

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### A. Sifat Fisik dan Kimia Etanol

Alkohol adalah senyawa hidrokarbon berupa gugus hidroksil (-OH) dengan 2 atom karbon (C). Spesies alkohol yang banyak digunakan adalah  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$  yang disebut metil alkohol (metanol),  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  yang diberi nama etil alkohol (etanol), dan  $\text{C}_3\text{H}_7\text{OH}$  yang disebut isopropil alkohol (IPA) atau propanol-2. Dalam dunia perdagangan yang disebut alkohol adalah etanol atau etil alkohol atau metil karbinol dengan rumus kimia  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  (Rama, 2008).

Etanol disebut juga etil alkohol dengan rumus kimia  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  atau  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$  dengan titik didihnya  $78,4^\circ \text{C}$ . Etanol memiliki sifat tidak berwarna, volatil dan dapat bercampur dengan air (Kartika dkk., 1997). Ada 2 jenis etanol menurut Rama (2008), etanol sintetik sering disebut metanol atau metil alkohol atau alkohol kayu, terbuat dari etilen, salah satu derivat minyak bumi atau batu bara. Bahan ini diperoleh dari sintesis kimia yang disebut hidrasi, sedangkan bioetanol direkayasa dari biomassa (tanaman) melalui proses biologi (enzimatik dan fermentasi).

Mengingat pemanfaatan bioetanol/ etanol beraneka ragam, sehingga *grade* etanol yang dimanfaatkan harus berbeda sesuai dengan penggunaannya. Untuk etanol yang mempunyai *grade* 90-96,5% dapat digunakan pada industri, sedangkan etanol yang mempunyai *grade* 96-99,5% dapat digunakan sebagai campuran untuk miras dan bahan dasar industri farmasi. Besarnya *grade* etanol yang dimanfaatkan sebagai campuran bahan bakar untuk kendaraan sebesar 99,5-

100%. Perbedaan besarnya *grade* akan berpengaruh terhadap proses konversi karbohidrat menjadi gula (glukosa) larut air (Indyah, 2007).

## **B. Morfologi dan Kedudukan Taksonomi Tanaman Jagung**

Jagung (*Zea mays* L.) merupakan salah satu tanaman pangan dunia yang terpenting, selain gandum dan padi. Sebagai sumber karbohidrat utama di Amerika Tengah dan Selatan, jagung juga menjadi alternatif sumber pangan di Amerika Serikat. Penduduk beberapa daerah di Indonesia (misalnya di Madura dan Nusa Tenggara) juga menggunakan jagung sebagai pangan pokok. Selain sebagai sumber karbohidrat, jagung juga ditanam sebagai pakan ternak (hijauan maupun tongkolnya), diambil minyaknya (dari biji), dibuat tepung (dari biji, dikenal dengan istilah tepung jagung atau maizena), dan bahan baku industri (dari tepung biji dan tepung tongkolnya) (Anonim, 2008b).

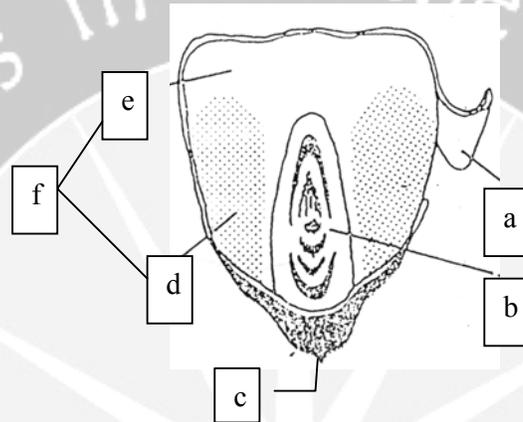
Menurut Anonim (2008b), Taksonomi tanaman jagung (*Zea mays* L.) adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Divisio	: Angiospermae
Classis	: Monocotyledonae
Ordo	: Poales
Familia	: Poaceae
Genus	: <i>Zea</i>
Species	: <i>Zea mays</i>

Jagung merupakan tanaman semusim (*annual*). Satu siklus hidupnya diselesaikan dalam 80-150 hari. Tinggi tanaman jagung sangat bervariasi. Meskipun tanaman jagung umumnya berketinggian antara 1 m sampai 3 m, ada varietas yang dapat mencapai tinggi 6 m. Tinggi tanaman umumnya diukur dari permukaan tanah hingga ruas teratas sebelum bunga jantan. Meskipun beberapa

varietas dapat menghasilkan anakan (seperti padi) (Anonim, 2008b).

Jagung (*Zea mays* L) adalah tanaman yang mempunyai batang berbentuk bulat. Setiap biji jagung secara botanis adalah sebuah biji *Caryopsis*, biji kering yang mengandung sebuah benih tunggal yang menyatu dengan jaringan dalam buahnya.



Gambar 1. Struktur Utama Biji Jagung

Ket : a = perikarp, b= lembaga, c= tincap, d= pati dan gluten, e= pati, f= endosperma

Biji jagung terdiri atas 4 bagian utama (Gambar 1) yaitu perikarp, lembaga (*germ*), endosperm dan tin kap. Perikarp juga disebut sebagai kulit atau bran terletak di bagian luar dari biji jagung. Endosperm merupakan bagian yang terbesar, yaitu 82% dari berat biji jagung. Endosperm berfungsi sebagai sumber energi dan protein untuk pertumbuhan benih jagung. Lembaga (*germ*) adalah merupakan bagian inti dari biji jagung.

Menurut Harsono (2006), jagung merupakan komoditas penting dalam industri pangan, kimia maupun industri. Kandungan yang terdapat dalam biji jagung dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi Kimia Setiap 100 gram Biji Jagung (Harsono, 2006)

No.	Komponen	Prosentase (%)
1	Karbohidrat	74,5
2	Protein	9,0
3	Serat	1,0
4	Abu	1,1
5	Lemak	3,4
6	Air	12,0

Biji jagung kaya akan karbohidrat. Sebagian besar berada pada endospermium. Kandungan karbohidrat dapat mencapai 80% dari seluruh bahan kering biji. Karbohidrat dalam bentuk pati umumnya berupa campuran amilosa dan amilopektin. Pada jagung ketan, sebagian besar atau seluruh patinya merupakan amilopektin. Perbedaan ini tidak banyak berpengaruh pada kandungan gizi, tetapi lebih berarti dalam pengolahan sebagai bahan pangan. Jagung manis tidak mampu memproduksi pati sehingga bijinya terasa lebih manis ketika masih muda (Anonim, 2008b).

### C. Karakteristik Pati Jagung

Biji jagung mengandung pati 54,1-71,7 %, sedangkan kandungan gulanya pada biji jagung sebesar 2,6-12,0 %. Komponen lain pada pati jagung adalah pentosan, serat kasar, dekstrin, sukrosa, dan gula pereduksi (Nur, 2007). Bentuk dan ukuran granula pati jagung dipengaruhi oleh sifat biokimia dari kloroplas atau amyloplastnya (Nur, 2007).

Pati jagung mempunyai ukuran granula yang cukup besar dan tidak homogen yaitu 1-7  $\mu\text{m}$  untuk yang kecil dan 15-20  $\mu\text{m}$  untuk yang besar. Granula besar berbentuk oval polihedral dengan diameter 6-30  $\mu\text{m}$ . Granula pati yang lebih

kecil akan memperlihatkan ketahanan yang lebih kecil terhadap perlakuan panas dan air dibanding granula yang besar (Singh *et al.*, 2005). Proses pembuatan pati meliputi pemipilan biji, pencucian dan penyaringan kulit luar, penggilingan (diblender), perendaman, penyaringan, pengendapan filtrat, dan pengeringan pati. Proses pembuatan pati jagung dapat dilihat pada Lampiran 1.

Pati jagung terdiri atas dua jenis polimer glukosa, yaitu amilosa dan amilopektin. Amilosa merupakan rantai unit-unit D-glukosa yang panjang dan tidak bercabang, digabungkan oleh ikatan  $\alpha(1\rightarrow4)$ , sedangkan amilopektin strukturnya bercabang. Ikatan glikosidik yang menggabungkan residu glukosa yang berdekatan dalam rantai amilopektin adalah ikatan  $\alpha(1\rightarrow4)$ , tetapi titik percabangan amilopektin merupakan ikatan  $\alpha(1\rightarrow6)$ . (Anonim, 2008d).

Jagung dapat digolongkan menjadi empat jenis berdasarkan sifat patinya yaitu pati jagung normal mengandung 74-76% amilopektin dan 24-26% amilosa, jenis pulut (*waxy*) mengandung 99% amilopektin, sedangkan jenis jagung amilomaize hanya mengandung 20% amilopektin dan 80% amilosa dan jagung manis mengandung sukrosa disamping pati (Nur, 2006). Jagung Pulut (*Waxy Corn*), *Z. mays* memiliki kandungan pati hampir 100% amilopektin hal ini disebabkan karena adanya gen tunggal *waxy* (*wx*) bersifat resesif epistasis yang terletak pada kromosom sembilan, sehingga mempengaruhi komposisi kimiawi pati, dan menyebabkan akumulasi amilosa sangat sedikit (Ferguson, 1994).

Konversi biomassa menjadi bioetanol dapat dilihat pada Tabel 2. Tabel tersebut menunjukkan bahwa jagung memiliki kandungan pati yang lebih tinggi

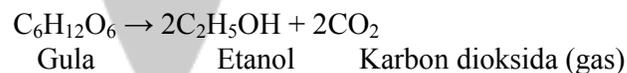
dari pada bahan baku lainnya dan juga menghasilkan perbandingan biomassa dan etanol yang lebih kecil.

Tabel 2. Konversi Biomassa Menjadi Bioetanol (Wahono, 2006)

Biomassa	Berat (kg)	Kandungan Gula/Pati (kg)	Jumlah Bioetanol (L)	Hasil Biomassa:Bioetanol
Ubi Kayu	1.000	240-300	166,6	6,5 : 1
Ubi Jalar	1.000	150-200	125	8 : 1
Jagung	1.000	600-700	400	2,5 : 1
Sagu	1.000	120-160	90	12 : 1
Tetes	1.000	450-520	250	4 : 1
Tebu	1.000	110	67	15 : 1

#### D. Produksi Bioetanol dengan Substrat Pati

Bahan baku bioetanol dapat diperoleh dari berbagai tanaman yang menghasilkan gula (seperti tebu dan molase) dan tepung (seperti jagung, singkong, dan sagu) (Anonim, 2008a). Pada tahap persiapan, bahan baku berupa padatan harus dikonversi terlebih dahulu menjadi larutan gula sebelum akhirnya difermentasi untuk menghasilkan etanol, sedangkan bahan-bahan yang sudah dalam bentuk larutan gula (seperti molase) dapat langsung difermentasi. Bahan padatan dikenai perlakuan pengecilan ukuran dan tahap pemasakan. Proses pengecilan ukuran dapat dilakukan dengan menggiling bahan (singkong, sagu, dan jagung) sebelum memasuki tahap pemasakan (Erliza, 2008), berikut ini adalah reaksi penguraian gula menjadi etanol :



Menurut Hidayat (2006), secara umum produksi bioetanol mencakup tiga rangkaian proses, yaitu persiapan bahan baku, tahap likuifikasi dan

sakarifikasi, fermentasi, dan pemurnian.

### 1. Persiapan bahan baku

Bahan baku untuk produksi etanol bisa didapatkan dari tanaman, baik yang secara langsung menghasilkan gula sederhana semisal tebu, gandum manis atau yang menghasilkan tepung seperti jagung (*corn*), singkong (*cassava*) dan gandum (*grain sorghum*) disamping bahan lainnya. Persiapan bahan baku beragam bergantung pada bahan bakunya, tetapi secara umum terbagi menjadi beberapa proses, yaitu:

- a. Tebu dan gandum manis harus digiling untuk mengekstrak gula.
- b. Tepung dan material selulosa harus dihancurkan untuk memecahkan susunan tepungnya agar bisa berinteraksi dengan air secara baik.
- c. Pemasakan, tepung dikonversi menjadi gula melalui proses pemecahan menjadi gula kompleks (*liquefaction*) dan sakarifikasi (*saccharification*) dengan penambahan air, enzim yang dihasilkan dari mikrobia (enzim hidrolisis) (Hidayat, 2006).

### 2. Tahap Likuifikasi

Tahap likuifikasi memerlukan penanganan sebagai berikut : pencampuran dengan air secara merata hingga menjadi bubur; pemasakan bubur hingga kisaran 50 sampai dengan 90 °C, dimana pati akan mengalami gelatinisasi (mengental seperti *jelly*). Proses likuifikasi selesai ditandai dengan parameter dimana bubur yang diproses menjadi seperti *jelly* (Hidayat, 2006).

### 3. Tahap sakarifikasi

Tahap sakarifikasi adalah pemecahan gula kompleks menjadi gula

sederhana, yang melibatkan proses sebagai berikut : Pendinginan bubur pati sampai suhu optimum; penginokulasian mikrobial yang diinginkan untuk memecah gula kompleks menjadi gula sederhana, proses sakarifikasi selesai ditandai dengan bubur pati berubah menjadi seperti sup (Hidayat, 2006).

#### 4. Fermentasi

Pada tahap ini, tepung telah berubah menjadi gula sederhana (glukosa atau fruktosa) dimana proses selanjutnya melibatkan enzim yang terdapat pada ragi (*yeast*) atau bakteri. Proses fermentasi ini akan menghasilkan etanol dan CO<sub>2</sub>. Pada tahap fermentasi dibutuhkan ketelitian agar tidak terkontaminasi oleh mikrobial lainnya, Oleh karena itu keseluruhan rangkaian proses dari likuifikasi, sakarifikasi dan fermentasi haruslah dilakukan pada kondisi bebas kontaminan (Hidayat, 2006). Prinsip fermentasi etanol adalah perubahan kimia yang spesifik pada substrat karbohidrat yang diinduksi oleh enzim yang dihasilkan mikroorganisme (Rogers and Cail, 1991).

Pada fermentasi terjadi proses pemecahan gula-gula sederhana menjadi etanol dengan melibatkan enzim yang berasal dari mikrobial. Fermentasi dilakukan pada kisaran suhu 27-32°C. Pada tahap ini akan dihasilkan gas CO<sub>2</sub> sebagai *by product* dan *sludge* sebagai limbahnya. (Erliza, 2008). Syarat-syarat yang dipergunakan dalam memilih mikrobial untuk fermentasi, adalah cepat berkembang biak, tahan terhadap alkohol tinggi, tahan terhadap suhu tinggi, mempunyai sifat yang stabil, cepat mengadakan adaptasi terhadap media yang difermentasi (Hamidah, 2003).

#### 5. Destilasi

Destilasi dilakukan untuk memisahkan etanol dengan *beer* (sebagian besar adalah air dan etanol). Titik didih etanol murni adalah 78,4°C sedangkan air adalah 100°C (kondisi standar). Dengan memanaskan larutan pada suhu rentang 78-100°C akan mengakibatkan sebagian besar etanol menguap, dan melalui unit kondensasi akan bisa dihasilkan etanol dengan konsentrasi 95% volume (Hidayat, 2006).

#### **E. Ciri-Ciri *Rhizopus oryzae* dan Aktivitasnya Dalam Produksi Etanol**

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

Salah satu enzim yang berperan dalam menghidrolisis pati menjadi glukosa adalah enzim amilase, terutama  $\alpha$ -amilase dan glukoamilase. Enzim  $\alpha$ -amilase bekerja menghidrolisis ikatan  $\alpha$ -1,4 secara acak di bagian dalam molekul baik pada amilosa maupun amilopektin. Hasil hidrolisis  $\alpha$ -amilase mula-mula akan menghasilkan dekstrin, dekstrin tersebut kemudian dipotong-potong lagi menjadi campuran antara glukosa, maltosa, maltotriosa, dan ikatan lain yang lebih panjang (Melliawati dkk.,2006).

Amilase mempunyai kemampuan untuk memecah molekul-molekul pati dan glikogen. Molekul pati yang merupakan polimer dari alfa-D-glikopiranos

akan dipecah oleh enzim pada ikatan alfa-1, 4 dan alfa-, 6 glikosida. Secara umum, amilase dibedakan menjadi tiga berdasarkan hasil pemecahan dan letak ikatan yang dipecah, yaitu alfa-amilase, beta-amilase, dan glukoamilase (Richana, 2000).

Enzim glukoamilase atau sering disebut amiloglukosidase atau  $\alpha$ -1,4-glukano glukohidrolase merupakan enzim ekstraseluler yang mampu menghidrolisis ikatan  $\alpha$ -1,4 pada rantai amilosa, amilopektin, glikogen. Enzim glukoamilase juga dapat menyerang ikatan  $\alpha$ -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; dalam Melliawati dkk., 2006).

*Rhizopus oryzae* juga mempunyai kemampuan memfermentasi karbohidrat (pati atau glukosa) menjadi etanol dan asam laktat secara aerob (Purwoko, 2007). Menurut Anonim (2004), klasifikasi *Rhizopus oryzae* adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Fungi
Phylum	: Zygomycota
Class	: Zygomycetes
Subclass	: Incertaesedis
Order	: Mucorales
Family	: Mucoraceae
Genus	: <i>Rhizopus</i>
Spesies	: <i>Rhizopus oryzae</i>

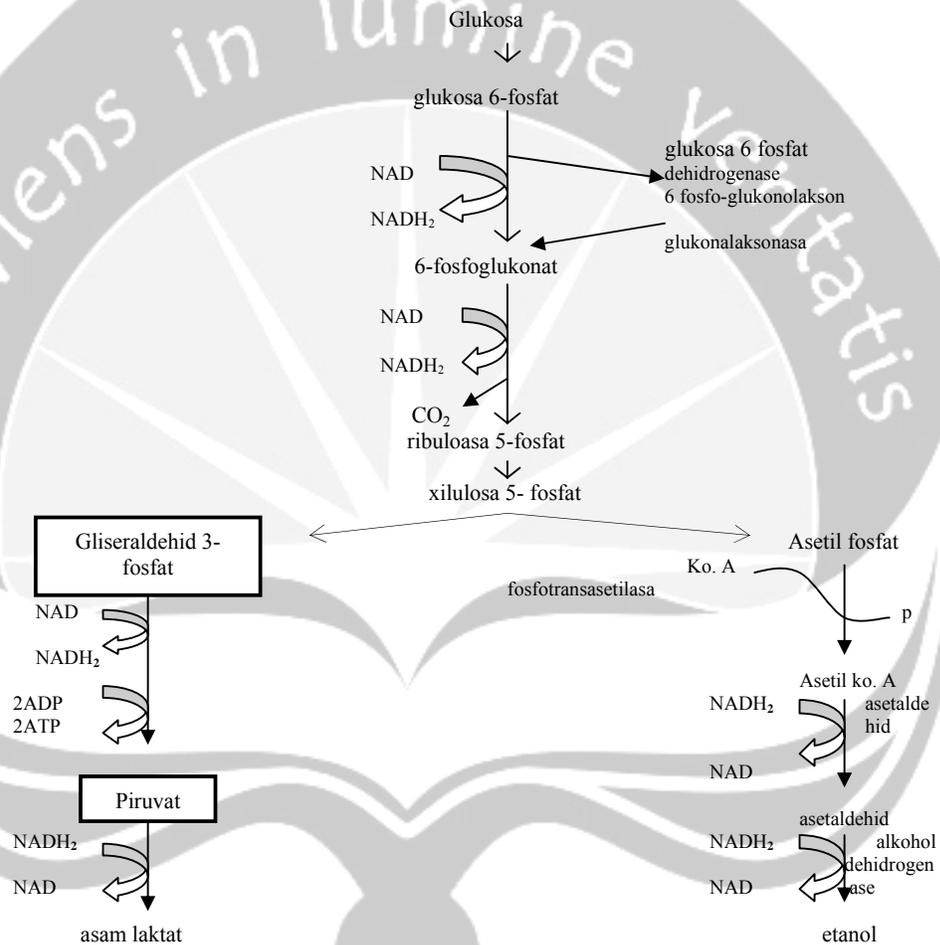
Ciri-ciri dari *Rhizopus oryzae* adalah hifa bersepta dan tidak selalu bercabang, mempunyai stolon dan rhizoid yang berwarna gelap jika sudah tua. Sporangiospora tumbuh pada noda dimana terbentuk juga rhizoid. Sporangium

besar dan berwarna hitam, kolumela agak bulat, tidak mempunyai sporangiola. Pertumbuhannya cepat, membentuk miselium seperti kapas. Pertumbuhan seksual dengan membentuk zigospora, bersifat heterotalik dimana reproduksi seksual membutuhkan dua talus yang berbeda (Anonim, 2004).

*Rhizopus* termasuk jamur berfilamen. Jamur berfilamen sering disebut kapang. *Rhizopus* merupakan anggota *Zygomycetes*. Anggota *Rhizopus* yang sering dipakai dalam proses fermentasi makanan adalah *R. oligosporus* dan *R. oryzae*. Kedua kapang ini sering digunakan dalam produk fermentasi di Indonesia. Kapang *R. oryzae* memiliki karakteristik sebagai berikut : miselia berwarna putih, ketika dewasa maka miselia putih akan tertutup oleh sporangium yang berwarna abu-abu kecoklatan. Hifa kapang *R. oryzae* tidak bersepta dan tidak berwarna (jernih/hialin). 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, pH optimum untuk *Rhizopus oryzae* adalah 2,5-7, Suhu pertumbuhan maksimum adalah 33-36°C dan suhu pertumbuhan optimum adalah  $\pm 30^{\circ}\text{C}$  (Rahmi, 2008).

Jalur metabolisme yang digunakan oleh *Rhizopus oryzae* untuk menghasilkan etanol adalah dengan menggunakan jalur HMP (Heksosa Monofosfat). Moat dan Foster (1979) menyebutkan bahwa jamur *Rhizopus* termasuk spesies heterofermentatif yang menggunakan jalur fosfoketolase sebagai jalur utama dari metabolisme glukosa. Jalur tersebut seperti yang digunakan oleh bakteri yang tergolong *Lactobacillus* heterofermentatif. 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. Jalur heksosa monofosfat dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Jalur Heksosa Monofosfat (Timotius, 1992)

Lockwood *et al.*, (1936) menyebutkan bahwa *R. oryzae* mampu mengubah glukosa menjadi asam laktat dalam suasana aerob apabila kadar mineral dalam medium fermentasi terbatas. Asam laktat yang diproduksi *R. oryzae*, bukan

merupakan satu-satunya produk metabolisme seperti pada bakteri-bakteri homofermentatif asam laktat. Di samping asam laktat, *R. oryzae* memproduksi asam fumarat, asam tartrat, asam format, asam asetat, dan etanol (Schlegel dan Schmidt, 1994).

#### **F. Ciri-Ciri *Saccharomyces cerevisiae* dan Aktivitasnya Dalam Produksi Etanol**

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 : Saccharomycetes  
 Ordo : Saccaromycetales  
 Familia : Saccharomycetaceae

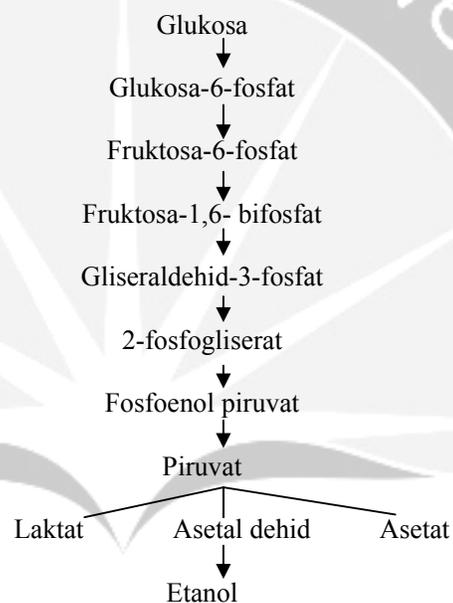
Genus : *Saccharomyces*  
Spesies : *Saccharomyces cerevisiae*

Pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* dipengaruhi oleh kondisi lingkungan sebagai tempat tumbuhnya, berupa temperatur, pH dan medium. Strain mesofilik *Saccharomyces* dapat tumbuh secara optimum pada temperatur 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* (Gambar 3).

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 (Gambar 3). Tahap I merupakan tahap perubahan glukosa C6 menjadi 2 molekul gliseraldehid-3-fosfat (C3) menggunakan ATP. Reaksi oksidasi-reduksi dan pelepasan energi tidak terjadi

pada tahap ini, kedua reaksi tersebut baru terjadi dalam tahap II. 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 membran sel (Guarzoni *et al.*, 1997).



Gambar 3. Jalur *Embden-Meyerhof* (Sumber: Madigan *et al.*, 2000)

Menurut Indyah (2007), fermentasi gula menjadi etanol dengan penambahan *yeast* atau ragi akan menghasilkan reaksi sederhana yaitu sebagai berikut :



Pada kondisi aerob dan konsentrasi gula yang tinggi, *Saccharomyces cerevisiae* tumbuh dengan baik tetapi tidak menghasilkan alkohol. Dalam kondisi lingkungan yang anaerob, pertumbuhan mikrobia lambat dan piruvat dekarboksilase menjadi asetaldehid dan CO<sub>2</sub>, selanjutnya akan terbentuk etanol dari hasil reduksi asetaldehid oleh alkohol dehidrogenase (Crueger and Crueger, 1990).

#### **G. Ciri-Ciri *Zymomonas mobilis* dan Aktivitasnya Dalam Produksi Etanol**

Menurut Swings and De Lay (1997), bakteri *Zymomonas mobilis* sebagai penyebab fermentasi pada sejenis tuak Mexico ("pluque"). Bakteri ini mampu memfermentasi sukrosa, glukosa dan fruktosa menjadi etanol, CO<sub>2</sub> dan beberapa asam laktat, mikroorganisme ini dinamakan *Termobacterium mobile* (sekarang : *Zymomonas mobilis*, sub sp: *mobilis*).

Bakteri *Zymomonas mobilis* memiliki ciri-ciri : sel diplobasil, ukuran 4-5µm dan 1,4-2,0 µm, motil dengan polar flagella, gram negatif, tidak membentuk endospora dalam *beer wort* ; koloni bakteri berwarna putih, sirkuler konveks, mempunyai diameter 1mm, dan tumbuh baik dengan penambahan 2 % CaCO<sub>3</sub>, pH medium pepton glukosa sebesar 6,5, suhu optimum 30°C. Organisme ini bersifat anaerob fakultatif, tetapi kondisi anaerob diperlukan untuk memfermentasi gula (Swings and De Lay, 1997).

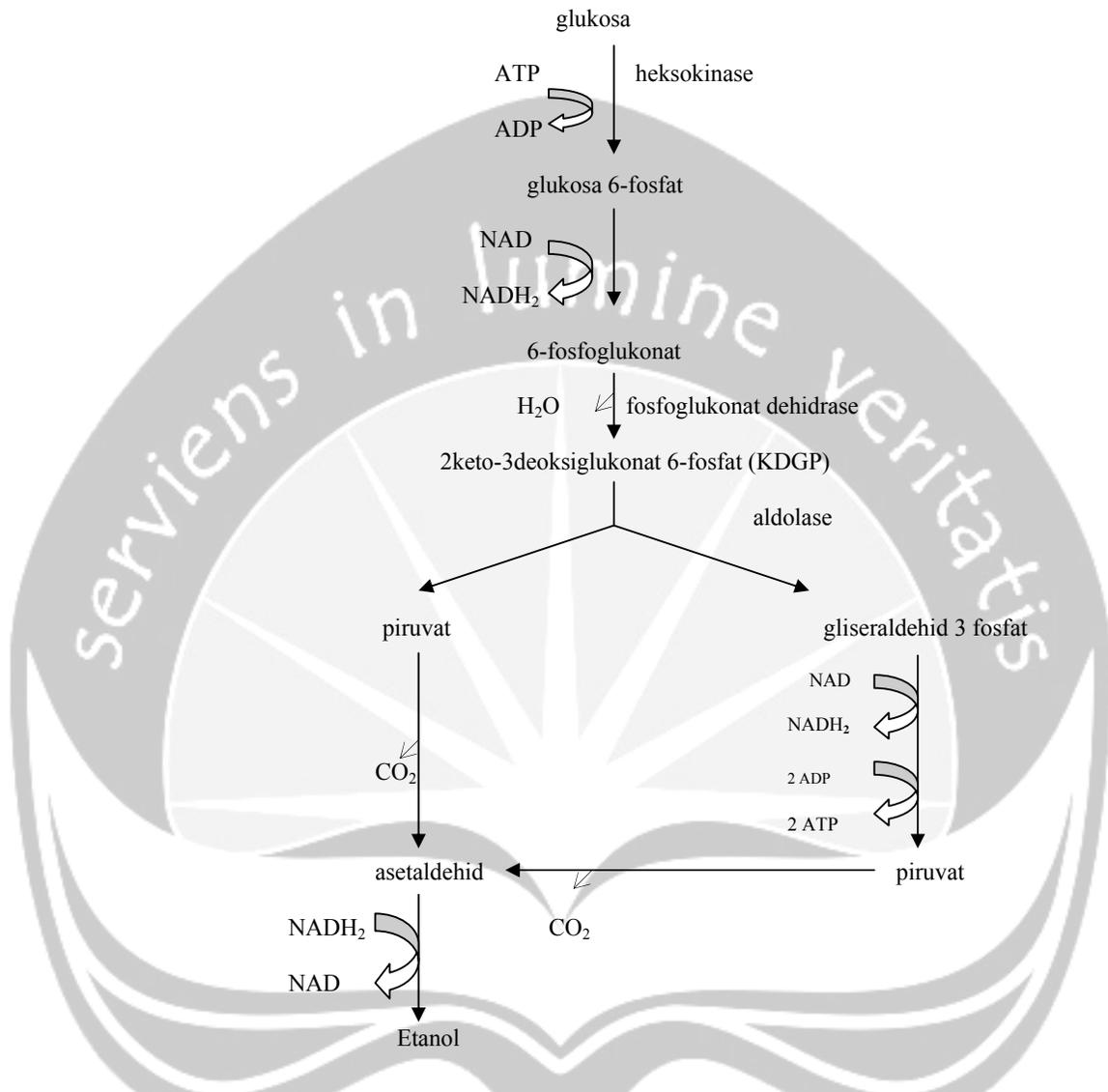
Bakteri *Zymomonas mobilis* juga mempunyai sifat osmotoleran sampai kadar 40%, alkohol toleran dengan kadar alkohol 2-10 %, kisaran pH optimum 5,0-7,0. Sel kadang-kadang membentuk rantai pendek (koloni), pada fermentasi

sukrosa biasanya diawali dengan fase adaptasi yang lama (Swings and De Lay, 1997).

Penggunaan *Zymomonas mobilis* dalam fermentasi etanol banyak mengalami keberhasilan. Bakteri ini menunjukkan produktifitas etanol lebih tinggi 3-5 kali lipat dari *yeast* (Rogers *et al.*, 1982) dengan hasil etanol dari glukosa mencapai nilai maksimum 95-98 % secara teori. Jalur glikolisis yang digunakan *Zymomonas mobilis* adalah lintasan Entner- Doudoroff (ED). Ciri khas jalur ini adalah terdapatnya enzim 2-keto-3deoksiglukonat-6-fosfat (Dawes, 1986). Dalam jalur ED tidak terdapat enzim pengatur reaksi kunci seperti pada jalur EMP yaitu allosterik heksokinase dan fosfofruktokinase (Osman *et al.*, 1987).

Faktor-faktor yang mempengaruhi fermentasi etanol oleh *Zymomonas mobilis* meliputi : pH, temperatur, sumber karbon, faktor tumbuh, sumber nitrogen, oksigen, dan alkohol. Disamping itu, kondisi inokulum serta kualitas substrat juga mempengaruhi hasil yang diperoleh dan efisiensi fermentasi. Kondisi inokulum tergantung pada faktor-faktor lingkungannya, adanya mikrobia kontaminan akan sangat menghambat fermentasi (Swings and De Lay, 1977).

Jalur 2keto-3deoksiglukonat 6-fosfat mempunyai suatu senyawa yang khas yaitu 2keto-3deoksiglukonat 6-fosfat. Dari senyawa ini akan dihasilkan asam piruvat dan gliseraldehida 3-fosfat dengan bantuan enzim aldolasa (Gambar 4).



Gambar 4. Skema Jalur 2keto-3deoksiglukonat 6-fosfat pada fermentasi etanol oleh bakteri *Zymomonas mobilis* (Timotius, 1992)

## H. 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 mikrobia dalam medium fermentasi. Kuswanto (1994) menjelaskan bahwa dalam proses fermentasi terjadi perubahan gula menjadi etanol sehingga menyebabkan penurunan gula seiring dengan meningkatnya produksi etanol.

Faktor- faktor yang mempengaruhi fermentasi etanol antara lain adalah kondisi fisiologi inokulum meliputi pH, suhu, faktor tumbuh, alkohol. Kualitas substrat pertumbuhan yang terdiri dari sumber karbon, sumber nitrogen, oksigen, dan CO<sub>2</sub> juga berpengaruh terhadap hasil yang diperoleh serta efisiensi 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).

Untuk fermentasi etanol, mikrobia 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 mikrobia 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 mikrobia 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 CO<sub>2</sub>. 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  $O_2$  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).

### **I. Pengukuran Kadar Etanol Dengan Alat Kromatografi Gas**

Kromatografi gas adalah teknik kromatografi yang bisa digunakan untuk memisahkan senyawa organik yang mudah menguap. Senyawa-senyawa yang dapat ditetapkan dengan kromatografi gas sangat banyak, namun ada batasan-batasannya. Senyawa-senyawa tersebut harus mudah menguap dan stabil pada temperatur pengujian, utamanya pada kisaran  $50 - 300^\circ\text{C}$ . Jika senyawa tidak

mudah menguap atau tidak stabil pada temperatur pengujian, maka senyawa tersebut bisa diderivatisasi agar dapat dianalisis dengan kromatografi gas (Mardoni, 2005).

Hal yang perlu dilakukan dalam menggunakan kromatografi gas adalah pengaturan alat kromatografi. Hal ini disebabkan bagian-bagian dari kromatografi gas yang dapat mempengaruhi hasil kadar etanol seperti gas pembawa, kolom yang digunakan, suhu kolom, suhu detektor, dan suhu injektor. Dasar pemisahan secara kromatografi gas adalah penyebaran cuplikan diantara dua fase salah satu adalah fase diam dan fase yang lain adalah gas (fase gerak) yang mengelusi fase diam. Bila fase diam berupa zat padat, maka yang digunakan adalah Kromatografi Gas Padat (KGP). Proses pemisahan tersebut tergantung dari pemilihan fase diam (kolom) dan fase gerak yang digunakan. Contoh fase diam yang dapat digunakan adalah silika gel, ayakan molekul dan arang, sedangkan contoh fase gerak adalah hidrogen, helium, dan nitrogen. (Harold, 1988).

Menurut Harold (1988), Bagian dari suatu kromatografi gas adalah

1. Tangki gas pembawa

Tangki gas bertekanan tinggi berlaku sebagai sumber gas pembawa. Pada kromatografi gas suhu-tetap, ketetapan kolom tidak berubah selama analisis. Suatu pengatur tekanan digunakan untuk menjamin tekanan yang seragam pada pemasuk kolom sehingga diperoleh laju aliran gas yang tetap. Gas yang biasa dipakai adalah hidrogen, helium, dan nitrogen.

2. Gerbang suntik (lubang masuk cuplikan)

Cuplikan gas biasanya dimasukkan dengan alat *syringe* (jarum suntik).

### 3. Kolom

Pipa kolom dapat dibuat dari tembaga, baja nirkarat, alukunium, dan kaca. Kolom adalah jantung kromatografi karena pemisahan sesungguhnya komponen cuplikan dicapai dalam kolom. Karena itu, keberhasilan atau kegagalan suatu pemisahan sebgaiian besar bergantung pada pemilihan kolom

### 4. Detektor

Detektor menunjukkan adanya komponen dalam efluen dan mengukur kuantitasnya. Ciri detektor yang dikehendaki ialah kepekaannya tinggi, tanggap terhadap semua jenis senyawa, kuat, tidak peka terhadap perubahan aliran dan suhu serta murah harganya.

### 5. Perekam

Hasil akan direkam sebagai urutan puncak-puncak. Setiap puncak mewakili satu senyawa dalam campuran yang melalui detektor.

## J. Hipotesis

Berdasarkan Landasan teori, perumusan masalah, dan tujuan penelitian, maka dapat diajukan hipotesis sebagai berikut :

1. Penggunaan medium pati jagung yang optimal untuk menghasilkan gula reduksi adalah 4 % dengan waktu inkubasi selama 3 hari.
2. Tahap fermentasi pati jagung dengan menggunakan inokulum *Saccharomyces cerevisiae* menghasilkan kadar etanol yang maksimal pada kultur sekali unduh.

