

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Durian dan Biji Durian

Durian (*Durio zibethinus* Murr.) adalah termasuk dalam suku Bombacaceae yang hanya terdapat pada daerah tropis. Di Indonesia durian merupakan buah yang amat populer, bahkan di luar negeri terkenal dengan sebutan “*The King of Fruits*” atau “Raja Buah”. Tiap pohonnya dapat menghasilkan 80 sampai 100 buah, bahkan hingga 200 buah terutama pada pohon yang tua. Tiap rongga buah terdapat 2 sampai 6 biji atau lebih. Buah durian berbentuk kapsul yang bulat, bulat telur atau lonjong, berukuran panjang mencapai 25 cm, berwarna hijau sampai kecoklatan, tertutup oleh duri-duri yang berbentuk piramid lebar, tajam dan panjang 1 cm (Rukmana,1996). Menurut Heyne (1987), klasifikasi Durian, yaitu:

Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Bangsa	: Malvales
Suku	: Bombacaceae
Marga	: Durio
Jenis	: <i>Durio zibethinus</i> Murr.

Biji durian berbentuk bulat telur, berkeping dua, berwarna putih kekuning-kuningan atau coklat muda seperti terlihat pada Gambar 1. Kandungan patinya cukup tinggi, sehingga berpotensi sebagai alternatif pengganti bahan makanan. Di Indonesia biji durian memang belum memasyarakat untuk digunakan sebagai bahan makanan. Di Thailand biji durian biasa diolah menjadi bubur dengan diberi campuran daging buahnya. Bubur biji durian ini menghasilkan kalori yang cukup potensial bagi manusia. Biasanya biji durian dapat dikonsumsi setelah direbus

atau dibakar, bahkan saat ini biji durian dibuat tepung yang bisa digunakan sebagai bahan baku wajik dan berbagai produk yang lainnya (Rukmana, 1996).



Gambar 1. Biji durian (basah) (Sumber: Bernard, 2009)

Tabel 1. Komposisi Kimia Biji Durian dan Beberapa Sumber Karbohidrat Lain per 100 gram

Komponen	Biji Durian	Biji Nangka	Beras	Jagung	Singkong
Air	51,5 g	57,7%	13,0%	60,0%	62,5%
Lemak	0,4 g	0,1 g	0,7 g	1,3 g	0,3 g
Protein	2,6 g	4,2 g	6,8 g	4,7 g	1,2 g
Karbohidrat	43,6 g	36,7 g	78,9 g	33,1 g	43,7 g
Kalsium	17 mg	33,0 mg	6,0 mg	6,0 mg	33,0 mg
Besi	1 mg	200,0 mg	140,0 mg	118,0 mg	40,0 mg
Fosfor	68 mg	1,0 mg	0,8 mg	0,7 mg	0,7 mg
Vitamin B1	0,05 mg	0,20 mg	0,12 mg	0,12 mg	0,06 mg
Vitamin C	-	10,0 mg	0,0 mg	8,0 mg	30,0 mg

(Sumber: Brown, 1997; Anonymous, 1972)

Komposisi kimia biji durian hampir sama dengan biji-biji yang termasuk suku Bombacaceae yang lain. Kandungan karbohidrat pada biji durian cukup tinggi, yaitu 43,6 g seperti yang tercantum dalam Tabel 1. Kandungan karbohidrat dalam biji durian tersebut lebih tinggi dibanding yang terkandung dalam biji nangka dan jagung, walaupun lebih rendah dibanding beras dan tidak berbeda signifikan dengan singkong. Namun, dapat dilihat kandungan gizi dalam biji durian cukup tinggi dan hampir setara dengan kandungan gizi biji nangka, beras, jagung, dan singkong. Oleh karena itu, biji durian dapat dimanfaatkan sebagai

substrat bagi pertumbuhan kapang dan untuk produksi enzim amilase (Brown, 1997; Anonymous, 1972).

B. Pati Biji Durian

Pati merupakan polisakarida yang banyak ditemukan pada tanaman. Senyawa ini disimpan dalam bentuk granula dengan ukuran dan karakteristik yang spesifik untuk setiap spesies tanaman (van der Maarel dkk., 2002). Pati merupakan polimer yang tersusun dari unit satuan α -D-glukosa yang dihubungkan oleh ikatan α -1,4 glikosidik dan ikatan α -1,6 glikosidik pada percabangan rantainya. Secara alami, pati merupakan campuran dari amilosa dan amilopektin yang keduanya merupakan suatu polimer dari α -D-glukosa. (Kunamneni dkk., 2005; van der Maarel dkk., 2002). Amilosa merupakan suatu polimer rantai tunggal tidak bercabang, terbentuk dari 500-20.000 monomer α -D-glukosa yang dihubungkan oleh ikatan α -1,4 glikosidik (Myers dkk., 2000). Amilopektin merupakan suatu polimer rantai bercabang, terbentuk dari 100.000 monomer glukosa yang dihubungkan oleh ikatan α -1,4 glikosidik pada rantai utama dan α -1,6 glikosidik pada percabangannya (Kunamneni dkk., 2005; Myers dkk., 2000). Pemeriksaan mikroskopik menunjukkan bahwa pati pada tanaman terdapat sebagai granula-granula kecil. Lapisan luar dari setiap granula terdiri atas molekul-molekul pati yang tersusun amat rapat sehingga tidak tertembus air dingin (Gaman dan Sherrington, 1994).

Menurut Gaman dan Sherrington (1994), sifat-sifat pati, yaitu:

1. Keasaman dan kelarutan. Pati berwarna putih, berbentuk serbuk bukan kristal yang tidak larut dalam air dingin.

2. Rasa manis. Tidak seperti monosakarida dan disakarida, pati dan polisakarida lain tidak mempunyai rasa manis.
3. Hidrolisis. Hidrolisis pati dapat dilakukan oleh asam atau enzim. Hidrolisis pati dengan enzim seperti enzim amilase memecah pati menjadi maltosa. Molekul pati mula-mula pecah menjadi unit-unit rangkaian glukosa yang lebih pendek disebut dekstrin. Dekstrin kemudian dipecah menjadi maltosa dan akhirnya maltosa menjadi glukosa.
4. Pengaruh panas. Jika suspensi pati dalam air dipanaskan, air akan menembus lapisan luar granula dan granula akan mulai menggelembung. Hal ini terjadi saat temperatur meningkat dari suhu 60°C sampai 80°C. Granula-granula pati menggelembung atau membesar menyebabkan campuran pati menjadi kental. Pada suhu sekitar 85°C granula pati pecah dan isinya terdispersi merata ke seluruh air di sekelilingnya. Molekul berantai panjang mulai membuka atau terurai dan campuran pati dan air menjadi makin kental membentuk sol. Pada pendinginan, jika perbandingan pati dan air cukup besar, molekul pati membentuk jaringan dengan molekul air terkurung di dalamnya sehingga terbentuk gel. Keseluruhan proses ini disebut gelatinisasi.

Pati biji durian berbentuk sebuk halus dan berwarna putih kecoklatan. Pati biji durian secara mikroskopik berupa butir tunggal, agak bulat atau bersegi banyak. Butir pati kecil berdiameter 8-13 μ m. Hilus terletak di tengah berupa titik dan lamela tidak jelas. Pati biji durian praktis tidak larut dalam air dingin dan dalam etanol. Suhu gelatinasi pati biji durian adalah 91,5°C. Kadar amilosa pati biji durian adalah 38,89%. Kandungan amilosa memengaruhi kekentalan gel

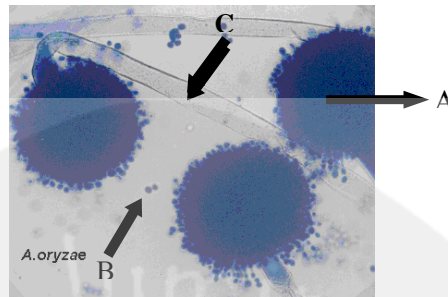
yang terbentuk. Semakin rendah kandungan amilosa, maka kekentalan gel semakin besar (Soebagio dkk., 2004).

C. Morfologi dan Sifat-Sifat *Aspergillus oryzae*

Jamur *Aspergillus oryzae* hidup sebagai saprofit atau parasit dengan masa berbentuk benang atau *filamen*, multiseluler, bercabang-cabang, dan tidak berklorofil. Masing-masing benang disebut hifa, dan kumpulan hifa disebut miselium. Miselium *Aspergillus oryzae* bersekat-sekat. Koloni yang sudah menghasilkan spora warnanya menjadi coklat kekuning-kuningan, kehijau-hijauan, atau kehitam-hitaman, miselium yang semula berwarna putih sudah tidak tampak lagi (Suriawiria, 1986). Menurut Raper dan Fennel (1977), taksonomi jamur *Aspergillus oryzae* yaitu

Divisi	: Eumycophyta
Kelas	: Deuteromycetes
Bangsa	: Moniliales
Suku	: Moniliaceae
Marga	: <i>Aspergillus</i>
Jenis	: <i>Aspergillus oryzae</i>

Perkembangbiakkan secara vegetatif dilakukan dengan konidia, sedangkan pembiakkan secara generatif dilakukan dengan spora yang terbentuk dalam askus. Beberapa askus terdapat di dalam suatu tubuh buah. Pada umumnya *askus* itu suatu ujung hifa yang mengandung 4 atau 8 buah spora. Kegunaan dari jamur *Aspergillus oryzae* adalah dalam pembuatan minuman, etanol, dan kecap (Dwidjoseputro, 1990). Morfologi jamur *Aspergillus oryzae* dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Jamur *Aspergillus oryzae*. A. Kepala Konidia B. Konidia C. Konidiofora (Sumber: Dũng, 2007)

Aspergillus oryzae termasuk kapang berseptata, tidak menghasilkan spora seksual, konidiofor terletak bebas dan tumbuh ireguler, miselium bersih dan tidak berwarna serta bercabang (Frazier dan Westhoff, 1988). Pertumbuhan memerlukan kondisi aerobik, suhu optimum 35-37°C, pH optimum 4-6,5, substrat terutama karbohidrat dan kadar air harus tinggi (Suwaryono dan Ismeini, 1988)

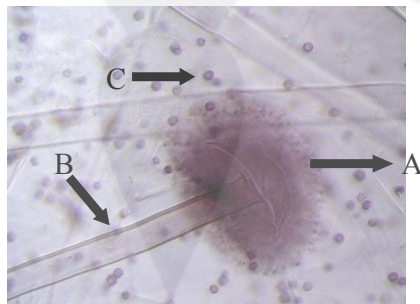
Menurut Crus dan Park (1982), *Aspergillus oryzae* dikenal sebagai jamur yang paling banyak menghasilkan enzim. Jamur ini mempunyai kelebihan dibanding mikrobialia yang lain, antara lain bahwa enzim yang dihasilkan telah dimanfaatkan secara luas pada proses pengolahan pangan dan telah berstatus GRAS (*Generally Recognized as Safe*) dan enzim yang dihasilkan bersifat ekstraselular. Azmi (2006) melaporkan kadar pati biji nangka 2% menghasilkan enzim amilase tertinggi oleh *Aspergillus oryzae*. Rosita (2008) mendapatkan *Aspergillus oryzae* yang ditumbuhkan pada substrat onggok menghasilkan enzim α -amilase dan glukoamilase dengan kadar masing-masing berturut-turut sebesar 385,14 U/ml dan 222,65 U/ml.

D. Morfologi dan Sifat-Sifat *Aspergillus niger*

Aspergillus niger merupakan salah satu spesies yang paling umum dan mudah diidentifikasi dari marga *Aspergillus*. *Aspergillus niger* dapat tumbuh pada suhu 35°C-37°C (optimum), 6°C-8°C (minimum), 45°C-47°C (maksimum) dan memerlukan oksigen yang cukup (aerobik) (Hidayat, 2007).

Aspergillus niger memiliki bulu dasar berwarna putih atau kuning dengan lapisan konidiospora tebal berwarna coklat gelap sampai hitam. Kepala konidia berwarna hitam, bulat, cenderung memisah menjadi bagian-bagian yang lebih longgar dengan bertambahnya umur. Konidiospora memiliki dinding yang halus dan berwarna coklat (Hidayat, 2007). Morfologi jamur *Aspergillus niger* dapat dilihat pada Gambar 3. Sistematika *Aspergillus niger* menurut Raper dan Fennel (1977) adalah sebagai berikut:

Divisi	: Eumycophyta
Kelas	: Deuteromycetes
Bangsa	: Moniliales
Suku	: Moniliaceae
Marga	: <i>Aspergillus</i>
Jenis	: <i>Aspergillus niger</i>



Gambar 3. Jamur *Aspergillus niger*. A. Kepala Konidia B. Konidiofora C. Konidia (Sumber: Guillaume, 2004)

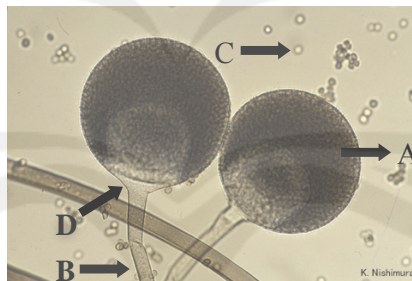
Aspergillus niger dalam pertumbuhannya berhubungan langsung dengan zat makanan yang terdapat dalam substrat, molekul sederhana yang terdapat di sekeliling hifa dapat langsung diserap sedangkan molekul yang lebih kompleks harus dipecah dahulu sebelum diserap ke dalam sel, dengan menghasilkan beberapa enzim ekstraseluler. Bahan organik dari substrat digunakan oleh *Aspergillus niger* untuk aktivitas transport molekul, pemeliharaan struktur sel dan mobilitas sel (Hidayat, 2007). Carlile dan Watkinson (1994) menyebutkan bahwa *Aspergillus niger* bersifat toleran terhadap aktivitas air rendah, mampu tumbuh pada substrat dengan potensial osmotik cukup tinggi dan sporulasi pada kelembaban relatif rendah.

Aspergillus niger dapat tumbuh dengan cepat dan digunakan secara komersial dalam produksi asam sitrat, asam glukonat dan pembuatan beberapa enzim seperti amilase, pektinase, glukoamilase dan selulase (Hidayat, 2007). Kombong (2004) mendapatkan bahwa *Aspergillus niger* yang ditumbuhkan dalam medium pati kentang dan pati jagung dapat menghasilkan glukoamilase dan menghasilkan maltosa. Rosita (2008) melaporkan *Aspergillus niger* menghasilkan enzim α -amilase sebesar 373,14 U/ml dan glukoamilase sebesar 230,79 U/ml.

Purwantari dkk. (2004) menyatakan pH optimum *Aspergillus niger* pada fermentasi tepung ganyong untuk produksi etanol adalah 4,5 dan menghasilkan gula pereduksi tertinggi sebesar 1,230 g/100 ml pada hari ke-4. Zakpaa *et al.* (2009) melaporkan konsentrasi substrat tongkol jagung optimum dalam sakarifikasi oleh *Aspergillus niger* adalah 6% dengan kadar gula pereduksi tertinggi sebesar 3,1105 mg/ml.

E. Morfologi dan Sifat-Sifat *Rhizopus oryzae*

Rhizopus termasuk jamur berfilamen. Jamur berfilamen sering disebut kapang. *Rhizopus* merupakan anggota Zygomycetes. Anggota *Rhizopus* yang sering dipakai dalam proses fermentasi makanan adalah *Rhizopus oligosporus* dan *Rhizopus oryzae*. Kedua kapang ini sering digunakan dalam produk fermentasi di Indonesia. *Rhizopus oryzae* memiliki karakteristik, yaitu miselia berwarna putih, ketika dewasa maka miselia putih akan tertutup oleh sporangium yang berwarna abu-abu kecoklatan. Hifa kapang terspesialisasi menjadi 3 bentuk, yaitu rhizoid, sporangiofor, dan sporangium. Rhizoid merupakan bentuk hifa yang menyerupai akar (tumbuh ke bawah). Sporangiofor adalah hifa yang menyerupai batang (tumbuh ke atas). Sporangium adalah hifa pembentuk spora dan berbentuk bulat. Suhu pertumbuhan optimum adalah 30°C (Rahmi, 2008). Morfologi jamur *Rhizopus oryzae* ditunjukkan pada Gambar 4.



Gambar 4. Jamur *Rhizopus oryzae*. A. Sporangium B. Sporangiofora
C. Sporangiospora D. Kolumela (Sumber: Nishimura, 1999)

Koloni *Rhizopus oryzae* yang ditumbuhkan pada *Sabouraud's dextrose agar* tumbuh cepat pada suhu 25°C, panjang 5-8 mm, berbentuk seperti kapas putih awalnya kemudian menjadi abu-abu kecoklatan dan abu-abu kehitaman tergantung pada jumlah sporulasi. Sporangiospora mencapai panjang hingga 1500

μm dan lebar $18 \mu\text{m}$, berdinding halus, tidak bersepta, tunggal atau bercabang, tumbuh dari stolon berlawanan dengan rhizoid. Sporangia berbentuk globosa, hitam keabu-abuan, terlihat seperti bubuk, diameter mencapai $175 \mu\text{m}$ dan mengandung banyak spora. Kolumela dan apofisis bersama-sama berbentuk globosa, subglobosa atau oval, panjang mencapai $130 \mu\text{m}$ dan segera pecah berbentuk seperti payung setelah spora terlepas keluar. Sporangiospora berbentuk bulat, subglobosa mendekati elipsoidal, dengan kepadatan pada permukaan, dan panjang mencapai $8 \mu\text{m}$. *Rhizopus oryzae* tidak tumbuh pada 45°C , tumbuh baik pada 40°C (Ellis, 1997). Menurut Atlas (1984), klasifikasi *Rhizopus oryzae* adalah sebagai berikut:

Divisi	: Zygomycota
Kelas	: Zygomycetes
Bangsa	: Mucorales
Suku	: Mucoraceae
Marga	: <i>Rhizopus</i>
Jenis	: <i>Rhizopus oryzae</i>

Salah satu jamur yang memiliki potensi besar dalam pengembangan riset bioetanol adalah *Rhizopus sp.* karena jamur tersebut memiliki enzim glukamilase yang dapat mengubah pati menjadi glukosa (Rahmi, 2008). *Rhizopus oryzae* memproduksi enzim pendegradasi karbohidrat seperti amilase, selulase, xylanase, glukamilase dan sebagainya. Selama fermentasi, karbohidrat akan berkurang karena dirombak menjadi gula-gula sederhana (Nur, 2006).

Purba (2009) melaporkan *Rhizopus oryzae* mampu menghasilkan kadar gula pereduksi tertinggi pada substrat pati jagung dengan kadar 4%. Rosita (2008) melaporkan sakarifikasi substrat onggok dengan menggunakan *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, dan *Rhizopus oryzae* diperoleh hasil enzim α -amilase

yang dihasilkan *Rhizopus oryzae* sebesar 363,45 U/ml dan glukoamilase sebesar 479,02 U/ml. Aktifitas α -amilase yang dihasilkan *Rhizopus oryzae* tersebut tidak berbeda signifikan dengan aktifitas α -amilase yang dihasilkan oleh *Aspergillus oryzae* dan *Aspergillus niger* sedangkan aktifitas glukoamilase yang dihasilkan *Rhizopus oryzae* berbeda signifikan dengan aktifitas glukoamilase yang dihasilkan *Aspergillus oryzae* dan *Aspergillus niger*. Aktifitas α -amilase menyebabkan pengurangan kadar pati dan menghasilkan gula pereduksi berupa maltosa, maltotriosa dan dekstrin sedangkan aktifitas glukoamilase menghasilkan gula pereduksi berupa glukosa (Melliawati dkk., 2006 dalam Saidin, 2008).

Rhizopus oryzae juga mempunyai kemampuan memfermentasi karbohidrat (pati dan glukosa) menjadi etanol dan asam laktat secara aerob (Purwoko, 2007). Jalur metabolisme yang digunakan *Rhizopus oryzae* untuk menghasilkan etanol adalah dengan menggunakan jalur HMP (Heksosa Monofosfat). Moat dan Foster (1988) menyebutkan bahwa jamur *Rhizopus* termasuk spesies heterofermentatif yang menggunakan jalur fosfoketolase sebagai jalur utama dari metabolisme glukosa. Pada spesies heterofermentatif, fermentasi glukosa menghasilkan lebih dari satu produk dalam jumlah relatif sama, sedangkan pada spesies homofermentatif hanya menghasilkan satu produk fermentasi yang dominan. Lockwood *et al.* (1936) menyebutkan bahwa *Rhizopus oryzae* mampu mengubah glukosa menjadi asam laktat dalam suasana aerob apabila kadar mineral dalam medium fermentasi terbatas. Asam laktat yang diproduksi *Rhizopus oryzae* bukan merupakan satu-satunya produk metabolisme seperti pada bakteri-bakteri homofermentatif asam laktat.

F. Enzim Amilase

Salah satu enzim yang berperan dalam menghidrolisis pati menjadi glukosa adalah enzim amilase. Berdasarkan kemampuan hidrolitiknya, enzim amilase dikelompokkan menjadi dua kelompok besar yaitu α -amilase yang mampu menghidrolisis ikatan α -1,4-glikosidik dan glucoamilase yang mampu menghidrolisis ikatan α -1,6-glikosidik. Berdasarkan letak pemotongan ikatan, enzim amilase dikelompokkan menjadi tiga yaitu *exospliting*, *endospliting*, dan *debranching* (Pandey *et al.*, 2000; Moo Young, 1985). Secara umum, amilase dibedakan menjadi tiga berdasarkan hasil pemecahan dan letak ikatan yang dipecah, yaitu alfa-amilase, beta-amilase, dan glucoamilase (Richana, 2000 dalam Saidin, 2008).

Enzim α -amilase merupakan enzim amilase *endospliting* yang memutuskan ikatan glikosidik pada bagian dalam rantai pati secara acak baik pada molekul amilosa dan amilopektin. Enzim α -amilase hanya spesifik untuk memutuskan atau menghidrolisis ikatan α -1,4-glikosidik tetapi mampu melewati titik percabangan (ikatan α -1,6-glikosidik) untuk memutuskan ikatan ikatan α -1,4-glikosidik diseberangnya sehingga menghasilkan isomaltosa. Hasil hidrolisis pati dan glikogen oleh α -amilase adalah oligosakarida (maltodekstrin), maltosa, dan dekstrin. Dekstrin tersebut kemudian dipotong-potong lagi menjadi campuran antara glukosa, maltosa, maltotriosa, dan ikatan lain yang lebih panjang. Enzim α -amilase umumnya diisolasi dari *Bacillus amyloquefaciens*, *B. licheniformis*, *Aspergillus oryzae*, dan *Aspergillus niger* (Sivaramkrishnan *et al.*, 2006; Kunamneni *et al.*, 2005; Melliawati dkk., 2006 dalam Saidin, 2008).

Enzim glukoamilase memecah ikatan α -1,4 glikosida pada pati secara berturut-turut dari ujung rantai non reduksi menghasilkan β -D-glukosa, sedang α -amilase memecah ikatan α -1,4 glikosida secara acak (Bernfeld, 1955). Menurut Kombong (2004), pH optimum aktivitas enzim glukoamilase, yaitu 4,0-5,0 dan suhu optimum 40°C. Enzim glukoamilase atau amiloglukosidase merupakan enzim ekstraselular yang mampu menghidrolisis ikatan α -1,4 pada rantai amilosa, amilopektin, glikogen, dan pullulan. Enzim glukoamilase juga dapat menyerang ikatan α -1,6 pada titik percabangan, walaupun dengan laju yang lebih rendah. Hal ini berarti bahwa pati dapat diuraikan secara sempurna menjadi glukosa (Josson *et al.*, 1992; Soebiyanto, 1986; Melliawati dkk., 2006 dalam Saidin, 2008).

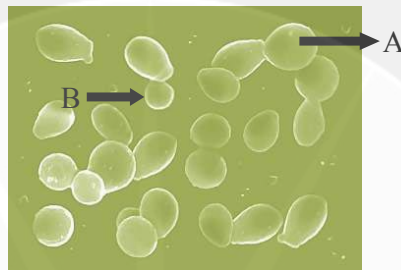
G. Morfologi dan Sifat-Sifat *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae merupakan salah satu jenis khamir. Khamir adalah fungi uniselular yang eukariotik. Sel *Saccharomyces cerevisiae* berbentuk bulat, oval atau memanjang. Sel *Saccharomyces cerevisiae* berukuran (3-10) x (4,5–21) μ m. Reproduksi *Saccharomyces cerevisiae* dilakukan dengan membentuk tunas dan spora seksual (Fardiaz, 1992). Morfologi *Saccharomyces cerevisiae* dapat dilihat pada Gambar 5.

Saccharomyces cerevisiae mempunyai struktur seperti khamir lainnya, yaitu terdiri dari sel dan membran sel. Dinding sel terdiri dari senyawa polisakarida (glukan, mana, protein, kitin, dan lipid). Lapisan membran selnya terdiri dari lipoprotein, di dalamnya terdapat enzim-enzim yang diperlukan untuk sintesis berbagai komponen dinding sel. Fungsi dari membran sel adalah untuk transportasi zat yang dibutuhkan oleh sel dan zat-zat sisa metabolisme (Amaria *et*

al., 1999). Menurut Yarow (1984), klasifikasi *Saccharomyces cerevisiae* dapat digolongkan menjadi:

Divisi : Eumycota
 Kelas : Hemiascomycetes
 Bangsa : Endomycetales
 Suku : Saccharomycetaceae
 Marga : Saccharomyces
 Jenis : *Saccharomyces cerevisiae*



Gambar 5. Sel *Saccharomyces cerevisiae* (Perbesaran 1000x) (A)
 Tunas *Saccharomyces cerevisiae* (B) (Sumber: Anonim, 2009)

Kisaran suhu untuk pertumbuhan khamir pada umumnya hampir sama dengan kapang, yaitu dengan suhu optimum 25-30°C dan suhu maksimum 35-37°C. Beberapa khamir mampu tumbuh pada 0°C atau kurang. Khamir mampu tumbuh pada kondisi aerobik tetapi yang bersifat fermentatif dapat tumbuh secara anaerobik meskipun lambat (Fardiaz dan Winarno, 1989). *Saccharomyces cerevisiae* disamping memproduksi enzim heksokinase, L-laktase, dehidrogenase, glukosa-6-fosfat dehidrogenase dan pirofosfat anorganik, juga menghasilkan enzim etanol dehidrogenase yang sangat penting peranannya dalam proses fermentasi etanol (Waites *et al.*, 2001).

Pada permulaan proses fermentasi, khamir memerlukan oksigen untuk pertumbuhannya sehingga fermentasi berlangsung secara aerob. Setelah terbentuk CO₂, reaksi akan berubah menjadi anaerob. Alkohol yang terbentuk akan

menekan fermentasi lebih lanjut setelah tercapai konsentrasi antara 13-15% volume. Terhalangnya proses fermentasi, juga dipengaruhi suhu proses dan jenis khamir yang digunakan (Prescott dan Dunn, 1981).

Saccharomyces cerevisiae banyak digunakan untuk produksi etanol karena memenuhi kriteria, antara lain produksi etanol tinggi, toleransi terhadap kadar etanol dan substrat tinggi, dan tumbuh baik pada pH netral (Pelczar dan Chan, 1988). Rosita (2008) melaporkan *Saccharomyces cerevisiae* menghasilkan etanol sebesar 7,89% sedangkan Aryani dkk. (2004) mampu menghasilkan etanol sebesar 2,647% oleh *Saccharomyces cerevisiae*. Elevri dan Putra (2006) menghasilkan etanol sebesar 2,97% sedangkan Putri dan Sukandar (2008) mampu menghasilkan etanol sebesar 4,84%.

H. Bioetanol dan Fermentasi Etanol dengan Substrat Pati

Bioetanol adalah etanol yang dihasilkan dari proses fermentasi gula dari bahan nabati (Nur, 2009). Etanol disebut juga etil etanol dengan rumus kimia C_2H_5OH atau CH_3CH_2OH . Titik didih etanol adalah $78,4^{\circ}C$. Etanol memiliki sifat tidak berwarna, volatil, dan dapat bercampur dengan air (Kartika dkk., 1997). Etanol memiliki banyak manfaat. Selama bertahun-tahun etanol diproduksi untuk konsumsi manusia sebagai bahan minuman beretanol. Namun, beberapa tahun ini perhatian mengarah pada produksi etanol sebagai bahan bakar dan pelarut kimia (Crueger and Crueger, 1990). Etanol juga dimanfaatkan sebagai bahan cita rasa, obat-obatan, dan komponen antibeku (Nitz, 1976).

Bioetanol memiliki beberapa keuntungan diantaranya berasal dari bahan yang dapat diperbaharui, ramah lingkungan karena bioetanol memiliki nilai oktan

tinggi yaitu 96-113 sehingga dapat menggantikan fungsi bahan aditif, seperti metil tersier butil eter dan bioetanol mudah terurai (Indah, 2010).

Etanol dapat dihasilkan melalui proses fermentasi. Pati dapat digunakan sebagai bahan mentah untuk fermentasi etanol. Fermentasi etanol dengan substrat pati terjadi dalam dua tahap. Tahap pertama adalah sakarifikasi dan tahap kedua adalah fermentasi. Tahap sakarifikasi pati lebih dulu dihidrolisis menjadi gula sederhana yang dapat difermentasi oleh khamir (Pelczar dan Chan, 1988).

Sebelum tahap sakarifikasi, pati terlebih dahulu mengalami likuifikasi. Pada tahap likuifikasi pati terjadi pemecahan ikatan α -1,4 glikosidik oleh enzim α -amilase pada bagian dalam rantai polisakarida secara acak sehingga dihasilkan glukosa, maltosa, maltodekstrin dan α -limit dekstrin (Nikolov dan Reilly, 1991). Alfa limit dekstrin adalah oligosakarida yang terdiri dari empat atau lebih residu gula yang semuanya mengandung ikatan alfa 1,6 dan tidak dapat dihidrolisis oleh enzim α -amilase (Pudjaatmaka, 2002). Enzim α -amilase merupakan enzim yang menghidrolisis secara khas melalui bagian dalam dengan memproduksi oligosakarida dari konfigurasi alfa yang memutus ikatan α -1,4 glikosidik pada amilosa, amilopektin, dan glikogen. Ikatan α -1,6 glikosidik tidak dapat diputus oleh α -amilase, tetapi dapat dibuat menjadi cabang-cabang yang lebih pendek (Nikolov dan Reilly, 1991).

Setelah terjadi likuifikasi, selanjutnya bahan akan mengalami proses sakarifikasi oleh enzim glukoamilase. Glukoamilase merupakan eksoenzim yang terutama memecah ikatan α -1,4 dengan melepaskan unit-unit glukosa dari ujung

non reduksi molekul amilosa dan amilopektin untuk memproduksi β -D-glukosa (Nikolov dan Reilly, 1991).

Madigan *et al.*, (2000) mengatakan tahap fermentasi gula menjadi etanol biasanya dilakukan oleh khamir. Khamir yang penting dalam proses fermentasi etanol adalah *Saccharomyces cerevisiae*. Khamir mempunyai kemampuan fermentasi etanol menggunakan gula-gula sederhana seperti glukosa, maltosa, sukrosa, laktosa, dan rafinosa. Produksi etanol dari glukosa oleh *Saccharomyces cerevisiae* terjadi melalui jalur *Embden-Meyerhof-Parnas* (EMP) yang terbagi dalam 3 tahap (Gambar 6).



Gambar 6. Jalur *Embden-Meyerhof-Parnas* (Madigan *et al.*, 2000)

Tahap pertama merupakan tahap perubahan glukosa (C6) menjadi 2 molekul gliseraldehid-3-fosfat (C3) menggunakan ATP. Reaksi oksidasi-reduksi dan pelepasan energi tidak terjadi pada tahap pertama. Kedua reaksi tersebut baru terjadi dalam tahap kedua dan menghasilkan energi berupa ATP. Piruvat sebanyak 2 mol juga dihasilkan dalam tahap ini. Tahap ketiga merupakan tahap terjadinya reaksi oksidasi-reduksi yang ke-2 dan pembentukan produk fermentasi (Madigan *et al.*, 2000). Etanol yang dihasilkan pada tahap ketiga bersifat ekstraselular karena dikeluarkan dari sel melalui membran sel (Guerzoni *et al.*, 1997).

Faktor-faktor yang mempengaruhi fermentasi etanol, antara lain sumber karbon, pH, suhu, sumber nitrogen, faktor tumbuh, oksigen, etanol dan CO₂. Selain itu, kondisi fisiologi inokulum dan kualitas substrat pertumbuhan juga berpengaruh terhadap hasil fermentasi. Kondisi fisiologi inokulum tergantung pada faktor-faktor lingkungan, adanya mikrobia kontaminan akan sangat berpengaruh terhadap produk metabolit yang dihasilkan dan menghambat proses fermentasi (Najafpour *et al.*, 2004).

I. Hipotesis

Berdasarkan tinjauan pustaka, perumusan masalah, dan tujuan penelitian, maka dapat diajukan hipotesis sebagai berikut:

1. Jamur *Rhizopus oryzae* menghasilkan gula pereduksi paling tinggi pada tahap sakarifikasi.
2. Jamur tersebut menghasilkan gula pereduksi paling tinggi pada kadar pati biji durian 4%.

Kadar etanol yang dihasilkan oleh *Saccharomyces cerevisiae* pada tahap fermentasi etanol dari medium hasil sakarifikasi dengan kadar gula pereduksi paling tinggi (tanpa pemurnian) adalah 2-8%.

