Analitik Instrumen Polsri, 2014

Dalam kromatografi gas atau KG, fase gerak berupa gas lembam seperti helium, nitrogen, argon bahkan hidrogen digerakkan dengan tekanan melalui pipa yang berisi fase diam (Mardoni, 2005). Tekanan uap atau keatsirian memungkinkan komponen menguap dan bergerak bersama-sama dengan fase gerak yang berupa gas. Kromatografi gas merupakan metode yang sangat tepat dan cepat untuk memisahkan campuran yang sangat rumit. Komponen campuran dapat diidentifikasi dengan menggunakan waktuambat (waktu retensi) yang khas pada kondisi yang tepat. Waktuambat ialah waktu yang menunjukkan berapa lama suatu senyawa tertahan dalam kolom.

Waktu retensi (t_R) adalah perbedaan waktu antara penyuntikan komponen sampel dengan puncak maksimum yang tercatat pada kromatogram. Volume retensi (v_R) adalah produk dari waktu retensi dan kecepatan aliran gas pengemban. Umumnya, waktu retensi yang sudah disetel (t'_R) dan volume retensi yang sudah disetel (v'_R), dan retensi relatif ($T_{A/B}$) digunakan untuk analisis kualitatif.

Waktu retensi atau volume retensi yang sudah disetel adalah perbedaan antara waktu retensi atau volume retensi dari sampel dengan suatu komponen yang inert, biasanya udara. Retensi relatif adalah rasio dari waktu retensi atau volume retensi yang disetel dari standar dengan waktu retensi atau volume retensi yang disetel dari komponen sampel. Sistem peralatan dari kromatografi gas terdiri dari 6 bagian utama. Diantaranya :

- | | |
|--|------------------------|
| 1. Tabung gas pembawa | 4. Detektor |
| 2. Pengontrolan aliran dan regulator tekanan | 5. Rekorder (pencatat) |
| 3. Injection port (tempat injeksi cuplikan) | 6. Kolom |

Cara pemisahan dari sistem ini sangat sederhana sekali, cuplikan yang akan dipisahkan diinjeksikan kedalam injektor, aliran gas pembawa yang inert akan membawa uap cuplikan kedalam kolom. Kolom akan memisahkan komponen-komponen cuplikan tersebut. Komponen-komponen yang telah terpisah tadi dapat dideteksi oleh detektor sehingga memberikan sinyal yang kemudian dicatat pada rekorder dan berupa puncak-puncak (kromatogram).

a. Gas Pembawa

Gas pembawa ditempatkan dalam tabung bertekanan tinggi. Untuk memperkecil tekanan tersebut agar memenuhi kondisi pemisahan maka digunakan *drager* yang dapat mengurangi tekanan dan mengalirkan gas dengan laju tetap. Aliran gas akan mengelusi komponen-komponen dengan waktu yang karakteristik terhadap komponen tersebut (waktu retensi). Karena kecepatan gas tetap maka komponen juga mempunyai volume yang karakteristik untuk gas pembawa (volume retensi). Adapun persyaratan-persyaratan yang harus dipenuhi oleh gas pembawa adalah :

- Inert, agar tidak terjadi interaksi dengan pelarut.
- Murni, mudah didapat dan murah harganya.
- Dapat mengurangi difusi dari gas
- Cocok untuk detektor yang digunakan.

b. Tempat Injeksi

Sebelum memasuki kolom maka ia harus dirubah menjadi uap dan ini dilakukan pada tempat injeksi. Suhu pada tempat injeksi ini haruslah $\pm 50^{\circ}\text{C}$ diatas titik didih tertinggi yang ada dalam campuran cuplikan dan tidak boleh terlalu tinggi karena kemungkinan dapat mengurai senyawa yang akan dianalisa.

c. Kolom

Ada 2 jenis kolom yang digunakan dalam kromatografi gas secara umum, yaitu kolom jejal (*packed columns*) dan kolom tubuler terbuka (*open tubulas columns*). kolom jejal (*packed columns*) adalah kolom metal atau gelas yang diisi bahan pengepak terdiri dari penunjang padatan yang dilapisi fase cair yang tidak menguap (untuk kromatografi gas-padatan). Kolom tubuler terbuka sangat berbeda dengan kolom jejal, yaitu gas yang mengalir sepanjang kolom tidak mengalami hambatan, karena kolomnya merupakan tabung tanpa bahan pengisi.

Kolom jejal umumnya mempunyai panjang yang berkisar antara 0,7 sampai 2 meter, sedangkan kolom tubuler terbuka dapat mempunyai panjang dari 30 sampai

300 meter. Kolom yang panjang ini biasanya dibuat dalam bentuk melilit bergulung seperti spiral.

Kemampuan memisahkan komponen per meter kolom pada kolom tubuler terbuka tidak jauh berbeda dengan pemisahan pada kolom jejil. Meskipun demikian, penggunaan kolom yang sangat panjang bersama-sama dengan waktu analisis yang relatif cepat merupakan alat penolong yang berharga bagi para ahli kimia untuk dapat memisahkan komponen-komponen yang perbedaannya kecil didalam sifat-sifat fisiknya. Ada 2 jenis kolom tubuler terbuka, yaitu WCOT (*Wall Coated Open Tubular Columns*) dan SCOT (*Support Coated Open Tubular Columns*).

d. Detektor

Detektor dapat menunjukkan adanya sejumlah komponen didalam aliran gas pembawa serta sejumlah dari komponen-komponen tersebut. Detektor yang diinginkan adalah detektor yang mempunyai sensitifitas yang tinggi, noisennya rendah, responnya linear, dapat memberikan respon dengan setiap senyawa, tidak sensitif terhadap perubahan temperatur dan kecepatan aliran dan juga tidak mahal harganya.

e. Rekorder (Pencatat)

Rekorder jenis potensiometer yang dipergunakan dalam kromatografi gas adalah *servo-operated voltage balancing device*. Adapun keunggulan dari kromatografi gas-cair (GLC) yaitu :

1. Kecepatan

- a. Gas yang merupakan fasa bergerak sangat cepat mengadakan kesetimbangan antara fasa bergerak dengan fasa diam.
- b. Kecepatan gas yang tinggi dapat juga digunakan

2. Sederhana

Alat GLC relatif sangat mudah dioperasikan. Interpretasi langsung dari data yang diperoleh dapat dikerjakan. Harga dari alat GLC relatif murah. Alat GLC dapat dipakai dalam waktu yang lama dan berulang-ulang.

3. Sensitif

GLC sangat sensitif. Alat yang paling sederhana dapat mendeteksi konsentrasi dalam ukuran 0,01% (100 ppm).

4. Pemisahan

Dengan GLC memungkinkan untuk memisahkan molekul-molekul dari suatu campuran, di mana hal ini tidak mungkin dipisahkan dengan cara-cara yang lain.

5. Analisa, dapat digunakan sebagai :

- a. Analisa kualitatif yaitu dengan membandingkan waktu retensi.
- b. Analisa kuantitatif yaitu dengan perhitungan luas puncak.

2.11 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 faktor-faktor proses oksidasi dan suhu. Alat yang digunakan untuk menentukan Indeks Bias adalah Refraktometer.



Gambar 10. Refraktometer