

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Sifat Fisik, Khemis dan Produksi Alkohol

Alkohol adalah suatu cairan tak berwarna dengan bau yang menyengat, memiliki berat jenis pada suhu 15°C sebesar 0,7973 g/cm³ dan titik didih dengan tekanan 760 mmHg sebesar 78,32°C. Alkohol larut dalam air dan eter, nilai kalorinya sebesar 7100 kal/g dan pengapian dalam keadaan cair sebesar 328 kal (Tjokroadikoesoemo, 1993). Etanol disebut juga etil alkohol dengan rumus kimia C₂H₅OH. Titik didihnya 78,4°C. Alkohol mempunyai sifat tak berwarna, volatil dan dapat bercampur dengan air (Damajanti, 1994; Kartika, 1990).

Pembuatan alkohol dapat dilakukan dengan 2 cara, yaitu :

- a. Secara sintesis, yaitu dengan melakukan reaksi kimia untuk mengubah bahan baku menjadi alkohol, dimana kadarnya lebih mudah ditentukan.
- b. Secara fermentasi dengan menggunakan aktivitas mikrobia. Proses produksi alkohol yang diproduksi melalui proses fermentasi diketahui biayanya lebih murah dibandingkan dengan pembuatan alkohol secara sintesis (Suriawiria, 1985).

Menurut Stanburry & Whittaker (1984), alkohol merupakan hasil dari metabolisme primer fermentasi. Selain itu, metabolisme primer juga menghasilkan asam suksinat, gliserol, dan asam organik lainnya. Metabolisme primer adalah suatu proses metabolisme yang berguna untuk proses pertumbuhan sel dan pembentukan produk pada waktu yang bersamaan, kalau metabolit sekunder yaitu suatu proses

metabolisme yang digunakan untuk pertumbuhan sel, setelah sel mencapai pertumbuhan yang optimal maka akan dibentuk produk, contohnya antibiotik.

B. Fermentasi Alkohol

Fermentasi adalah proses perubahan senyawa organik menjadi senyawa yang lebih sederhana secara anaerob (tanpa memerlukan oksigen). Menurut Madigan *et al.* (2000), fermentasi merupakan reaksi katabolisme yang terjadi secara anaerob dan senyawa organik bertindak sebagai donor maupun akseptor elektron. Katabolisme adalah proses pemecahan senyawa yang kompleks menjadi senyawa yang sederhana dengan berat molekul yang lebih rendah (Martoharsono. S, 1993). ATP dari hasil fermentasi diperoleh melalui fosforilasi tingkat substrat.

Fermentasi disebabkan adanya aktivitas mikroorganisme penyebab fermentasi yang tumbuh pada substrat yang sesuai. Selama fermentasi akan terjadi perubahan akibat adanya enzim mikrobial yang menguraikan bahan pangan, misalnya perubahan keasaman, kadar gula, dan kandungan vitamin (Alcarno, 1984).

Pada proses pembuatan alkohol secara fermentasi terjadi penguraian karbohidrat, yaitu glukosa menjadi alkohol dan CO₂ dengan bantuan *Saccharomyces cerevisiae*. Reaksi kimia pada fermentasi alkohol dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Reaksi Kimia pada Fermentasi Alkohol (Sumber : Yuliani, 2003)

Alkohol yang diproduksi secara fermentasi dapat menggunakan bantuan bakteri yaitu *Zymomonas mobilis*, *Bacillus macerans*, *Bacillus acetoethylicus*, dan

atau khamir, yaitu *Saccharomyces cerevisiae*, *S. aerilius*, *S. lipolitika*, pada medium yang mengandung karbohidrat (glukosa dan sukrosa) (Crueger & Crueger, 1990; Lee, 1987).

Menurut Crueger & Crueger (1990), mikrobia yang sering digunakan untuk proses fermentasi dari golongan bakteri digunakan *Zymomonas mobilis* sedangkan dari golongan khamir sering digunakan *Saccharomyces cerevisiae*. Pernyataan ini diperjelas oleh Fardiaz (1992), yang menyatakan bahwa *Saccharomyces cerevisiae* tergolong dalam khamir yang disebut *top yeast*, yaitu khamir yang bersifat fermentatif kuat, mampu tumbuh pada keadaan asam dengan pH 4-4,5.

Fermentasi alkohol dapat dilakukan melalui sistem *batch* (sekali unduh). Fermentasi tipe ini merupakan sistem tertutup karena tidak ada penambahan nutrisi. Pengaturan kondisi aerob dilakukan terlebih dahulu dalam sistem *batch* dengan tujuan untuk memperoleh biomassa sel yang maksimum. Jika diatur kondisi anaerob terlebih dahulu maka densitas sel tidak tinggi, ini dikarenakan energi yang digunakan untuk pertumbuhan dan untuk proses produksi alkohol pada kondisi anaerob lebih kecil dibanding pada kondisi aerob (Crueger & Crueger, 1990).

Proses fermentasi alkohol umumnya berada dalam suasana asam dengan pH 4-4,5 (pH yang rendah), sehingga perlu penambahan asam selama proses yaitu dengan asam sitrat. Apabila pada medium terjadi keadaan asam dibawah pH optimum maka sel *Saccharomyces cerevisiae* akan membentuk spora, dimana spora akan melindungi sel *Saccharomyces cerevisiae* yang berada pada kondisi yang ekstrim, yaitu lingkungan yang tidak mendukung untuk pertumbuhan dan

perkembangan sel. Adapun Suhu yang diperlukan untuk pertumbuhan berkisar antara 30-37°C (Suriawiria, 1985).

Menurut Crueger & Crueger (1990), proses fermentasi terdiri dari empat tahap, yaitu :

- a. Tahap penyimpanan dan pemeliharaan inokulum. Pada tahap ini inokulum dijaga agar tidak melakukan pembelahan sel dengan menempatkan inokulum pada suhu yang dingin (-4 - 0°C).
- b. Tahap perbanyak inokulum. Inokulum ditumbuhkan pada medium pertumbuhan. Hal ini digunakan untuk proses adaptasi. Medium yang digunakan lebih sedikit dibanding pada prefermentasi (starter 1).
- c. Tahap prefermentasi, yaitu tahap perbanyak jumlah biomassa sel yang berfungsi sebagai starter (starter 2).
- d. Tahap fermentasi, yaitu tahap perbanyak jumlah biomassa sel yang siap untuk melakukan fermentasi untuk menghasilkan alkohol.

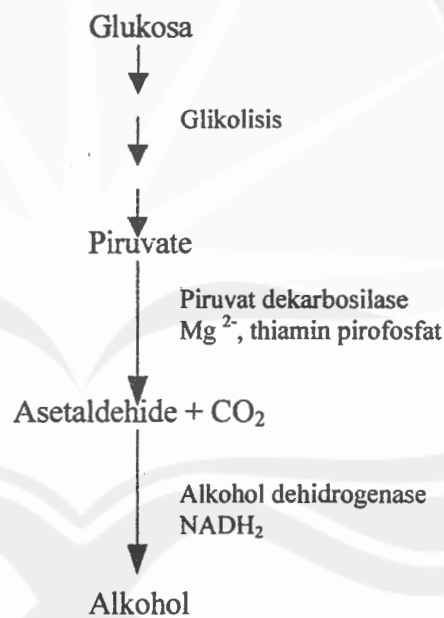
C. Katabolisme Alkohol

Menurut Fardiaz (1992), fermentasi glukosa menghasilkan asam piruvat pada tahap pertama. Pemecahan glukosa yang diubah ini terjadi pada jalur pemecahan glukosa. Adapun jalur glukosa yang terdapat pada mikrobia ada berbagai macam jalur salah satunya adalah jalur *Embden-Meyerhoff-Parnas* (EMP) atau dikenal sebagai jalur glikolisis.

Menurut Moss & Smith (1977), proses fermentasi alkohol umumnya terjadi dalam 2 tahap yaitu

1. Pemecahan rantai karbon dari polisakarida dan pelepasan paling sedikit dua pasang atom hidrogen (terjadi proses oksidasi), yang menghasilkan senyawa glukosa.
2. Pemecahan senyawa glukosa yang dihasilkan menjadi produk fermentasi.

Menurut Crueger & Crueger (1990), biosintesis alkohol dapat dilihat seperti Gambar 2.



Gambar 2. Biosintesis Alkohol (Sumber : Crueger & Crueger, 1990)

Menurut Stanburry & Whittaker (1984), alkohol diperoleh akibat perubahan substrat yang awalnya memerlukan oksigen untuk pertumbuhan optimal khamir yang dalam hal ini adalah *Saccharomyces cerevisiae*. Kemudian bersamaan dengan itu energi (ATP) yang terbentuk diubah menjadi alkohol. Gill *et al.* (1996),

menambahkan bahwa alkohol akan diperoleh dari metabolisme primer yang dihasilkan sejak awal pertumbuhan.

D. Pola Pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae tergolong dalam genus *Saccharomyces* yang berbentuk oval atau memanjang. *Saccharomyces cerevisiae* mempunyai panjang sel 1-50 μm , dan lebar 1-10 μm (Volk & Wheeler, 1988). Khamir termasuk fungi, khamir bersifat uniseluler dan hidup berkoloni (Fardiaz, 1992).

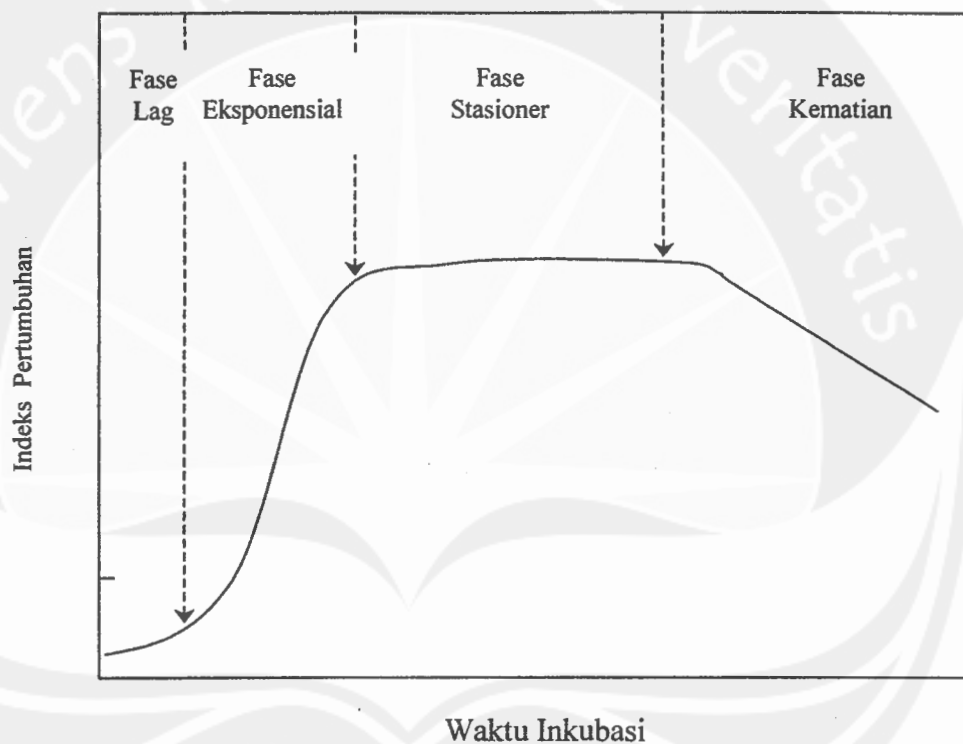
Menurut Yarrow (1984), klasifikasi *Saccharomyces cerevisiae* adalah sebagai

berikut :

- Divisio : Eumycota
- Sub divisio : Ascomycotina
- Klas : Hemiascomycetes
- Ordo : Endomycetales
- Familia : Saccharomycetaceae
- Sub familia : Saccharomycetoideae
- Genus : *Saccharomyces*
- Spesies : *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae mempunyai struktur seperti khamir lainnya yaitu terdiri dari dinding sel dan membran sel. Dinding sel terdiri dari senyawa polisakarida (glukan, mangan, protein, khitin, dan lipid). Lapisan membran selnya terdiri dari lipoprotein, di dalamnya terdapat enzim-enzim yang diperlukan untuk sintesis sebagian komponen dinding sel (Amaria *et al.*, 1999).

Saccharomyces cerevisiae dapat membentuk 9 sampai 43 tunas per sel dengan rata-rata 24 tunas per sel dan paling banyak terdapat pada ke-2 ujung sel yang memanjang. Pada kondisi ideal, sel khamir dapat tumbuh menjadi 2 sel dalam waktu 1-2 jam, tetapi setelah terbentuk banyak tunas, waktu generasi menjadi lebih lama sampai ± 6 jam (Fardiaz, 1992).



Gambar 3. Fase Pertumbuhan Mikrobia pada Proses Fermentasi dengan Sistem Sekali Unduh (Sumber : Yousef & Carlstorm, 2003)

Pola pertumbuhan sel dapat diketahui dari peningkatan dan penurunan jumlah sel yang membentuk pola pertumbuhannya, pola ini dibuat dalam sebuah kurva pertumbuhan. Kurva pertumbuhan untuk populasi sel mikrobia dalam sistem *batch* diilustrasikan pada Gambar 3. Kurva pertumbuhan tersebut dibagi menjadi 4 fase yaitu fase lag, fase eksponensial, fase stasioner, dan fase kematian (Yousef &

Carlstorm, 2003). Fase lag mengawali fase pertumbuhan eksponensial dan dalam fase ini mikroorganisme beradaptasi dengan lingkungan barunya. Fase eksponensial merupakan fase penambahan jumlah dan massa mikroorganisme yang terjadi dengan cepat. Fase stasioner merupakan fase yang terjadi setelah fase eksponensial. Jumlah nutrien berkurang dan terjadi akumulasi metabolit, contohnya alkohol dan asam-asam, yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Jumlah sel tidak mengalami peningkatan maupun penurunan pada fase stasioner. Jumlah sel akan mengalami penurunan pada fase kematian ini dikarenakan pada fase stasioner nutrien yang diperlukan dalam pertumbuhan semakin berkurang sehingga jumlah sel hidup sama dengan jumlah sel yang mati (Yousef & Carlstorm, 2003).

Khamir dibedakan menjadi dua kelompok berdasarkan sifat metabolismenya yaitu khamir fermentatif dan khamir oksidatif. *Saccharomyces cerevisiae* termasuk dalam khamir fermentatif dan oksidatif. *Saccharomyces cerevisiae* bersifat fermentatif pada saat kondisi lingkungan anaerob karena dapat melakukan fermentasi alkohol yaitu dengan memecah glukosa melalui jalur glikolisis atau EMP (*Embden Meyerhoff-Parnas*) menghasilkan alkohol. *Saccharomyces cerevisiae* bersifat oksidatif pada saat kondisi lingkungan aerob atau pada saat proses pertumbuhan sel *Saccharomyces cerevisiae* karena sebagian glukosa dapat dioksidasi menjadi karbondioksida dan air, sehingga alkohol yang dihasilkan sedikit, kedua sifat tersebut terjadi pada saat *Saccharomyces cerevisiae* berada pada jalur glikolisis, selain itu kedua jalur tersebut terdapat pada mikrobia yang hidup dengan sifat aerob fakultatif (Fardiaz, 1992).

Menurut Caldwell (1995), kadar gula (sukrosa dan atau glukosa) sangat diperlukan bagi pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae*. Gula bagi khamir ini diperlukan sebagai penyusun sebagian besar komponen protoplasma. Selain itu, gula (glukosa dan atau sukrosa) dapat digunakan sebagai sumber energi untuk menghasilkan produk tertentu khususnya alkohol.

Proses fermentasi dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain suhu, konsentrasi gula, pH, tersedianya oksigen dan nutrisi (Pulungan *et al.*, 1993). Guerzoni *et al.* (1997), menambahkan bahwa *Saccharomyces cerevisiae* dalam fermentasi alkohol memerlukan kondisi faktor lingkungan yang sesuai. Strain mesofilik *Saccharomyces* dapat tumbuh secara optimum pada temperatur 28-35 °C (Atkinson & Mavituna, 1991). Khamir pada umumnya dapat tumbuh dan secara efisien melakukan fermentasi etanol pada pH 3,5-6,0 (Kosaric *et al.*, 1983). *Saccharomyces cerevisiae* memiliki kemampuan untuk menggunakan berbagai jenis gula yaitu glukosa, fruktosa, galaktosa, sukrosa, maltosa, manosa, rafinosa, trehalosa dan maltotriosa (Kosaric *et al.*, 1983).

Menurut Pirsellova *et al.* (1993), *Saccharomyces cerevisiae* dapat melakukan fermentasi alkohol pada kisaran konsentrasi gula yang berkisar kurang lebih 2-30%. Fermentasi alkohol diperlukan perlakuan awal, karena perlakuan awal ternyata dapat menentukan kadar alkohol yang dihasilkan dengan cara fermentasi. Perlakuan awal tersebut antara lain dapat menentukan biomassa sel *Saccharomyces cerevisiae*, dan pH awal yang harus dijaga dalam kisaran 4-4,5.

Kondisi optimal untuk pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* berada pada kondisi aerob hal ini dikarenakan pada kondisi aerob sel akan memanfaatkan

kandungan gula yang ada untuk menghasilkan bahan-bahan sel 20 kali lipat dibanding kondisi anaerob. Kondisi anaerob lebih banyak dihasilkan alkohol dibanding perbanyakan sel (Pelczar, 1986).

E. Molase (tetes tebu) sebagai Sumber C untuk Fermentasi Alkohol

Tetes tebu merupakan hasil sampingan proses pembuatan gula. Molase (tetes tebu) mengandung sejumlah gula baik sukrosa maupun gula pereduksi (Tabel. 1).

Total kandungan gula berkisar 48-56% sedangkan pHnya 5,5-6,5.

Tabel 1. Komposisi Molase

Komposisi Nutrisi Molase	%
Air	17-25
Sukrosa	30-40
Glukosa	4-9
Fruktosa	5-12
Gula pereduksi	1-5
Karbohidrat lain	2-5
Abu	7-15
Komponen nitrogen	2-6
Asam bukan nitrogen	2-6
Fosfolipid	0,1-1

(Sumber : Judoatmidjojo *et al.*, 1992).

Pembuatan alkohol dengan menggunakan molase harus mendapatkan perlakuan pendahuluan, yaitu pengenceran molase. Hal ini disebabkan karena molase bersifat kental, kadar gula dan pHnya masih terlalu tinggi serta nutrisi yang diperlukan oleh mikrobial belum mencukupi dalam molase tersebut. Molase yang digunakan dalam pembuatan alkohol harus diencerkan terlebih dahulu dengan air sehingga konsentrasi gulanya menjadi 14-18 %. Jika konsentrasi gula terlalu tinggi akan mengakibatkan terjadinya plasmolisis dinding sel khamir sehingga menyebabkan kematian, terjadinya plasmolisis pada dinding sel ini disebabkan

karena terjadinya perbedaan konsentrasi cairan didalam sel dan lingkungan, dimana konsentrasi lingkungan lebih tinggi dibanding konsentrasi cairan didalam sel sehingga cairan didalam sel keluar ke lingkungan. Kadar alkohol yang dihasilkan bila terlalu tinggi akan menghambat aktivitas khamir tersebut. Akibat lain yang ditimbulkan adalah waktu fermentasinya lebih lama dan sebagian gula tidak terkonversi sehingga proses fermentasi menjadi tidak ekonomis (Judoatmidjojo *et al.*, 1992).

Perbandingan komposisi antara medium molase dan jumlah biomassa sel *Saccharomyces cerevisiae* yang digunakan untuk proses fermentasi menunjukkan bahwa medium molase masih kurang akan beberapa sumber nutrisi seperti N, P, K, Mg, Zn, dan S, sehingga untuk memperoleh pertumbuhan yang optimal unsur-unsur tersebut perlu ditambahkan (Wibowo, 1989a).

F. Amonium Sulfat sebagai Sumber N

Kebutuhan akan nitrogen oleh mikrobial dapat dipenuhi dari senyawa anorganik. Sebenarnya senyawa nitrogen organik dapat memberikan pertumbuhan yang lebih baik tetapi jarang digunakan karena senyawa nitrogen organik lebih mahal, selain itu sel tidak mampu mensintesis senyawa nitrogen organik tertentu yang dibutuhkan untuk pertumbuhan (Wijono *et al.*, 1983). Menurut Williems & Wimpeny (1997), konsentrasi nitrogen dalam medium dapat meningkatkan jumlah polisakarida yang terbentuk. Lebih lanjut Jutono *et al.* (1975), menambahkan fungsi nitrogen bagi *Saccharomyces cerevisiae* adalah sebagai penyusun protein, asam nukleat dan koenzim. Protein untuk organisme yang sedang tumbuh berguna sebagai

penyusun biomolekul yang berperan dalam proses biokimiawi dan pembentukan sel baru.

Senyawa nitrogen yang umumnya ditambahkan pada medium molase adalah amonium sulfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) sebanyak 70-400g/100 l cairan molase. Sumber unsur nitrogen selain amonium sulfat dapat juga digunakan asam amino, peptida, pepton, nitrat, atau urea (Judoatmidjojo *et al.*, 1992). *Saccharomyces cerevisiae* membutuhkan sekitar 6,5-10% sumber N untuk proses fermentasi, senyawa nitrogen anorganik seperti amonium sulfat, garam amonia, amonia dan urea dapat ditambahkan, pemilihan sumber N didasarkan atas biaya (Wibowo, 1989b).