

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Definisi dan Manfaat Bioetanol

Bioetanol merupakan cairan hasil proses fermentasi gula dari sumber karbohidrat (selulosa) menggunakan bantuan mikroba. Produksi bioetanol dari tanaman yang mengandung selulosa, dilakukan melalui proses konversi lignoselulosa menjadi selulosa dengan beberapa metode diantaranya dengan hidrolisis fisik, kimia, dan biologi (Khairani, 2007). Bioetanol merupakan bahan bakar alternatif yang memiliki keunggulan mampu menurunkan emisi CO₂ hingga 18 %.

Bioetanol memiliki karakteristik mudah menguap, mudah terbakar, larut dalam air, tidak karsinogenik, dan tidak berdampak negatif pada lingkungan. Bioetanol mempunyai manfaat untuk dikonsumsi manusia sebagai minuman beralkohol. Selain itu, bioetanol dapat dimanfaatkan sebagai bahan bakar dengan kandungan minimal 10 % etanol (Seftian dkk., 2012). Biaya produksi bioetanol tergolong murah karena sumber bahan baku berasal dari limbah pertanian yang memiliki nilai ekonomis yang rendah (Novia dkk., 2014).

B. Definisi, Bahan Baku, dan Proses Fermentasi

Fermentasi adalah proses penguraian senyawa organik yang berfungsi untuk menghasilkan energi serta terjadinya proses perubahan substrat atau bahan baku menjadi sebuah produk oleh mikroba dalam kondisi anaerob (Madigan dkk., 2008). Fermentasi merupakan penerapan metabolisme mikroba

untuk mengubah bahan baku menjadi produk yang bernilai tinggi, seperti asam organik, protein sel tunggal, antibiotika, dan biopolimer (Tarigan, 1988). Fermentasi telah lama dilakukan oleh nenek moyang kita secara tradisional dengan produk yang biasa dikonsumsi manusia sampai sekarang, seperti tape, tuak, *wine*, tempe, dan oncom (Nurhayani dkk., 2000).

Fermentasi anaerob merupakan fermentasi yang tidak membutuhkan oksigen tetapi bahan lain akan bertindak sebagai akseptor, misalnya *aldehyde* atau asam karboksilat. Mikroba yang melakukan fermentasi ini adalah *yeast* (ragi) terutama dari *Saccharomyces* sp., beberapa jamur dan bakteri (Tarigan, 1988). Proses fermentasi alkohol hanya dapat terjadi apabila terdapat sel-sel khamir. Bahan baku untuk proses fermentasi berupa bahan mentah seperti monosakarida atau disakarida (gula tebu, tetes tebu), bahan berpati (padi, jagung, umbi, dll), dan bahan selulosa (kayu, limbah pertanian) (Anshori, 1985).

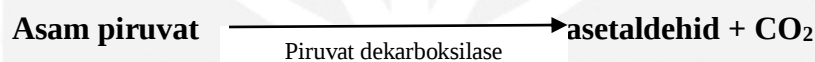
Proses fermentasi etanol dapat dilakukan secara *batch*. Fermentasi secara *batch* membutuhkan waktu sekitar 50 jam, pH awal 4,5 dan suhu 20-30 °C untuk menghasilkan *yield* etanol 90 % dari nilai gula teoritis (Anshori, 1985). Pada fermentasi secara proses *batch* tidak dilakukan penambahan substrat maupun nutrisi sehingga semakin lama waktu fermentasi maka produktivitas etanol semakin berkurang serta adanya akumulasi produk etanol yang dapat mengganggu pertumbuhan mikroba (Tarigan, 1988).

Keberadaan oksigen dalam fermentasi akan menghambat jalur fermentasi di dalam sel khamir sehingga sumber karbon yang ada akan

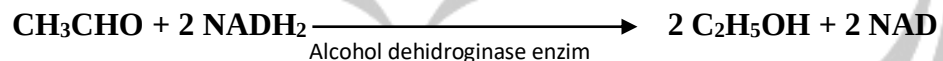
digunakan melalui jalur respirasi (*Pasteur effect*), namun *Pasteur effect* pada sel khamir dapat diamati pada fase *stationer*, sedangkan produksi alkohol terjadi ketika sel berada pada fase pertumbuhan (fase *log*) (Pelczar dan Chan, 1986). Menurut Widiastuti dan Pramesti (2011), pada saat fermentasi alkohol dalam kondisi anaerob satu molekul glukosa dapat menghasilkan 2 molekul ATP. Jalur biokimia bervariasi tergantung jenis gula yang digunakan akan tetapi biasanya melibatkan jalur glikolisis yang merupakan bagian awal dari tahap respirasi aerobik pada sebagian besar organisme. Reaksi yang terjadi sebagai berikut:

1. Gula ($C_6H_{12}O_6$) $\rightarrow$ asam piruvat (glikolisis)

2. Dekarboksilasi asam piruvat.



3. Asetaldehid oleh alkohol dihidrogenasi diubah menjadi ethanol.



Sumber: Widiastuti dan Pramesti (2011)

C. Deskripsi, Morfologi, dan Kandungan Nanas

Menurut Kwartiningsih dkk. (2005), klasifikasi tanaman nanas adalah sebagai berikut:

Kingdom : Plantae
 Divisio : Spermatofita
 Kelas : Monocotyledonae
 Ordo : Farinosae
 Famili : Bromeliaceae
 Genus : *Ananas*
 Spesies : *Ananas comosus* (L.) Merr

Nanas (*Ananas comosus*) merupakan anggota dari famili

Bromeliaceae dan terdiri dari sekitar 200 species dengan produksi tahunan di

seluruh dunia lebih dari 14 juta ton (Brat dkk., 2004). Buah nanas berasal dari Brazil dan telah tersebar ke berbagai negara tropis dan subtropis di seluruh dunia (Dhar dkk., 2008). Limbah pertanian merupakan sumber energi terbarukan dan dapat dimanfaatkan karena memiliki karakteristik tidak beracun, terdapat dalam jumlah besar, murah dan mampu mendukung pertumbuhan produksi biomassa (Dhanasekaran dkk., 2011).

Pabrik pengalengan nanas hampir 67 % dari buah yang terdiri dari 41 % kulit, 6 % jonggol atau inti, 20 % mahkota tidak dimanfaatkan dan dibuang sebagai limbah yang menyebabkan pencemaran lingkungan. Kandungan bahan kering dari nanas sekitar 10 % terdiri dari 96 % bahan organik dan 4 % bahan anorganik (Abdullah, 2007). Limbah nanas mengandung bahan organik dengan konsentrasi 96 % dan padatan tersuspensi. Selain dampak negatif yang ditimbulkan dari limbah nanas, terdapat potensi untuk didaur ulang menjadi bahan baku yang dikonversi menjadi produk selai, jus, kripik dan bioetanol (Abdullah, 2007).

Kulit nanas mengandung 81,72 % air, 20,87 % serat kasar, 17,53 % karbohidrat, 4,41 protein, dan 13,65 % gula reduksi (Wijana dkk., 1991). Kandungan selulosa pada kulit nanas sebesar 19,8 % dan hemiselulosa 11,87 % (Bardiya dkk., 1996). Berdasarkan kandungan karbohidrat dan gula pada kulit nanas yang cukup tinggi maka kulit nanas berpotensi sebagai bahan baku pembuatan bioetanol. Karakteristik limbah kulit nanas dapat dilihat pada Tabel 1.

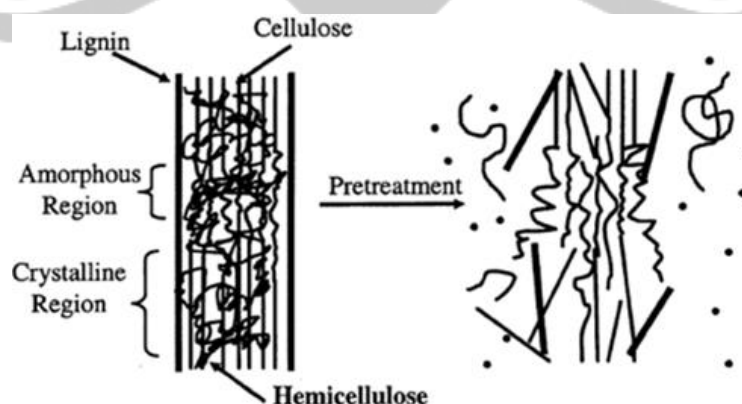
Tabel 1. Karakteristik limbah kulit nanas

Parameter	Konsentrasi (g/L)
Gula reduksi	53,4
Gula total	79,1
Kjeldahl nitrogen	0,224
pH	4,5

Sumber: Paramashinta dan Abdullah (2014).

D. Hidrolisis Lignoselulosa

Bahan lignoselulosa dapat diperoleh dari jerami padi, rumput, limbah pertanian seperti kulit nanas dan bonggol jagung. Lignoselulosa memiliki komponen polimer selulosa, hemiselulosa dan lignin. Proses hidrolisis diperlukan untuk melepas selulosa dan hemiselulosa dari ikatan kompleks lignin dan depolimerisasi untuk mendapatkan gula bebas (Anindyawati, 2010). Tahap hidrolisis merupakan tahap senyawa-senyawa kompleks diuraikan menjadi senyawa yang lebih sederhana seperti senyawa asam organik, glukosa, dan hidrokarbon, kemudian senyawa-senyawa tersebut akan digunakan sebagai sumber karbon dan energi oleh mikroba fermentasi (Fernandes dkk., 2008). Efek dari Hidrolisis Lignoselulosa untuk melepas komponen selulosa dan hemiselulosa dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Efek dari Hidrolisis Lignoselulosa untuk melepas komponen selulosa dan hemiselulosa

Sumber: Mosier dkk. (2005).

Proses hidrolisis lignoselulosa memiliki fungsi dalam proses konversi selulosa yaitu untuk memisahkan selulosa dari ikatan lignin-hemiselulosa dan mengurangi kristal selulosa (Balan dkk., 2009). Metode hidrolisis lignoselulosa dapat dilakukan secara fisika (pencacahan, penggilingan), fisiko-kimia (*steam explosion*, *ammonia fiber explosion*), kimia (*alkaline pretreatment*, ozonolisis, hidrolisis asam, dan delignifikasi oksidatif), dan metode hidrolisis biologi (enzim selulase) (Khairani, 2007). Beberapa metode hidrolisis untuk bahan lignoselulosa dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Metode Hidrolisis untuk Bahan Lignoselulosa

Metode	Contoh
Mekanik panas	Digerus, digiling, digunting
<i>Autohydrolysis</i>	Tekanan uap, letusan uap, <i>carbon dioxide explosion</i>
Perlakuan asam	Asam sulfat dan asam klorida encer, asam sulfat dan asam klorida pekat
Perlakuan alkali	Sodium hidroksida, amonia, alkali hidrogen peroksida
Perlakuan larutan organik	Metanol, etanol, butanol, phenol

Sumber: Saha (2003).

Alkaline pretreatment memiliki kelebihan dibandingkan teknik hidrolisis fisik dan biologi yaitu mampu menghilangkan lignin sebesar 77,3 % dengan menggunakan NaOH 2 % pada suhu 121 °C dan tekanan 1 atm selama 90 menit (Mcintosh dan Vancov, 2010). Pada penelitian Harun dkk. (2010), *alkaline pretreatment* untuk memproduksi bioetanol dari mikroalga. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *yield* glukosa tertinggi diperoleh sebesar 350 mg/g alga dan etanol tertinggi sebesar 0,2 g etanol/ g alga pada saat penggunaan NaOH 0,75 % dengan suhu 120 °C dan tekanan 1 atm selama 50 menit (Harun dkk., 2010).

E. Fermentasi Produk oleh *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae termasuk dalam filum Ascomycota. Secara aseksual, khamir dalam kelas ini memperbanyak diri melalui aseksual dengan pembentukan konidium dalam jumlah besar (Pelczar dan Chan, 1986). Ukuran khamir ini dapat mencapai 5 – 10 μm (diameter), berbentuk bulat atau oval, memiliki spora bulat lonjong, permukaan halus, elevasi konveks, volume sel rata-rata 29 hingga 55 μm^3 dan berwarna putih atau krem (Madigan dkk., 2008).

Saccharomyces cerevisiae sangat bermanfaat bagi manusia sebagai agen sediaan hayati dalam industri pembuatan keju, roti, dan minuman berakohol (Pelczar dan Chan, 1986). *Saccharomyces cerevisiae* telah lama digunakan dalam industri alkohol karena dapat melakukan fermentasi glukosa menjadi etanol. Proses fermentasi dalam *Saccharomyces cerevisiae* berlangsung dalam keadaan anaerob. Fermentasi etanol oleh *Saccharomyces cerevisiae* akan berlangsung secara optimal pada temperatur 32 °C dengan pH 4,5 (Winarno dan Fardiaz, 1979).

Spesies ragi yang mempunyai daya konversi gula menjadi etanol yang tinggi adalah *Saccharomyces cerevisiae*, khamir (*yeast*) ini dapat menghasilkan enzim hidrolase dan enzim invertase. Enzim hidrolase pada *Saccharomyces cerevisiae* berfungsi sebagai pemecah sukrosa (disakarida) menjadi glukosa (monosakarida) dan enzim invertase pada *Saccharomyces cerevisiae* yang berfungsi mengubah glukosa menjadi etanol. *Saccharomyces cerevisiae* banyak digunakan dalam fermentasi etanol (Muhiddin dan Nurhayati, 2001).

Menurut Darwis dan Aziz (1995), produk fermentasi yang terbentuk tergantung kepada berbagai faktor lain, antara lain:

1. Jenis dan konsentrasi ragi

Pemilihan mikroba ini biasanya didasarkan pada jenis karbohidrat yang digunakan sebagai medium. Pada pembuatan alkohol dari gula digunakan *Saccharomyces cereviceae*. Selain itu dapat juga digunakan *Saccharomyces ellipsoidea*. Konsentrasi optimum adalah 1–5 %.

2. Lama fermentasi

Lama fermentasi tergantung pada jenis karbohidrat yang digunakan serta raginya. Pada umumnya membutuhkan waktu 20 hari untuk memperoleh fermentasi yang sempurna (karbohidrat yang di fermentasi terkonversi secara maksimal)

3. Temperatur

Kecepatan reaksi kimia umumnya akan bertambah jika terjadi kenaikan temperatur. Tetapi untuk reaksi enzimatis hal ini tidak berlaku. Suhu optimum proses fermentasi antara 19 – 29 °C, pada interval suhu tersebut aktivitas khamir akan optimum.

4. pH

Keasaman yang optimum untuk pertumbuhan sel khamir adalah pH 4 sampai dengan 4,5, karena pada interval tersebut pertumbuhan bakteri pembusuk (Bakteri Asam Laktat) terhambat.

5. Konsentrasi substrat

Sumber karbon yang biasanya dipakai adalah gula dengan konsentrasi 15 sampai 30 %. Konsentrasi gula yang optimum untuk permulaan fermentasi adalah 16 %. Hal ini bertujuan untuk mempercepat pertumbuhan khamir. Apabila gula di dalam ekstrak sudah habis, dapat ditambahkan lagi gula untuk memperoleh kandungan etanol yang besar.

6. Oksigen

Kebutuhan oksigen hanya pada saat awal fermentasi dan ini sudah cukup dengan oksigen terlarut dan yang ada pada permukaan. Penggunaan oksigen ini untuk merangsang pertumbuhan khamir, meningkatkan jumlah sel khamir dan memungkinkan metabolisme maltosa. Keadaan dalam fermentor bertahap menjadi anaerobik dan fermentasi alkohol mulai terjadi.

7. Umur Khamir

Semakin tua umur sel khamir maka kemampuan khamir dalam memfermentasi etanol semakin menurun.

F. Deskripsi dan Jenis Metode Imobilisasi sel

Imobilisasi sel merupakan suatu proses untuk menghentikan pergerakan dari molekul enzim atau sel ditahan pada tempat tertentu dalam suatu ruang reaksi yang digunakan sebagai katalis (Darmawan dkk., 2010). Sel khamir imobil yang digunakan secara berulang akan mempengaruhi kadar etanol yang dihasilkan (semakin menurun) karena sel khamir imobil semakin menua sehingga kemampuan fermentasi etanol berkurang (Darwis dan Aziz, 1995).

Teknik imobilisasi sel dapat dilakukan dengan tiga cara, yaitu ikatan dengan *carrier*, ikatan silang, dan metode penjemputan (Grote dkk., 1980). Metode penjemputan dapat dilakukan dalam matrik polimer. Matrik polimer yang dapat digunakan adalah kolagen, gelatin, selulosa triasetat, alginat, agar, poliakrilamid, dan polistiren untuk menghasilkan sel imobil dalam bentuk manik-manik, kubus atau lembaran. Metode penjemputan dengan matrik alginat lebih sering digunakan, karena sederhana dalam pelaksanaannya, dapat mempertahankan viabilitas dan aktivitas sel imobil, tidak beracun serta murah dan mudah didapat (Grote dkk., 1980).

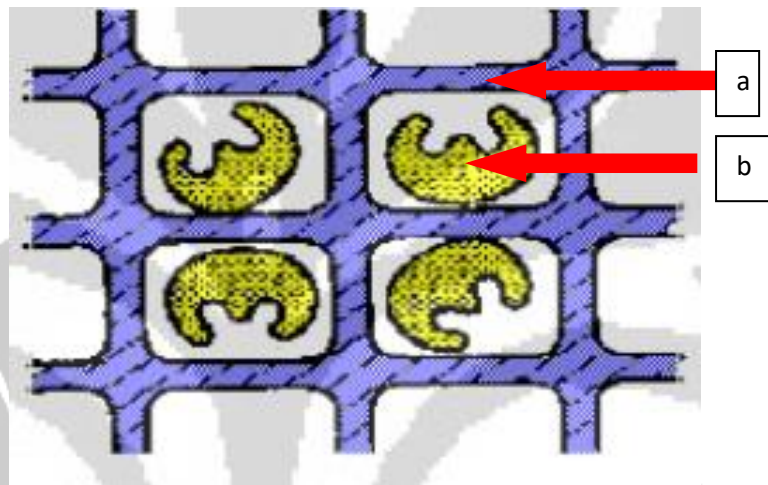
Rakin dkk. (2009) melakukan studi perbandingan antara produksi etanol oleh *Saccharomyces cerevisiae* terimobilisasi pada Ca-alginat dengan produksi etanol oleh *Saccharomyces cerevisiae* terimobilisasi pada *polyvinly alcohol* (PVA). Substrat yang digunakan adalah hidrolisat pati jagung dengan kadar total gula awal sebesar 176 g/L. Hasil studi tersebut menunjukkan bahwa penggunaan *yeast* terimobilisasi pada Ca-alginat mampu menghasilkan etanol dengan konsentrasi mencapai 10,1 % (v/v). Nilai konsentrasi tersebut lebih baik jika dibandingkan dengan penggunaan *yeast* terimobilisasi PVA (Poli Vinil Alkohol) yang hanya mampu menghasilkan etanol berkonsentrasi 7,2 % (v/v) (Rakin dkk., 2009).

Metode ikatan dengan *carrier* yaitu pengikatan sel langsung pada matriks yang tidak larut dalam air dan dapat dibedakan lagi atas tiga macam berdasarkan cara pengikatannya, yaitu adsorpsi fisik, ikatan ionik, dan ikatan kovalen (Muchtadi dkk., 1992). Matriks yang dapat digunakan untuk

imobilisasi dengan sistem ikatan diantaranya polisakarida tidak larut air (selulosa, dekstran, dan turunan agarosa), protein (gelatin dan albumin), polimer sintetik (gel poliakrilamida), bahan organik (gelas berpori, silica, ion metal dan tanah alkali) (Muchtadi dkk., 1992).

Metode ikatan silang didasarkan atas pembentukan ikatan kimia seperti pada metode ikatan kovalen. Imobilisasi sel terjadi melalui komponen multifungsional, sebagai komponen pengikat dapat digunakan gluraldehida dan turunan bis-diazobenzidin. Sel yang diimobilisasi dengan metode ikatan silang sering bersifat gel. Sel dapat diimobilisasi sebagai bagian dari suatu kopolimerisasi dengan anhidrida maleat dan etilen yang sebelumnya telah direaksikan dengan etilen diamin (Palmer, 1991).

Pada penelitian ini menggunakan metode penjebakan dengan matrik alginat karena sederhana dalam pelaksanaannya, dapat mempertahankan viabilitas dan aktivitas sel immobil, tidak beracun serta murah dan mudah didapat (Grote dkk., 1980). Glukosa berdifusi masuk ke dalam gel melalui matriks pori alginat maka dari itu konsentrasi alginat yang tepat dapat mengoptimalkan difusi masuk dan keluarnya glukosa (Widjaja dkk., 2009). Alginat dengan konsentrasi tinggi (7-10%) atau semakin kental dapat menyebabkan difusi glukosa semakin menurun (Beshay, 2003). Matriks pori yang terlalu rapat (konsentrasi alginat tinggi) akan menurunkan efisiensi difusi glukosa karena glukosa yang berukuran 0,8 nm sulit masuk ke dalam gel melalui matriks pori alginat (Goksungur dan Zorlu, 2001). Metode imobilisasi sel dengan Ca-alginat dapat dilihat pada Gambar 2.



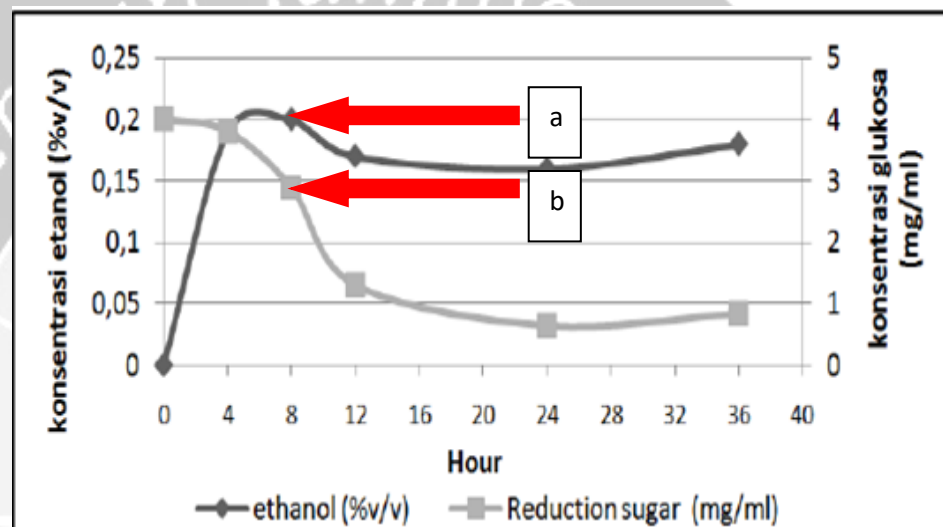
Gambar 2. Metode Imobilisasi Sel dengan Ca-alginat (Ozturk, 2001).
Keterangan: a. Matriks Polimer Ca-alginat b. Sel *Saccharomyces cerevisiae*

G. Analisis Kadar Gula Reduksi

Analisis kadar gula reduksi pada penelitian ini menggunakan metode *Nelson Somogy*. Metode *Nelson Somogy* merupakan uji kuantitatif yang digunakan untuk menentukan kadar gula reduksi dalam sampel dengan menggunakan metode absorbansi dengan alat spektrofotometri (Tranggono, 1984). Uji ini menggunakan reagen *arsenomolibdat* yang terdiri dari *Nelson A* dan *Nelson B*. Glukosa diendapkan dengan ZnSO_4 dan Ba(OH)_2 . Kupri oksida dioksidasi oleh larutan tembaga alkali dengan membentuk kupro oksida (CuO), kemudian kupro oksida dioksidasi kembali dengan asam *arsenomolibdat* yang akan membentuk warna biru (Bintang, 2010).

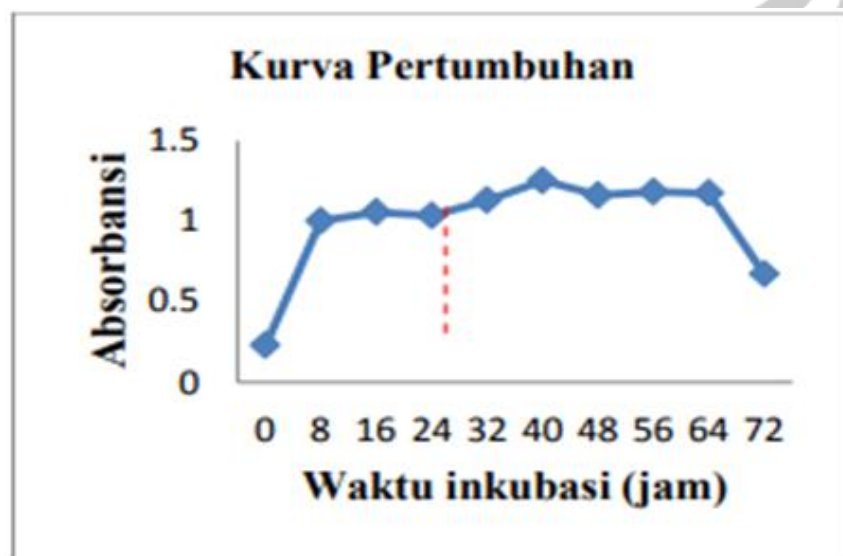
Uji kadar gula reduksi dapat digunakan untuk mengetahui pola pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* (Muhiddin dan Nurhayati, 2001). *Saccharomyces cerevisiae* menggunakan glukosa untuk pertumbuhan dan

produksi etanol. Substrat merupakan bahan baku fermentasi yang mengandung nutrisi yang dibutuhkan oleh *Saccharomyces cerevisiae* untuk tumbuh dan menghasilkan produk fermentasi. Nutrien yang paling dibutuhkan adalah karbohidrat (glukosa) (Azizah dkk., 2012). Grafik konsentrasi gula reduksi dan konsentrasi etanol dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Konsentrasi gula reduksi dan etanol *Saccharomyces cerevisiae* (Ria dkk., 2012)

Keterangan: a. Konsentrasi etanol. b. Konsentrasi gula reduksi



Gambar 4. Kurva pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* (Brooks dkk., 2005)

Pada Gambar 3 menunjukkan jam ke-4 hingga jam ke-12 penurunan kadar gula reduksi signifikan dapat diasumsikan sel *Saccharomyces cerevisiae* sedang bertumbuh (Ria dkk., 2012). Pada jam ke-12 hingga jam ke-72 kadar gula reduksi tidak turun terlalu banyak yang dapat diasumsikan sel *Saccharomyces cerevisiae* sedang melakukan fermentasi etanol (Ria dkk., 2012). Pada Gambar 4 fase log terjadi pada 12 jam awal kemudian dilanjutkan dengan fase stasioner pada jam pengamatan berikutnya hingga dari jam ke-64 sampai jam ke-72 menandakan fase kematian bagi *Saccharomyces cerevisiae* (Brooks dkk., 2005).

H. Hipotesis

Berdasarkan landasan teori, rumusan masalah, dan tujuan, maka dapat diajukan hipotesis sebagai berikut :

1. Kadar etanol yang dihasilkan pada fermentasi substrat filtrat kulit nanas dengan teknik imobilisasi Ca-alginat pada pengulangan pertama sebesar 9 %, dan pada pengulangan ketiga sebesar 7 %.
2. Penggunaan sel imobil *Saccharomyces cereviceae* dapat dilakukan secara berulang lebih dari 2 kali dalam fermentasi substrat filtrat kulit nanas.