

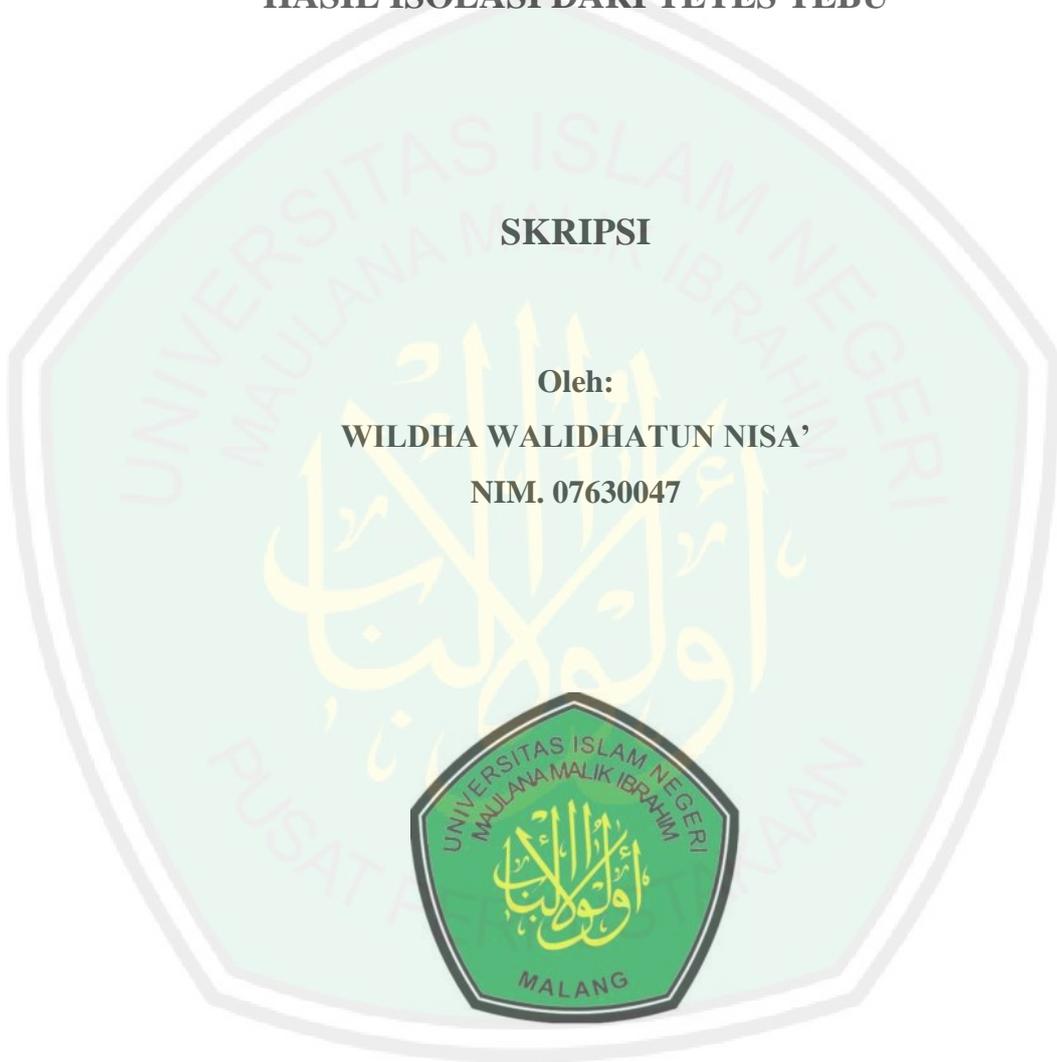
**PRODUKSI BIOETANOL DARI ONGGOK (LIMBAH PADAT
TAPIOKA) DENGAN PROSES SAKARIFIKASI DAN
FERMENTASI SERENTAK MENGGUNAKAN KHAMIR
HASIL ISOLASI DARI TETES TEBU**

SKRIPSI

Oleh:

WILDHA WALIDHATUN NISA'

NIM. 07630047



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2014**

**PRODUKSI BIOETANOL DARI ONGGOK
(LIMBAH PADAT TAPIOKA) DENGAN
PROSES SAKARIFIKASI DAN FERMENTASI SERENTAK
MENGUNAKAN KHAMIR HASIL ISOLASI
DARI TETES TEBU**

SKRIPSI

**Diajukan Kepada:
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)**

Oleh:

**WILDHA WALIDHATUN NISA'
NIM. 07630047**

**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI (UIN)
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
2014**

SURAT PERNYATAAN ORISINIL PENELITIAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Wildha Walidhatun Nisa'
NIM : 07630047
Fakultas/Jurusan : Sains dan Teknologi/Kimia
Judul Penelitian : Produksi Bioetanol dari Onggok (Limbah Padat Tapioka) dengan Proses Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak menggunakan Khamir Hasil Isolasi dari Tetes Tebu.

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa hasil penelitian saya ini tidak terdapat unsur-unsur penjiplakan karya penelitian atau karya ilmiah yang pernah dilakukan atau dibuat oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah atau disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata hasil penelitian ini terbukti terdapat unsur-unsur jiplakan, maka saya bersedia untuk mempertanggung jawabkan, serta diproses sesuai peraturan yang berlaku.

Malang, 08 Juli 2014

Yang Membuat Pernyataan,

Wildha Walidhatun Nisa'
NIM. 07630047

**PRODUKSI BIOETANOL DARI ONGGOK
(LIMBAH PADAT TAPIOKA) DENGAN
PROSES SAKARIFIKASI DAN FERMENTASI SERENTAK
MENGUNAKAN KHAMIR HASIL ISOLASI
DARI TETES TEBU**

SKRIPSI

Oleh:
Wildha Walidhatun Nisa'
NIM.07630047

Telah disetujui oleh:

Pembimbing Utama

Pembimbing Agama

Akyunul Jannah, S.Si, M.P
NIP.19750410 200501 2 009

Tri Kustono Adi, M.Sc
NIP.19710311 200312 1 002

Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang

Elok Kamila Hayati, M.Si
NIP.1979020 200604 2 002

**PRODUKSI BIOETANOL DARI ONGGOK
(LIMBAH PADAT TAPIOKA) DENGAN
PROSES SAKARIFIKASI DAN FERMENTASI SERENTAK
MENGUNAKAN KHAMIR HASIL ISOLASI
DARI TETES TEBU**

SKRIPSI

Oleh:
Wildha Walidhatun Nisa'
NIM.07630047

**Telah Dipertahankan di Depan Penguji Tugas Akhir dan
Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan Untuk
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)**

Malang, 10 Juli 2014

Susunan Dewan Penguji	Tanda Tangan
1. Penguji Utama : A. Ghanaim Fasya, S.Si, M.Si NIP. 19820616 200604 1 002	(_____)
2. Ketua Penguji : Diana Candra Dewi, M.Si NIP. 19770720 200312 2 001	(_____)
3. Sekretaris : Akyunul Jannah, S.Si, M.P NIP. 19750410 200501 2 009	(_____)
4. Anggota : Tri Kustono Adi, M.Sc NIP. 19710311 200312 1 002	(_____)

**Mengetahui dan Mengesahkan,
Ketua Jurusan Kimia**

**Elok Kamila Hayati, M.Si
NIP.1979020 200604 2 002**

MOTTO

**.... Verily never will Allah change the condition of a people until
They change it themselves (with their own souls)...**

(Ar ra'd: 11)

Tanamlah gagasan, petiklah tindakan. Tanamlah tindakan, petiklah kebiasaan.
Tanamlah kebiasaan, petiklah watak. Tanamlah watak, petiklah nasib. Dimulai
dari gagasan yang diwujudkan dalam tindakan, kemudian tindakan yang dilakukan
berulang-ulang akan menjadi suatu kebiasaan. Kebiasaan yang dilakukan berkali-
kali akan menjelma menjadi watak, dan watak inilah yang akhirnya mengantarkan
kita kepada nasib. Jadi nasib kita, kita sendirilah yang menentukan.

Nasib kita ada di tangan kita.

(Samuel Smiles)

HALAMAN PERSEMBAHAN

Skripsi ini Kupersembahkan untuk:

Allah yang Maha Segalanya, tiada daya dan upaya tanpa ijin dari Engkau Ya Rabb..

Puji syukur senantiasa kupanjatkan hanya padaMu.

Nabiyullah, sholawat serta salam senantiasa tercurahkan kepadamu, Junjunganku

Nabi Muhammad SAW.

Kedua orang tuaku yang terkasih: H. Sukardi Rahmat dan Hj. Siti Artilah yang dengan sepenuh hati mengasuh, mendidik, membimbing dan selalu berdo'a dengan ikhlas untuk kebaikan dan kebahagiaan putrinya.

Saudaraku tersayang Mbak Himma juga Pak Uuk yang selalu memberiku bantuan dan motivasi, juga si Kecil Aila yang selalu menghibur dengan tingkah lucunya.....

Dosen Kimia yang terhormat: Bu Elok, Bu Akyun, Bu Anik, Bu Diana, Bu Rachma, Bu Suci, P. Tri, P. Naim, Terima kasih untuk semua ilmu yang telah bapak dan Ibu berikan, Allah yang akan membalas kebaikan Bapak Ibu.

Laboran Jurusan Kimia: Maz abi, Maz Taufik, Mbak Mei, Mbak Susi, Mbak Rika, Mb Is, yang selalu memberiku bantuan selama berada di laboratorium.....

Dan Admin Jurusan Kimia: Mbak Ana Yang selalu memberiku bantuan selama berada di jurusan kimia....

Teman Spesialku, Zilah, teman seperjuangan, **akhirnya kita bisa^_^**

Dan untuk teman2 angkatan '07, Trimakasih Atas Motivasinya.....

Teman-temanku seperjuangan di Lab; Dinar, Zahra, Hendi, Lu'ul, Asad, Ihya', Alfin, tanpa kalian Lab akan terasa sepi ^_^

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah SWT, dengan segala taufik dan hidayah-Nya serta inayah-Nya yang senantiasa terlimpahkan kepada hambanya, sehingga penulisan skripsi dengan judul **“Produksi Bioetanol Dari Onggok (Limbah Padat Tapioka) Dengan Proses Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak Menggunakan Khamir Hasil Isolasi Dari Tetes Tebu”** dapat terselesaikan.

Untaian sholawat beriringan salam selalu tercurahkan kepada sang Pangeran di muka bumi ini yaitu Nabiyullah Muhammad SAW, sehingga kita dapat merangkul damainya dunia dengan Islam, agama yang paling sempurna di sisi Allah SWT.

Dalam menyusun proposal penelitian ini, penulis mendapat banyak bantuan, bimbingan, dan arahan dari berbagai pihak. Oleh sebab itu, dalam kesempatan ini penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih yang tulus kepada:

1. Bapak Prof. Dr. Mudjia Rahardjo selaku Rektor Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang beserta stafnya.
2. Ibu Dr. Hj. Bayyinatul M, drh, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi, UIN Maulana Maliki Ibrahim Malang.
3. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si selaku Ketua Jurusan Kimia, yang telah memberikan ilmunya dan perhatian.
4. Keluarga tercinta yang telah membantu penulis dengan do'a dan dukungan dalam berbagai hal.

5. Ibu Akyunul Jannah, M.P dan Bapak Tri Kustono Adi, M.Sc selaku dosen pembimbing, serta Ibu Anik Maunatin, M.P selaku dosen konsultan.
6. Bapak A. Ghanaim Fasya, M.Si dan Ibu Diana Candra Dewi, M.Si selaku dosen penguji.
7. Segenap Dosen Fakultas Sains dan Teknologi dan seluruh staf Laboratorium dan Administrasi Jurusan Kimia atas seluruh bantuan selama penyelesaian skripsi ini.

Semoga arahan, motivasi, dan bantuan yang telah diberikan menjadi amal ibadah, sehingga memperoleh balasan yang lebih baik dari Allah SWT.

Penulis menyadari bahwa karya ini jauh dari kesempurnaan dan banyak kekurangan, untuk itu penulis mengharapkan kritik dan saran dari segenap pembaca dan pemerhati. Penulis berharap semoga karya ini dapat bermanfaat bagi penulis khususnya dan pembaca pada umumnya.

Malang, 04 Juli 2014

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman Pengesahan	iii
Halaman Persetujuan	iv
Motto	v
Halaman Persembahan	vi
Kata Pengantar	viii
Daftar Isi	ix
Daftar Gambar	xiii
Daftar Tabel	xiv
Daftar Lampiran	xv
Abstrak	xvi
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	8
1.3 Tujuan Penelitian	8
1.4 Batasan Penelitian	8
1.5 Manfaat Masalah	9
BAB II KAJIAN PUSTAKA	
2.1 Onggok (Limbah Padat Tapioka)	10
2.2 Pati (<i>Starch</i>)	14
2.3 Bioetanol	17
2.4 Pembuatan Bioetanol secara Fermentatif	22
2.5 Proses Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak (SFS)	29
2.6 Enzim α -amilase	31
2.7 Khamir (<i>Yeast</i>)	33
2.8 Penentuan Kadar Glukosa dengan Metode DNS (3,5-Dinitrosalisilat)	38
2.9 Pemisahan Bioetanol Hasil Fermentasi dengan Metode Destilasi	40
2.10 Pengukuran Kadar Etanol dengan Konversi Berat Jenis	43
2.11 Pemanfaatan Onggok untuk Produksi Bioetanol dalam Perspektif Islam	45
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	
3.1 Waktu dan Tempat	49
3.2 Alat dan Bahan Penelitian	49
3.2.1 Alat Penelitian	49
3.2.2 Bahan Penelitian	49
3.3 Rancangan Penelitian	50
3.4 Tahapan penelitian	51
3.5 Cara Kerja	51

3.5.1	Sterilisasi Alat	51
3.5.2	Pembuatan Media	52
	3.5.2.1 Pembuatan Media YPGA (<i>Yeast Extract Pepton Glucose Agar</i>)	52
	3.5.2.2 Pembuatan Media YPGGB (<i>Yeast Extract Pepton Glucose Broth</i>)	52
3.5.3	Regenerasi Khamir (Kh 2)	53
3.5.4	Pembuatan Inokulum	53
3.5.5	Preparasi Sampel	53
3.5.6	Sakarifikasi Limbah Padat Tapioka menjadi Glukosa	54
3.5.7	Uji Aktivitas Enzim Amilase	54
3.5.8	Fermentasi Limbah Padat Tapioka menggunakan Khamir (Kh2) Hasil Isolasi dari Tetes Tebu	55
3.5.9	Pemisahan Fasa Cair Hasil Fermentasi Menggunakan Destilasi.....	55
3.5.10	Penentuan Kadar Etanol	55
	3.5.10.1 Penentuan Berat Jenis Etanol p.a	55
	3.5.10.2 Pengukuran Kadar Alkohol dengan Metode Konversi Berat Jenis	56
3.5.11	Penentuan Kadar Glukosa menggunakan Metode DNS	57
	3.5.11.1 Penentuan Panjang Gelombang maksimum	57
	3.5.11.2 Pembuatan Kurva Standar Glukosa	57
	3.5.11.3 Analisis Glukosa menggunakan DNS	58
3.6	Analisa Data	58
 BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN		
4.1	Preparasi Sampel	59
4.2	Regenerasi Khamir (Kh 2) pada Media Padat (YPGB)	62
4.3	Sakarifikasi Limbah Padat Tapioka menjadi Glukosa	64
4.4	Uji Aktivitas Enzim Amilase	67
4.5	Produksi Etanol dengan proses Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak	69
4.6	Pemisahan Hasil Fermentasi dengan Destilasi	74
4.7	Penentuan Kadar Etanol dengan Metode Konversi Berat Jenis	77
4.8	Pengaruh Variasi pH dan Lama Fermentasi Terhadap Kadar Etanol	78
4.9	Analisis Kadar Glukosa Sisa Fermentasi	82
4.10	<i>Yield</i> Bioetanol	86
4.11	Pemanfaatan Onggok Sebagai Media Fermentasi Untuk Menghasilkan Bioetanol Dalam Perspektif Islam	88
 BAB V PENUTUP		
5.1	Kesimpulan	91

5.2	Saran	91
	DAFTAR PUSTAKA	92
	LAMPIRAN	97



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Onggok (Limbah Padat Tapioka)	11
Gambar 2.2	Struktur Amilosa	15
Gambar 2.3	Struktur Amilopektin	16
Gambar 2.4	Struktur Etanol	17
Gambar 2.5	Skema Perubahan Glukosa menjadi Alkohol.....	24
Gambar 2.6	Kurva Pertumbuhan Kultur Mikroba	35
Gambar 2.7	Bagian Destilasi sederhana	41
Gambar 4.1	(a) Onggok yang telah dikeringkan	60
	(b) Sampel yang telah dihaluskan	60
Gambar 4.2	Sampel yang telah melalui Proses Gelatinisasi	61
Gambar 4.3	Karakter Fisik Khamir (Kh 2) Pada Hari ke-2	63
Gambar 4.4	Cara Kerja Enzim α -amilase Memutus Ikatan Glikosidik α -1,4	65
Gambar 4.5	Lintasan Embden Meyerhof-Parnas	73
Gambar 4.6	Reaksi Fermentasi Alkohol Onggok	74
Gambar 4.7	Kurva Hubungan Massa Jenis dan Konsentrasi Etanol	78
Gambar 4.8	Pengaruh Variasi pH dan Lama Fermentasi terhadap Kadar Etanol	80
Gambar 4.9	Reaksi DNS dengan Glukosa	83

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Komposisi Ubi Kayu/Singkong (per 100 gram bahan)	12
Tabel 2.2	Komposisi Nutrisi Onggok	12
Tabel 2.3	Sifat Fisik Etanol	18
Tabel 2.4	Konversi Berat Jenis-Kadar Etanol (v/v)	44
Tabel 3.1	Kombinasi Perlakuan antara Pengaruh pH dan Lama Fermentasi	50
Tabel 4.1	Kadar Glukosa	67
Tabel 4.2	Volume Destilat Hasil Fermentasi	76
Tabel 4.3	Data Massa Jenis Etanol p.a	77
Tabel 4.4	Kadar Etanol Hasil Fermentasi	79
Tabel 4.5	Kadar Gula Sisa Setelah Fermentasi	84
Tabel 4.6	Yield Bioetanol	87

DARTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Diagram Alir Penelitian	97
Lampiran 2	Pembuatan Larutan HCl 7 %	103
Lampiran 3	Perhitungan Pembuatan Reagen	103
Lampiran 4	Pembuatan Konsentrasi Glukosa Standart 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 mg/mL	103
Lampiran 5	Kurva Standar Glukosa	105
Lampiran 6	Analisis Kadar Gula Metode DNS (3,5-Dinitrosalisilat)	105
Lampiran 7	Penentuan Nilai Aktivitas Enzim Amilase	109
Lampiran 8	Destilasi Hasil Fermentasi	110
Lampiran 9	Analisis Kadar Bioetanol Hasil Fermentasi Menggunakan Metode Konversi Berat jenis	111
Lampiran 10	Pengaruh Variasi pH dan Lama Fermentasi Terhadap Kadar Bioetanol	117
Lampiran 11	Dokumentasi Penelitian	122
Lampiran 12	Daftar Tabel t dan Tabel F (P = 0,05)	124

ABSTRAK

Nisa', W. 2014. Produksi Bioetanol Dari Onggok (Limbah Padat Tapioka) Dengan Proses Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak Menggunakan Khamir Hasil Isolasi Dari Tetes Tebu. Skripsi. Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing : (I) Akyunul Jannah, S. Si, M.P. (II) Anik Maunatin, S.T, M.P.

Kata Kunci : Onggok, Khamir, pH, Lama Fermentasi, dan Bioetanol.

Onggok merupakan limbah padat dari industri pembuatan tepung tapioka yang masih mengandung kadar pati tinggi yaitu 63 % sehingga dapat dimanfaatkan sebagai media fermentasi. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh pH dan lama fermentasi terhadap produksi bioetanol dengan proses sakarifikasi dan fermentasi serentak menggunakan khamir hasil isolasi dari tetes tebu.

Penelitian ini terdiri dari proses sakarifikasi, fermentasi etanol, dan pemisahan bioetanol dari media fermentasi. Sakarifikasi pati menjadi glukosa dilakukan menggunakan enzim α -amilase dan penentuan kadar glukosa ditentukan dengan metode DNS (3,5-Dinitrosalisilat). Proses fermentasi dilakukan dengan variasi pH 4; 4,5; 5, dan lama fermentasi selama 5; 7; 9; 11 hari. Bioetanol hasil fermentasi dipisahkan dari media fermentasi dengan metode destilasi fraksinasi dan untuk mengukur kadar bioetanol digunakan metode konversi berat jenis. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan analisis varians (ANOVA) dan dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) 5 %.

Kadar bioetanol tertinggi diperoleh 7,303 % dengan nilai yield 84,91 % dan kadar gula sisa fermentasi 1,157 %. Hasil analisis menggunakan uji ANOVA ($\alpha=5$ %) menunjukkan bahwa pH dan lama fermentasi berpengaruh nyata terhadap kadar bioetanol hasil fermentasi. Uji BNT menyatakan bahwa perlakuan D_3T_2 (pH 5 dan lama fermentasi 7 hari) dengan kadar bioetanol 7,303 % dan nilai kadar gula sisa fermentasi 1,157 % merupakan perlakuan yang berbeda nyata.

ABSTRACT

Nisa', W. 2014. Bioethanol Production from Onggok (Solid Waste of Tapioca) with Simultaneous Saccharification and Fermentation Process Using Yeast as Result of Cane Molasses. Thesis. Chemistry Department, Faculty of Science and Technology, State Islamic University Maulana Malik Ibrahim of Malang. Advisor: Akyunul Jannah, S.Si, M.P, Anik Maunatin, S.T, M.P, and Tri Kustono Adi, M.Sc.

Keywords: Onggok, Yeast, pH, Fermentation Period, and Bioethanol

Onggok is solid waste of tapioca industries which contains high starch concentration, for about 63 %, that it is very potential to be used as fermentation media. Fermentation of onggok to produce bioethanol becomes an alternative to decrease of waste and sufficient fuel that increase every years. The purpose of this study is to know the influence of pH and fermentation period towards bioethanol production from onggok with simultaneous saccharification and fermentation process using yeast from cane molasses.

The sequence of this research were fermentation process and separation of bioethanol from the media. Saccharification of tapioca starch into glucose by α -amylase enzyme and glucose amount result were determined using DNS (3,5-Dinitrosalicylic) method. Fermentation process is achieved with two variations i.e pH (pH 4; 4,5; 5) and fermentation period variations (5; 7; 9; 11 days). Bioethanol separated from fermentation media used fractional distillation and pure bioethanol concentration can be measured by density conversion method. The data obtained was analyzed using ANOVA and will be tested by LSD (Least Significant Difference) 5 %.

The highest bioethanol concentration achieved 7,30 %, with yield value is 84,91 %, and glucose concentration of fermentation residue is 1,16 %. The analysis result ANOVA ($\alpha=5$ %) test shows that pH and fermentation period really influence the bioethanol concentration resulted from the fermentation. LSD test shows that D_3T_2 treatment (pH 5 and 7 days of fermentation period) with 7,30 % bioethanol concentration is a truly different treatment.

الملخص

نساء. 2014. انتاج الإيثانول من اعكوء (نفاية صلب التايوكا) بعملية السكرفكس والتخمير معا با
 استخدام خمير نتيجة العزلة من دبس السكر. المقالة. شعبلة الكيمياء، كلية العلوم و التكنولوجيا،
 جامعة الإسلامية الحكومية مولانا مالك إبراهيم. بمالانج.
 تحت إشراف : أعين اللجنة الما جستير، أنيك معونة الما جستير، ترى كوسطانو ادى الما جستير.

كلمة رئيسية: اعكوء، خمير، الهيدروجين الطاقة، و زمان التخمير، و إيثانول.

كان اعكوء نفاية صلبة من مصنع التايوك التي تحتوي قدر السري الكشيرة 63 المئة نستطيع ان
 تستعمل لو سيلة التخمير. يهدف هذا البحث لمعرفة أثار الهيدروجين الطاقة و زمان التخمير على إنتاج
 الإيثانول بإستعمال التخمير نتيجة العزلة من دبس السكر.

احتوى خطوات هذا البحث على عملية التخمير و تفريق الإيثانول من و سيلة التخمير. تعقد عملية
 التخمير با استخدام الهيدروجين الطاقة أربعة، أربعة و نصف، و خمسة، و على أزمنة هي خمسة، و سبعة، و
 تسعة واحد عشر يوما. الإيثانول مفصولة بتجيء التقطير و لتعريف نقيه الإيثانول بطريقة تحويل الثقال النوعي.
 و سوف تحلل هذه المعطيات بتحليل التباين (أنوفا) و باختبار الفرق كبير الأقل خمسة في المئة.

فمحتوى الإيثانول العليا يحصل 7,30 في المئة محصوله 84,91 في المئة مع الباقية 1,16 في المئة. نتا
 ثج التحليل بتحليل التباين أنوفا خمسة في المئة قد حصل أن اختلاف الهيدروجين الطاقة و زمان التخمير مؤثر
 على محتوى الإيثانول. يدل أن اختبار الفرق كبير الأقل من عملية الهيدروجين الطاقة خمسة في سبعة أيام بالعه
 جه اختلافًا كبيرًا.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Allah SWT berfirman dalam QS. Ali Imran: 190-191:

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَاخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ لَآيَاتٍ لِّأُولِي الْأَلْبَابِ ﴿١٩٠﴾ الَّذِينَ يَذْكُرُونَ
 اللَّهَ قِيَمًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَطْلًا
 سُبْحَانَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ ﴿١٩١﴾

“Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, dan silih bergantinya malam dan siang terdapat tanda-tanda bagi orang-orang yang berakal, (yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri atau duduk atau dalam keadan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata): "Ya Tuhan Kami, Tiadalah Engkau menciptakan ini dengan sia-sia, Maha suci Engkau, Maka peliharalah Kami dari siksa neraka”.

Limbah dikenal sebagai hasil buangan dari suatu proses produksi baik industri maupun domestik (rumah tangga). Kuantitas tertentu, kehadiran limbah dapat berdampak negatif terhadap lingkungan terutama bagi kesehatan manusia, sehingga perlu dilakukan penanganan terhadap limbah. Limbah biomassa selama ini hanya dilihat dari sisi negatifnya saja, yaitu sebagai hal yang tidak bermanfaat dan hanya dianggap sebagai sesuatu yang sia-sia. Jika merujuk pada surat Ali Imran ayat 191 yang menjelaskan bahwa segala sesuatu yang diciptakan Allah di alam semesta ini tidak ada yang sia-sia, maka jika dikaji lebih dalam limbah dapat dimanfaatkan dan diolah untuk menghasilkan produk baru. Salah satu limbah yang dapat dimanfaatkan adalah limbah industri yang merupakan buangan dari pengolahan tepung tapioka.

Industri pengolahan tepung tapioka ini mempunyai efek samping berupa limbah padat dan cair. Limbah industri tapioka banyak mengandung amilum yang bila terlarut dalam air akan menyebabkan turunnya jumlah oksigen terlarut dan menimbulkan bau busuk yang berasal dari proses degradasi bahan organik yang kurang sempurna (Syarifah, 1996). Limbah industri tapioka termasuk limbah organik, karena ditimbulkan sebagai sisa dari pengolahan singkong yang merupakan salah satu bahan organik dan biasa disebut sebagai onggok. Onggok ini diperoleh dari proses pamarutan dan pengepresan, apabila tidak ditangani dengan seksama onggok dapat menimbulkan potensi besar mencemari lingkungan.

Onggok dalam keadaan kering akan mengeluarkan bau tidak sedap, apalagi dalam keadaan basah saat musim hujan. Meskipun merupakan limbah tetapi kandungan karbohidrat onggok masih tinggi yaitu mencapai 63 - 68 %, sementara kadar airnya 20 %. Tingginya kandungan karbohidrat dan kadar air inilah yang mempermudah aktifitas mikroba pengurai. Proses penguraian bisa bersifat aerob (membutuhkan oksigen) dan bisa pula bersifat anaerob (tidak membutuhkan oksigen) (Prasetyana, 2009). Upaya meminimalisasi limbah ini salah satunya dengan memanfaatkan kembali limbah. Teknologi biokonversi merupakan konversi bahan secara enzimatik melalui fermentasi yang dapat dimanfaatkan untuk meningkatkan nilai ekonomi onggok. Perkembangan bioteknologi melalui pemanfaatan mikroba dengan proses fermentasi dapat mengkonversi bahan secara enzimatik, misalnya onggok dapat dimanfaatkan untuk produksi bioetanol (Rahman, 1989).

Bioetanol merupakan energi alternatif BBM yang bersumber dari bahan baku tanaman yang mengandung karbohidrat atau pati seperti singkong, ubi jalar, tebu, jagung, gandum, serta limbah pertanian seperti jerami. Bioetanol didapatkan dari hasil fermentasi singkong dengan menggunakan yeast *Saccharomyces cerevisiae* sehingga menghasilkan alkohol. Kemudian dilakukan proses destilasi untuk mencapai kemurnian 95 %. Energi alternatif ini memiliki banyak kelebihan dibandingkan dengan BBM yang ada saat ini, yaitu dapat diperbaharui, ramah lingkungan, terjangkau masyarakat luas, serta konsumsinya pun lebih irit dibandingkan dengan premium (Tim Nasional Pengembangan BBN, 2007).

Bioetanol secara umum diproduksi melalui tiga tahapan meliputi: hidrolisis pati (pembuatan bubur pati), sakarifikasi, dan fermentasi etanol (Crueger dan Crueger, 1984). Onggok yang mengandung pati sekitar 46 - 65 % potensial untuk dimanfaatkan lebih lanjut untuk pembuatan bioetanol (Kusmiyati, 2007). Pati dalam onggok digunakan sebagai sumber glukosa melalui perlakuan hidrolisis asam atau enzimatis sehingga menghasilkan glukosa, kemudian gula difermentasi untuk menghasilkan etanol (Richana, 2011). Retnowati dan Sutanti (2009) melaporkan proses sakarifikasi pada pembuatan etanol dari ampas singkong dan lindur menggunakan HCl 0,5 N, menghasilkan kadar glukosa pada lindur sebanyak 0,898 g dan pada ampas singkong sebanyak 0,841 g. Sukandar dan Putri (2008) telah melakukan penelitian tentang konversi pati ganyong menjadi bioetanol menggunakan katalis asam HNO₃, HCl, dan H₂SO₄ masing-masing pada konsentrasi 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, dan 7 % (v/v). Hidrolisis optimum didapat dengan HNO₃ 7 % dengan kadar etanol hasil fermentasi 4,48 %.

Kelemahan hidrolisis pati dalam suasana asam yaitu dapat menghasilkan produk dengan rasa dan warna yang buruk karena asam memiliki sifat sangat reaktif dan proses pemurnian produk yang sulit.

Proses hidrolisis pati dalam penelitian ini dilakukan secara enzimatis menggunakan enzim α -amilase sebagai bio katalis. Reaksi hidrolisa berlangsung lambat sehingga untuk mempercepat reaksi perlu menggunakan katalisator. Kerja enzim dalam menghidrolisis pati adalah dengan memotong ikatan 1,4 α -glikosida, tapi tidak memotong ikatan 1,6 α -glikosida (ebookpangan, 2006). Menurut Juliastuti (2009), pada hidrolisis pati dari limbah padat tapioka (onggok) menggunakan enzim α -amilase dan glukoamilase 0,5 % dan 0,5 % memberikan hasil yang terbaik, yaitu kadar glukosanya mencapai 8,468 %. Khamdiah (2010) kadar etanol yang diperoleh pada proses fermentasi alga merah *Eucheuma spinosum* menggunakan ragi roti tanpa sakarifikasi adalah 6,99 % dari waktu fermentasi selama 2 hari sedangkan melalui tahap sakarifikasi menggunakan enzim α -amilase diperoleh kadar etanol sebesar 14 % (alkoholmeter) dan 15,25 % (kromatografi gas) dengan waktu fermentasi 3 hari. Hidrolisa pati dengan menggunakan enzim memberikan beberapa keuntungan yang antara lain produk lebih murni, biaya pemurnian lebih murah, dan tanpa produk samping yang berbahaya.

Fermentasi merupakan proses unik yang dilakukan oleh mikroba, yakni cepat, murah, aman, hemat energi dan nilai organoleptik (nilai yang dapat dirasakan oleh lidah) rata-rata sesuai dengan selera (Waluyo, 2004). Fermentasi merupakan proses perubahan-perubahan kimia dalam suatu substrat organik yang

berlangsung karena aksi katalisator biokimiawi yaitu enzim yang dihasilkan oleh mikroba hidup tertentu. Prinsip dasar dari fermentasi etanol adalah pemecahan komponen pati menjadi gula, kemudian diubah menjadi etanol dan karbondioksida yang disebabkan oleh sel khamir (Gumbira, 1987). Umumnya melibatkan khamir dari genus *Saccharomyces* (Meidyawati, 1997). Elevri dan Putra (2006) menyatakan *Saccharomyces cerevisiae* dapat memproduksi bioetanol dalam jumlah besar dan mempunyai toleransi tinggi terhadap bioetanol. Menurut penelitian Jannah (2010), pemanfaatan limbah padat tapioka (onggok) menjadi bioetanol dengan fermentasi menggunakan ragi tape menghasilkan kadar etanol tertinggi 15,625 % pada variabel dosis ragi tape 10 % dan lama fermentasi 5 hari. Sedangkan dengan menggunakan *Saccaromyces cerevisiae*, menghasilkan kadar etanol tertinggi 19 % pada variabel dosis 10 % *Saccaromyces cerevisiae* dan lama fermentasi 7 hari.

Beberapa penelitian lain tentang pemanfaatan onggok sebagai bahan baku untuk produksi bioetanol. Retnowati dan Sutanti (2009) melakukan pembuatan bioetanol menggunakan limbah tapioka padat kering yang dihaluskan diproses dengan cara fermentasi dan destilasi yang mengasilkan kadar alkohol tertinggi 14,43 % (7 hari/75 gr) sedangkan kadar alkohol terendah 3,70 % (9 hari/25 gr). Triyani (2009), melaporkan adanya pengaruh antara lama fermentasi dengan dosis ragi yang diberikan. Penelitian ini menyatakan bahwa kadar alkohol tertinggi 16,90 % dan disimpulkan bahwa perlakuan waktu fermentasi 9 hari dan dosis ragi 75 g dapat memberikan pengaruh optimum terhadap kadar alkohol pada fermentasi limbah tapioka padat kering. Sutanti dan Retnowati (2008) melaporkan

kadar etanol dari limbah padat ampas singkong adalah 1,66 % dengan waktu optimum fermentasi hari ke 7.

Fermentasi merupakan tahap paling kritis dalam produksi etanol. Proses fermentasi diawali dengan proses pembiakan khamir, yang dalam hal ini jenis khamir yang sering digunakan adalah *Saccharomyces cerevisiae*. *Saccharomyces cerevisiae* mempunyai daya konversi gula yang sangat tinggi karena menghasilkan enzim zimase dan invertase. Enzim invertase berfungsi untuk memecah sukrosa menjadi monosakarida (glukosa dan fruktosa). Enzim zimase mengubah glukosa menjadi etanol (Judoamidjoyo, dkk., 1990). Proses pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* memerlukan nutrisi. Penambahan nutrisi pada proses fermentasi sangat diperlukan walau dalam jumlah kecil komponen esensial. Penambahan senyawa ini berperan sebagai nutrisi untuk pertumbuhan dan aktivitas metabolisme bakteri selama fermentasi, dan sebagai protein, mereka juga mempengaruhi stabilitas dari etanol yang dihasilkan (Rikana dan Adam, 2010). Karena itu penting bahwa harus mengandung cukup jumlah nitrogen untuk mendukung populasi bakteri untuk mendapatkan proses fermentasi yang maksimal.

Faktor yang juga berpengaruh terhadap hasil fermentasi selain penambahan nutrisi adalah derajat keasaman (pH) dan lama fermentasi. Semakin lama waktu fermentasi maka semakin tinggi kadar bioetanol yang dihasilkan. Tetapi jika kadar bioetanol dalam substrat terlalu tinggi akan berpengaruh buruk terhadap pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae*. Penelitian Retnowati (2009) melaporkan kadar etanol meningkat seiring bertambahnya waktu fermentasi,

sesuai dengan kurva pertumbuhan mikroba dimana fase deselerasinya (pertumbuhan optimal) terjadi pada hari ke-7 fermentasi dengan kadar etanol pada ampas singkong 1,66 % berat. Puspitasari (2009) melaporkan bahwa ampas ketela pohon yang dimanfaatkan sebagai bahan baku dalam proses fermentasi etanol menghasilkan kadar alkohol terendah sebanyak 11,70 % pada waktu fermentasi 9 hari dan kadar alkohol tertinggi sebanyak 41,67 % pada waktu fermentasi 15 hari.

Pengaruh pH terhadap pertumbuhan tidak kalah pentingnya dari pengaruh lama fermentasi. Ada pH minimum, pH optimum, dan pH maksimum. Rentang pH bagi pertumbuhan bakteri antara 4–9 dengan pH optimum 6,5–7,5. Selama pertumbuhan pH dapat berubah, naik atau turun, bergantung kepada komposisi medium yang diuraikan. Bila ingin pH konstan selama pertumbuhan harus diberikan larutan penyangga atau buffer yang sesuai dengan media dan jenis mikroorganismenya. Begitu pula dengan *Saccharomyces cerevisiae*, apabila pH di bawah atau di atas pH optimum maka akan berpengaruh pada aktivitasnya selama proses fermentasi. Minarni, dkk., (2013) telah melakukan penelitian memproduksi etanol menggunakan *Saccharomyces cerevisiae*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar etanol tertinggi dihasilkan pada pH fermentasi 4 sebesar 1,61 % (v/v). Elevri dan Putra (2006) menambahkan bahwa *Saccharomyces cerevisiae* dapat melakukan fermentasi secara optimal pada pH 4,5.

Pemanfaatan limbah padat tapioka (onggok) sebagai sisa pembuatan tepung tapioka pada pembuatan bioetanol sudah banyak dilakukan namun masih kurang efektif karena waktu fermentasi yang terlalu lama dan kadar etanol yang dihasilkan relatif rendah sehingga perlu diadakan penelitian lebih lanjut. Optimasi

terhadap pembuatan bioetanol dari limbah padat tapioka (onggok) ini melibatkan efektifitas bakteri biakan murni pada proses fermentasi dengan berbagai kajian variasi pH dan lama fermentasi.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana perubahan kadar glukosa dalam sampel selama proses pembuatan bioetanol?
2. Bagaimana pengaruh pH dan lama fermentasi terhadap kadar etanol hasil pada fermentasi limbah padat tapioka?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui perubahan kadar glukosa dalam sampel selama proses pembuatan bioetanol.
2. Mengetahui pengaruh pH dan lama fermentasi terhadap kadar etanol hasil pada fermentasi limbah padat tapioka.

1.4 Batasan masalah

1. Onggok padat tapioka yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari perusahaan PT. Nagamas Sakti, Kromengan.
2. Proses fermentasi dilakukan dengan menggunakan khamir hasil isolasi dari tetes tebu.

3. Penentuan kadar glukosa sampel menggunakan metode DNS (3,5-Dinitrosalisilat).
4. Parameter pH yang digunakan adalah pH 4; 4,5; 5 dan lama fermentasi selama 5; 7; 9; 11 hari.
5. Analisa kadar etanol menggunakan metode konversi berat jenis.

1.5 Manfaat penelitian

Memberikan informasi mengenai keefektifan biakan murni khamir hasil isolasi dari tetes tebu untuk memperoleh kualitas bioetanol pada fermentasi limbah padat yang baik, sehingga dapat dijadikan acuan bagi para peneliti berikutnya sebagai dasar penelitian selanjutnya.

BAB II

KAJIAN PUSTAKA

2.1 Onggok (Limbah Padat Tapioka)

Onggok adalah limbah dari pabrik tapioka (singkong) yang kering, padat dan keras, biasanya berukuran satu kepal atau pecahan lebih kecil tergantung dari hasil pemerasan saat menyadap tapioka dari singkong. Limbah industri pangan ini berjumlah sangat banyak dan akan menjadi polusi bila tidak segera ditangani.

Dalam industri pangan, limbah dapat menimbulkan masalah bagi lingkungan. Limbah industri pangan juga dapat menimbulkan masalah dalam penanganannya karena mengandung sejumlah besar karbohidrat, protein, lemak, garam-garam mineral dan sisa-sisa bahan kimia yang digunakan dalam pengolahan dan pembersihan (Jenie dan Rahayu, 1990). Pada umumnya, limbah industri pangan tidak membahayakan kesehatan masyarakat, karena tidak terlibat langsung dalam perpindahan penyakit. Akan tetapi kandungan bahan organiknya yang tinggi dapat bertindak sebagai sumber makanan untuk pertumbuhan mikroba (Jenie dan Rahayu, 1990).

Industri tapioka mengolah singkong sebagai bahan baku utama menjadi tepung tapioka. Limbah industri tapioka terdiri dari dua jenis, yaitu limbah cair dan limbah padat. Limbah cair akan mencemari air, sedangkan limbah padat akan menimbulkan bau yang tidak sedap, apabila tidak ditangani dengan tepat. Onggok tapioka merupakan limbah padat industri tapioka yang berupa ampas hasil

ekstraksi dari pengolahan tepung tapioka. Dalam industri tapioka dihasilkan 75 % onggok tapioka dari total bahan baku yang digunakan.



Gambar 2.1. Onggok (Kawid, 2013)

Ketersediaan onggok terus meningkat sejalan dengan meningkatnya produksi tapioka. Hal ini diindikasikan dengan semakin meluasnya areal penanaman dan produksi ubi kayu. Produksi ubi kayu mengalami peningkatan dari 13,3 juta ton pada tahun 1990 menjadi 19,4 juta ton pada tahun 1995. Setiap ton ubi kayu dapat dihasilkan 250 kg tepung tapioka dan 114 kg onggok.

Ubi kayu yang juga dikenal sebagai ketela pohon atau singkong, adalah pohon tahunan tropika dan subtropika dari keluarga Euphorbiaceae (Maskustri, 2009). Umbinya dikenal luas sebagai makanan pokok penghasil karbohidrat dan daunnya sebagai sayuran. Ubi merupakan sejenis umbi atau akar pohon yang panjang dengan fisik rata-rata bergaris tengah 2 – 3 cm dan panjang 50 – 80 cm, tergantung dari jenis singkong yang ditanam. Tanaman ini termasuk tanaman tahunan, karena bisa hidup hingga beberapa tahun (Sosrosoedirdjo, 1992).

Ketela pohon merupakan umbi yang banyak dikonsumsi masyarakat. Ketela pohon mengandung glikosida yang jumlahnya bervariasi. Bila kadar glikosida lebih dari 70 mg/kg ketela pohon, jenis ini disebut pahit. Bila kurang dari 70 mg/kg ketela pohon termasuk jenis manis. Glikosida ini menyebabkan rasa

pahit dan bila dimakan di dalam perut berubah menjadi asam hidrosian. Asam tersebut dapat mempengaruhi pernafasan sehingga orang dapat mati karena kekurangan O_2 atau disebut keracunan (Tarwotjo, 1981).

Tabel 2.1. Komposisi Ubi Kayu/Singkong (per 100 gram bahan)

Komponen	Kadar
Kalori	146,00 kal
Air	63,00 gr
Phosphor	40,00 mg
Karbohidrat	34,70 gr
Kalsium	33,00 mg
Vitamin C	30,00 mg
Protein	1,20 gram
Besi	0,70 mg
Lemak	0,30 gram
Vitamin B1	0,06 mg
Berat dapat dimakan	75,00

Sumber: Departemen Kesehatan R.I, (1992).

Onggok sebagai limbah padat dari industri tapioka masih mengandung kadar tepung yang cukup tinggi. Produknya cukup melimpah dan belum dimanfaatkan secara optimal. Menurut Childyal dan Lonsanse (1990), limbah padat industri tapioka masih mengandung pati cukup tinggi yaitu 63 %. Badan Penelitian dan Pengkajian Teknologi Indonesia menyatakan bahwa kandungan pati pada ampas tapioka sebesar 67,8 %.

Tabel 2.2 Komposisi Nutrisi Onggok

Zat Nutrisi	Onggok
Bahan Kering (BK) (%)	81,7
Abu (% BK)	3,060
Protein (% BK)	0,979
Lemak (% BK)	0,245
Serat Kasar (% BK)	2,690
BETN (% BK)	93,0
Energi Bruto (kal/g)	-

Sumber: Lubis, 1963

Onggok tapioka mengandung protein dengan kadar rendah (kurang dari 5 %), limbah tersebut belum dimanfaatkan orang. Namun dengan teknik fermentasi, kandungan proteinnya dapat ditingkatkan. Dengan proses bioteknologi menggunakan teknik fermentasi dapat meningkatkan mutu gizi dari bahan-bahan yang bermutu rendah. Onggok dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku pembuatan etanol karena kandungan karbohidrat yang tersisa pada limbah tepung tapioka tersebut masih banyak.

Salah satu teknologi alternatif untuk dapat memanfaatkan onggok sebagai bahan baku pakan ternak adalah dengan cara mengubahnya menjadi produk yang berkualitas, yaitu melalui proses fermentasi. Proses tersebut dapat dilakukan secara semi padat dengan menggunakan kapang *Aspergillus niger* sebagai inokulum, ditambah campuran urea dan ammonium sulfat sebagai sumber nitrogen anorganik (Maskustri, 2009).

Menurut Supriyati (2003), sebelum difermentasi onggok tersebut harus dikeringkan terlebih dahulu, sampai kadar airnya maksimal 20 % dan selanjutnya digiling. Untuk setiap 10 kg bahan baku pakan dibutuhkan 80 gram kapang *A. niger* dan 584,4 gram campuran mineral anorganik. Sedang untuk preparasinya adalah sebagai berikut: 10 kg onggok kering giling dimasukkan ke dalam baskom besar (ukuran 50 kg). Selanjutnya ditambah 584,4 gram campuran mineral dan diaduk sampai rata. Kemudian ditambah air hangat sebanyak delapan liter, diaduk rata dan dibiarkan selama beberapa menit. Setelah agak dingin ditambahkan 80 gram *A. niger* dan diaduk kembali. Setelah rata dipindahkan ke dalam baki plastik dan ditutup. Fermentasi berlangsung selama empat hari. Setelah terbentuk

miselium yang terlihat seperti fermentasi tempe, maka onggok terfermentasi dipotong- potong, diremas-remas dan dikeringkan dalam oven pada suhu 60 °C dan selanjutnya digiling. Setelah dianalisa kandungan nutriennya.

2.2 Pati (*Starch*)

Karbohidrat merupakan senyawa yang terbentuk dari molekul karbon, hidrogen dan oksigen. Karbohidrat dapat didefinisikan sebagai turunan aldehyd atau keton dari alkohol polihidrik, atau sebagai senyawa yang menghasilkan turunan tersebut apabila dihidrolisa (Riadi, 2013). Nama karbohidrat digunakan pada senyawa-senyawa tersebut mengingat rumus empirisnya yang berupa $C_nH_{2n}O_n$ yaitu mendekati $C_n(H_2O)_n$ yaitu karbon yang mengalami hidroksi.

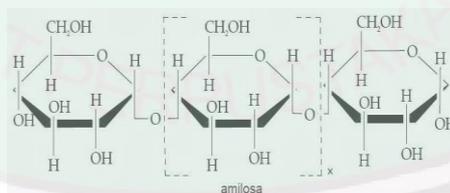
Karbohidrat dapat dikelompokkan menjadi monosakarida, oligosakarida, dan polisakarida. Monosakarida merupakan suatu molekul yang dapat terdiri dari lima atau enam atom C, sedangkan oligosakarida merupakan polimer dari 2-10 monosakarida, dan pada umumnya polisakarida merupakan polimer yang terdiri dari 10 monomer monosakarida (Winarno, 2004).

Pati merupakan polisakarida yang banyak terdapat di alam, yaitu pada sebagian besar tumbuhan. Umbi yang terdapat pada ubi jalar atau akar pada ketela pohon atau singkong mengandung pati yang cukup banyak, sebab ketela pohon tersebut selain dapat digunakan sebagai makanan sumber karbohidrat, juga digunakan sebagai bahan baku dalam pabrik tapioka.

Pati tersusun paling sedikit oleh tiga komponen utama, yaitu amilosa, amilopektin, dan material seperti, protein, dan lemak. Umumnya pati mengandung

15- 30 % amilosa, 70-85 % amilopektin, dan 5-10 % material antara. Struktur dan jenis material antara tiap sumber pati berbeda tergantung sifat-sifat botani sumber pati tersebut (Greenwood, 1975). Amilosa dan amilopektin berperan dalam menentukan sifat suspensi pati dalam air. Amilosa tidak mudah larut dalam air dingin tapi kelarutannya meningkat dengan pemanasan. Hal ini terjadi karena retrogradasi (terbentuknya ikatan hidrogen antar gugus-OH) molekul amilosa yang berdekatan dalam larutan. Amilopektin lebih stabil dan tidak teretrogradasi sehingga tidak larut dalam air panas (Fessenden, 1995).

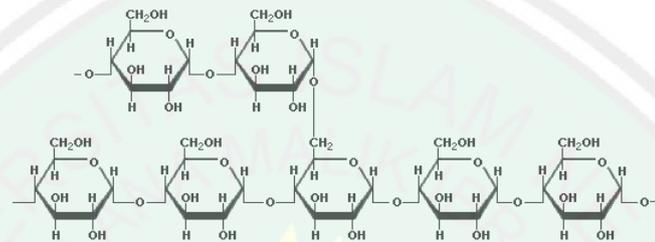
Amilosa merupakan polimer rantai lurus yang dibangun oleh ikatan α -1,4-glikosidik dan pada setiap rantai terdapat 500-2000 unit D-glukosa. Rantai amilosa berbentuk heliks. Bagian dalam stuktur heliks mengandung atom H sehingga bersifat hidrofob yang memungkinkan amilosa membentuk kompleks dengan asam lemak bebas, komponen asam lemak dari gliserida (Estiasih, 2006).



Gambar 2.2. Struktur Amilosa

Amilopektin merupakan polisakarida bercabang bagian dari pati, terdiri atas molekul-molekul glukosa yang terikat satu sama lain melalui ikatan 1,4-glikosidik dengan percabangan melalui ikatan 1,6-glikosidik pada setiap 20-25 unit molekul glukosa. Amilopektin merupakan bagian dari pati yang tidak larut dalam air dan mempunyai berat molekul antara 70.000 sampai satu juta.

Amilopektin dengan iodium memberikan warna ungu hingga merah (Lehninger, 1988). atau asam dilakukan oleh asam atau enzim. Jika pati dipanaskan dengan asam akan terurai menjadi molekul-molekul yang lebih kecil secara berurutan dan hasilnya adalah glukosa.



Gambar 2.3. Struktur Amilopektin

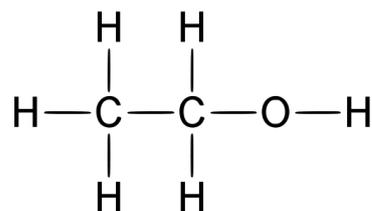
Struktur amilosa-amilopektin yang berbeda menyebabkan daya cerna yang berbeda. Amilosa mempunyai struktur tidak bercabang sehingga amilosa terikat lebih kuat. Granula pati yang lebih banyak kandungan amilosanya, mempunyai struktur yang lebih kristalin. (Meyer, 1973). Amilopektin mempunyai struktur bercabang, ukuran molekul lebih besar dan lebih terbuka sehingga lebih mudah tergelatinisasi (Rimbawan dan Siagian, 2004). Struktur granula pati terdiri dari kristal dan bukan kristal. Kristal merupakan perubahan sejumlah besar rantai glukosa yang mengalami pengikatan hidrogen untuk membentuk area yang sulit bagi air dan enzim untuk menembus. Granula pati asli tidak dapat larut dalam air dingin. Ketika pati murni dipanaskan dalam air, granula akan mengembang dan strukturnya hancur (gelatinisasi). Proses penghilangan kristal oleh panas dan air tersebut disebut proses gelatinisasi. Granula pati yang mengalami gelatinisasi dapat dibuat membengkak luar biasa dan bersifat tidak dapat kembali pada kondisi

semula. Suhu pada saat granula pati pecah disebut suhu gelatinisasi (Winarno, 1992).

2.3 Bioetanol

Bioetanol merupakan salah satu jenis biofuel (bahan bakar cair dari pengolahan tumbuhan) di samping biodiesel. Bioetanol adalah etanol yang dihasilkan dari fermentasi glukosa (gula) yang dilanjutkan dengan proses destilasi. Proses destilasi dapat menghasilkan etanol dengan kadar 95 % volume, untuk digunakan sebagai bahan bakar (biofuel) perlu lebih dimurnikan lagi hingga mencapai 99 % yang lazim disebut *fuel grade ethanol* (FGE). Bioetanol tersebut bersumber dari karbohidrat yang potensial sebagai bahan baku seperti jagung, ubi kayu, ubi jalar, sagu dan tebu (Richana, 2011.)

Etanol adalah sejenis cairan yang mudah menguap, mudah terbakar, tak berwarna, dan merupakan alkohol yang paling sering digunakan dalam kehidupan sehari-hari. Etanol termasuk ke dalam alkohol rantai tunggal, dengan rumus kimia C_2H_5OH dan rumus empiris C_2H_6O . Ia merupakan isomer konstitusional dari dimetil eter. Etanol sering disingkat menjadi EtOH, dengan "Et" merupakan singkatan dari gugus etil (C_2H_5) (Rizani, 2000).



Gambar 2.4 Struktur Etanol

Etanol yang nama lainnya *aethanolum*, *etil alcohol*, adalah cairan yang bening, tidak berwarna, mudah mengalir, mudah menguap, mudah terbakar, *higroskopik* dengan karakteristik bau spiritus dan rasa membakar, mudah terbakar dengan api biru tanpa asap. Campur dengan air, kloroform, eter, gliserol, dan hampir semua pelarut organik lainnya. Penyimpanan pada suhu 8 – 15 °C, jauh dari api dalam wadah kedap udara dan dilindungi dari cahaya. Bahan ini dapat memabukkan jika diminum (Mardoni .,dkk, 2007).

Tabel 2.3. Sifat Fisik Etanol

Massa molekul relative	46,07 g/mol
Titk beku	-114,1 °C
Titik didih normal	78,32 °C
Densitas pada 20 °C	0,7893 g/mL
Kelarutan dalam air 20 °C	Sangat larut
Viskositas pada 20 °C	1,17 cP
Kalor spesifik 20 °C	0,579 kal/g °C
Kalor pembakaran 25 °C	7092,1 kal/g
Kalor penguapan 78,32 °C	200,6 kal/g

Sumber: Rizani (2000)

Alkohol (khususnya etanol) dapat dibuat dari berbagai hasil pertanian. Secara umum bahan-bahan tersebut dapat dibagi dalam tiga golongan, yaitu 1) bahan yang mengandung turunan gula (molasses, gula tebu, gula bit, sari buah anggur, dan sari buah lainnya), 2) bahan-bahan yang mengandung pati biji-bijian, kentang, dan tapioka, dan 3) bahan yang mengandung selulosa (kayu, dan beberapa limbah pertanian lainnya). Selain dari ketiga jenis bahan tersebut diatas etanol juga dapat dibuat dari bahan bukan dari hasil pertanian tetapi dari bahan yang merupakan hasil proses lain. Sebagai contohnya adalah etilen. Bahan-bahan yang mengandung monosakarida langsung dapat difermentasi, akan tetapi disakarida, pati maupun karbohidrat kompleks harus dihidrolisis terlebih dahulu

menjadi komponen yang sederhana yaitu monosakarida. Oleh karena itu agar tahap proses fermentasi dapat berjalan dengan optimal, maka bahan-bahan tersebut diatas harus mengalami perlakuan pendahuluan sebelum masuk kedalam proses fermentasi. Disakarida (seperti gula pasir) harus dihidrolisis menjadi glukosa dan fruktosa. Terbentuknya glukosa dan monosakarida yang lain menunjukkan bahwa proses pendahuluan telah berakhir dan bahan selanjutnya telah siap difermentasi. Secara kimiawi reaksi alam proses fermentasi berjalan cukup panjang, karena terjadi suatu deret reaksi yang masing-masing dipengaruhi oleh enzim khusus (Budiyanto, 2002).

Richana (2011), menyatakan etanol dapat diklasifikasikan berdasarkan bahan baku yang digunakan, proses, dan pemanfaatannya:

1. Klasifikasi berdasarkan bahan baku serta prosesnya.
 - a. Etanol nabati: secara mikrobiologis menggunakan bahan baku berpati (jagung, ubi kayu, dan umbi-umbian lain), serta bahan yang mengandung gula (molasses, tebu, sweet sorghum, aren, dan jenis palem lainnya) dan bahan berserat (onggok, jerami dan sekam, tongkol jagung, baggas tebu, dan kulit kakao dan kopi).
 - b. Etanol sintesis: secara sintesis menggunakan bahan baku antara lain minyak mentah, gas. Saat ini produksi etanol sintesis kurang dari 5 % dari total produksi.
2. Klasifikasi berdasarkan kandungan air.
 - a. Etanol 95 – 96 % (alcohol prima super, prima I, dan alkohol prima II).
 - b. Etanol 99,5 % (*anhydrous etanol*) dengan kandungan air 0,05 %.

3. Klasifikasi menurut pemanfaatannya.

- a. Untuk industri (*industrial grade*), sebagai pelarut pada pembuatan venis, minyak wangi, *iodium tincture* dan spiritus; dilaboratorium sebagai pelarut senyawa bersifat polar; di bidang kedokteran sebagai bahan baku pembuatan kloroform, iodoform.
- b. Untuk minuman beralkohol (*portable grade*)
- c. Untuk bahan bakar (*fuel grade etanol*).

Menurut Suriawira (1986) dalam Kultsum (2009) pembuatan etanol dapat dilakukan dengan dua cara yaitu :

1. Cara Sintetis

Pada cara sintetis dilakukan reaksi kimia untuk mengubah bahan baku menjadi alkohol, misalnya dengan reaksi hidrasi etilena yang merupakan hasil sampingan pada proses penyulingan minyak bumi. Proses ini menggunakan suatu katalis asam sulfat dan pemanasan pada temperature 70 °C pada tekanan 10 atm. Etanol juga dapat disintesis dari aldehyd melalui proses reduksi.

Reaksi :



2. Cara Fermentasi

Cara ini dilakukan dengan menggunakan aktifitas mikroba. Bahan yang mengandung gula sederhana langsung dapat difermentasi, tetapi bahan yang mengandung karbohidrat harus diubah terlebih dahulu dengan jalan hidrolisis. Untuk bahan dari tanaman, produksi etanol melalui fermentasi gula menggunakan ragi *Saccharomyces cerevisiae* atau *Saccharomyces elipsoides*. Beberapa bakteri

seperti *Zymomonas mobilis* juga diketahui memiliki kemampuan untuk melakukan fermentasi untuk memproduksi etanol (Richana, 2011).

Secara teoritis, hidrolisis glukosa akan menghasilkan etanol dan karbondioksida. Perbandingan mol antara glukosa dan etanol dapat dilihat pada diagram reaksi berikut ini:



Satu mol glukosa menghasilkan 2 mol etanol dan 2 mol karbondioksida, atau dengan perbandingan bobot tiap 180 gram glukosa akan menghasilkan 90 gram etanol (Richana, 2011).

Faktor-faktor yang dapat memengaruhi jumlah etanol yang dihasilkan dari fermentasi adalah mikroorganisme dan media yang digunakan, adanya komponen media yang dapat menghambat pertumbuhan serta kemampuan fermentasi mikroorganisme dan kondisi selama fermentasi. Selain itu, hal-hal yang perlu diperhatikan selama fermentasi adalah pemilihan khamir, konsentrasi gula, keasaman, ada tidaknya oksigen dan suhu dari perasaan buah. Pemilihan sel khamir didasarkan pada jenis karbohidrat yang digunakan sebagai medium, untuk memproduksi alkohol dari pati dan gula digunakan *Saccharomyces cerevisiae* (Astuti, 1991).

Suhu optimum untuk fermentasi berkisar antara 25 – 30 °C. Proses fermentasi sama dengan pH optimum untuk proses pertumbuhan khamir yaitu pH 4,0 - 4,5. Etanol dihasilkan dari gula yang merupakan hasil aktivitas fermentasi sel khamir. Khamir yang baik digunakan untuk menghasilkan etanol adalah dari genus *Saccharomyces*. Kriteria pemilihan khamir untuk produksi etanol adalah

mempunyai laju fermentasi dan laju pertumbuhan cepat, perolehan etanol banyak, tahan terhadap konsentrasi etanol dan glukosa tinggi, tahan terhadap konsentrasi garam tinggi, pH optimum serta fermentasi rendah, temperatur optimum fermentasi sekitar 25 – 30 tahan terhadap stres fisika dan kimia (Astuti, 1991).

2.4 Pembuatan Etanol secara Fermentatif

Fermentasi dapat didefinisikan sebagai perubahan gradual oleh enzim beberapa bakteri, ragi, dan jamur. Contoh perubahan kimia dari fermentasi meliputi pengasaman susu, dekomposisi pati dan gula menjadi alkohol dan karbon dioksida, serta oksidasi senyawa nitrogen organik. Fermentasi merupakan kegiatan mikrobial pada bahan pangan, sehingga dihasilkan produk yang dikehendaki. Mikrobial yang umumnya terlibat dalam fermentasi adalah bakteri, khamir, dan kapang. Beberapa contoh proses fermentasi yaitu pembuatan tempe, onggok, alkohol, dan sebagainya (Hidayat, 2006).

Dalam pengertian yang luas, fermentasi adalah proses pemecahan gula-gula sederhana (glukosa dan fruktosa) menjadi etanol dan CO₂ dengan melibatkan enzim yang dihasilkan pada ragi agar dapat bekerja pada suhu optimum. Proses fermentasi tergantung pada banyak sedikitnya penambahan khamir dalam bahan. Semakin banyak jumlah ragi yang diberikan berarti semakin banyak jumlah khamir yang terlibat, sehingga kadar alkohol meningkat (Tarigan, 1990).

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

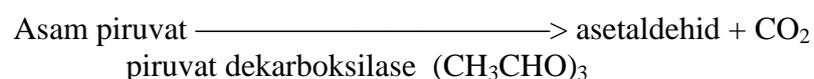
aseton. Louis Pasteur untuk pertama kalinya mengenalkan metode fermentasi. Louis melakukan fermentasi gula menggunakan mikroorganisme, dan telah membuka cakrawala baru memproduksi senyawa kimia dengan bantuan mikroorganisme (Anonymous, 2007). Menurut Pasteur, keberadaan oksigen akan menghambat jalur fermentasi di dalam sel khamir sehingga sumber karbon yang ada akan digunakan melalui jalur respirasi (Walker, 1998).

Fermentasi alkohol merupakan pembentukan etanol dan karbondioksida dari piruvat hasil glikolisis glukosa secara anaerobik (Lehninger, 1982). Pada tahun 1815, Gay-Lussac memformulasikan konversi glukosa menjadi etanol dan karbondioksida. Formulasinya sebagai berikut :



Dalam fermentasi alkohol, satu molekul glukosa hanya dapat menghasilkan 2 molekul ATP, sedangkan dengan respirasi aerob satu molekul glukosa mampu menghasilkan 38 molekul ATP. Reaksinya :

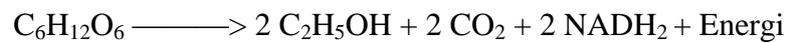
1. Gula ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) $\xrightarrow{\text{glikolisis}}$ asam piruvat (glikolisis)
2. Dekarboksilasi asam piruvat yaitu piruvat yang dihasilkan dari pemecahan glukosa kehilangan gugus karboksilat oleh kerja piruvat dekarboksilase (Lehninger, 1982). Reaksi ini merupakan dekarboksilasi sederhana dan tidak melibatkan oksidasi total piruvat dan tidak bersifat tidak balik dalam sel.



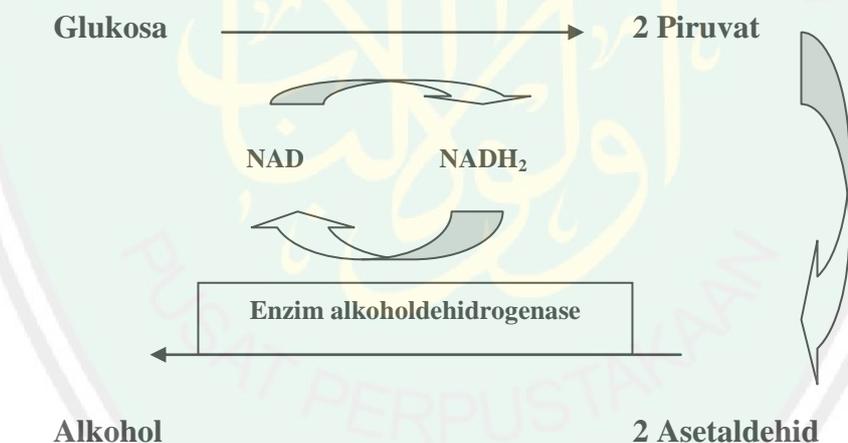
3. Asetaldehid oleh alkohol dihidrogenase diubah menjadi alkohol (etanol).



Sehingga reaksinya menjadi:



Fermentasi alkohol dalam tahap pertama, fermentasi glukosa selalu terbentuk asam piruvat melalui jalur *Embden Meyerhof Parnas* (EMP) atau glikolisis. Menurut Schlegel (1994), piruvat tersebut diubah menjadi alkohol melalui dua tahap yaitu pertama, piruvat didekarboksilasi menjadi asetaldehid oleh *piruvat dekarboksilase* (1) dengan melibatkan tiamin pirofosfat dan tahap kedua asetaldehid oleh *alkohol dehidrogenase* (2) direduksi dengan NADH_2 menjadi alkohol. Perubahan glukosa menjadi alkohol dapat dilihat pada Gambar di bawah ini :



Gambar 2.5. Skema Perubahan Glukosa menjadi Alkohol (Schlegel,1994)

Selain alkohol, dihasilkan juga sejumlah senyawa lain seperti asam suksinat, amilalkohol dan gliserol. Terdapat beberapa faktor yang berpengaruh terhadap fermentasi alkohol diantaranya konsentrasi inokulum, lama fermentasi, nutrien dan pH. Menurut Buckle (2007) konsentrasi inokulum yang ditambahkan ke dalam medium fermentasi adalah 5 % dari volume keseluruhan. Sumber karbon bagi *S. cerevisiae* biasanya sukrosa, glukosa, fruktosa, galaktosa, manosa

dan maltosa (Judoamidjojo, 1990). Derajat keasaman (pH) merupakan salah satu dari beberapa faktor penting yang mempengaruhi fermentasi alkohol. Derajat keasaman optimum untuk proses fermentasi adalah antara 4 – 5. Pada pH dibawah 3, proses fermentasi alkohol akan berkurang kecepatannya (Samsuri, 2007).

Mikroorganisme memerlukan media yang mengandung nutrisi tertentu untuk tumbuh. Mikroorganisme yang ditumbuhkan pada media baru pada umumnya tidak segera berkembang, tetapi memerlukan waktu penyesuaian. Jika faktor lingkungan memungkinkan, maka mikroorganisme akan berkembang dengan kecepatan lambat, kemudian meningkat menjadi cepat. Syarat-syarat yang dipergunakan dalam memilih ragi untuk fermentasi, adalah (Abidin, 2009) :

1. Cepat berkembang biak
2. Tahan terhadap alkohol tinggi
3. Tahan terhadap suhu tinggi
4. Mempunyai sifat yang stabil
5. Cepat mengadakan adaptasi terhadap media yang difermentasikan.

Ragi ini dapat mengubah glukosa menjadi alkohol dan gas CO₂ (karbondioksida). Ragi merupakan mikroorganisme bersel satu, dengan bentuk oval tak beraturan, ukuran 5 sampai 20 mikrometer (Paturau, 1982). Khamir tumbuh optimum pada suhu 25 – 30 °C, pH 4 – 5. Putarau (1982) menyatakan bahwa fermentasi etanol membutuhkan waktu 30 – 72 jam. Sementara Prescott dan Dunn (1981) menyatakan bahwa waktu fermentasi etanol adalah 3 sampai 7 hari.

Khamir memerlukan media dan lingkungan yang sesuai untuk pertumbuhan dan perkembangannya. Unsur dasar yang dibutuhkan adalah karbon, hidrogen, oksigen, fosfor, kalium, zat besi, dan magnesium. Unsur mikro juga memegang peranan penting dalam pertumbuhan khamir. Unsur karbon banyak diperoleh dari gula, sebagai sumber nitrogen dapat digunakan ammonia, garam ammonium, asam amino, peptide, pepton, nitrat, atau urea, tergantung pada jenis khamir (Prescott dan Dunn, 1981).

Maiorella (1983) menyebutkan bahwa seleksi khamir berdasarkan kemampuan menghasilkan etanol, waktu fermentasi, pertumbuhan khamir yang tinggi, toleransi terhadap tekanan osmosis, optimum pada kondisi pH rendah, suhu tinggi, tahan terhadap pengaruh kimia dan fisika. Pertumbuhan yang tinggi dan waktu fermentasi yang cepat menjadikan proses fermentasi dapat dilakukan dengan peralatan yang lebih sederhana. Toleransi terhadap konsentrasi etanol dan glukosa yang tinggi memberikan kemudahan dalam mengurangi energy dan penanganan *stillage*. Toleransi terhadap tekanan nilai pH yang rendah menghambat adanya kontaminasi dari mikroba lain.

Faktor-faktor yang mempengaruhi fermentasi:

a. Nutrisi (zat gizi),

Dalam kegiatannya ragi memerlukan penambahan nutrisi untuk pertumbuhan dan perkembangbiakan, misalnya :

- Unsur C : ada pada karbohidrat
- Unsur N : dengan penambahan pupuk yang mengandung nitrogen, ZA, Urea.

- Unsur P : penambahan pupuk fospat dari NPK, TSP, DS_p dll

b. Keasaman (pH),

Untuk fermentasi alkohol, ragi memerlukan media suasana asam, yaitu antara pH 4 – 5. Pengaturan pH dilakukan penambahan asam sulfat jika substratnya alkalis atau natrium bikarbonat jika substratnya asam.

c. Temperatur,

Temperatur optimum untuk dan pengembangbiakan adalah 27 – 30 °C pada waktu fermentasi, terjadi kenaikan panas karena ekstrem. Untuk mencegah agar suhu fermentasi tidak naik, perlu pendinginan supaya suhu dipertahankan tetap 27 – 30 °C.

d. Volume starter,

Pada umumnya volume starter yang digunakan sekitar 5 % dari volume larutan fermentasi. Hal ini dikarenakan pada volume starter yang lebih kecil dari 5 % maka kecepatan fermentasi kecil, sedangkan pada volume starter yang lebih besar dari 5 % keaktifan yeast berkurang karena alkohol yang terbentuk pada awal fermentasi sangat banyak sehingga fermentasi lebih lama dan banyak glukosa yang tidak terfermentasikan.

e. Udara,

Fermentasi alkohol berlangsung secara anaerobik (tanpa udara). Namun demikian, udara diperlukan pada proses pembibitan sebelum fermentasi, untuk pengembangbiakan ragi sel.

f. Suplai Makanan

Bahan dasar yang dapat digunakan untuk fermentasi alkohol adalah bahan yang mengandung pati atau gula dalam jumlah tinggi (Hamidah, 2003).

g. Air (H_2O)

Menurut Buckle (1985) suatu organisme membutuhkan air untuk hidup. Air berperan dalam reaksi metabolik dalam sel dan merupakan alat pengangkut zat gizi atau bahan limbah ke dalam dan luar sel. Jumlah air yang terdapat dalam bahan pangan dikenal aktivitas air (a_w). Bakteri tumbuh dalam perkembangbiakan hanya dalam media dengan nilai a_w tinggi (0,91), pada khamir (0,87 – 0,91) dan kapang (0,80 – 0,87).

h. Ketersediaan oksigen (O_2)

Derajat *anaerobiosis* merupakan faktor utama mengendalikan fermentasi. Bila tersedia oksigen dalam jumlah besar, maka produksi sel-sel khamir terpacu. Akan tetapi bila produksi alkohol yang dikehendaki, maka diperlukan penyediaan oksigen yang sangat terbatas (Desrosier, 1988 dalam Maimuna, S., 2004).

Jenis khamir yang biasanya dipakai dalam industri fermentasi alkohol adalah jenis *Saccharomyces cerevisiae*. *Saccharomyces cerevisiae* adalah jenis khamir utama yang berperan dalam produksi minuman beralkohol seperti bir, anggur, dan juga digunakan untuk fermentasi adonan dalam perusahaan roti dan fermentasi tape. Kultur yang dipilih harus dapat tumbuh dengan baik dan mempunyai toleransi yang tinggi terhadap alkohol serta mampu menghasilkan alkohol dalam jumlah banyak (Irianto, 2006).

2.5 Proses Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak (SFS)

Secara umum sintesa bioetanol yang berasal dari biomassa terdiri atas dua tahap utama, yaitu hidrolisis dan fermentasi. Pada metode terdahulu proses hidrolisis dan fermentasi dilakukan secara terpisah dan yang terbaru adalah proses sakarifikasi dan fermentasi serentak. Sakarifikasi adalah proses penguraian polisarida menjadi gula-gula sederhana seperti glukosa, fruktosa dan galaktosa (Stanbury, 1995). Proses sakarifikasi dapat dilakukan dengan menggunakan enzim amilase atau asam.

Richana (2011) menyatakan proses sakarifikasi dan fermentasi secara simultan adalah proses yang dimulai dengan mengubah dekstrin menjadi gula dengan bantuan enzim glukoamilase. Kemudian gula yang terbentuk secara simultan difermentasi menjadi etanol dan CO₂ dengan bantuan khamir.

Sakarifikasi dan fermentasi simultan (SFS) adalah kombinasi antara hidrolisis enzim dan fermentasi yang dilakukan dalam suatu reaktor. Proses ini memiliki keuntungan yaitu polisakarida yang terkonversi menjadi monosakarida tidak kembali menjadi polisakarida karena monosakarida langsung difermentasi menjadi etanol (Samsuri, 2007).

Pada proses SFS, hidrolisis selulosa dan fermentasi gula tidak dilakukan secara terpisah atau bertahap, tetapi secara simultan. Mikrob yang digunakan pada proses SFS biasanya adalah jamur penghasil enzim selulase, seperti *T. reesei*, *T. viride*, dan khamir *S. cerevisiae*. Suhu optimal proses SFS adalah 38 °C, yang merupakan perpaduan suhu optimal hidrolisis (45 – 50 °C) dan suhu optimal fermentasi (30 °C). Proses SFS memiliki keunggulan dibandingkan dengan proses

hidrolisis dan fermentasi bertahap. Beberapa keunggulan tersebut adalah: 1) meningkatkan kecepatan hidrolisis dengan mengonversi gula yang terbentuk dari hasil hidrolisis selulosa yang menghambat aktivitas enzim selulase, 2) mengurangi kebutuhan enzim, 3) meningkatkan rendemen produk, 4) mengurangi kebutuhan kondisi steril karena glukosa langsung dikonversi menjadi etanol, 5) waktu proses lebih pendek, dan 6) volume reaktor lebih kecil karena hanya digunakan satu reaktor (Sun dan Cheng, 2002).

Hidrolisis onggok dapat dilakukan oleh asam atau enzim. Jika onggok dipanaskan dengan asam akan terurai menjadi molekul-molekul yang lebih kecil secara berurutan dan hasil akhirnya adalah glukosa.



Hidrolisis onggok dapat dilakukan dengan cara hidrolisis dengan katalis asam, kombinasi asam dan enzim serta kombinasi enzim dengan enzim. Pada hidrolisis onggok dengan asam, diperlukan suhu yang tinggi. Semakin lama hidrolisis asam akan memecah molekul onggok secara acak dan gula pereduksi yang dihasilkan juga semakin besar (Judoamidjojo, 1992).

Hidrolisis pati dengan asam (HCl atau H₂SO₄) memiliki kelemahan yaitu senyawa asam tersebut bersifat korosif. Pemberian senyawa asam akan membentuk senyawa lain yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba dan glukosa yang dihasilkan sedikit (Crueger dan Crueger, 1984).

2.6 Enzim α -amilase

Enzim merupakan protein khusus yang dapat bergabung dengan suatu substrat spesifik untuk mengkatalisasi reaksi biokimia dari substrat tersebut (Maier, 2000). Dalam reaksi tersebut enzim mengubah senyawa yang disebut substrat menjadi bentuk suatu senyawa baru yang disebut produk. Enzim memiliki substrat spesifik dan reaksi kimia yang spesifik untuk dikatalisnya (Palmer, 1985). Aktivitas enzim dipengaruhi oleh suhu, pH dari lingkungan tempat enzim bekerja, konsentrasi substrat, aktivator dan inhibitor enzim.

Amilase merupakan enzim yang penting dalam bidang pangan dan bioteknologi. Amilase merupakan enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis pati menjadi gula-gula sederhana. Amilase mengubah karbohidrat yang merupakan polisakarida menjadi maltose (alfa dan beta) ataupun glukosa (gluko amilase). Amilase dapat diperoleh dari berbagai sumber seperti tanaman, binatang, dan mikroorganisme. Saat ini sejumlah enzim amilase telah diproduksi secara komersial. Penggunaan mikroba dianggap lebih prospektif karena mudah tumbuh cepat menghasilkan dan kondisi lingkungan dapat dikendalikan (anonymous, 2010).

Produksi enzim amilase dapat menggunakan berbagai sumber karbon. Contoh-contoh sumber karbon molase, tepung tapioka, dan sebagainya. Dalam produksi enzim amilase dengan menggunakan mikroba, pengendalian terhadap faktor lingkungan adalah sangat penting karena dalam produksinya, mikroba dipengaruhi berbagai hal, seperti suhu dan lama inkubasi, pH awal, jumlah inokulum dan faktor yang berpengaruh lainnya yang dapat diperoleh melalui

eksperimen. Jenis mikroba juga berpengaruh terhadap jumlah enzim yang dihasilkan. Oleh karena itu untuk menghasilkan produk enzim amylase dengan kualitas dan kuantitas yang memuaskan perlu dilakukan optimasi kondisi dan karakteristik dari bakteri yang digunakan (Marlida, 2000).

Enzim amilase dapat memecah ikatan-ikatan pada amilum sehingga terbentuk maltose. Ada tiga macam enzim amilase, yaitu α -amilase, β -amilase, dan γ -amilase. α -amilase terdapat dalam saliva (ludah) dan pankreas. Enzim ini memecah ikatan 1,4 yang terdapat dalam amilum yang disebut endo amylase, sebab enzim ini memecah bagian dalam atau bagian tengah molekul amilum. β -amilase terutama terdapat dalam tumbuhan dan dinamakan ekso amilase, sebab memecah dua unit glukosa yang terdapat pada ujung molekul amilum secara berurutan sehingga pada akhirnya terbentuk maltose. γ -amilase telah diketahui terdapat dalam hati. Enzim ini dapat memecah ikatan 1-4 dan 1-6 pada glikogen dan menghasilkan glukosa (Poedjiadi, 2007).

Proses sakarifikasi merupakan proses hidrolisis pati menjadi glukosa dengan menggunakan enzim α -amilase. Tujuan sakarifikasi ini untuk memudahkan dan mempercepat proses fermentasi sehingga akan mendapatkan hasil yang optimal karena konversi menjadi etanol dari glukosa (monosakarida) tidak dari pati langsung yang merupakan polisakarida (Hidayat, 2008). Sedangkan melalui proses Sakarifikasi dan Fermentasi Simultan (SFS), pati diubah menjadi glukosa oleh enzim glucoamilase, kemudian langsung diubah menjadi etanol oleh ragi dalam satu tahap proses. Dengan demikian harus ada jumlah enzim glucoamilase dan jumlah sel ragi tertentu yang memungkinkan

kecepatan sakarifikasi berimbang dengan kecepatan konsumsi glukosa oleh ragi, sehingga tidak akan terjadi akumulasi glukosa yang dapat menghambat aktivitas ragi dan aktivitas enzim glukoamilase. Pada kondisi ini akan terjadi konversi pati menjadi etanol yang maksimal (Shleser, 1994).

Konsentrasi dan kualitas substrat, metode perlakuan awal yang digunakan, aktivitas enzim dan kondisi hidrolisis seperti temperatur, pH, dan mixing adalah faktor-faktor utama yang mempengaruhi hidrolisis enzimatis. Temperatur dan pH optimum hidrolisis enzim tidak selalu sama, tergantung pada bahan baku, mikroorganisme penghasil enzim, dan durasi hidrolisis (Taherzadeh dan Karimi, 2007).

Saat ini, hidrolisis enzimatis pati mentah sangat diperlukan untuk menekan konsumsi energi di dalam industri berbasis pati. Eksplorasi sumber-sumber baru penghasil α -amilase yang dihasilkannya penting dilakukan untuk memfasilitasi penemuan α -amilase baru yang memenuhi persyaratan industri dengan kemampuan yang lebih baik, terutama dalam mendegradasi pati mentah.

2.7 Khamir (*Yeast*)

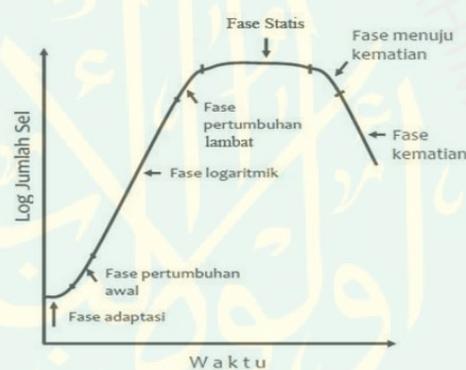
Khamir adalah fungi ekasel (uniselular) yang beberapa jenis spesiesnya umum digunakan untuk membuat roti, fermentasi minuman beralkohol, dan bahkan digunakan percobaan sel bahan bakar. Kebanyakan khamir merupakan anggota divisi *Ascomycota*, walaupun ada juga yang digolongkan dalam *Basidiomycota*. Beberapa jenis khamir, seperti *Candida albicans*, dapat menyebabkan infeksi pada manusia (kandidiasis).

Sel khamir mempunyai ukuran yang bervariasi, yaitu dengan panjang 1-5 μm sampai 20-50 μm , dan lebar 1-10 μm . sel vegetatif yang berbentuk apikulat atau lemon merupakan karakteristik grup khamir yang ditemukan pada tahap awal fermentasi alami buah-buahan dan bahan lain yang mengandung gula (Fardiaz, 1989). Khamir bereproduksi secara aseksual, dengan cara pembelahan sel sederhana atau dengan cara pelepasan sel tunas dari sel induk. Beberapa fungi dapat tumbuh sebagai sel tunggal atau sebagai miselium filament, tergantung pada ketersediaan zat-zat hara yang ada (Cambell, 2003).

Kebanyakan sel khamir memperbanyak diri dengan cara membentuk tunas. Meskipun demikian ada sebagian kecil sel khamir yang dapat memperbanyak diri dengan membelah diri sama besar (binary fission). Dalam proses pertunasan, mula-mula diawali dengan lisisnya dinding sel pada daerah tertentu. Dengan tidak adanya dinding sel pada daerah tersebut, menyebabkan terjadinya tekanan dari isi sel keluar membentuk struktur seperti balon yang dikelilingi dinding sel induknya. Bagian ini kemudian membesar, nukleus membelah secara mitosis dan nukleus hasil pembelahan kemudian berpindah menuju tunas yang terbentuk tadi. Tunas baru yang sudah terbentuk dan sudah dilengkapi dengan nukleus kemudian melanjutkan pertumbuhannya. Setelah pertumbuhan cukup, akhirnya tunas akan melepaskan diri dari sel induknya. Beberapa spesies khamir dapat menghasilkan tunas lebih dari satu sebelum pemisahan tunas terjadi. Bila setelah terbentuk satu tunas tidak dilanjutkan dengan pemisahan tunas, maka suatu rantai sel berbentuk bola dapat terbentuk. Kegagalan dalam memisahkan tunas-tunas baru yang terbentuk secara terus menerus akan

menyebabkan dihasilkannya suatu rantai sel khamir yang memanjang yang menyerupai hifa (benang) (Brock & Madigan, 1991).

Pertumbuhan sel merupakan puncak aktivitas fisiologis yang saling mempengaruhi secara berurutan. Proses pertumbuhan ini sangat kompleks mencakup pemasukan nutrisi dasar dari lingkungan ke dalam sel, konversi bahan nutrisi menjadi energi dan berbagai konstituen vital sel serta perkembangbiakan. Pertumbuhan mikrobial ditandai dengan peningkatan jumlah dan massa sel serta kecepatan pertumbuhan tergantung pada lingkungan fisik dan kimia.



Gambar 2.6 Kurva Pertumbuhan Kultur Mikroba (Fardiaz, 1988).

1. Fase Adaptasi

Pemindahan mikroba dari suatu medium ke medium lain, menyebabkan mikroba akan mengalami fase adaptasi untuk melakukan penyesuaian dengan substrat dan kondisi lingkungan sekitar. Pada fase ini belum terjadi pembelahan sel karena beberapa enzim mungkin belum disintesis. Jumlah sel pada fase ini mungkin tetap tetapi kadang-kadang menurun. Lama fase ini bervariasi, dapat cepat atau lambat tergantung dari kecepatan penyesuaian dengan lingkungan sekitar. Medium, lingkungan pertumbuhan, dan jumlah inokulum akan mempengaruhi lama adaptasi. Jika medium dan lingkungan pertumbuhan sama

seperti medium dan lingkungan sebelumnya, mungkin tidak diperlukan waktu adaptasi. Tetapi jika nutrisi yang tersedia dan kondisi lingkungan yang baru berbeda dengan sebelumnya, diperlukan waktu penyesuaian untuk mensintesis enzim-enzim. Selain itu, jumlah inokulum juga berpengaruh terhadap jumlah sel. Jumlah awal sel yang semakin tinggi akan mempercepat fase adaptasi.

2. Fase Pertumbuhan Awal

Setelah mengalami fase adaptasi, mikroba mulai membelah dengan kecepatan yang masih rendah karena baru tahap penyesuaian diri.

3. Fase Pertumbuhan Logaritmik

Pada fase ini sel mikroba membelah dengan cepat dan konstan, pertambahan jumlahnya mengikuti kurva logaritmik. Kecepatan pertumbuhan sangat dipengaruhi oleh medium tempat tumbuhnya seperti pH dan kandungan nutrisi, juga kondisi lingkungan termasuk suhu dan kelembaban udara. Sel mikroba membutuhkan energi yang lebih banyak daripada fase lainnya dan sel paling sensitif terhadap keadaan lingkungan.

4. Fase Pertumbuhan Lambat

Pertumbuhan populasi mikroba mengalami perlambatan. Perlambatan pertumbuhan disebabkan zat nutrisi di dalam medium sudah sangat berkurang dan adanya hasil-hasil metabolisme yang mungkin beracun atau dapat menghasilkan racun yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba. Pertumbuhan sel pada fase ini tidak stabil, tetapi jumlah populasi masih naik karena jumlah sel yang tumbuh masih lebih banyak daripada jumlah sel yang mati.

5. Fase Pertumbuhan Tetap (Statis)

Jumlah populasi sel tetap karena jumlah sel yang tumbuh sama dengan jumlah sel yang mati. Ukuran sel pada fase ini menjadi lebih kecil-kecil karena sel tetap membelah meskipun zat-zat nutrisi sudah mulai habis. Karena kekurangan zat nutrisi, sel kemungkinan mempunyai komposisi berbeda dengan sel yang tumbuh pada fase logaritmik. Sel-sel menjadi lebih tahan terhadap keadaan ekstrim seperti panas, dingin, radiasi, dan bahan-bahan kimia.

6. Fase Menuju Kematian dan Fase Kematian

Sebagian populasi mikroba mulai mengalami kematian yang disebabkan oleh nutrisi di dalam medium dan energi cadangan di dalam sel sudah habis. Kecepatan kematian dipengaruhi oleh kondisi nutrisi, lingkungan, dan jenis mikroba (Fardias, 1988).

Lama fermentasi pada proses produksi bioetanol sangat mempengaruhi kadar bioetanol yang dihasilkan. Semakin lama waktu fermentasi maka semakin tinggi kadar bioetanol yang dihasilkan. Jika bioetanol yang terkandung dalam substrat tinggi maka hal ini justru akan berpengaruh buruk terhadap pertumbuhan khamir. Karena pada kadar alkohol 2,5 % pertumbuhan khamir akan terhambat. Oleh karena itu dibutuhkan lama fermentasi yang tepat untuk proses fermentasi bioetanol agar didapatkan kadar etanol dalam jumlah yang tinggi, nilai pH rendah, dan produksi gas yang tinggi tetapi tidak mengganggu pertumbuhan khamir.

Penelitian Sutanti dan Retnowati (2008), menunjukkan bahwa ada pengaruh lama fermentasi terhadap kadar etanol dari limbah padat ampas tapioka,

dimana dalam selang waktu 1 - 7 hari kadar etanol dari limbah padat ampas tapioka terus meningkat, sedangkan setelah 7 hari kadar etanol dari limbah padat ampas tapioka menurun. Memasuki hari ke 7 ragi *Saccharomyces cerevisiae* memasuki fase stasioner, dimana fase ini jumlah mikroba yang hidup sebanding dengan jumlah mikroba yang mati. Dengan demikian semakin berkurang jumlah nutrisi *Saccharomyces cerevisiae* dan substrat, sehingga *Saccharomyces cerevisiae* akan semakin menurun dan tidak mampu memproduksi alkohol.

2.8 Penentuan Kadar Glukosa dengan Metode DNS (3,5-Dinitrosalisilat)

Metode DNS merupakan salah satu cara yang digunakan dalam analisis kuantitatif glukosa. Parameter ini dilakukan untuk mengetahui kadar glukosa yang terdapat dalam sampel dalam rentang sebelum dilakukan proses hidrolisis sampai fermentasi.

Raffa (2012) menjelaskan metode ini digunakan untuk mengukur gula pereduksi dengan teknik kolorimetri. Teknik ini hanya dapat mendeteksi satu gula pereduksi, misalnya glukosa. Glukosa memiliki gugus aldehida, sehingga dapat dioksidasi menjadi gugus karboksil.

Gula reduksi adalah semua gula yang memiliki kemampuan untuk mereduksi dikarenakan adanya gugus aldehid atau keton bebas. Umumnya gula pereduksi yang dihasilkan berhubungan erat dengan aktifitas enzim, dimana semakin tinggi aktifitas enzim maka semakin tinggi pula gula pereduksi yang dihasilkan.

Metode penentuan komposisi gula reduksi dalam sampel yang mengandung karbohidrat yang digunakan adalah menggunakan pereaksi asam dinitro salisilat. Metode ini adalah metode kimiawi. DNS merupakan senyawa aromatis yang akan bereaksi dengan gula reduksi maupun komponen pereduksi lainnya untuk membentuk 3-amino-5-nitrosalicylic acid, suatu senyawa yang mampu menyerap dengan kuat radiasi gelombang elektromagnetik pada 540 nm. Semakin banyak komponen pereduksi yang terdapat dalam sampel, maka akan semakin banyak pula molekul 3-amino-5-nitrosalicylic acid yang terbentuk dan mengakibatkan serapan semakin tinggi (Anonymous, 2012).

Reaksi dengan DNS yang terjadi merupakan reaksi redoks pada gugus aldehyd gula dan teroksidasi menjadi gugus karboksil. Sementara itu DNS sebagai oksidator akan tereduksi membentuk 3-amino dan 5-nitrosalicylic acid. Reaksi ini berjalan dalam suasana basa. Bila terdapat gula reduksi pada sampel, maka larutan DNS yang awalnya berwarna kuning akan bereaksi dengan gula reduksi sehingga menimbulkan warna jingga kemerahan (Anonymous, 2012).

Dalam pembuatan reagen DNS, kita perlu menambahkan NaOH ke dalam larutan yang bertujuan untuk memberikan suasana basa. Karena nantinya reaksi dari reagen DNS ini bekerja pada suasana basa. Selain menambahkan NaOH, juga ditambahkan kalium natrium tartrat 40% (Rochelle Salt). Fungsi dari penambahan ini adalah untuk menstabilkan warna yang terbentuk pada saat reaksi terjadi yaitu merah bata/kecoklatan. Di samping itu, kadang juga diperlukan pemanasan untuk membantu mempercepat jalannya reaksi. Karena nantinya yang akan diukur

adalah absorbansi dari warna yang terbentuk tersebut dengan spektrofotometri pada panjang gelombang 575 nm (Anonymous, 2012).

2.9 Pemisahan Bioetanol Hasil Fermentasi dengan Metode Destilasi

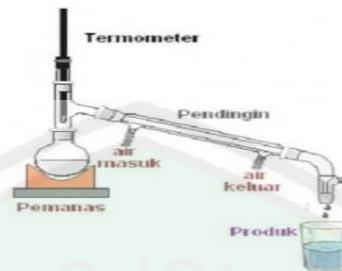
Pemurnian/ destilasi untuk memisahkan alkohol dari hasil fermentasi dapat dilakukan dengan destilasi. Destilasi atau penyulingan merupakan proses pemurnian atau pemisahan komponen cair dari campurannya melalui penguapan oleh pemanasan dan zat cair yang menguap kemudian diembunkan dan ditampung; proses pemisahan didasarkan pada perbedaan titik didih; biasanya ditujukan untuk memisahkan pelarut dari komponen terlarutnya (Mulyono, 2008).

Kadar etanol hasil fermentasi tidak dapat mencapai level diatas 18 - 21 %, sebab etanol dengan kadar tersebut bersifat *toxic* terhadap ragi yang memproduksi etanol tersebut sehingga untuk memperoleh etanol dengan kadar yang lebih tinggi perlu dilakukan destilasi. (Archunan, 2004).

Destilasi adalah suatu cara pemisahan larutan dengan menggunakan panas atau pemisah dengan “separating agent”. Jika komponen terdiri dari dua larutan yang mudah menguap, misalnya larutan benzene-toluena, larutan n-heptana dan n-heksan dan larutan lain sejenis yang dididihkan, maka fase uap yang terbentuk akan mengandung komponen yang lebih menguap dengan jumlah komponen yang relatif lebih banyak dibandingkan dengan fase cair (Junaidi, 2009).

Jadi ada perbedaan antara fase cair dan fase uap, dan hal ini merupakan syarat utama supaya pemisahan dengan distilasi dapat dilakukan. Kalau komposisi fase uap sama dengan fase cair, maka pemisahan dengan jalan destilasi

tidak dapat dilakukan (Junaidi, 2009).



Gambar 2.7 Bagian Distilasi Sederhana (Risal, 2014)

Proses distilasi dalam kilang minyak bumi merupakan proses pengolahan secara fisika yang primer yang mengawali semua proses-proses yang diperlukan untuk memproduksi BBM dan Non-BBM. Proses distilasi ini dapat menggunakan satu kolom atau lebih menara distilasi hampa atau ke menara distilasi bertekanan (Junaidi, 2009).

Proses pemisahan secara distilasi dengan mudah dapat dilakukan terhadap campuran, dimana antara komponen yang satu dengan yang lain terdapat campuran (Junaidi, 2009):

- a. Dalam keadaan standar berupa cairan, saling melarutkan menjadi campuran homogen.
- b. Mempunyai sifat penguapan relatif (α) cukup besar.
- c. Tidak membentuk cairan zeotrop

Pada proses pemisahan secara destilasi, fase uap akan segera terbentuk setelah sejumlah cairan dipanaskan. Uap dipertahankan kontak dengan sisa cairannya (dalam waktu relative cukup) dengan harapan pada suhu dan tekanan tertentu antara uap dan sisa cairan akan berada dalam keseimbangan, sebelum campuran dipisahkan menjadi distilat dan residu (Junaidi, 2009).

Fase uap yang mengandung lebih banyak komponen yang lebih mudah menguap relatif terhadap fase cair, berarti menunjukkan adanya suatu pemisahan. Sehingga kalau uap yang terbentuk selanjutnya diembunkan dan dipanaskan secara berulang-ulang, maka akhirnya akan diperoleh komponen-komponen dalam keadaan relative murni (Junaidi, 2009).

Tujuan proses destilasi adalah untuk memisahkan etanol dari campuran etanol-air. Titik didih etanol adalah $78\text{ }^{\circ}\text{C}$ dan titik didih air adalah $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ sehingga dengan pemanasan pada suhu $78\text{ }^{\circ}\text{C}$ dengan metode destilasi maka etanol dapat dipisahkan dari campuran etanol-air. Konsentrasi maksimum etanol yang dapat diperoleh dengan cara destilasi biasa adalah 96 %. Etanol anhidrat (99,5 %-100 %) dapat diperoleh dengan menggunakan metode destilasi azeotrop menggunakan benzen (Waller, J.C., dkk. 1981).

Campuran azeotrop etanol-air dapat dipisah dengan penambahan benzen dimana akan terbentuk campuran azeotrop benzen-etanol-air dengan titik didih $64,9\text{ }^{\circ}\text{C}$. Titik didih campuran tersebut lebih rendah dari campuran etanol-air ($78,2\text{ }^{\circ}\text{C}$) sehingga etanol dapat dipisahkan dari air dengan destilasi bertingkat, namun pemisahan etanol dengan metode ini akan menyisakan beberapa ppm residu benzene di dalam etanol yang diperoleh (Graham, S. 2003).

Alat-alat yang digunakan dalam destilasi cukup sederhana. Pertama tempat sampel, berupa reservoir biasanya dipilih labu alas bulat, kondensor untuk mengembunkan uap dan tempat destilat. Pemanas yang digunakan dapat berupa kompor listrik atau heating mantle yang dapat diatur suhunya. Untuk mengontrol suhu uap, pada salah satu ujung labu dipasang thermometer (Sukri, 1999).

Beberapa hal penting harus diperhatikan dalam destilasi adalah kondisi saat pemanasan labu didih. Dalam keadaan suhu dan tekanan tinggi, labu dapat mengalami ledakan yang dikenal sebagai super heated. Secara teknis, sebelum proses pemanasan, di dalam labu didih disertakan agen anti bumping seperti pecahan anti porcelain. Pori-pori porcelain dapat merayap panas dan meratakan panas ke seluruh sistem. Metode destilasi digunakan pada larutan yang mempunyai titik didih moderat sekitar 100 °C. Apabila terdapat sampel dengan titik didih sangat tinggi, tidak disarankan menggunakan teknik pemisahan destilasi karena dua hal yaitu suhu dan tekanan tinggi rawan ledakan dan pada suhu tinggi senyawa dapat mengalami dekomposisi atau rusak (Sukri, 2009).

2.10 Pengukuran Kadar Etanol dengan Konversi Berat Jenis (v/v)

Mengukur kadar bioetanol dalam cairan fermentasi adalah salah satu hal penting yang harus kita ketahui, jika kita ingin membuat bioetanol. Ada banyak cara untuk mengukur bioetanol. Mulai dari cara yang paling mudah, rumit, dan paling canggih. Setiap metode pengukuran memiliki keunggulan dan kekurangannya sendiri-sendiri. Beberapa metode itu adalah analisis dengan GC (Gas Chromatography), HPLC (High Performance Liquid Chromatography), metode enzim, dan hydrometer. Tiga metode yang pertama sangat sensitif, dapat mengukur kadar bioethanol dalam konsentrasi yang sangat rendah, tetapi juga lebih rumit dan mahal.

Berat jenis untuk penggunaan praktis lebih sering didefinisikan sebagai perbandingan massa dari suatu zat terhadap massa sejumlah volume air yang sama

pada suhu 4 ° atau temperatur lain yang tertentu. Notasi berikut sering ditemukan dalam pembacaan berat jenis: 25 °/25 °, 25 °/4 °, dan 4 °/4 °. Angka yang pertama menunjukkan temperatur udara saat zat ditimbang, angka yang berikutnya menunjukkan temperatur air yang digunakan (Martin dkk., 1983).

Berat jenis larutan etanol dapat diukur dengan piknometer. Berat jenis larutan etanol semakin kecil, maka kadar etanol di dalam larutan tersebut semakin besar. Hal ini dikarenakan etanol mempunyai berat jenis lebih kecil daripada air sehingga semakin kecil berat jenis larutan berarti jumlah / kadar etanol semakin banyak. Konversi berat jenis menjadi kadar etanol (v/v) disajikan pada Tabel 2.4 di bawah ini:

Tabel 2.4 Konversi Berat Jenis (% v/v)

Berat jenis larutan etanol	Kadar etanol (% v/v)	Berat jenis larutan etanol	Kadar etanol (% v/v)	Berat jenis larutan etanol	Kadar etanol (% v/v)
1,000	0,00	0,9978	1,48	0,9956	2,98
0,9999	0,07	0,9977	1,54	0,9955	3,05
0,9998	0,13	0,9976	1,61	0,9954	3,12
0,9997	0,20	0,9975	1,68	0,9953	3,19
0,9996	0,26	0,9974	1,75	0,9952	3,26
0,9995	0,33	0,9973	1,81	0,9951	3,33
0,9994	0,40	0,9972	1,88	0,9950	3,40
0,9993	0,46	0,9971	1,95	0,9949	3,47
0,9992	0,53	0,9970	2,02	0,9948	3,54
0,9991	0,60	0,9969	2,09	0,9947	3,61
0,9990	0,66	0,9968	2,15	0,9946	3,68
0,9989	0,73	0,9967	2,22	0,9945	3,76
0,9988	0,80	0,9966	2,29	0,9944	3,83
0,9987	0,87	0,9965	2,37	0,9943	3,90
0,9986	0,93	0,9964	2,43	0,9942	3,97
0,9985	1,00	0,9963	2,50	0,9941	4,04
0,9984	1,07	0,9962	2,57	0,9940	4,11
0,9983	1,14	0,9961	2,64	0,9939	4,18
0,9982	1,20	0,9960	2,70	0,9938	4,26
0,9981	1,27	0,9959	2,77	0,9937	4,33
0,9980	1,34	0,9958	2,84	0,9936	4,40
0,9979	1,41	0,9957	2,91	0,9935	4,48

Sumber: Less, 1975

2.11 Pemanfaatan Onggok untuk Produksi Bioetanol dalam Perspektif Islam

Limbah industri tapioka termasuk limbah organik, karena ditimbulkan sebagai sisa dari pengolahan singkong yang merupakan salah satu bahan organik dan biasa disebut sebagai onggok. Onggok ini diperoleh dari proses pamarutan dan pengepresan, apabila tidak ditangani dengan seksama onggok dapat menimbulkan potensi besar mencemari lingkungan. Onggok dalam keadaan kering akan mengeluarkan bau tidak sedap, apalagi dalam keadaan basah saat musim hujan.

Salah satu tuntunan terpenting Islam dalam hubungannya dengan lingkungan, ialah bagaimana menjaga keseimbangan alam/ lingkungan dan habitat yang ada tanpa merusaknya. Karena tidak diragukan lagi bahwa Allah menciptakan segala sesuatu di alam ini dengan perhitungan tertentu. Seperti dalam firman Nya dalam QS. al-Mulk (3).

الَّذِي خَلَقَ سَبْعَ سَمَاوَاتٍ طِبَاقًا مَّا تَرَى فِي خَلْقِ الرَّحْمَنِ مِن تَفَوتٍ فَارْجِعِ الْبَصَرَ هَل تَرَى مِن فُطُورٍ

“Allah yang telah menciptakan tujuh langit berlapis-lapis. Kamu sekali-kali tidak melihat pada ciptaan Tuhan yang Maha Pemurah sesuatu yang tidak seimbang. Maka lihatlah berulang-ulang. Adakah kamu lihat sesuatu yang tidak seimbang” (QS.Al Mulk:3).

Inilah prinsip yang senantiasa diharapkan dari manusia, yakni sikap adil dan moderat dalam konteks keseimbangan lingkungan, tidak berlebih-lebihan atau pun meremehkan, yang akhirnya akan menyebabkan kerusakan lingkungan. Tetapi menurut al-Qur’an, kebanyakan bencana di planet bumi disebabkan oleh ulah perbuatan manusia yang tidak bertanggung jawab.

Kerusakan yang disebabkan oleh manusia telah menampakan dampaknya di permukaan bumi ini, seperti tercemarnya lingkungan yang akhirnya berdampak pada kehidupan makhluk lainnya. Al-Qur'an sebagai *hudan li al-nas* sudah barang tentu, bukan hanya petunjuk dalam arti metafisis-eskatologis, tetapi juga menyangkut masalah-masalah kehidupan manusia di alam dunia sekarang ini, termasuk di dalamnya, petunjuk dasar tentang bagaimana manusia melestarikan lingkungan sekitarnya.

Firman Allah dalam QS Al-Jaatsiyah ayat 13.

وَسَخَّرَ لَكُم مَّا فِي السَّمَوَاتِ وَمَا فِي الْأَرْضِ جَمِيعًا مِّنْهُ ۗ إِنَّ فِي ذَٰلِكَ لَآيَاتٍ لِّقَوْمٍ
يَتَفَكَّرُونَ ﴿١٣﴾

“Dan Dia (Allah) telah menundukkan untukmu apa yang di langit dan apa yang di bumi semuanya, (sebagai rahmat) daripada-Nya. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda-tanda (kekuasaan Allah) bagi kaum yang berfikir.”

Shihab (2002) menjelaskan bahwa penundukan tersebut secara potensial terlaksana melalui hukum-hukum alam yang ditetapkan Allah dan kemampuan yang dianugerahkanNya kepada manusia. Manusia berpotensi mengetahui rahasia alam raya dan memanfaatkan alam yang telah ditundukkan oleh Allah. Segala nikmat ini bukti atas kekuasaan Allah bagi kaum yang memikirkan, mengkaji, dan melakukan penelitian ilmiah.

Berdasarkan uraian di atas manusia diharapkan tahu akan urusan keduniaannya dan memanfaatkan semua fakta ilmiah mengenai fenomena-fenomena di alam kehidupan sehingga menghasilkan banyak kebaikan dan manusia dituntut untuk berpikir dalam menciptakan solusi yang bermanfaat untuk

kebaikan tersebut. Salah satu upaya yang bisa dilakukan untuk mengurangi dampak limbah adalah, dengan mengolah limbah tersebut untuk menghasilkan produk baru yang dapat dimanfaatkan. Menurut Childyal dan Lonsanse (1990), limbah padat industri taioka ini mengandung kadar pati yang cukup tinggi yaitu 63 %, dengan teknologi biokonversi kadar pati yang tinggi ini dapat diubah menjadi bioetanol yang lebih bermanfaat.

Bioetanol merupakan energi alternatif bahan bakar minyak (BBM) yang bersumber dari bahan baku tanaman yang mengandung karbohidrat atau pati seperti singkong, ubi jalar, tebu, jagung, gandum, serta limbah pertanian seperti jerami. Bioetanol didapatkan dari hasil fermentasi singkong dengan menggunakan yeast *Saccharomyces cerevisiae* sehingga menghasilkan alkohol. Kelebihan penggunaan bioetanol sebagai bahan bakar yaitu lebih ramah lingkungan karena hasil pembakarannya hanya menghasilkan H₂O dan CO₂.

Limbah ongkok yang sebelumnya merupakan limbah yang bisa menyebabkan, sebenarnya mempunyai potensi yang sangat besar untuk menyokong kebutuhan BBM negara. Dari uraian di atas, sangat jelas bahwa segala sesuatu yang Allah ciptakan merupakan nikmat yang tidak ada kesia-siaan dalam penciptaannya. Allah berfirman dalam QS Shaad ayat 27:

وَمَا خَلَقْنَا السَّمَاءَ وَالْأَرْضَ وَمَا بَيْنَهُمَا بَطْلًا ۚ ذَٰلِكَ ظَنُّ الَّذِينَ كَفَرُوا ۚ فَوَيْلٌ لِّلَّذِينَ كَفَرُوا مِنَ النَّارِ ﴿٢٧﴾

“Dan Kami tidak menciptakan langit dan bumi dan apa yang ada di antara keduanya tanpa hikmah. Yang demikian itu adalah anggapan orang-orang kafir, maka celakalah orang-orang kafir itu karena mereka akan masuk neraka”.

Allah SWT menjelaskan bahwa Dia menjadikan langit, bumi dan makhluk apa saja yang berada di antaranya, tidaklah sia-sia. Langit dengan segala bintang yang menghiasi, matahari yang memancarkan sinarnya di waktu siang, dan bulan yang menampakkan bentuknya berubah-ubah dari malam ke malam, sangat bermanfaat bagi manusia. Begitu juga bumi dengan segala isinya. baik yang tampak di permukaannya ataupun yang tersimpan dalam perutnya, sangat besar artinya bagi kehidupan manusia. Kesemuanya itu diciptakan Allah atas kekuasaan dan kehendak-Nya sebagai rahmat yang tak ternilai harganya. Apabila orang mau memperhatikan dengan seksama terhadap makhluk-makhluk yang ada di jagat raya ini, pastilah ia mengetahui bahwa semua makhluk yang ada itu tunduk pada ketentuan-ketentuan yang berlaku, yang tak bisa dihindari. Kesemuanya menaati ketentuan-ketentuan yang berlaku baginya.

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Februari–Mei 2014 di Laboratorium Biokimia dan Kimia Organik Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada proses pembuatan etanol adalah timbangan analitik, seperangkat alat gelas, seperangkat alat destilasi biasa, blender, *hot plate*, kertas saring, indikator pH universal, *blue tip*, *vortex*, lemari asam, plastik wrap, bunsen, dan korek api. Alat untuk menentukan kadar glukosa adalah spektrofotometer, dan untuk uji penentuan kadar etanol menggunakan piknometer.

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah limbah padat tapioka (onggok) yang diperoleh dari PT. Naga Mas Sakti Tapioka di desa Ngadirejo Kecamatan Kromengan, Malang. Bahan pendukung pada pembuatan bioetanol adalah enzim α -amilase, biakan murni khamir 2 (Kh 2) hasil isolasi dari tetes tebu, akuades, *yeast extract*, *pepton*, glukosa, agar, HCl 7 %, NaOH 7 %, DNS, NaOH, Na₂SO₃, fenol, K-Na Tartrat dan aluminium foil.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksploratif laboratorik yang bertujuan untuk mengetahui kadar etanol dengan sakarifikasi menggunakan enzim α -amilase dan fermentasi menggunakan khamir hasil isolasi dari tetes tebu. Penelitian ini menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari dua faktor, yaitu pH dan lama fermentasi.

Proses penelitian dimulai dengan perlakuan awal yang diberikan pada onggok. Onggok dikeringkan, diblender, dipanaskan hingga menjadi bubur, dan didinginkan. Sakarifikasi dilakukan menggunakan enzim α -amilase. Glukosa yang dihasilkan diukur kadarnya menggunakan metode DNS (3,5-dinitrosalisilat). Sampel yang telah disakarifikasi ditambahkan HCl 7 %, NaOH 7 %, untuk mengatur pH yang dikehendaki yaitu pH 4; 4,5; 5. Sampel yang telah dipreparasi kemudian ditambahkan inokulum, selanjutnya difermentasi dengan variasi lama fermentasi 5; 7; 9; 11 hari. Masing-masing perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 3 (tiga) kali. Berikut kombinasi perlakuan pH dan lama fermentasi yang tersaji dalam Tabel 3.1.

Tabel 3.1. Kombinasi Perlakuan antara Pengaruh pH dan Lama Fermentasi

D \ T	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄
D ₁	D ₁ T ₁	D ₁ T ₂	D ₁ T ₃	D ₁ T ₄
D ₂	D ₂ T ₁	D ₂ T ₂	D ₂ T ₃	D ₂ T ₄
D ₃	D ₃ T ₁	D ₃ T ₂	D ₃ T ₃	D ₃ T ₄

Keterangan: Faktor 1 = Variasi pH (D)

D₁ = pH 4
 D₂ = pH 4,5
 D₃ = pH 5

Faktor 2 = Lama Fermentasi (T)

T₁ = Lama fermentasi 5 hari
 T₂ = Lama fermentasi 7 hari
 T₃ = Lama fermentasi 9 hari
 T₄ = Lama fermentasi 11 hari

Hasil fermentasi selanjutnya didestilasi pada suhu 78 °C ($\pm 2^\circ\text{C}$). Destilat kemudian ditentukan kadar etanolnya menggunakan metode konversi berat jenis. Data yang diperoleh dianalisis dengan ragam varians ANOVA untuk mengetahui pengaruh pH dan lama fermentasi.

3.4 Tahapan penelitian

Tahapan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Pembuatan media.
2. Regenerasi khamir (Kh 2).
3. Pembuatan inokulum.
4. Preparasi sampel.
5. Sakarifikasi menggunakan enzim α - amylase.
6. Penentuan kadar glukosa dengan metode DNS (3,5-dinitrosalisilat).
7. Fermentasi menggunakan penambahan inokulum 10 % dengan variasi pH dan lama fermentasi.
8. Pemisahan hasil fermentasi menggunakan destilasi.
9. Analisis etanol dengan metode konversi berat jenis.
10. Analisis data.

3.5 Cara Kerja

3.5.1 Sterilisasi Alat (Syamsulhuda, 2011)

Alat-alat gelas yang digunakan, yaitu erlenmeyer dan tabung reaksi dicuci bersih dibawah air mengalir dan dikeringkan. Setelah kering erlenmeyer dan tabung reaksi dimasukkan dalam plastik tahan panas. Selanjutnya disterilisasi

dalam autoklaf pada suhu 121 °C pada tekanan 15 psi dengan waktu diatur 1 jam.

3.5.2 Pembuatan Media

3.5.2.1 Pembuatan Media YPGA (*Yeast Extract Pepton Glucose Agar*) (Schwelberger , 2012)

Pembuatan media YPGA melibatkan beberapa bahan. Langkah pertama ditimbang *yeast extract* 0,5 g, *pepton* 1 g, glukosa 2 g, dan agar 3 g menggunakan neraca analitik. Masing-masing bahan dimasukkan ke dalam gelas beaker, selanjutnya dilarutkan dengan ditambah akuades 100 mL dan dipanaskan hingga mendidih. Media YPGA dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing 10 mL, ditutup menggunakan kapas. Tabung reaksi yang telah diisi media YPGA disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121 °C pada tekanan 15 psi dengan waktu diatur 1 jam. Selanjutnya larutan dalam tabung reaksi didinginkan hingga menjadi padat dalam keadaan miring.

3.5.2.2 Pembuatan Media YPGB (*Yeast Extract Pepton Glucose Broth*) (Schwelberger , 2012)

Pembuatan media YPGB diawali dengan melakukan penimbangan beberapa bahan. Bahan-bahan yang ditimbang, *yeast extract* 1 g, *pepton* 2 g, glukosa 4 g, kemudian dilarutkan dengan akuades 200 mL. Diaduk secara homogen dan dipanaskan hingga mendidih. Larutan dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditutup dengan menggunakan kapas. Selanjutnya disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121 °C pada tekanan 15 psi dengan waktu diatur 1 jam. Media YPGB ini digunakan untuk pembuatan inokulum.

3.5.3 Regenerasi Khamir (Kh 2)

Stok khamir yang ada diambil dua ose dengan kawat yang telah disterilkan dengan alkohol dan dipanaskan di atas api. Dimasukkan ke dalam media YPGA yang telah disterilkan menggunakan autoklaf. Kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Khamir yang telah diregenerasi digunakan untuk pembuatan inokulum.

3.5.4 Pembuatan Inokulum

Pembuatan inokulum dilakukan dengan memindahkan 2 ose khamir ke dalam 100 mL media YPGB, kemudian dishaker pada kecepatan 150 rpm selama 18 jam pada suhu 30 °C. Inokulum digunakan untuk produksi bioetanol.

3.5.5 Preparasi Sampel

Onggok tapioka diambil sebanyak 100 g dan dihaluskan menggunakan blender. Onggok yang sudah halus dimasukkan ke dalam beaker glass 2000 mL dan ditambah 1000 mL akuades. Dilakukan pengadukan menggunakan pengaduk kaca untuk menghasilkan sampel yang homogen. Diatur pH larutan menjadi 4,5. Apabila pH belum mencapai yang dikehendaki, ditambahkan HCl 7 % atau NaOH 7 %, masing-masing sampel ditambah buffer asetat pH 4 sebanyak 15 mL. Dilakukan pengadukan, dan ditambah akuades hingga volume mencapai 1500 mL. Dipanaskan hingga menjadi bubur dan larutan mendidih. Sampel didinginkan pada suhu ruang. Dilakukan analisis kadar gula reduksi dengan metode DNS. Sampel ini selanjutnya akan digunakan untuk proses sakarifikasi dan fermentasi.

3.5.6 Sakarifikasi Onggok (Limbah Padat Tapioka) menjadi Glukosa (Kaewvimol, 2009)

Proses konversi pati dalam onggok menjadi glukosa dengan teknik sakarifikasi menggunakan α -amilase. Sampel dari perlakuan awal diambil masing-masing 100 gram dan dimasukkan ke dalam botol kaca dilakukan sterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121 °C pada tekanan 15 psi dengan waktu diatur 1 jam. Sampel didinginkan hingga mencapai suhu 40 °C. Selanjutnya ditambahkan α -amilase sebanyak 5 mL pada substrat dan inkubasi pada suhu ruang selama 1 jam. Sampel yang telah dipreparasi dianalisis kadar gula reduksi dengan metode DNS dan selanjutnya digunakan untuk fermentasi produksi bioetanol.

3.5.7 Uji Aktivitas Enzim Amilase

Proses uji aktivitas enzim dimulai dengan melarutkan 5 gr *soluble starch* ke dalam 50 mL buffer asetat pH 4. Dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer*. Disaring, diambil filtratnya sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Ditambah 1 mL enzim α -amilase dan diinkubasi selama 30 menit. Sampel yang telah diinkubasi diambil 1 mL, dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambah 1 mL reagen DNS. Didiamkan dalam air mendidih selama 15 menit dan kemudian didinginkan pada suhu ruang selama 20 menit. Ditambah 1 mL K-Na Tartrat 40%, dan ditetapkan volume larutan hingga 10 mL menggunakan akuades. Setelah itu sampel diukur absorbansinya pada panjang gelombang 510 nm.

3.5.8 Fermentasi Onggok (Limbah Padat Tapioka) menggunakan khamir (Kh 2) Hasil Isolasi dari Tetes Tebu

Sampel hasil sakarifikasi yang dipreparasi dengan variasi pH 4; 4,5; 5 dengan penambahan HCl 7 % atau NaOH 7 %. Ditambahkan inokulum sebanyak 10 mL, kemudian botol ditutup dengan kapas dan didiamkan selama waktu fermentasi yang dikehendaki yaitu 5; 7; 9; 11 hari. Hasil proses fermentasi ditimbang dan selanjutnya dihitung kadar total gula yang terpakai menggunakan metode DNS. Pemisahan bioetanol dari media fermentasi dilakukan melalui proses destilasi.

3.5.9 Pemisahan Fasa Cair Hasil Fermentasi Menggunakan Destilasi

Proses destilasi hasil fermentasi limbah padat tapioka, yaitu hasil dari fermentasi diambil 25 g ditambah 25 mL aquades, dimasukkan dalam labu alas bulat dan labu destilat dipasang pada alat destilasi. Sampel didestilasi sampai mendidih pada suhu $78\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) dan destilat hasil destilasi ditampung dalam gelas ukur 50 mL. Hasil destilat yang didapat ditimbang dalam satuan v/v (volume/volume), selanjutnya diukur dengan piknometer 25 mL, untuk mengetahui berat jenis dan ditutup rapat. Destilat yang disimpan dalam botol siap untuk dicari berat jenisnya kemudian dianalisis menggunakan metode konversi berat jenis.

3.5.10 Penentuan Kadar Etanol

3.5.10.1 Menentukan Massa Jenis Etanol p.a

Piknometer volume 25 mL dibersihkan secara hati-hati dengan menggunakan aseton, dikeringkan di dalam oven pada suhu $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 1 jam

dan ditimbang. Akuades didinginkan sampai di bawah suhu percobaan (± 15 °C). Piknometer diisi dengan akuades secara hati-hati hingga penuh dan termometer dimasukkan. Suhu akuades dalam piknometer ditunggu hingga mencapai suhu percobaan (25 °C), akuades pada puncak pipa kapiler dibersihkan. Piknometer yang telah diisi akuades segera ditimbang dan beratnya dicatat. Cara yang sama dilakukan untuk larutan baku etanol dengan masing-masing konsentrasi 20; 18; 16; 14; 12; 10; 8; 6; 4; dan 2 %. Berat jenis dihitung dengan rumus persamaan:

$$\rho = \frac{m}{v}$$

Keterangan: m : massa dari etanol
 v : volume etanol
 $m = m_2 - m_1$
 m_1 : berat piknometer kosong
 m_2 : berat piknometer + etanol

dari rumus diatas dibuat grafik hubungan antara berat jenis dengan konsentrasi etanol. Sehingga, diperoleh persamaan regresi linier.

3.5.10.2 Pengukuran Kadar Alkohol dengan Metode Konversi Berat Jenis (Mardoni, 2009)

Piknometer volume 25 mL dibersihkan secara hati-hati dengan menggunakan aseton, dikeringkan di dalam oven dan ditimbang. Piknometer diisi dengan destilat hasil fermentasi secara hati-hati hingga penuh. Suhu akuades dalam piknometer ditunggu hingga mencapai suhu percobaan (25 °C), sisa destilat pada puncak pipa kapiler dibersihkan. Piknometer segera ditimbang dan beratnya dicatat.

3.5.11 Penentuan Kadar Glukosa dengan Metode DNS (Sarah, dkk., 2010)

3.5.11.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) dilakukan dengan menggunakan larutan standar glukosa dan ditambah dengan reagen DNS kemudian ditentukan absorbansinya menggunakan spektrofotometer. Dalam penelitian ini dibuat larutan glukosa 0,2 mg/mL kemudian diambil sebanyak 1 mL dan ditambahkan 1 mL reagen DNS, diinkubasi pada air mendidih selama 15 menit dan kemudian didinginkan pada suhu ruang selama 20 menit. Ditambah 1 mL K-Na Tartrat 40%, dan ditetapkan volume larutan hingga 10 mL menggunakan akuades. Larutan standar glukosa diukur absorbansinya pada panjang gelombang 500-560 nm dengan interval 5 nm sebanyak tiga kali untuk masing masing panjang gelombang sehingga diperoleh λ_{maks} yang digunakan untuk pengukuran selanjutnya. Sebagai blanko digunakan akuades dengan perlakuan yang sama. Kurva dibuat antara panjang gelombang sebagai absis terhadap absorbansi sebagai ordinat.

3.5.11.2 Penentuan Kurva Standar Glukosa

Kurva standar glukosa dibuat dari larutan glukosa konsentrasi 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 mg/mL. Larutan glukosa diambil sebanyak 1 mL dan ditambahkan 1 mL reagen DNS, diinkubasi pada air mendidih selama 15 menit dan kemudian didinginkan pada suhu ruang selama 20 menit. Ditambah 1 mL K-Na Tartrat 40 %, dan ditetapkan volume larutan hingga 10 mL menggunakan akuades. Setelah itu sampel diukur absorbansinya pada panjang gelombang 510 nm. Konsentrasi glukosa standar ditunjukkan dengan kurva standar.

3.5.11.3 Analisis Glukosa menggunakan Metode DNS

Substrat dari hasil perlakuan yang akan dianalisis kadar glukosanya dipipet sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, direaksikan dengan 1 mL reagen DNS, diinkubasi pada air mendidih selama 15 menit dan kemudian didinginkan pada suhu ruang selama 20 menit. Ditambah 1 mL K-Na Tartrat 40 %, dan ditetapkan volume larutan hingga 10 mL menggunakan akuades. Setelah itu sampel diukur absorbansinya pada panjang gelombang 510 nm. Nilai absorbansi yang diperoleh diplotkan pada kurva standar untuk mengetahui konsentrasi glukosa pada sampel.

3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh dalam penelitian ini adalah kadar bioetanol hasil fermentasi. Data yang diperoleh dianalisis dengan analisis varians (ANOVA) untuk menguji adanya perbedaan konsentrasi kadar (%) etanol filtrat hasil hidrolisis sewaktu fermentasi. Apabila terjadi perbedaan yang signifikan maka dilanjutkan dengan uji BNT dengan taraf 5 %. Untuk mengetahui perlakuan yang berpengaruh atau berbeda nyata diantara perlakuan yang lain.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Preparasi Sampel

Penelitian tentang pembuatan bioetanol ini menggunakan limbah padat dari industri tapioka (onggok) sebagai bahan utama. Menurut Childyal dan Lonsanse (1990), limbah padat industri tapioka ini mengandung kadar pati yang cukup tinggi yaitu 63 %, sedangkan berdasarkan Badan Penelitian dan Pengkajian Teknologi Indonesia kadar pati mencapai angka 67,8 %. Pati dalam onggok digunakan sebagai sumber glukosa yang diperoleh melalui perlakuan hidrolisis. Glukosa yang dihasilkan selanjutnya akan difermentasi dengan bantuan khamir untuk menghasilkan etanol.

Onggok yang merupakan limbah padat dari industri tepung tapioka ini masih mengandung kadar air yang cukup tinggi sehingga perlu diberikan perlakuan pengeringan. Pengeringan tanpa suhu tinggi dilakukan di bawah sinar matahari selama kurang lebih 3 hari. Tujuan dari pengeringan ini adalah untuk menghambat pertumbuhan bakteri sehingga memperlambat pembusukan onggok. Proses pengeringan tidak menggunakan suhu tinggi, tetapi memanfaatkan panas sinar matahari. Hal ini dikarenakan suhu tinggi menyebabkan degradasi keluarnya air dari onggok terlalu cepat, sehingga akan mengakibatkan *browning*. Onggok yang telah dikeringkan berbentuk seperti batu kerikil dengan warna cokelat kehitaman, dan mempunyai waktu penyimpanan lebih tahan lama daripada dalam keadaan basah. Onggok yang telah kering kemudian diblender hingga berukuran

lebih kecil dari ukuran sebelumnya. Pemplenderan ini bertujuan untuk memperluas permukaan dari onggok, agar mempermudah proses gelatinisasi.

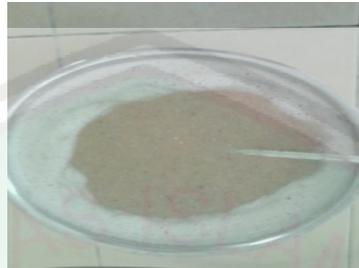
Onggok yang telah dikeringkan dan diblender dapat dilihat pada Gambar 4.1.



(a) Onggok yang Dikeringkan
(b) Onggok yang telah Dihaluskan

Proses pembuatan bioetanol dengan cara fermentasi sangat dipengaruhi oleh bahan baku yang digunakan. Sumber bahan baku yang mengandung pati seperti onggok ini harus dilakukan pengolahan awal gelatinisasi. Onggok yang telah diblender ditimbang sebanyak 100 gram dan ditambah akuades 1000 mL. pH sampel diatur menjadi pH 4,5 yang merupakan pH optimum dari enzim α -amilase dengan penambahan HCl 7 %. Apabila pH sudah sesuai yang dikehendaki, selanjutnya dilakukan penambahan buffer asetat pH 4 sebanyak 15 mL dan volume ditetapkan menjadi 1500 mL dengan akuades. Penambahan buffer asetat dilakukan untuk mempertahankan pH dalam sampel sehingga pada waktu proses sakarifikasi nanti enzim α -amilase bisa bekerja secara maksimal pada pH optimumnya, sedangkan penambahan akuades dimaksudkan untuk membengkakkan granula pati. Tujuan dilakukan pengadukan adalah agar akuades dapat tercampur dan membentuk pasta. Campuran akuades dan onggok

dipanaskan hingga suhu 100 °C dan terus diaduk selama 15 menit. Pemanasan dengan pengadukan akan lebih mempercepat proses gelatinisasi.



Gambar 4.2. Sampel yang telah Melalui Proses Gelatinisasi

Gelatinisasi adalah peristiwa perkembangan granula pati sehingga granula pati tersebut tidak dapat kembali pada kondisi semula (Winarno, 1947). Perkembangan granula ini pada mulanya bersifat balik, tetapi jika dipanaskan secara terus menerus hingga mencapai suhu tertentu, maka sifatnya berubah menjadi tidak dapat balik bahkan akan terjadi perubahan struktur granula. Proses gelatinisasi ini akan merusak pertahanan struktur granula pati dengan terlebih dulu merusak ikatan hidrogen yang mempunyai fungsi utama dalam mempertahankan struktur dan integritas granula pati.

Pati merupakan gabungan dari jutaan granula-granula pati. Menurut Bank dan Greenwood (1975), pati tersusun dari dua macam karbohidrat, amilosa dan amilopektin, dalam komposisi yang berbeda. Jumlah komposisi amilosa dan amilopektin dalam pati ini sangat berpengaruh pada proses gelatinisasi pati.

Penambahan air pada pati akan membentuk suatu sistem dispersi pati dengan air, karena pati mengandung amilosa dan amilopektin yang mengandung gugus hidroksil yang reduktif. Gugus hidroksil akan bereaksi dengan hidrogen dari air. Dalam keadaan dingin (belum dilakukan pemanasan) viskositas sistem

dispersi pati air hanya berbeda sedikit dengan viskositas air, karena ikatan patinya masih cukup kuat sehingga air belum mampu masuk ke dalam granula pati. Setelah onggok dipanaskan ikatan hidrogen antara amilosa dan amilopektin mulai lemah sehingga air semakin mudah terpenetrasi ke dalam susunan amilosa dan amilopektin. Pada kondisi ini telah terjadi proses pembengkakan, dan ketika suhu pemanasan dinaikkan maka molekul granula pati bergetar sehingga memutuskan ikatan-ikatan antar molekul pati dan mengikat air dengan ikatan hidrogen. Jika pemanasan dilanjutkan pada suhu yang lebih tinggi, pembengkakan granula pati menjadi maksimum hingga menjadi pecah, akibatnya akan terjadi gelatinisasi pati.

Onggok yang telah dipanaskan pada suhu tinggi ini akan menjadi lebih kental seperti bubur dengan warna menjadi lebih pekat (kecoklatan). Hal ini menandakan bahwa telah terjadi proses gelatinisasi dari pemanasan yang telah diberikan. Onggok yang telah menjadi bubur kemudian didiamkan sampai dingin, diambil 45 gram, dimasukkan ke dalam erlenmeyer atau wadah berbahan kaca dan ditutup menggunakan kapas dan plastik *wrap* untuk dilakukan sterilisasi. Proses sterilisasi dilakukan dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 1 jam. Tahap ini dilakukan untuk persiapan proses sakarifikasi menggunakan enzim α -amilase.

4.2 Regenerasi Khamir (Kh 2) pada Media Padat (YPGB)

Isolasi khamir merupakan suatu cara untuk memisahkan atau memindahkan mikroba tertentu dari lingkungan sehingga diperoleh kultur murni atau biakan murni. Kultur murni khamir ini selanjutnya akan dilakukan peremajaan secara kontinyu untuk menjaga keberlangsungan hidup khamir. Khamir yang digunakan

pada proses fermentasi dalam penelitian ini adalah hasil peremajaan dari khamir yang diisolasi dari tetes tebu.

Pada penelitian pendahulu, khamir hasil isolasi dari tetes tebu ini mempunyai waktu pertumbuhan yaitu 18 jam. Pada jam ke-18 ini khamir telah mengalami fase eksponensial dimana terjadi pembelahan sel sehingga terjadi peningkatan jumlah khamir. Sehingga khamir sudah bisa digunakan sebagai inokulum untuk proses fermentasi.

Kultur khamir dilakukan untuk menjaga kelangsungan hidup khamir itu sendiri. Kultur khamir ini dilakukan selama 24 jam. Dalam rentang waktu 1 - 2 hari, hasil biakan sudah bisa digunakan untuk pembuatan inokulum. Mikroorganisme khamir yang akan memfermentasi dan mengubah sebagian besar energi dari gula ke dalam bentuk etanol. Penampakan secara fisik khamir ada yang membentuk film atau lapisan pada permukaan medium, umumnya kering dan berlendir, berwarna putih atau krem serta tidak berbau. Penampakan fisik khamir setelah dikultivasi selama 2 hari dapat dilihat pada Gambar 4.3.



Gambar 4.3. Karakter Fisik Khamir (Kh 2) pada Hari ke-2

4.3 Sakarifikasi menggunakan α -amilase

Pembuatan bioetanol dari onggok (limbah padat tapioka) dilakukan dengan menggunakan metode sakarifikasi dan fermentasi simultan, yang menggunakan enzim α -amilase untuk proses hidrolisis dan mikroorganisme khamir hasil dari isolasi tetes tebu untuk proses fermentasi dengan variasi pH dan lama fermentasi.

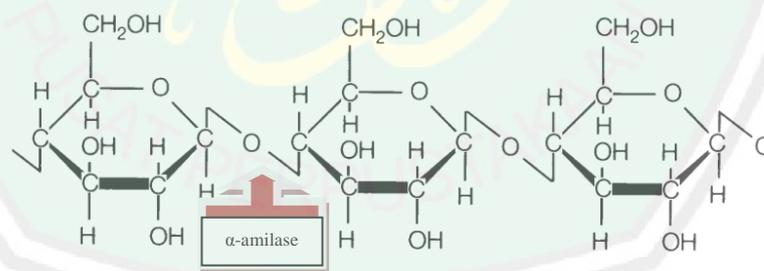
Pembuatan bioetanol dalam penelitian ini terbagi menjadi menjadi dua tahap utama, yaitu hidrolisis dan fermentasi. Sakarifikasi secara umum adalah proses mengubah pati menjadi gula sederhana. Karena itu sakarifikasi merupakan proses yang penting pada pembuatan bioetanol, sebagai proses penentu jumlah glukosa yang akan dikonversikan menjadi etanol pada tahap fermentasi.

Proses sakarifikasi dalam penelitian ini dilakukan secara enzimatik, yaitu menggunakan enzim α -amilase. Sampel (onggok yang telah menjadi bubur) yang telah dimasukkan ke dalam botol kaca dan disterilisasi ditambahkan enzim α -amilase 5 mL. Diinkubasi pada suhu ruang selama 1 jam, dengan maksud untuk memaksimalkan kerja enzim. Setelah 1 jam substrat diambil untuk dianalisa kadar glukosa menggunakan metode DNS.

Sakarifikasi onggok bertujuan untuk memecah pati dalam onggok menjadi rantai yang lebih pendek. Menurut Purba (2009) hidrolisis pati merupakan proses pemecahan molekul amilum menjadi bagian-bagian penyusunnya yang lebih sederhana seperti dekstrin, isomaltosa, maltosa dan glukosa. Salah satu enzim yang dapat memotong ikatan tersebut adalah enzim α -amilase.

Enzim α -amilase adalah endoenzim yang kerjanya memutuskan ikatan α -1,4 secara acak di bagian dalam molekul baik pada amilosa maupun pada amilopektin. Hidrolisis dengan α -amilase menyebabkan amilosa terurai menjadi maltosa dan maltotriosa. Pada tahap selanjutnya maltotriosa terurai kembali menjadi maltosa dan glukosa (Walker dan Whelan, dalam Forgy, 1983). Enzim α -amilase ini memiliki beberapa sisi aktif yang dapat mengikat 4 hingga 10 molekul substrat sekaligus sehingga proses hidrolisisnya lebih cepat.

Enzim α -amilase yang memotong ikatan α -1,4 amilosa dan amilopektin dengan cepat pada larutan pati yang telah kental yang telah mengalami gelatinisasi. Proses ini dinamakan likuifikasi pati. Produk akhir yang dihasilkan adalah dekstrin beserta sejumlah kecil glukosa dan maltosa. α -amilase akan menghidrolisis ikatan α -1,4 glikosida pada polisakarida dengan hasil degradasi secara acak dibagian tengah atau bagian dalam molekul.



Gambar 4.4. Cara Kerja Enzim α -amilase Memutus Ikatan Glikosidik α -1,4

Cara kerja enzim α -amilase terjadi melalui dua tahap, yaitu: pertama, degradasi amilosa menjadi maltosa dan maltotriosa yang terjadi secara acak. Degradasi ini terjadi sangat cepat dan diikuti dengan menurunnya viskositas yang cepat pula. Kedua, relatif sangat lambat yaitu pembentukan glukosa dan maltosa

sebagai hasil akhir dan caranya tidak acak. Keduanya merupakan kerja enzim α -amilase pada molekul amilosa saja (Winarno, 1983).

Kerja α -amilase pada amilopektin akan menghasilkan glukosa, maltosa dan berbagai jenis α -limit dekstrin, yaitu oligosakarida yang terdiri dari cepat atau lebih residu gula yang semuanya mengandung ikatan α -1,6 (Winarno, 1983). Kerja enzim α -amilase dalam menghidrolisis pati adalah dengan memotong ikatan α -amilase-1,4, tapi tidak memotong α -1,6 (Winarno (1992) dalam Rochmawatin, 2101). Enzim α -amilase biasa juga disebut sebagai *liquifying enzyme*, karena enzim α -amilase bekerja pada proses liquifikasi yang memecah pati menjadi rantai yang lebih pendek.

Pengembangan teknologi bioproses dengan menggunakan enzim pada proses hidrolisis diyakini sebagai suatu proses yang lebih ramah lingkungan. Hidrolisis secara enzimatik dapat mengurangi penggunaan asam sehingga dapat mengurangi efek negatif terhadap lingkungan. Keuntungan lainnya, jumlah glukosa yang dihasilkan lebih besar jika dibandingkan dengan hidrolisa asam. Hidrolisa enzim juga dapat mencegah adanya reaksi efek samping karena sifat katalis enzim sangat spesifik, sehingga dapat mempertahankan aroma bahan dasar.

Hasil pengamatan dari ongkok yang telah diinkubasi selama 1 jam untuk proses hidrolisis tidak menampakkan perbedaan fisik yang nyata. Tetap berwarna kecoklatan dengan tekstur seperti bubur. Tahapan ini berakhir ditandai dengan dilakukan uji kadar glukosa menggunakan metode DNS pada panjang gelombang 510 nm. Hasil glukosa ongkok setelah sakarifikasi dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1. Kadar Glukosa

Sampel	Kadar Glukosa (%)
Sebelum sakarifikasi	0,79
Setelah sakarifikasi	9,76

Berdasarkan tabel 4.1 terjadi peningkatan yang signifikan dari kadar glukosa onggok dari sebelum sakarifikasi dan setelah dilakukan sakarifikasi menggunakan enzim α -amilase. Sebelum dilakukan sakarifikasi, kadar glukosa sampel 0,79 % dan setelah dilakukan sakarifikasi kadar glukosa meningkat 9,76 %. Peningkatan kadar glukosa ini menunjukkan bahwa enzim α -amilase bekerja secara optimal mengubah pati menjadi glukosa. Sampel yang telah diuji kadar glukosa selanjutnya dipersiapkan untuk proses fermentasi.

4.4 Uji Aktifitas Amilase

Uji aktivitas amilase pada dasarnya dilakukan untuk mengetahui aktivitas enzim untuk mengubah pati menjadi glukosa. Pada uji aktivitas enzim, aktivitas α -amilase ditentukan dengan cara mengukur jumlah gula pereduksi yang dihasilkan oleh aktivitas hidrolisis enzim terhadap substrat pati.

Berneld (1955) dalam Sarah (2010) mengemukakan bahwa aktivitas enzim α -amilase secara kuantitatif dapat ditentukan dengan menggunakan metode DNS. Reagen DNS sebagai oksidator akan tereduksi oleh gula yaitu maltosa menjadi asam-3-amino-5-dinitro salisilat dan akan terjadi perubahan warna kuning menjadi merah jingga. Oleh karena itu semakin pekat warna yang dihasilkan maka semakin banyak gula pereduksi yang terkandung. Gula pereduksi ini dihasilkan dari proses hidrolisis oleh enzim α -amilase maka semakin banyak reagen DNS

yang tereduksi oleh gula pereduksi dan perubahan warna menjadi merah jingga semakin pekat.

Penentuan aktivitas enzim pada penelitian ini diawali dengan melarutkan 5 gr *soluble starch* ke dalam 50 mL buffer asetat pH 4. Dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer*. Disaring, diambil filtratnya sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Ditambah 1 mL enzim α -amilase dan diinkubasi selama 30 menit. Sampel yang telah diinkubasi diambil 1 mL, dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambah 1 mL reagen DNS. Didiamkan dalam air mendidih selama 15 menit dan kemudian didinginkan pada suhu ruang selama 20 menit. Ditambah 1 mL K-Na Tartrat 40%, dan ditetapkan volume larutan hingga 10 mL menggunakan akuades. Setelah itu sampel diukur absorbansinya pada panjang gelombang 510 nm.

Sutrisno (2007), pengukuran aktivitas enzim dilakukan dengan mengkonversikan nilai absorbansi yang diperoleh ke dalam persamaan linear kurva standar glukosa, kemudian dihitung dengan persamaan linear. Perhitungan (Lampiran 7) menunjukkan bahwa aktivitas enzim α -amilase adalah 0,32 Unit. Banyaknya pati yang berhasil dihidrolisis oleh enzim α -amilase selama satu menit sebanding dengan aktivitas enzim α -amilase. Jadi, aktivitas enzim α -amilase didefinisikan sebagai jumlah enzim α -amilase yang diperlukan untuk menghidrolisis sejumlah pati dalam waktu satu menit. Penelitian Suarni (2007) menyatakan bahwa enzim α -amilase yang bersumber dari kecambah kacang hijau memiliki nilai aktivitas enzim 4,09 U/mL, dan aktivitas spesifik 1,73 U/mg.

4.5 Produksi Etanol dengan Proses Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak

Produksi bioetanol dari onggok (limbah padat tapioka) dilakukan dengan variasi pH dan lama fermentasi, dengan tujuan untuk mengetahui kombinasi perlakuan yang paling optimum. Pada penelitian ini proses sakarifikasi dan fermentasi dilakukan secara serentak. Proses ini sebenarnya hampir sama dengan proses terpisah antara hidrolisis enzim dengan proses fermentasi, hanya dalam proses sakarifikasi dan fermentasi serentak, hidrolisis dan fermentasi dilakukan dalam satu reaktor. Samsuri (2007) mengungkapkan bahwa keuntungan dari proses ini adalah polisakarida yang terkonversi menjadi monosakarida tidak kembali menjadi polisakarida karena monosakarida langsung difermentasi menjadi etanol. selain itu dengan menggunakan satu reaktor dalam prosesnya akan mengurangi biaya yang digunakan.

Fermentasi merupakan tahap paling kritis dalam produksi etanol. Fermentasi merupakan proses biokimia dimana mikroba yang berperan dalam fermentasi akan menghasilkan enzim yang mampu mengonversi substrat menjadi bioetanol. Proses fermentasi melibatkan mikroorganisme khamir yang merupakan hasil isolasi dari tetes tebu. Isolat khamir dari tetes tebu ini mempunyai waktu inkubasi optimum 18 jam. Pada jam ke-18 inokulum sudah bisa digunakan untuk proses fermentasi. Berdasarkan pada kurva pertumbuhannya, pada jam ke-18 ini khamir mengalami fase eksponensial, dimana sel mulai membelah dan masuk ke dalam periode pertumbuhan, reproduksi sel paling aktif dan waktu regenerasinya konstan, ini dibuktikan dengan nilai absorbansi yang mulai meningkat.

Penelitian ini menggunakan kombinasi kajian variasi pH dan lama fermentasi. Sebelum fermentasi dilakukan perlakuan untuk mempersiapkan sampel sesuai pH yang dikehendaki, yaitu pH 4; 4,5; 5. Pengaturan PH dengan menambahkan HCl 7 % ke dalam sampel dan pengecekan pH menggunakan indikator pH universal. Media fermentasi yang telah siap ditambahkan inokulum sebanyak 10 mL dan diinkubasi selama waktu 5; 7; 9; 11 hari.

Salah satu faktor yang harus diperhatikan dalam proses fermentasi adalah medium fermentasi. Medium sebagai tempat tumbuh dan berkembang harus menjamin ketersediaan dan kebutuhan mikroba untuk hidup dan tumbuh berkembang. Jika mikroba kekurangan nutrisi maka akan mengganggu metabolisme sel. Medium fermentasi mengandung sumber karbon yang dapat dimanfaatkan oleh khamir. Sumber karbon yang dimanfaatkan adalah gula, seperti fruktosa, galaktosa, sukrosa. Khamir, yaitu *Saccharomyces cerevisiae* dapat menghasilkan enzim zimase dan invertase. Enzim invertase berfungsi untuk memecah sukrosa menjadi gula sederhana (glukosa dan fruktosa), dan enzim zimase merombak glukosa menjadi etanol.

Setelah fermentasi aerobik selesai, dilanjutkan dengan fermentasi anaerobik, yaitu tanpa adanya suplai oksigen. Fermentasi ini merupakan proses konversi glukosa menjadi etanol dengan bantuan enzim zimase yang terbentuk selama proses berlangsung. Menurut Rose (1967), fermentasi glukosa ini berjalan lebih cepat dan spontan karena sifatnya yang fermentatif. Hal ini akan menimbulkan panas yang menyebabkan suhu fermentator terus meningkat.

Kondisi ini sesuai dengan keadaan ketika perlakuan berlangsung dimana wadah tempat substrat mengalami peningkatan suhu menjadi hangat.

Pada fermentasi pada limbah padat tapioka yang lebih lanjut alkohol oleh enzim alkoholase dapat diubah menjadi asam asetat, asam piruvat dan asam laktat. Terbentuknya asam asetat, asam piruvat dan asam laktat karena adanya bakteri *Acetobacter* yang sering terdapat dalam ragi yang bersifat oksidatif. (Buckle, et al., 1985), menyatakan bahwa asam piruvat adalah produk yang terbentuk pada hidrolisis glukosa menjadi etanol. Asam piruvat dapat diubah menjadi etanol dan asam laktat. Asam-asam organik dari alkohol membentuk ester aromatik sehingga tape memiliki cita rasa yang khas.

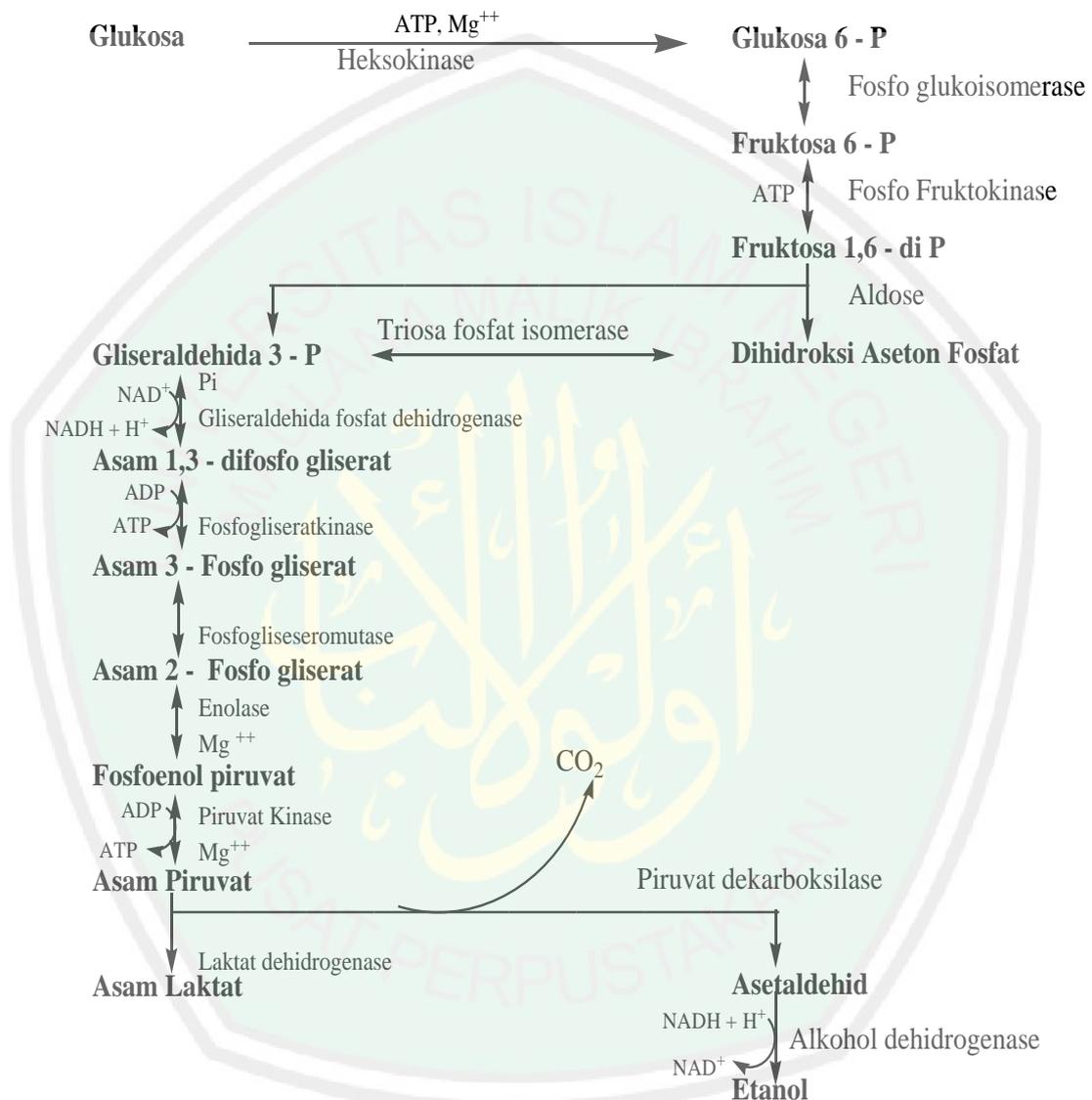
Fermentasi anaerobik berjalan sesuai biosintesis *Embden-Meyerhof Pathway* (EMP), yaitu reaksi konversi menjadi asam piruvat yang kemudian dapat diubah menjadi berbagai produk, salah satunya adalah etanol. Secara garis besar, selama proses berlangsung, dua molekul ADP diubah menjadi ATP. Selanjutnya ATP tersebut diregenerasi kembali menjadi ADP, dan pada akhir proses fermentasi dihasilkan dua mol ATP.



Senyawa ATP yang dihasilkan dari jalur anaerobik ini membutuhkan 2 mol senyawa fosfat sebagai nutrisi untuk setiap mol glukosa yang mengalami metabolisme. Sumber senyawa fosfat bebas ini berasal dari reaksi-reaksi yang mengonsumsi ATP dan mengeluarkan senyawa monofosfat. Senyawa ATP yang dihasilkan ini merupakan energi tinggi yang melepaskan panas ke lingkungan, sehingga suhu fermentasi berangsur-angsur meningkat.

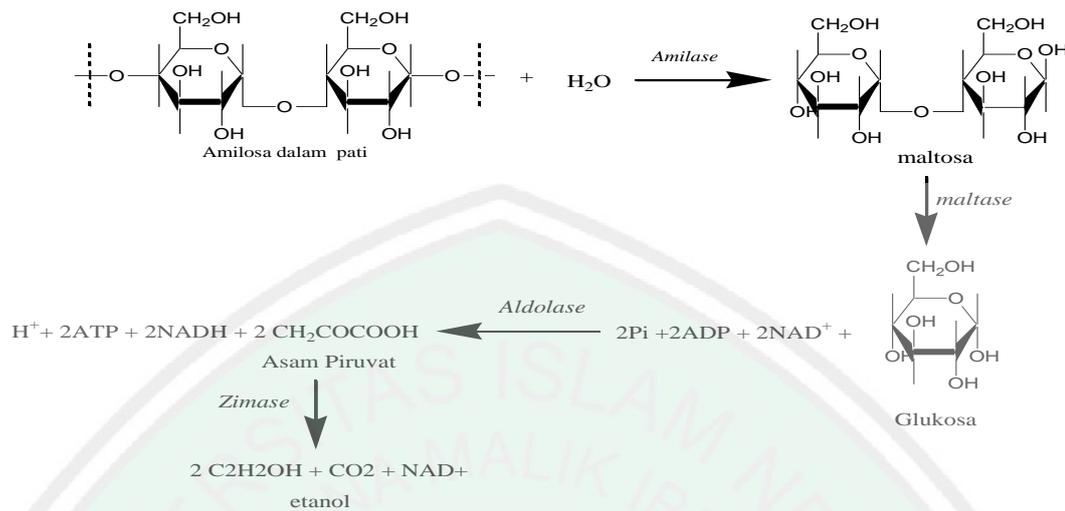
Tahap glikolisis berdasarkan skema *Embden-Meyerhof Pathway* (EMP) (Gambar 4.5), dimulai dari glukosa. Reaksi tahap pertama terjadi reaksi fosforolasi yang mengubah glukosa menjadi glukosa 6-fosfat yang disertai dengan penguraian ATP menjadi ADP. Tahap kedua merupakan isomerisasi glukosa 6-fosfat menjadi fruktosa 6-fosfat, tetapi tidak terjadi penguraian maupun pembentukan ATP. Fruktosa 6-fosfat ini selanjutnya diubah menjadi fruktosa 1,6-difosfat dengan memasukkan gugus fosfat dari ATP. Tahap berikutnya, fruktosa 1,6-difosfat mengalami pemecahan menjadi dua senyawa, yaitu gliseraldehida 3-fosfat dan dihidroksiaseton fosfat. Dalam keadaan normal dihidroksiaseton fosfat diubah seluruhnya menjadi yaitu gliseraldehida 3-fosfat sehingga kemungkinan hilangnya setengah dari energi molekul glukosa dapat dicegah. Reaksi kelima terjadi perubahan gliseraldehida 3-fosfat menjadi asam 1,3-difosfoglisarat, yang melibatkan reaksi pemasukan satu gugus fosfat dari asam fosfat. Reaksi ini disertai dengan reaksi reduksi pembentukan NADH dari NAD^+ . Asam 1,3-difosfoglisarat kemudian mengalami defosforilasi menjadi 3-P-asam gliserat dengan melepaskan fosfat dan aseptor fosfat ADP membentuk ATP. Reaksi selanjutnya adalah isomerisasi asam gliserat 3-fosfat menjadi asam gliserat 2-fosfat yang berlanjut membentuk asam fosfoenol piruvat dengan menghasilkan ATP. Tahap terakhir reaksi glikolisis ditandai dengan pembentukan asam piruvat dari asam fosfoenol piruvat. Terbentuknya asam piruvat merupakan awal dari terjadinya fermentasi alkohol. Reaksi ini ditandai dengan terjadi reaksi perubahan asam piruvat menjadi asetaldehida, dan selanjutnya direduksi oleh NADH dengan

enzim zimase, asetaldehida akan diubah menjadi etanol dan CO_2 yang merupakan hasil akhir fermentasi alkohol.



Gambar 4.5. Lintasan Embden Meyerhof-Parnas (Sebayang, 2006).

Secara singkat perubahan biokimia selama fermentasi onggok dapat ditulis sebagai berikut (Kuswanto dan Sudarmadji (1987) dalam Hasanah (2012):



Gambar 4.6. Reaksi Fermentasi Alkohol Ongkok (Hasanah, 2012)

4.6 Pemisahan Hasil Fermentasi dengan Destilasi

Distilasi merupakan proses pemisahan berdasarkan pada perbedaan kemampuan atau daya penguapan komponen-komponen tersebut. Adanya perbedaan kemampuan penguapan antara komponen-komponen tersebut dikenal sebagai volatilitas relatif. Prinsip pada destilasi biasa adalah pemisahan dua zat atau lebih yang mempunyai perbedaan titik didih. Jika zat-zat yang dipisahkan mempunyai perbedaan titik didih yang jauh berbeda, dapat digunakan metode isolasi biasa. Zat yang memiliki titik didih rendah akan cepat terdestilasi daripada zat yang bertitik didih tinggi. Uap zat yang bersifat volatil dan memiliki titik didih yang rendah akan masuk ke dalam pipa pada kondensator (terjadi proses pendinginan) sehingga akan turun berupa tetesan-tetesan yang turun ke dalam penampung atau disebut juga destilat.

Metode destilasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah destilasi fraksinasi. Dalam destilasi fraksinasi proses pemisahan parsial diulang berkali-kali

dimana setiap kali terjadi pemisahan lebih lanjut. Destilasi ini digunakan untuk untuk larutan yang mempunyai perbedaan titik didih yang tidak terlalu besar yaitu sekitar 30 °C atau lebih. Dasar pemisahan suatu campuran dengan destilasi adalah adanya perbedaan titik didih dua cairan atau lebih yang jika campuran tersebut dipanaskan, maka komponen yang titik didihnya lebih rendah akan menguap lebih dulu. Tetapi dengan mengatur suhu dengan cermat maka dapat menguapkan kemudian mengembunkan komponen-komponen secara bertahap. Destilasi terfraksi ini berbeda dengan destilasi biasa karena terdapat suatu kolom fraksionasi dimana terjadi suatu proses refluks. Proses refluk pada destilasi ini dilakukan agar pemisahan campuran etanol-air dapat terjadi dengan baik. Kolom fraksinasi berfungsi agar kontak antar cairan dengan uap terjadi lebih lama, sehingga komponen yang lebih ringan dengan titik didih yang lebih rendah akan terus menguap dan masuk kondensor. Sedangkan komponen yang lebih besar titik didihnya akan kembali pada labu destilasi.

Campuran etanol dan air dicampurkan dalam labu destilasi, lalu didesstilasikan dengan memanaskan campuran tersebut dengan *hot plate*. Uap yang dihasilkan adalah uap hasil dari zat yang bertitik didih rendah, dalam hal ini adalah etano. Uap tersebut nantinya akan diembunkan dengan bantuan kondensor yang berfungsi sebagai pendingi uap. Cairan tersebut nantinya akan menetes ke dalam labu elenmeyer. Proses aliran air pada elenmeyer harus dari bawah (tempat rendah) menuju atas (tempat tinggi) agar uap yang dihasilkan dapat didinginkan dengan baik dan optimal serta melawan arah datangnya uap agar proses penyubliman berlangsung maksimal dan destilat yang dihasilkan lebih murni.

Destilasi dilakukan dengan memasukkan media fermentasi ke dalam labu alas bulat dan diposisikan di atas *hot plate*. Suhu diatur pada 78 °C ($\pm 2^\circ\text{C}$). Pemilihan didasarkan pada titik didih yang dimiliki oleh etanol adalah 78 °C, apabila suhu mencapai 100 °C ditakutkan air yang terdapat dalam media ikut teruapkan sehingga etanol yang dihasilkan berkurang kemurniannya. Jumlah destilat pada masing-masing perlakuan dapat dilihat pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Volume Destilat Hasil Fermentasi

Perlakuan	Total (mL)	Rata-rata (mL)	Rendemen (%)
D ₁ T ₁	94	31,30	62,70
D ₂ T ₁	93	31	62
D ₃ T ₁	91	30,30	60,67
D ₁ T ₂	93	31	62
D ₂ T ₂	90	30	60
D ₃ T ₂	91	30,30	60,60
D ₁ T ₃	88	29,30	58,67
D ₂ T ₃	92	31,30	62,67
D ₃ T ₃	90	30	60
D ₁ T ₄	91	30,30	60,67
D ₂ T ₄	89	29,67	59,33
D ₃ T ₄	89	29,67	59,33

Berdasarkan data dari Tabel 4.2 setiap perlakuan hampir mempunyai volume yang sama, tetapi tingginya volume destilat tidak menandakan bahwa kadar etanol akan tinggi. Karena semakin lama proses fermentasi, aktivitas khamir semakin menurun. Jumlah nutrisi yang terdapat dalam medium fermentasi semakin menurun yang mengakibatkan khamir tidak mampu lagi memproduksi alkohol. Tabel 4.2 juga menjelaskan bahwa perlakuan D₁T₁ (variasi pH 4 dan lama fermentasi 5 hari) dan D₂T₃ (variasi pH 4,5 dan lama fermentasi 9 hari) yang mempunyai destilat terbanyak yaitu 31,30 mL dengan rendemen 62,67 % .

Destilat selanjutnya dianalisis menggunakan metode konversi berat jenis untuk mengetahui kadar etanol sampel.

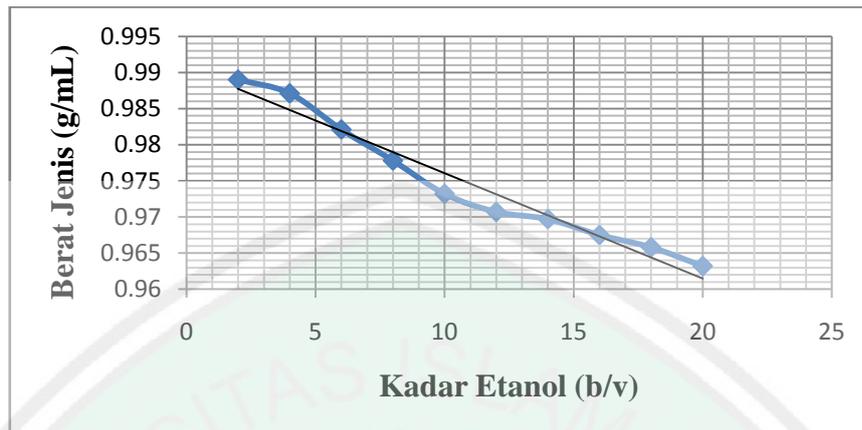
4.7 Penentuan Kadar Etanol dengan Metode Konversi Berat Jenis

Metode konversi berat jenis merupakan metode penentuan kadar etanol berdasarkan hasil berat jenis destilat hasil fermentasi. Berat jenis destilat ini diukur dengan menggunakan piknometer 25 mL. Sebelumnya dilakukan pembuatan kurva standar etanol dengan variasi konsentrasi. Pembuatan kurva standar ini untuk membuat grafik hubungan antara kadar etanol dengan berat jenis sehingga akan dihasilkan persamaan linier. Nilai hubungan antara berat jenis dan kadar etanol dapat dilihat pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3. Data Massa Jenis Etanol p.a

Kadar Etanol (%)	Berat Jenis (g/mL), 25 °C
2	0,989
4	0,9871
6	0,9821
8	0,9778
10	0,9732
12	0,9707
14	0,9697
16	0,9675
18	0,9658
20	0,9632

Berdasarkan data pada Tabel 4.3, maka kurva standar yang diperoleh:



Gambar 4.7. Kurva Hubungan Massa Jenis dan Konsentrasi Etanol

Gambar 4.7 menjelaskan bahwa semakin kecil berat jenis etanol maka semakin semakin tinggi kadar etanolnya. Persamaan linier berdasarkan kurva diatas adalah $y = -0,0015x + 0,9906$ (Lampiran 9). Persamaan ini selanjutnya digunakan untuk menentukan kadar etanol hasil fermentasi. Dengan memplotkan hasil berat jenis ke dalam persamaan linier.

4.8 Pengaruh Variasi pH dan Lama Fermentasi terhadap Kadar Etanol

Etanol yang terbentuk selama proses sakarifikasi dan fermentasi serentak merupakan produk hasil metabolit sekunder dari pertumbuhan mikroorganismenya. Khamir dalam merombak glukosa menjadi etanol membutuhkan kondisi optimum untuk pertumbuhan. Menurut Sutiari dalam Sugiharto (1991), ada banyak faktor yang mempengaruhi hasil fermentasi, diantaranya kultur inokulum yang digunakan, lama fermentasi, suhu, pH medium, jumlah nutrisi dalam media fermentasi, gula reduksi dan sebagainya. Penelitian ini menggunakan kajian variasi pH dan lama fermentasi yang dikombinasikan dalam perlakuannya untuk mengetahui kombinasi optimum yang bisa menghasilkan kadar etanol tertinggi.

Persamaan liner yang telah didapatkan dari kurva standar etanol (Lampiran 9), digunakan untuk mencari kadar etanol sampel. Hasil absorbansi yang didapatkan dari pengukuran sampel, kemudian diplotkan ke dalam persamaan. Kadar etanol masing-masing sampel dapat dilihat di tabel 4.4.

Tabel 4.4. Kadar Etanol Hasil Fermentasi

Perlakuan	Kadar Etanol (%)
D ₁ T ₁	2,91 ^b
D ₂ T ₁	3,83 ^{bcd}
D ₃ T ₁	5,39 ^e
D ₁ T ₂	4,25 ^{cde}
D ₂ T ₂	4,56 ^{de}
D ₃ T ₂	7,30 ^f
D ₁ T ₃	3,05 ^{bc}
D ₂ T ₃	4,30 ^{de}
D ₃ T ₃	4,52 ^{de}
D ₁ T ₄	0,49 ^a
D ₂ T ₄	1,05 ^a
D ₃ T ₄	1,13 ^a

Keterangan: Setiap huruf yang berbeda menunjukkan perlakuan yang berbeda nyata dengan tingkat toleransi $\alpha = 0,05$
 Setiap huruf yang sama menunjukkan perlakuan yang tidak berbeda nyata dengan tingkat toleransi $\alpha = 0,05$

Tabel 4.4 menunjukkan bahwa perlakuan yang mempunyai notasi sama tidak berbeda nyata dengan perlakuan lain, akan tetapi perlakuan yang mempunyai notasi berbeda menunjukkan pengaruh nyata dengan perlakuan lain. Perlakuan yang berbeda dengan perlakuan lainnya adalah perlakuan D₃T₂ (pH 5, lama fermentasi 7 hari) yang mempunyai kadar etanol tertinggi yaitu 7,30 %. Perlakuan ini sangat berbeda nyata dengan perlakuan D₃T₁ (pH 5, lama fermentasi 7 hari) yang mempunyai kadar etanol 5,39 %. Menurut analisis statistik menggunakan

anova dua jalur (ANOVA two-way) (Lampiran 10), perlakuan variasi pH dan lama fermentasi memang berpengaruh nyata terhadap kadar etanol yang dihasilkan. Hal ini dapat dilihat dari $F_{hitung} > F_{tabel}$, yaitu $20,78 > 3,40$ dan $61,950 > 3,01$ yang berarti faktor variasi pH dan lama fermentasi berpengaruh nyata ($P < 0,05$). Tetapi interaksi antara kedua variasi tidak menunjukkan pengaruh yang nyata terhadap kadar etanol yang dihasilkan, karena melihat $F_{hitung} < F_{tabel}$, yaitu $0,21 < 2,51$.



Gambar 4.8. Pengaruh Variasi pH dan Lama Fermentasi terhadap Kadar Etanol

Penelitian ini menghasilkan kadar etanol tertinggi mencapai 7,303 % dari perlakuan D_3T_2 (variasi pH 5, lama fermentasi 7 hari) dan kadar etanol terendah 0,49 % adalah kombinasi perlakuan D_1T_4 (pH 4, lama fermentasi 11 hari) (lihat Gambar 4.8). Maka dapat disimpulkan bahwa pada penelitian ini pH terbaik untuk khamir 2 ini adalah pH 5 dengan lama fermentasi 7 hari. Semakin lama waktu fermentasi maka semakin tinggi kadar bioetanol yang dihasilkan. Tetapi jika kadar bioetanol dalam substrat terlalu tinggi akan berpengaruh buruk terhadap pertumbuhan khamir 2. Menurut Retnowati (2009) ampas singkong yang telah dihidrolisis menggunakan HCN 0,5 N dan dilakukan fermentasi, kadar etanolnya

meningkat seiring bertambahnya waktu fermentasi, sesuai dengan kurva pertumbuhan mikroba dimana fase deselarasinya (pertumbuhan optimal) terjadi pada hari ke-7 fermentasi dengan kadar etanol (GC) pada ampas singkong 1,66 % berat dengan yield etanol 0,0166 % berat. Rentang pH bagi pertumbuhan bakteri antara 4–9 dengan pH optimum 6,5–7,5. Begitu pula dengan khamir yang diisolasi dari tetes tebu ini, apabila pH di bawah atau di atas pH optimum maka akan berpengaruh pada aktivitasnya selama proses fermentasi. Menurut Samsuri, dkk (2007), produksi etanol melalui proses SFS tertinggi adalah pada kondisi pH 5 dengan menghasilkan konsentrasi etanol sebesar 2,709 g/L. Penelitian Minarni (2013) tentang pembuatan bioetanol dari biji durian yang telah dihidrolisis oleh asam klorida. Glukosa hasil hidrolisis difermentasi menjadi etanol dengan bantuan *Saccharomyces cerevisiae* dengan variasi pH fermentasi, menunjukkan bahwa kadar etanol tertinggi dihasilkan pada pH fermentasi 4 sebesar 1,61 % (v/v) (GC). Elevri dan Putra (2006) menambahkan bahwa agar batang yang difermentasi menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* menghasilkan kadar etanol secara optimal pada pH 4,5.

Lamanya fase logaritmik bervariasi tergantung pada pengaruh yang digunakan dalam medium fermentasi. Gambar 4.8 menunjukkan pada semua kondisi yaitu pH 4; 4,5; 5, terjadi penurunan kadar etanol dari hari ketujuh. Prescott dan Daunn dalam Rofiq (2012) menyatakan bahwa adanya pengaruh waktu fermentasi terhadap kadar etanol dalam tape. Dimana dalam selang waktu 1 – 7 hari kadar etanol dalam tape terus meningkat, sedangkan setelah 7 hari kadar etanol dalam tape menurun. Hal ini karena pada hari ke-7 telah memasuki fase

stationer dimana jumlah sel yang hidup sebanding dengan yang mengalami kematian. Kondisi ini mengakibatkan jumlah nutrisi terus menurun sehingga metabolit khamir Kh 2 terganggu dan tidak dapat lagi memproduksi etanol. Hal ini sesuai dengan pernyataan Fardiaz (1989) bahwa penurunan jumlah mikroorganisme disebabkan oleh zat nutrisi di dalam medium sudah sangat berkurang dan juga disebabkan oleh adanya hasil-hasil metabolisme yang mungkin beracun atau dapat menghambat pertumbuhan jasad renik.

4.9 Analisis Kadar Glukosa Sisa Fermentasi

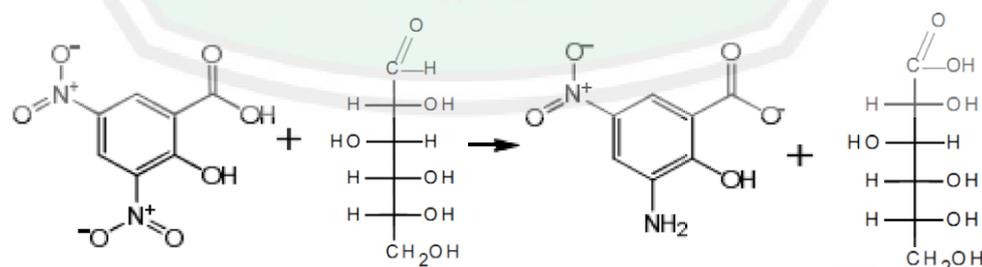
Faktor yang berpengaruh pada hasil fermentasi salah satunya adalah kadar glukosa. Kadar glukosa dapat dianalisa secara kuantitatif untuk mengetahui besar kadar glukosa dalam sampel. Glukosa itu sendiri merupakan senyawa utama yang dikonversikan menjadi etanol oleh khamir. Pada penelitian ini penentuan kadar glukosa secara kuantitatif menggunakan metode DNS (3,5-dinitrosalisilat).

DNS merupakan senyawa aromatis yang dapat bereaksi dengan gula reduksi membentuk asam 3-amino-5-nitrosalisilat, suatu senyawa yang mampu menyerap radiasi gelombang elektromagnetik pada panjang gelombang maksimum 540 nm (Adney and Baker, 2008). Semakin tinggi kadar gula reduksi yang terdapat dalam sampel, maka akan semakin banyak pula molekul asam 3-amino-5-nitrosalisilat yang terbentuk, sehingga absorbansi sampel akan semakin tinggi.

Proses penentuan kadar glukosa diawali dengan penentuan panjang gelombang maksimum dan pembuatan kurva standar. Tujuan dari penentuan

panjang gelombang maksimum adalah untuk mencari panjang gelombang yang akan digunakan untuk spektrofotometer, sedangkan tujuan dari pembuatan kurva ini adalah untuk mengetahui hubungan antara konsentrasi larutan dengan nilai absorbansinya. Hasil dari penelitian, panjang gelombang maksimum terdapat pada kisaran 510 nm dan hasil dari kurva standar menghasilkan persamaan linier $y = 0,751x - 0,096$. Dengan mensubstitusi nilai absorbansi sampel ke persamaan tersebut dan kemudian diplotkan terhadap kurva standar, maka dapat diketahui konsentrasi atau kadar gula reduksi pada sampel.

Reaksi antara gula reduksi dengan DNS merupakan reaksi redoks pada gugus aldehyd gula dan teroksidasi menjadi gugus karboksil. Sementara itu, DNS sebagai oksidator akan tereduksi membentuk asam 3-amino dan 5-nitrosalisilat. Reaksi ini berlangsung dalam suasana basa dan suhu tinggi atau pada air mendidih selama 15 menit. Bila terdapat gula reduksi pada sampel, maka larutan DNS yang awalnya berwarna kuning akan bereaksi dengan gula reduksi sehingga menimbulkan warna jingga kemerahan (Kusmiati dan Agustini, 2010). Reaksi antara DNS dengan glukosa adalah sebagai berikut:



Asam 3,5-dinitrosalisilat Glukosa 3-amino-5-nitrosalisilat Asam glukonat
Gambar 4.9. Reaksi DNS dengan Glukosa

Sampel yang telah direaksikan dengan DNS selanjutnya ditentukan kadar glukosanya menggunakan spektrofotometer. Spektrofotometer adalah alat untuk

mengukur absorbans suatu sampel yang dinyatakan dalam fungsi panjang gelombang. Prinsip kerja spektrofotometer adalah bila cahaya jatuh pada suatu medium homogen, sebagian dari sinar masuk akan dipantulkan, sebagian diserap dalam medium itu, dan sisanya diteruskan. Nilai yang keluar dari cahaya yang diteruskan dinyatakan dalam nilai absorbansi karena memiliki hubungan dengan konsentrasi sampel.

Tabel 4.5. Kadar Gula Sisa Setelah Fermentasi

Perlakuan	Kadar Gula Sisa Fermentasi (%)
D ₁ T ₁	4,06
D ₂ T ₁	2,77
D ₃ T ₁	2,74
D ₁ T ₂	3,37
D ₂ T ₂	3,70
D ₃ T ₂	1,16
D ₁ T ₃	3,06
D ₂ T ₃	2,79
D ₃ T ₃	2,22
D ₁ T ₄	5,56
D ₂ T ₄	5,06
D ₃ T ₄	4,71

Kadar gula setelah sakarifikasi dan kadar gula sisa setelah fermentasi dapat diketahui dengan metode DNS. Kadar gula sisa setelah fermentasi merupakan kadar gula yang belum digunakan oleh khamir dalam proses fermentasi. Kadar gula sisa setelah fermentasi dapat dilihat pada Tabel 4.5. Perlakuan D₃T₂ (variasi pH 5, lama fermentasi 7 hari) yang mempunyai kadar etanol paling tinggi yaitu 7,30 % mempunyai kadar gula sisa fermentasi yang paling rendah 1,16 % dari kadar gula setelah sakarifikasi 9,76 %. Perlakuan D₁T₄ (variasi pH 4, lama fermentasi 11 hari) mempunyai kadar gula sisa fermentasi yang paling tinggi yaitu 5,56 % dari kadar gula setelah sakarifikasi 9,76 %.

Adanya variasi konsentrasi kadar gula sisa fermentasi, kemungkinan disebabkan karena perbedaan penggunaan gula oleh khamir selama proses fermentasi. Berbedanya keadaan tiap-tiap media fermentasi pada perlakuan juga berpengaruh pada aktivitas khamir tersebut. Akibatnya jumlah glukosa yang akan dikonversikan menjadi etanol menjadi tidak maksimal.

Khamir yang digunakan pada proses fermentasi ini adalah khamir yang berada pada fase eksponensial. Pada saat pemasukan khamir (Kh 2) ke dalam medium fermentasi yang memiliki pH 4, khamir akan mengalami proses adaptasi kembali. Ini disebabkan karena pH 4 merupakan keadaan yang sesuai untuk khamir, sehingga gula yang seharusnya dikonversikan menjadi etanol, sebagian besar digunakan untuk proses pertumbuhan dan sintesis enzim. Misalnya pada perlakuan D_1T_3 (variasi pH 4, lama fermentasi 9 hari), dengan kadar gula sisa fermentasi cukup tinggi 3,06 % menghasilkan kadar etanol 3,05 %. Perlakuan D_2T_3 (variasi pH 4,5, lama fermentasi 9 hari) kadar etanol yang dihasilkan 4,30 %, menunjukkan bahwa pada pH 4,5 khamir beradaptasi lebih cepat dari pH 4, sehingga sebagian besar produk gula dikonversikan menjadi bioetanol. Berbeda pada perlakuan D_3T_2 (variasi pH 5, lama fermentasi 7 hari), kadar gula sisa fermentasi terukur sangat rendah yaitu 1,16 % dengan kadar etanol 7,30 %.

Tingginya kadar etanol ini menunjukkan bahwa makin banyak gula reduksi yang dimanfaatkan oleh khamir sehingga kadar gula sisa fermentasi akan semakin kecil dan sebaliknya makin sedikit gula reduksi yang dimanfaatkan khamir maka makin rendah pula konsentrasi yang dihasilkan. Winarti (1996) menyatakan semakin tinggi konsentrasi substrat atau gula reduksi yang dipecah

oleh sel khamir menjadi etanol maka semakin tinggi pula konsentrasi etanol yang dihasilkan. Penelitian Sutiyono, dkk (2013) menunjukkan hasil penelitian hidrolisis onggok yang terbaik adalah: waktu fermentasi 6 hari dengan penambahan starter *Saccharomyces cereviceae* 10 %, menghasilkan kadar etanol 15,82 % dengan kadar glukosa sisa 3,198 %.

4.10 Yield Bioetanol

Parameter yang digunakan dalam penelitian pembuatan bioetanol dengan bahan baku onggok (limbah padat tapioka) ini adalah kadar gula terpakai, kadar gula sisa fermentasi, dan kadar etanol yang selanjutnya akan digunakan untuk mencari nilai *yield* etanol. *Yield* etanol merupakan nilai banyaknya glukosa yang dikonversikan menjadi bioetanol dalam satuan (%). Nilai *Yield* etanol dari penelitian ini didapatkan dengan membandingkan kadar etanol hasil penelitian dengan kadar gula terpakai. Nilai *yield* bioetanol (Lampiran 9) dapat dilihat pada Tabel 4.6.

Tabel 4.6 menunjukkan *yield* bioetanol tertinggi ditunjukkan pada perlakuan D₃T₂ (pH 5, lama fermentasi 7 hari) dengan nilai 84,91 % dibandingkan dengan perlakuan lainnya yang mempunyai nilai 75,38 % dan 75,28 %. Jadi dapat dikatakan bahwa perlakuan D₃T₂ (pH 5, lama fermentasi 7 hari) dari penelitian ini adalah perlakuan yang optimum untuk menghasilkan bioetanol.

Tabel 4.6 *Yield* Bioetanol

Perlakuan	Gula Terpakai (%)	Kadar Etanol (%)	Yield (%)
D ₁ T ₁	5,69	2,91	51,14
D ₂ T ₁	6,99	3,83	54,77
D ₃ T ₁	7,02	5,34	75,38
D ₁ T ₂	6,38	4,25	66,56
D ₂ T ₂	6,05	4,56	75,28
D ₃ T ₂	8,60	7,30	84,91
D ₁ T ₃	6,69	3,05	45,54
D ₂ T ₃	6,97	4,30	61,70
D ₃ T ₃	7,54	4,52	59,89
D ₁ T ₄	4,20	0,49	11,57
D ₂ T ₄	4,70	1,05	22,40
D ₃ T ₄	5,04	1,13	22,42

Penelitian Sutiyono (2013) yang membuat etanol dari hasil hidrolisis onggok dengan variasi lama fermentasi 4, 6, dan 8 hari menghasilkan kadar etanol terbaik yaitu 15,82 % pada hari ke-6 dengan kadar glukosa sisa 3,198 % dengan yield etanol 31,09 %. Penelitian Wijayanti (2012) yang melakukan hidrolisis dengan menggunakan asam sulfat menghasilkan kadar etanol 0,72 (v/v) (GC) dengan *yield* etanol sebesar 32 %. Jannah (2010) melaporkan kadar etanol (penentuan menggunakan metode konversi berat jenis) tertinggi dari pemanfaatan onggok menjadi bioetanol adalah 19 % dengan lama fermentasi 7 hari.

Hasil bioetanol dari penelitian ini menghasilkan kadar yang lebih rendah dari penelitian-penelitian sebelumnya, hal ini dikarenakan kurangnya waktu yang diberikan pada saat proses hidrolisis. Sehingga kemungkinan proses mengubah pati menjadi glukosa belum maksimal yang akhirnya berpengaruh pada proses konversi glukosa menjadi bioetanol. Tetapi apabila dibandingkan dengan hasil kadar etanol dengan hidrolisis menggunakan asam, hasil kadar etanol penelitian ini masih tergolong tinggi. Hidrolisis secara enzimatik lebih menguntungkan, yaitu

jumlah glukosa yang dihasilkan lebih besar jika dibandingkan dengan hidrolisa asam, selain itu produk lebih murni, biaya pemurnian lebih murah, dan tanpa produk samping yang berbahaya. Palmqvist dan Hagerdal (2000) menjelaskan proses hidrolisis asam juga memiliki kelemahan yaitu timbulnya senyawa inhibitor seperti hidroksimetil furfural (HMF) dan furfural yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme dalam proses fermentasi untuk menghasilkan etanol. Sehingga mempengaruhi hasil kadar etanol yang dihasilkan.

4.11 Pemanfaatan Onggok Sebagai Media Fermentasi Untuk Menghasilkan Bioetanol Dalam Perspektif Islam

Pembuatan tepung tapioka dalam skala industri besar akan menghasilkan limbah yang bisa menimbulkan pencemaran lingkungan. Limbah industri tapioka termasuk limbah organik, karena ditimbulkan sebagai sisa dari pengolahan singkong yang merupakan salah satu bahan organik dan biasa disebut sebagai onggok. Onggok ini diperoleh dari proses pamarutan dan pengepresan, apabila tidak ditangani dengan seksama onggok dapat menimbulkan potensi besar mencemari lingkungan. Onggok dalam keadaan kering akan mengeluarkan bau tidak sedap, apalagi dalam keadaan basah saat musim hujan.

Dewasa ini, ilmu pengetahuan telah menjadi salah satu kebutuhan manusia untuk menghadapi tantangan hidup. Manusia tidak hanya diperintahkan untuk menikmati apa yang telah diberikan oleh Allah SWT tersebut, akan tetapi manusia diperintah juga untuk berfikir dan berusaha memanfaatkan ciptaan-Nya. Allah berfirman dalam QS Yunus: 101.

قُلِ أَنْظَرُوا مَاذَا فِي السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَمَا تُغْنِي الْآيَاتُ وَالنُّذُرُ عَنْ قَوْمٍ لَا يُؤْمِنُونَ ﴿١٠١﴾

“Katakanlah: “Perhatikanlah apa yang ada di langit dan bumi. Tidaklah bermanfaat tanda (kekuasaan Allah) dan rasul-rasul yang memberi peringatan bagi orang-orang yang tidak beriman”. (QS Yunus: 101).

Dalam ayat ini Allah menjelaskan bahwa semua ciptaan-Nya merupakan tanda-tanda keesaan dan kekuasaan Allah SWT bagi orang-orang yang berpikiran dan yakin kepada pencipta-nya. Semua ciptaan Allah tersebut apabila dipelajari dan diteliti akan melahirkan pengetahuan bagi manusia.

Onggok merupakan hasil samping pengolahan tepung tapioka dan diketahui mengandung pati sekitar 67,8 % (Winarno dkk., 1988). Pemanfaatan onggok tidak mengganggu program ke tahanan pangan karena sebagai limbah atau hasil samping. Oleh karena itu dilakukan pemanfaatan onggok sebagai bahan baku pembuatan Bioetanol. Hal ini dikarenakan Bioetanol merupakan salah satu bahan bakar alternatif pencampur premium, selain itu dapat menghemat penggunaan bahan bakar. Teknologi konversi biokimia memanfaatkan jasa khamir untuk mengubah bahan yang mengandung pati untuk diubah menjadi alkohol sebagaimana penelitian ini memanfaatkan khamir untuk diubah menjadi alkohol (bioetanol). Uraian ini membuktikan bahwa tidak ada yang sia-sia dalam penciptaan alam semesta beserta isinya. Allah berfirman dalam QS Ali Imran: 191.

الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَمًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَطْلًا سُبْحَانَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ ﴿١٩١﴾

“(yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri atau duduk atau dalam keadaan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata): “Ya Tuhan kami, tiadalah Engkau menciptakan ini dengan sia-sia, Maha Suci Engkau maka peliharalah kami dari siksa neraka”.

Sayyid Quthb (2001) menafsirkan ayat di atas bahwa Allah tidak menciptakan alam ini dengan sia-sia dan batil melainkan menciptakannya dengan penuh benar dan kebenaran. Benar nilainya, benar undang-undangnya, dan benar dasarnya. Sesungguhnya alam ini memiliki hakikat. Maka ia tidak dibiarkan rusak dan amburadul, ia berjalan untuk suatu tujuan. Ia diatur wujud, gerak, dan tujuannya dengan benar, ia tidak bercampur dengan kebatilan.

Penelitian tentang pembuatan bioetanol dari ongkok (limbah padat tapioka) ini memberikan pandangan bahwa limbah yang bisa merusak lingkungan, apabila diolah dan dimanfaatkan sebaik-baiknya akan menghasilkan produk yang bermanfaat bagi manusia. Bioetanol sebagai produk dari teknologi biokonversi ongkok ini dapat digunakan sebagai pengganti bahan bakar premium yang lebih ramah lingkungan.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

1. Proses hidrolisis secara enzimatik menggunakan α -amilase, meningkatkan kadar glukosa onggok dari 0,79 % menjadi 9,76 %.
2. Hasil fermentasi menunjukkan bahwa kadar bioetanol terendah diperoleh pada perlakuan pH 4 dan lama fermentasi 11 hari sebesar 0,48 % dengan nilai *yield* bioetanol 11,57 % dan kadar gula sisa fermentasi 5,65 %. Sedangkan bioetanol tertinggi diperoleh pada perlakuan pH 5 dan lama fermentasi 7 hari sebesar 7,30 % dengan nilai *yield* bioetanol tertinggi 84,91 % dan kadar gula sisa fermentasi 1,16 %.

5.2 Saran

1. Optimalisasi sakarifikasi: menambah masa inkubasi proses hidrolisis untuk memaksimalkan kerja enzim α -amilase, sehingga diharapkan akan meningkatkan produksi glukosa.
2. Perlunya penambahan buffer asetat sesuai dengan variasi pH yang diberikan pada substrat untuk mempertahankan pH selama proses fermentasi.
3. Optimalisasi proses fermentasi: perlunya penambahan nutrisi pada media fermentasi sebagai nutrisi untuk pertumbuhan dan aktivitas metabolisme khamir sehingga proses fermentasi lebih maksimal.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdalbasit, M., Gasmalla, A., Yang, R., Nikoo, M., and Man, S. 2012. Production of Etanol from Sudanese Sugar Cane Molasses and Evaluation of Its Quality. *Journal Food Processing and Technology*, Vol 3 issue 7, pp 1-3.
- Abidin, Rusdy. 2009. *Membuat Bensin Dari Ubi*. Jakarta: Bentara Cipta Prima.
- Astuti, M. 1980. *Rancangan Percobaan dan Analisa Statistik*. Bagian Pemuliaan Ternak. Fakultas Peternakan UGM.
- Buckle, K, A., Edwar, R, A., Fleet, G, H., and Wooton, M. 1987. *Ilmu Pangan*. Diterjemahkan oleh Purnomo dan Adino. 1987. Jakarta: UI Press.
- Budiyanto. 2002. *Mikrobiologi Terapan*. Malang. UMM Press.
- Crueger, W. dan Crueger, A. 1984. *Biotechnologi. A Texbook Of Industri Micrologi*. Sunderlan Sinaver Associates. Inc.
- Desroisier, N. W.1982. *Teknologi Pengawetan Pangan*. Jakarta: UI Press.
- Elevri, A, P., dan Putra, R, S. 2006. Produksi Etanol Menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* yang Diamobilisasi dengan Agar Batang. *Jurnal Akta Kimia Indonesia*. Surabaya: ITS.
- Fardiaz, S. 1989. disarikan dari Hardjo, S., Indrasari,N,S., Bantacut, T. Biokonversi: Pemanfaatan Limbah Industri Pertanian. *Bahan Ajar*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi Institut Pertanian Bogor.
- Fardiaz, S. 1998. *Fisiologi Fermentasi*. Jakarta: Departemen Pendidikan dan Kebudayaan.
- Fitria, L .2004, Pengaruh Lama Fermentasi Dan Pemberian Konsentrasi *Zymomonas Mobilis* Terhadap Produksi Etanol Dari Kulit Pisang Raja Sere, Malang: *Skripsi* tidak diterbitkan. Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Malang.
- Gumbira, Said. 1987. *Bioindustri, Penerapan Teknologi Fermentasi*. Jakarta: Mediatama Sarana Perkasa.

- Halimatuddahlia. 2003. *Pembuatan n-Butanol dari Berbagai Proses*. USU Digital Library.
- Hartina, F. 2013. Fermentasi Tetes Tebu Dari Pabrik Gula Pagotan Madiun Menggunakan *Saccharomyces Cerevisiae* Untuk Menghasilkan Bioetanol Dengan Kajian Variasi Ph Dan Lama Fermentasi. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Malang: Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Hartoto,L, Judoamidjojo, R.M., dan E.G. Sa'id. 2005. Biokonversi. Bogor. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Dirjen DIKTI, Pusat Antar Universitas Bioteknologi IPB. Bogor.
- Hasanah, H. 2008. Pengaruh Lama Fermentasi Terhadap Kadar Alkohol Tape Ketan Hitam (*Oryza sativa* L var forma *glutinosa*) dan Tape Singkong (*Manihottillissima* Pohl). *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
- Hidayat, N., Padaga, C, M., dan Suhartini, S. 2006. *Mikrobiologi Industri*. Yogyakarta: Andi Offset.
- Highina, B, K., Hashima, I., dan Bugaje, I, M. 2011. Optimization of Ethanol Production from Sugar Molasses in Nigeria. *Journal of Applied Technology in Enviromental Sanitation. Volume 1, number 3: 233-237*.
- Indahsari, M. 2012. Isolasi Bakteri Selulolitik dari Bekatul dan Uji Ativitas Enzim Selulase pada Media dengan Berbagai Sumber Nitrogen. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Malang: Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi UIN Malang.
- Irianto, K. 2006. *Mikrobiologi menguak dunia Mikroorganisme*. Bandung: Yrama Widya.
- Jannah, A., 2010. Optimasi Fermentasi Glukosa Dari Limbah Tapioka Padat Menjadi Bioetanol, Laporan Penelitian, Jurusan Kimia, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Jutono. 1972. *Dasar-Dasar Mikrobiologi (Untuk Perguruan Tinggi)*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press..
- Judoamidjojo, R.M., A.A.Darwis, dan E.G. Sa'id. 1992. *Teknologi Fermentasi*. Bogor: Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Pusat Antar Universitas Bioteknologi Institut Pertanian Bogor.

- Judoamidjojo, R. Mulyono. 1990. *Biokonversi*. Bogor : Depdikbud. Dirjen Dikti Pusat Antar Universitas Bioteknologi
- Khamdiyah. 2010. Optimasi Produksi Bioetanol dari Alga Merah. *Skripsi Diterbitkan*. Malang: jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri
- Khairani, Rini. 2007. Tanaman Jagung Sebagai Bahan Bio-fuel. <http://www.macklin-tmip-unpad.net/Bio-fuel/Jagung/Pati.pdf>. diakses tanggal 25 Maret 2009.
- Kultsum, U. 2009. Pengaruh Variasi Nira Tebu (*Saccharum Officinarum*) dari Beberapa Varietas Tebu Dengan Penambahan Sumber Nitrogen (N) dari Tepung Kedelai Hitam (*Glycine Soja*) sebagai Substrat Terhadap Efisiensi Fermentasi Etanol. *Skripsi Diterbitkan*. Malang: jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri.
- Lehninger, A. 1982. *Dasar-Dasar Biokimia jilid 2*. Jakarta: Erlangga
- Maier RM, Pepper IL & Gerba CP. 2000. *Environmental Microbiology*. London: Academic Press.
- Maiorella, B.L. 1982. *Comprehensive Biotechnology*. New York: Pergamon Press.
- Mardoni. 2007. Perbandingan Metode Kromatografi Gas dan Berat Jenis pada Kadar Etanol pada Minuman Anggur. *Skripsi*. Yogyakarta: Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma.
- Martin, A., Swarbrick, J. dan Cammarata, A., 1983, *Farmasi Fisik*, edisi ke-3, 8, penerjemah Yoshita. Jakarta: UI Press.
- Mulyono, 2008. *Kamus Kimia*. Yogyakarta: Panji Pustaka
- Palmer. T. 1985. *Understanding Enzyme*. Ellishorwood Publisher.
- Paturau, J.M. 1982. *By Product of the Sugar Cane Industry*. Amsterdam: Elsevier Publ. Co.
- Pelczar, M.J. and Chan E.C.S. 2005. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Jakarta: UI-Press.
- Poedjiadi, Anna. 1994. *Dasar-dasar Biokimia*. Jakarta: Universitas Indonesia.
- Poedjiadi, Anna. 2007. *Dasar-dasar Biokimia*. Jakarta: Universitas Indonesia.

- Prasetyana, S.D. 2009. Kualitas Bioetanol Limbah Padat kering Dihaluskan (Tepung) Dengan Penambahan Ragi Dan H₂SO₄ Pada lama fermentasi yang Berbeda. *Skripsi*. Surakarta: Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Presscot, S.C. and C.G. Dunn. 1981. *Industrial Microbiology*. New York: Mc Graw-Hill Book Company.
- Puspitasari, M. 2009. Kadar Bioetanol Limbah Padat Basah Tapioka Pada Pengendapan Hari ke 2 dengan Penambahan Ragi dan Waktu Fermentasi Berbeda. *Skripsi*. Surakarta: Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Qurthubi. 2008. Tafsir Al-Qurthubi. Jakarta: Penerbit Buku Islam Rahmatan.
- Rahman, A. 1989. *Pengantar Teknologi Fermentasi*. Departement Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Pusat Anatar Universitas Pangan dan Gizi. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Retnowati, Dwi & Sutanti, Rini. 2009. *Pemanfaatan Limbah Padat Ampas Singkong dan Lindur Sebagai Bahan Baku Pembuatan Etanol*. Penelitian tidak dipublikasikan. Semarang: Univ. Dipenogoro.
- Rofiq, A. 2012. Kajian Variasi Konsentrasi Ragi Tape dan Waktu Fermentasi Limbah Padat Industri Tapioka (Onggok) Menjadi Bioetanol. *Skripsi* Tidak Diterbitkan. Malang: Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Richana, Nur. 2011. *Bioetanol: Bahan Baku, Teknologi, Produksi Dan Pengendalian Mutu*. Bandung: Nuansa.
- Schlegel, Hans alih bahasa Tedjo Baskoro. 1994. *Mikrobiologi umum*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Sebayang, F. 2006. Pembuatan Etanol dari Molase Secara Fermentasi Menggunakan Sel *Saccharomyces cerevisiae* yang Terimobilisasi pada Kalsium Alginat. *Jurnal Teknologi Proses, Departemen Kimia, Fakultas MIPA Universitas Sumatera Utara*, halm 75-80.
- Sefriana, F. 2012. Variasi Nitrogen Dan Hidrolisis Enzimatis Pada Produksi Beta Glukan *Saccharomyces cerevisiae* Dengan Medium Onggok Ubi Kayu Dan Onggok Umbi Garut. *Skripsi*. Jakarta: Program Studi Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Indonesia.
- Shihab, Q. 2002. *Tafsir Al-Misbah: Pesan, Kesan dan Keserasian al-Quran*. Jakarta: Lentera Hati.

- Sukandar, D. 2008. Konversi Pati Gayong (*Canna edulis* Ker.) Menjadi Bioetanol Melalui Hidrolisis Asam dan Fermentasi. *Skripsi*. Jakarta: Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri (UIN) Syarif Hidayatullah.
- Supriyati. 2003. *Onggok Terfermentasi dan Pemanfaatannya dalam Ransum Ayam Ras Pedaging*. Balai Penelitian Ternak, PO BOX 221, Bogor 16002
- Syukri, S. 1999. *Kimia Dasar Jilid I*. Bandung: ITB Press.
- Tarigan. 2009. Pra Rancangan Pembuatan Pabrik Bioetanol dari Molase Kapasitas Produksi 98.000 ton/tahun. <http://Repository.usu.ac.id>. Diakses tanggal 15 Januari 2013.
- Tim Nasional Pengembangan BNN. 2007. *Bahan Bakar Nabati*. Jakarta: Penebar Sadaya.
- Toha, Abdul Hamid. 2005. *Biokimia: Metabolisme Molekul*. Jakarta: Alfabeta
- Thontowi, A., Kusmiati., dan Nuswantara, S. 2007. Produksi β -Glukan *Saccharomyces cerevisiae* dalam Media dengan Sumber Nitrogen Berbeda pada Air-Lift Fermentor. *Jurnal Biodiversitas Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI)*. volume 8, no 4, Halm 253-256.
- Triyani. 2009. Kualitas Bioetanol Limbah Tapioka Padat Kering Dengan Penambahan Ragi Dan H_2SO_4 Pada Lama Fermentasi Yang Berbeda. *Skripsi*. Surakarta: Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Walker, G.M. 1998. *Yeast: Physiology and biotechnology*. John Wiley & Sons, Chichester: xi + 350 hlm.
- Winarno, F.G. dkk., 1984, Pengantar Teknologi Pangan, Jakarta: PT Gramedia.
- Wirahadikusumah, Muhamad. 1985. *Biokimia: Metabolisme Energi, Karbohidrat, dan Lipid*. Bandung: ITB

LAMPIRAN

L1. Skema Kerja

➤ Sterilisasi Alat

Alat gelas

- dicuci dan dikeringkan
- dimasukkan dalam plastik tahan panas
- disterilisasi dalam *autoklaf* pada suhu 121 °C, tekanan 15 psi selama 1 jam

Hasil

➤ Pembuatan Media

• Media YPGA (*Yeast Extract Pepton Glucose Agar*) (Schwelberger, 2012)YPGA (*yeast extract* 0,5 g, *pepton* 1 g, glukosa 2 g, dan agar 3 g)

- dilarutkan dengan akuades 100 mL
- dipanaskan hingga mendidih
- dimasukkan dalam tabung reaksi masing-masing 10 mL dan ditutup kapas
- disterilisasi dalam *autoclave* pada suhu 121 °C, tekanan 15 psi selama 1 jam
- didinginkan dalam keadaan miring

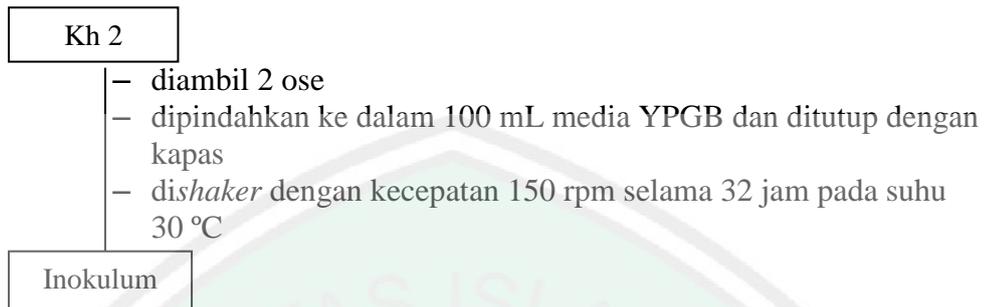
Hasil

• Media YPGB (*Yeast Extract Peptone Glucose Broth*)YPGB (*yeast extract* 1 g, *peptone* 2 g, glukosa 4 g)

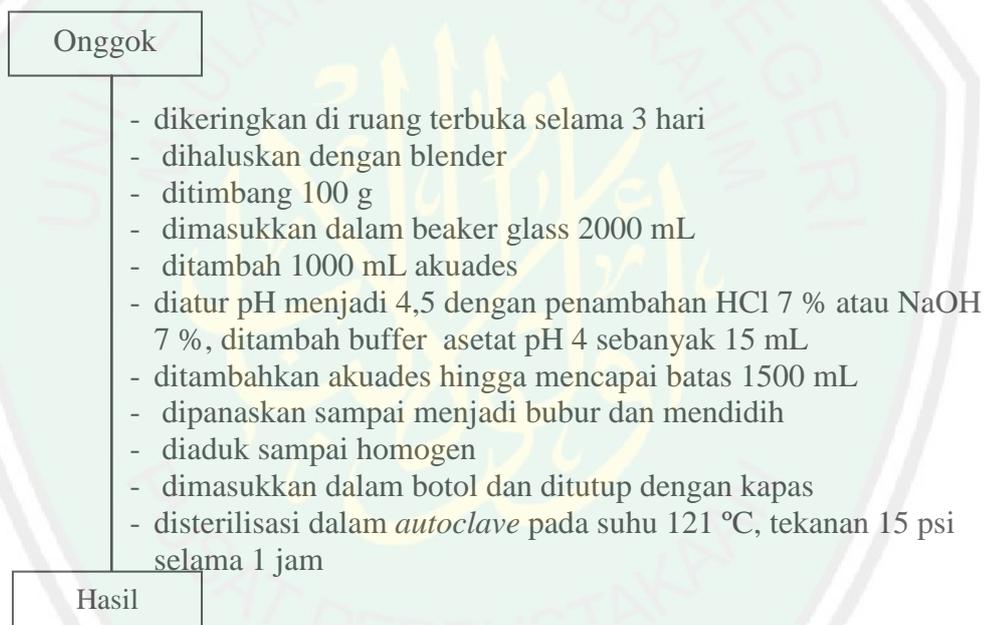
- dilarutkan dalam 200 mL akuades
- dipanaskan hingga mendidih
- dimasukkan dalam erlenmeyer dan ditutup kapas
- disterilisasi dalam *autoclave* pada suhu 121 °C, tekanan 15 psi selama 1 jam

Hasil

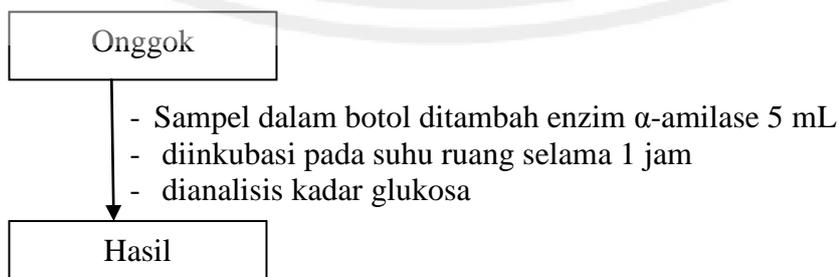
➤ **Pembuatan Inokulum**



➤ **Preparasi Sampel**



➤ **Proses Sakarifikasi limbah padat tapioka menjadi glukosa**



➤ **Penentuan Kadar Glukosa dengan Metode DNS**

• **Penentuan Panjang Gelombang Maksimum**

Glukosa 0,2 mg/mL

- dipipet sebanyak 1 mL
- dimasukkan ke dalam tabung reaksi
- ditambahkan 1 mL asam 3,5 dinitrosalisilat (DNS)
- dikocok dengan vortex
- ditutup mulut tabung dengan aluminium foil
- dipanaskan dalam air mendidih selama 15 menit
- ditambahkan K-Na Tartrat 40 % 1 mL
- didinginkan pada suhu ruang
- ditambahkan aquades hingga volume 10 mL
- dihomogenkan
- diukur absorbansinya pada panjang gelombang 500 - 560 nm dengan interval 5 nm

Hasil

• **Pembuatan Kurva Standar Glukosa**

Larutan glukosa 0,2, 0,4,
0,6, 0,8, 1 mg / mL

- dipipet masing-masing sebanyak 1 mL
- dimasukkan ke dalam tabung reaksi
- ditambahkan 1 mL asam 3,5 dinitrosalisilat (DNS)
- dikocok dengan vortex
- ditutup mulut tabung dengan aluminium foil
- dipanaskan dalam air mendidih selama 15 menit
- ditambahkan K-Na Tartrat 40 % 1 mL
- didinginkan pada suhu ruang
- ditambahkan aquades hingga volume 10 mL
- dihomogenkan
- diukur absorbansinya pada panjang gelombang 510 nm

Hasil

- **Analisis Glukosa menggunakan Metode DNS**



➤ **Produksi Bioetanol Menggunakan Khamir 2 dengan Variasi pH dan Lama Fermentasi**

45 gr sampel dengan pH 4, 4,5 dan 5

- ditambahkan inokulum *Saccharomyces cereviciae* yang telah mencapai fase log sebanyak 10 mL
- ditutup dengan kapas
- diinkubasi selama waktu fermentasi 5, 7, 9, 11 hari sambil *dishaker* dengan kecepatan 150 rpm dan suhu 30 °C
- dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali

Hasil

➤ **Destilasi Bioetanol Hasil Fermentasi**

Onggok yang telah di Fermentasi

- diambil 25 mL
- ditambah 25 mL akuades
- dimasukkan dalam labu destilasi
- didestilasi pada suhu berkisar 0-78 °C
- dihentikan ketika uap mencapai suhu 85 °C

Destilat

- ditampung dalam gelas ukur 50 mL
- dimasukkan dalam botol kecil
- ditutup rapat

Hasil

➤ **Pengukuran Kadar Alkohol dengan Metode Konversi Berat Jenis-Kadar Etanol**

• **Menentukan Massa Jenis Etanol p.a**

Piknometer

dibersihkan secara hati-hati dengan menggunakan aseton, dikeringkan dengan pemanasan di dalam oven ditimbang piknometer. didinginkan akuades sampai di bawah suhu percobaan ($\pm 15\text{ }^{\circ}\text{C}$). diisi dengan akuades secara hati-hati hingga penuh dan dimasukkan termometer ditunggu hingga mencapai suhu percobaan ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$), dibersihkan kelebihan akuades pada puncak pipa kapiler. ditimbang piknometer yang berisi akuades dicatat beratnya.

Hasil

Cara yang sama dilakukan untuk larutan baku etanol dengan masing-masing konsentrasi 20; 18; 16; 14; 12; 10; 8; 6; 4; dan 2 %.

• **Penentuan Berat jenis Etanol Hasil Destilasi**

Destilat

- disiapkan piknometer
- dikondisikan menggunakan aseton
- dikeringkan menggunakan hairdryer
- ditimbang piknometer kosong menggunakan timbangan analitik
- destilat dimasukkan ke dalam piknometer
- ditutup
- dibersihkan tumpahan destilat menggunakan tissu
- dicatat berat
- dilakukan duplo
- dilakukan penghitungan

Hasil

L2 Pembuatan Larutan HCl 7 %

Pembuatan dari larutan stok HCl 37 %

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$37 \% \cdot V_1 = 7 \% \cdot 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = \frac{7 \% \cdot 100 \text{ mL}}{37 \%} = 18,92 \text{ mL}$$

Jadi untuk membuat larutan HCl dengan konsentrasi 7 % dibutuhkan 18,92 mL larutan HCl 37 % dan dilarutkan dengan akuades sebanyak 100 mL

L3 Perhitungan Pembuatan Reagen

1. Pembuatan Reagen DNS

Sebanyak 0,1 DNS, 0,1 gram NaOH, 0,005 Na₂SO₃, dan 0,02 fenol dilarutkan dalam 10 ml aquades, diaduk dengan pengaduk bermagnet (*magnetic stirrer*). Setelah larut dimasukkan dalam labu takar 10 mL. Larutan disimpan dalam botol gelap pada suhu dingin.

2. Pembuatan reagen K-Na-Tartrat 40 %

Sebanyak 4 gram ditimbang dan dilarutkan dalam 10 mL akuades, diaduk dengan pengaduk bermagnet (*magnetic stirrer*). Setelah larut dimasukkan dalam labu takar 10 mL. Larutan disimpan dalam botol gelap pada suhu dingin.

L4 Pembuatan Konsentrasi Glukosa Standart 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; dan 1 mg/mL

Pembuatan stok glukosa baku dengan konsentrasi 5 mg/mL dapat dilakukan sebagai berikut:

$$\begin{aligned}\text{stok glukosa baku} &= \frac{0,5 \text{ g glukosa}}{100 \text{ mL akuades}} \\ &= 5 \text{ mg/mL}\end{aligned}$$

Untuk membuat larutan glukosa 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 dan 1 mg/mL dapat dilakukan dengan pengenceran larutan stok glukosa baku. Pembuatan larutan glukosa tersebut dapat dilakukan sebagai berikut:

a. konsentrasi 0,2 mg/mL:

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 5 \text{ mg/mL} = 100 \text{ mL} \times 0,2 \text{ mg/mL}$$

$$V_1 = 4 \text{ mL}$$

b. konsentrasi 0,4 mg/mL:

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 5 \text{ mg/mL} = 100 \text{ mL} \times 0,4 \text{ mg/mL}$$

$$V_1 = 8 \text{ mL}$$

c. konsentrasi 0,6 mg/mL:

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 5 \text{ mg/mL} = 100 \text{ mL} \times 0,6 \text{ mg/mL}$$

$$V_1 = 12 \text{ mL}$$

d. konsentrasi 0,8 mg/mL:

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 5 \text{ mg/mL} = 100 \text{ mL} \times 0,8 \text{ mg/mL}$$

$$V_1 = 16 \text{ mL}$$

e. konsentrasi 1 mg/mL:

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

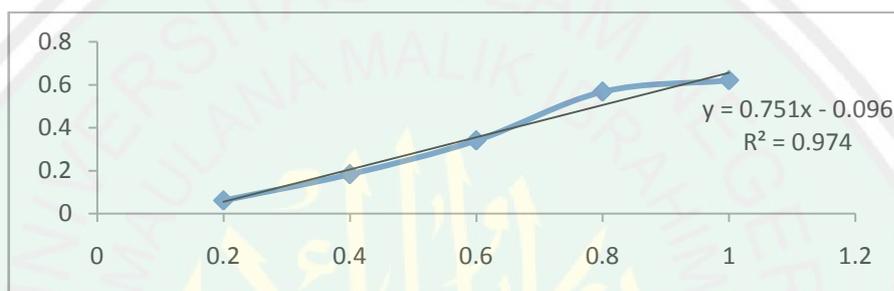
$$V_1 \times 5 \text{ mg/mL} = 100 \text{ mL} \times 1 \text{ mg/mL}$$

$$V_1 = 20 \text{ mL}$$

L5. Kurva Standar Glukosa

Tabel L5. Data Absorbansi Glukosa

Konsentrasi (mg/mL)	Absorbansi
0,2	0,061
0,4	0,183
0,6	0,34
0,8	0,567
1	0,62



Gambar L5. Kurva Standar Glukosa

L6. Analisis Kadar Gula Metode DNS

L6.1. Analisis Kadar Gula Bahan Baku

Analisis kadar total gula bahan baku dianalisis menggunakan metode DNS dan diukur absorbansinya dengan *spektrofotometer* pada panjang gelombang 510 nm. Data absorbansi bahan baku dapat dilihat pada Tabel L6.1.1.

Tabel L6.1.1 Absorbansi Bahan Baku

Nama	Absorbansi		
	Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III
Bahan baku	0,038	0,019	0,012

Perolehan absorbansi selanjutnya diplotkan ke dalam persamaan linier kurva standar glukosa yaitu $y = 0,751x - 0,096$ dengan ($y =$ absorbansi) dan x merupakan variabel yang dicari yakni kadar total gula sebelum fermentasi:

$$y = 0,751x - 0,096$$

$$0,038 = 0,751x - 0,096$$

$$x = \frac{0,038+0,096}{0,751}$$

$$x = 0,178 \times 50$$

$$x = 8,921 \text{ mg/mL} = 8921 \text{ ppm}$$

Kadar total gula bahan baku dapat dilihat pada Tabel L7.1.2

Tabel L6.1.2 Kadar Total Gula Bahan Baku

Perlakuan	Kadar Gula (ppm)			Total (ppm)	Rata-rata (ppm)
	Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III		
Bahan Baku	8921	7656	7190	23767	7922,333

L6.2 Analisis Kadar Gula Setelah Sakarifikasi

Analisis kadar total gula sampel setelah sakarifikasi dilakukan setelah proses inkubasi selama 1 jam setelah pemberian enzim α -amilase. Hasil absorbansi sampel dapat dilihat pada tabel L6.2.1

Tabel L6.2.1. Absorbansi Sampel Setelah Sakarifikasi

Perlakuan	Absorbansi		
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3
Sampel	1,344	1,560	1,205

Perolehan absorbansi selanjutnya diplotkan ke dalam persamaan linier kurva standar glukosa yaitu $y = 0,751x - 0,096$ (y = absorbansi) dan x merupakan variabel yang dicari yakni kadar total gula sebelum fermentasi:

$$y = 0,751x - 0,096$$

$$1,344 = 0,751x - 0,096$$

$$x = \frac{1,344+0,096}{0,751}$$

$$x = 1,917 \times 50 = 95,872 \text{ mg/mL} = 95872 \text{ ppm}$$

Tabel L6.2.2. Kadar Gula Setelah Sakarifikasi

Perlakuan	Kadar Gula (ppm)			Total (ppm)	Rata-rata (ppm)
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3		
Sampel	95872	110252	86617	292741	97580,333

L6.3. Analisis Kadar Gula Sisa Fermentasi

Data absorbansi total gula sisa fermentasi dapat dilihat pada Tabel L6.3.1

Tabel L6.3.1. Absorbansi Total Gula Sisa Fermentasi

Perlakuan	Absorbansi		
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3
D ₁ T ₁	0,542	0,495	0,505
D ₂ T ₁	0,392	0,212	0,355
D ₃ T ₁	0,324	0,289	0,331
D ₁ T ₂	0,416	0,420	0,395
D ₂ T ₂	0,475	0,490	0,415
D ₃ T ₂	0,079	0,073	0,078
D ₁ T ₃	0,337	0,390	0,365
D ₂ T ₃	0,324	0,340	0,302
D ₃ T ₃	0,233	0,267	0,211
D ₁ T ₄	0,752	0,741	0,723
D ₂ T ₄	0,631	0,659	0,701
D ₃ T ₄	0,601	0,623	0,611

Perolehan absorbansi diplotkan ke dalam persamaan linier kurva standar glukosa $y = 0,751x - 0,096$, nilai x sebagai kadar total gula yang diperoleh selanjutnya dikalikan dengan faktor pengenceran (fp = 50) misalnya:

$$y = 0,751x - 0,096$$

$$0,542 = 0,751x - 0,096$$

$$x = \frac{0,542 + 0,096}{0,751}$$

$$x = 0,8495 \times 50 = 42,476 \text{ mg/mL} = 42476 \text{ ppm}$$

Tabel L6.3.2. Kadar Gula Sisa Fermentasi

Perlakuan	Kadar Gula (ppm)			Total (ppm)	Rata-rata (ppm)
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3		
D ₁ T ₁	42476	39347	40013	121836	40612
D ₂ T ₁	32490	20505	30026	83021	27673,67
D ₃ T ₁	27984	25653	28450	82087	27362,33
D ₁ T ₂	34087	34354	32689	101130	33710
D ₂ T ₂	38015	39014	34021	111050	37016,67
D ₃ T ₂	11700	11314	11699	34713	11571
D ₁ T ₃	28828	32356	30692	91876	30625,33
D ₂ T ₃	27962	29027	26498	83487	27829
D ₃ T ₃	21904	24167	20439	66510	22170
D ₁ T ₄	56458	55725	54527	166710	55570
D ₂ T ₄	48402	50266	53062	151730	50576,67
D ₃ T ₄	46404	47869	47070	141343	47114,33

L6.4. Analisis Kadar Gula Terpakai Pada Proses Fermentasi

Analisis kadar gula setelah fermentasi dapat diketahui dari pengurangan kadar total gula awal sebelum fermentasi dengan kadar gula setelah fermentasi. Perolehan kadar gula yang terpakai pada proses fermentasi ditunjukkan pada tabel berikut:

Tabel L6.4. Kadar Gula Terpakai pada Proses Fermentasi

Perlakuan	Kadar Gula Sebelum Fermentasi (ppm)	Kadar Gula Sisa Fermentasi (ppm)	Kadar Gula Terpakai (ppm)
D ₁ T ₁	97580,33	40612	56968,33
D ₂ T ₁	97580,33	27673,67	69906,63
D ₃ T ₁	97580,33	27362,33	70218,03
D ₁ T ₂	97580,33	33710	63870,33
D ₂ T ₂	97580,33	37016,67	60563,63
D ₃ T ₂	97580,33	11571	86009,33
D ₁ T ₃	97580,33	30625,33	66955,03
D ₂ T ₃	97580,33	27829	69751,33
D ₃ T ₃	97580,33	22170	75410,33
D ₁ T ₄	97580,33	55570	42010,33
D ₂ T ₄	97580,33	50576,67	47003,63
D ₃ T ₄	97580,33	47114,33	50466,03

L7. Penentuan Nilai Aktivitas Enzim Amilase

Aktivitas enzim α -amilase didefinisikan sebagai jumlah enzim α -amilase yang diperlukan untuk menghidrolisis sejumlah pati dalam waktu satu menit. Uji kuantitas aktivitas enzim ini menggunakan metode DNS sehingga hasil absorbansi sampel dapat dilihat pada Tabel L7.1.

Tabel L7.1. Hasil Absorbansi pada $\lambda=510$ nm

Perlakuan	Absorbansi		
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3
Sampel	1,030	1,469	1,049

Perolehan absorbansi diplotkan ke dalam persamaan linier kurva standar glukosa $y = 0,751x - 0,096$, nilai x sebagai konsentrasi yang akan digunakan untuk mencari nilai aktivitas enzim amilase. misalnya:

$$y = 0,751x - 0,096$$

$$1,030 = 0,751x - 0,096$$

$$x = \frac{1,030 + 0,096}{0,751}$$

$$x = 1,4993 \text{ mg/mL} = 1499,3 \text{ ppm}$$

nilai konsentrasi (C) yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk mencari nilai aktivitas enzim amilase dengan rumus:

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas Enzim (AE)} &= \frac{C}{\text{BM glukosa} \times t} \times \frac{H}{E} \\ &= \frac{1499,3 \text{ ppm}}{180 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \cdot 30 \text{ menit}} \times \frac{1 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \\ &= 0,278 \frac{\mu\text{mol}}{\text{menit}} \end{aligned}$$

Tabel L7.2. Kadar Gula Setelah Sakarifikasi

Perlakuan	Aktivitas Enzim (Unit)			Total (Unit)	Rata-rata (Unit)
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3		
Sampel	0,278	0,387	0,282	0,947	0,315

L8. Destilasi Hasil Fermentasi

Bioetanol hasil fermentasi dipisahkan dari media fermentasi dengan metode destilasi. Bioetanol kasar hasil destilasi selanjutnya dianalisis kadar Etanolnya menggunakan metode konversi berat jenis. Destilat hasil destilasi dapat dilihat pada tabel L.8.

Tabel L8.1 Destilat Hasil Fermentasi

Perlakuan	Volume Destilat (mL)			Total (mL)	Rata-rata (mL)
	Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III		
D ₁ T ₁	35	30	29	94	31,30
D ₂ T ₁	30	33	30	93	31
D ₃ T ₁	33	29	29	91	30,30
D ₁ T ₂	33	30	30	93	31
D ₂ T ₂	30	30	30	90	30
D ₃ T ₂	32	29	30	91	30,30
D ₁ T ₃	29	29	30	88	29,30
D ₂ T ₃	32	30	30	92	31,30
D ₃ T ₃	30	30	30	90	30
D ₁ T ₄	31	30	30	91	30,30
D ₂ T ₄	30	30	29	89	29,67
D ₃ T ₄	30	30	29	89	29,67

Tabel L8.2 Rendemen Destilat Hasil Fermentasi

Perlakuan	Rata-rata (mL)	Rendemen (%)
D ₁ T ₁	31,3	62,70
D ₂ T ₁	31	62
D ₃ T ₁	30,3	60,67
D ₁ T ₂	31	62
D ₂ T ₂	30	60
D ₃ T ₂	30,3	60,60
D ₁ T ₃	29,3	58,67
D ₂ T ₃	31,3	62,67
D ₃ T ₃	30	60
D ₁ T ₄	30,3	60,67
D ₂ T ₄	29,67	59,33
D ₃ T ₄	29,67	59,33

L9. Analisis Kadar Bioetanol Hasil Fermentasi Menggunakan Metode Konversi Berat Jenis

L9.1 Pembuatan Larutan Etanol

- a. Pembuatan larutan etanol 20 %

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$99,8 \% \times V_1 = 20 \% \times 50$$

$$V_1 = 10,02 \text{ mL}$$

Dimana V_1 dan V_2 merupakan etanol p.a. Larutan etanol 99,8 % diambil sebanyak 10,02 mL dan diencerkan dengan penambahan akuades sebanyak 50 mL. Sehingga didapatkan larutan etanol 20 %.

- b. Pembuatan larutan etanol 18 %

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$99,8 \% \times V_1 = 18 \% \times 50$$

$$V_1 = 9,018 \text{ mL}$$

Dimana V_1 dan V_2 merupakan etanol p.a. Larutan etanol 99,8 % diambil sebanyak 9,018 mL dan diencerkan dengan penambahan akuades sebanyak 50 mL. Sehingga didapatkan larutan etanol 18 %.

- c. Pembuatan larutan etanol 16 %

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$99,8 \% \times V_1 = 160 \% \times 50$$

$$V_1 = 8,016 \text{ mL}$$

Dimana V_1 dan V_2 merupakan etanol p.a. Larutan etanol 99,8 % diambil sebanyak 8,016 mL dan diencerkan dengan penambahan akuades sebanyak 50 mL. Sehingga didapatkan larutan etanol 16 %.

d. Pembuatan larutan etanol 14 %

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$99,8 \% \times V_1 = 14 \% \times 50$$

$$V_1 = 7,014 \text{ mL}$$

Dimana V_1 dan V_2 merupakan etanol p.a. Larutan etanol 99,8 % diambil sebanyak 7,014 mL dan diencerkan dengan penambahan akuades sebanyak 50 mL. Sehingga didapatkan larutan etanol 14 %.

e. Pembuatan larutan etanol 12 %

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$99,8 \% \times V_1 = 12 \% \times 50$$

$$V_1 = 6,012 \text{ mL}$$

Dimana V_1 dan V_2 merupakan etanol p.a. Larutan etanol 99,8 % diambil sebanyak 6,012 mL dan diencerkan dengan penambahan akuades sebanyak 50 mL. Sehingga didapatkan larutan etanol 12 %.

f. Pembuatan larutan etanol 10 %

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$99,8 \% \times V_1 = 10 \% \times 50$$

$$V_1 = 5,01 \text{ mL}$$

Dimana V_1 dan V_2 merupakan etanol p.a. Larutan etanol 99,8 % diambil sebanyak 5,01 mL dan diencerkan dengan penambahan akuades sebanyak 50 mL. Sehingga didapatkan larutan etanol 10 %.

g. Pembuatan larutan etanol 8 %

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$99,8 \% \times V_1 = 8 \% \times 50$$

$$V_1 = 4 \text{ mL}$$

Dimana V_1 dan V_2 merupakan etanol p.a. Larutan etanol 99,8 % diambil sebanyak 4 mL dan diencerkan dengan penambahan akuades sebanyak 50 mL. Sehingga didapatkan larutan etanol 8 %.

h. Pembuatan larutan etanol 6 %

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$99,8 \% \times V_1 = 6 \% \times 50$$

$$V_1 = 3 \text{ mL}$$

Dimana V_1 dan V_2 merupakan etanol p.a. Larutan etanol 99,8 % diambil sebanyak 3 mL dan diencerkan dengan penambahan akuades sebanyak 50 mL. Sehingga didapatkan larutan etanol 6 %.

i. Pembuatan larutan etanol 4 %

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$99,8 \% \times V_1 = 4 \% \times 50$$

$$V_1 = 2 \text{ mL}$$

Dimana V_1 dan V_2 merupakan etanol p.a. Larutan etanol 99,8 % diambil sebanyak 2 mL dan diencerkan dengan penambahan akuades sebanyak 50 mL. Sehingga didapatkan larutan etanol 4 %.

j. Pembuatan larutan etanol 2 %

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$99,8 \% \times V_1 = 2 \% \times 50$$

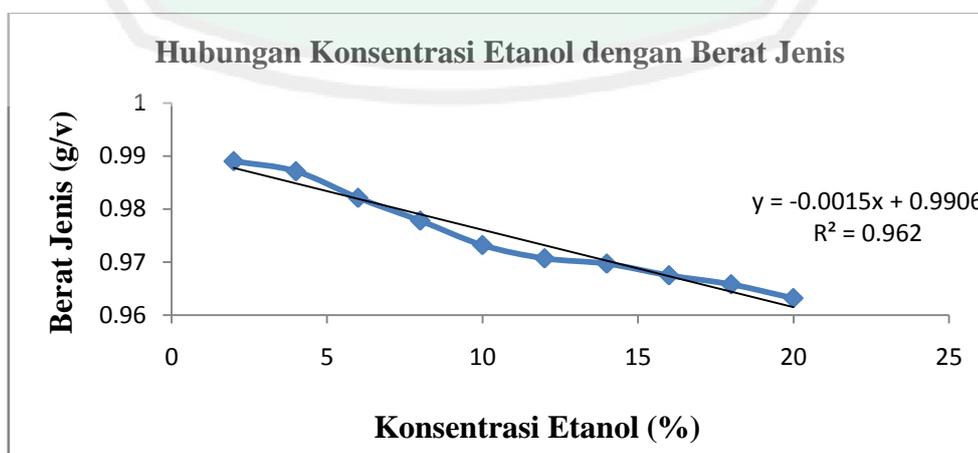
$$V_1 = 10,02 \text{ mL}$$

Dimana V_1 dan V_2 merupakan etanol p.a. Larutan etanol 99,8 % diambil sebanyak 1 mL dan diencerkan dengan penambahan akuades sebanyak 50 mL. Sehingga didapatkan larutan etanol 2 %.

L9.2 Penentuan Massa Jenis Etanol p.a

Tabel L9.2 Data Massa Jenis Etanol p.a

Kadar Etanol (%)	Berat Jenis (g/mL)
2	0,989
4	0,9871
6	0,9821
8	0,9778
10	0,9732
12	0,9707
14	0,9697
16	0,9675
18	0,9658
20	0,9632



Gambar L9.2 Kurva Hubungan Massa Jenis dan Konsentrasi Etanol

L9.3 Analisis Kadar Bioetanol Hasil Fermentasi

Hasil analisis bioetanol dengan konversi berat jenis dapat dilihat pada

Tabel L9.3.1

Tabel L9.3.1. Data Berat Jenis Destilat Hasil Fermentasi

Perlakuan	Berat Jenis		
	Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III
D ₁ T ₁	0,9855	0,9856	0,9876
D ₂ T ₁	0,9853	0,9847	0,9844
D ₃ T ₁	0,9821	0,983	0,9828
D ₁ T ₂	0,9842	0,9842	0,9841
D ₂ T ₂	0,9839	0,9832	0,984
D ₃ T ₂	0,9793	0,9798	0,9797
D ₁ T ₃	0,986	0,9859	0,986
D ₂ T ₃	0,984	0,984	0,9843
D ₃ T ₃	0,983	0,9842	0,9842
D ₁ T ₄	0,990	0,990	0,9896
D ₂ T ₄	0,9889	0,9890	0,9890
D ₃ T ₄	0,9888	0,9888	0,9888

Perolehan absorbansi diplotkan ke dalam persamaan linier kurva standar

etanol p.a, $y = -0,0015x + 0,9906$, nilai x sebagai kadar etanol, misalnya:

$$y = -0,0015x + 0,9906$$

$$0,9855 = 0,751x + 0,096$$

$$x = \frac{0,9855 - 0,9906}{-0,0051}$$

$$x = 3,4$$

Tabel L9.3.2. Kadar Etanol Hasil Fermentasi

Perlakuan	Kadar Etanol (%)			Total (%)	Rata-rata (%)
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3		
D ₁ T ₁	3,4	3,33	2	8,73	2,91
D ₂ T ₁	3,533	3,87	4,085	11,488	3,829
D ₃ T ₁	5,67	5,043	5,165	15,878	5,39
D ₁ T ₂	4,213	4,213	4,315	12,741	4,247
D ₂ T ₂	4,45	4,87	4,346	13,666	4,555
D ₃ T ₂	7,53	7,15	7,23	21,91	7,303
D ₁ T ₃	3,002	3,13	3,01	9,142	3,047
D ₂ T ₃	4,36	4,36	4,184	12,904	4,301
D ₃ T ₃	5,067	4,266	4,216	13,549	4,516
D ₁ T ₄	0,4	0,4	0,66	1,46	0,486
D ₂ T ₄	1,13	1,026	1,004	3,16	1,053
D ₃ T ₄	1,13	1,13	1,13	3,39	1,13

L9.4. Perhitungan *Yield* Bioetanol

Yield bioetanol merupakan banyaknya glukosa yang dikonversikan menjadi bioetanol dalam satuan (%).

$$\% \text{ yield bioetanol} = \frac{\text{konsentrasi bioetanol hasil analisis (\%)}}{\text{gula terpakai (\%)}} \times 100 \%$$

Misalnya untuk perhitungan *yield* bioetanol pada D₁T₁ yaitu:

$$\begin{aligned} \% \text{ yield bioetanol} &= \frac{2,91 \%}{5,69 \%} \times 100 \% \\ &= 51,14 \% \end{aligned}$$

Tabel L9.4 Yield Bioetanol

Perlakuan	Gula Terpakai (%)	Kadar Etanol (%)	Yield (%)
D ₁ T ₁	5,69	2,91	51,14
D ₂ T ₁	6,99	3,829	54,77
D ₃ T ₁	7,02	5,392	75,38
D ₁ T ₂	6,38	4,247	66,56
D ₂ T ₂	6,05	4,555	75,28
D ₃ T ₂	8,60	7,303	84,91
D ₁ T ₃	6,69	3,047	45,54
D ₂ T ₃	6,97	4,301	61,70
D ₃ T ₃	7,54	4,516	59,89
D ₁ T ₄	4,20	0,486	11,57
D ₂ T ₄	4,70	1,053	22,40
D ₃ T ₄	5,04	1,13	22,42

L10. Pengaruh Variasi pH dan Lama Fermentasi Terhadap Kadar Bioetanol**Tabel L10.1 Kadar Etanol Fermentasi**

pH (D)	Ulangan (U)	Lama Fermentasi (T)				Jumlah Lama Fermentasi (T)
		T1	T2	T3	T4	
D1	1	3,4	4,213	3,002	0,4	11,015
	2	3,33	4,213	3,13	0,4	11,073
	3	2	4,315	3,01	0,66	9,985
D2	1	3,533	4,45	4,36	1,13	13,473
	2	3,87	4,87	4,36	1,026	14,126
	3	4,085	4,346	4,184	1,004	13,619
D3	1	5,67	7,53	5,067	1,13	19,397
	2	5,043	7,15	4,266	1,13	17,589
	3	5,165	7,23	4,216	1,13	17,741
Jumlah ulangan (R)		36,096	48,317	35,595	8,01	
Jumlah umum (G)						128,018

Tabel L10.2 Jumlah Total pH x Lama Fermentasi

Substrat	Jumlah hasil (IS)				Jumlah (D)
	T1	T2	T3	T4	
D1	8,73	12,741	9,142	1,46	32,073
D2	11,488	13,666	12,904	3,16	41,218
D3	15,878	21,91	13,549	3,39	54,727
Jumlah (D)	36,096	48,317	35,595	8,01	128,018

1. Menghitung Faktor Koreksi (FK)

$$F.K. = \frac{G^2}{a.b.u} = \frac{(128,018)^2}{(3)(4)(3)} = \frac{16388,608}{36} = 455,24$$

2. Menghitung Jumlah Kuadrat (JK) Masing-masing Sumber Keragaman

$$\begin{aligned} \text{a. JK total} &= \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^u X_{ijk}^2 - FK \\ &= [(3,4)^2 + (3,33)^2 + \dots + (1,13)^2] - 455,24 \\ &= 586,87 - 455,24 = 131,63 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{b. JK (D)} &= \frac{\sum_{i=1}^a T_i^2}{bu} - F.K \\ &= \frac{(32,073)^2 + (41,218)^2 + (54,727)^2}{(3)(4)} - 455,24 \\ &= 476,887 - 455,24 = 21,647 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{c. JK (T)} &= \frac{\sum_{j=1}^b T_j^2}{au} - F.K \\ &= \frac{(36,096)^2 + (48,317)^2 + (35,595)^2 + (8,01)^2}{(3)(3)} - 455,24 \\ &= 552,069 - 455,24 = 96,228 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{d. JK interaksi (DT)} &= \frac{\sum_{i=1}^b \sum_{j=1}^k T_{ij}^2}{u} - JK D - JK T - F.K \\ &= \frac{[(8,73)^2 + (11,488)^2 + \dots + (8,01)^2]}{3} - 21,647 - 96,829 - 455,24 \\ &= 547,368 - 21,647 - 96,829 - 455,24 \\ &= 0,652 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{e. JK galat} &= JK \text{ total} - JK D - JK T - JK DT \\ &= 131,63 - 21,647 - 96,829 - 0,652 \\ &= 12,502 \end{aligned}$$

3. Menghitung Kuadrat Tengah (KT) Setiap Sumber Keragaman

$$\begin{aligned} \text{a. KT (D)} &= \frac{\text{JK (D)}}{\text{db (D)}} \\ &= \frac{21,647}{2} = 10,824 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{b. KT (T)} &= \frac{\text{JK (T)}}{\text{db (T)}} \\ &= \frac{96,829}{3} = 32,276 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{c. KT (D x T)} &= \frac{\text{JK (DxT)}}{\text{db (DxT)}} \\ &= \frac{0,652}{6} = 0,109 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{d. KT galat} &= \frac{\text{JK galat}}{\text{db galat}} \\ &= \frac{12,502}{24} = 0,521 \end{aligned}$$

4. Menghitung Nilai Fhitung

$$\begin{aligned} \text{a. F(D)} &= \frac{\text{KT (D)}}{\text{KT galat}} \\ &= \frac{10,824}{0,521} = 20,775 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{b. F (T)} &= \frac{\text{KT (T)}}{\text{KT galat}} \\ &= \frac{32,276}{0,521} = 61,950 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{c. F (D x T)} &= \frac{\text{KT D x T}}{\text{KT galat}} \\ &= \frac{0,109}{0,521} = 0,209 \end{aligned}$$

Tabel L10.3 Daftar Sidik Ragam

Sumber Keragaman	Derajat Bebas	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Tengah	F hitung	F tabel	P
					5%	
D (pH)	2	21,647	10,824	20,772*	3,40	< 0,05
T (lama fermentasi)	3	96,829	32,276	61,950*	3,01	< 0,05
D x T	6	0,652	0,109	0,209 ^{tn}	2,51	>0,05
Galat	24	12,502	0,521			
Umum	35	131,63				

Keterangan : * = nyata pada taraf 5 % , ^{tn} = tidak nyata

Berdasarkan hasil analisis dapat dinyatakan bahwa perlakuan dengan variasi pH dan lama fermentasi berpengaruh terhadap kadar bioetanol karena nilai $F_{hitung} > F_{tabel}$ yakni $20,772 > 3,40$, $61,950 > 3,01$, $7,941 > 3,443$ pada tingkat kepercayaan 0,05. Selanjutnya data diuji menggunakan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan $\alpha = 0,05$ untuk mengetahui perbedaan penambahan substrat dan inokulum terhadap kadar bioetanol, menggunakan rumus :

$$\begin{aligned}
 \text{BNT } 5 \% &= t_{\alpha} \sqrt{\frac{2KT \text{ Galat}}{u}} \\
 &= 2,064 \sqrt{\frac{2 \times 0,521}{3}} \\
 &= 2,074 \times 0,589 \\
 &= 1,216
 \end{aligned}$$

Tabel 10.3 Hasil Uji BNT

Perlakuan	Perlakuan dan nilai tenganya											
	0,49	1,05	1,13	2,91	3,05	3,83	4,25	4,3	4,52	4,56	5,39	7,3
0,49	-	0,56	0,64	2,42*	2,56*	3,34*	3,76*	3,81*	4,03*	4,07*	4,8*	6,81*
1,05	-	-	0,08	1,86*	2*	2,78*	3,2*	3,25*	3,47*	3,51*	4,24*	6,25*
1,13	-	-	-	1,78*	1,92*	2,7*	3,12*	3,17*	3,39*	3,43*	4,16*	6,17*
2,91	-	-	-	-	0,14	0,92	1,34*	1,39*	1,61*	1,65*	2,38*	4,39*
3,05	-	-	-	-	-	0,78	1,2	1,25*	1,47*	1,51*	2,24*	4,25*
3,83	-	-	-	-	-	-	0,41	0,47	0,69	0,73	1,46*	3,47*
4,25	-	-	-	-	-	-	-	0,05	0,27	0,31	1,04	3,05*
4,3	-	-	-	-	-	-	-	-	0,22	0,26	0,99	3*
4,52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,04	0,77	2,78*
4,56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,73	2,76*
5,39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,01*
7,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan: * = beda nyata pada taraf 0,05

Pembacaan hasil dengan notasi huruf :

Varietas	D1T4	D2T4	D3T4	D1T1	D1T3	D2T1	D1T2	D2T3	D3T3	D2T2	D3T1	D3T2
Nilai tengah	0,48	1,05	1,13	2,91	3,05	3,83	4,25	4,3	4,51	4,56	5,39	7,3
Notasi	a			b		bc		bcd		cde		e

Notasi huruf di atas dapat diartikan bahwa perlakuan dengan notasi a tidak berbeda nyata dengan perlakuan yang mempunyai notasi yang sama yaitu perlakuan D₁T₄, D₂T₄, dan D₃T₄. Perlakuan dengan notasi b yaitu perlakuan D₁T₁, tidak berbeda nyata dengan perlakuan yang bernotasi bc yaitu D₁T₃ dan notasi bcd yaitu D₂T₁. Begitu dengan penjelasan notasi cde, notasi de, notasi d, notasi e, dan notasi f.

Tabel 10.4 Pembacaan Hasil dengan Notasi Huruf

Perlakuan	Notasi
D ₁ T ₁	b
D ₂ T ₁	bcd
D ₃ T ₁	e
D ₁ T ₂	cde
D ₂ T ₂	de
D ₃ T ₂	f
D ₁ T ₃	bc
D ₂ T ₃	de
D ₃ T ₃	de
D ₁ T ₄	a
D ₂ T ₄	a
D ₃ T ₄	a

L11. Dokumentasi Penelitian



Gambar 11.1 Regenerasi khamir 2 (Kh 2)



Gambar 11.2 Pembuatan media YPGB



Gambar 11.3 Media YPGB



Gambar 11.4 Preparasi sampel



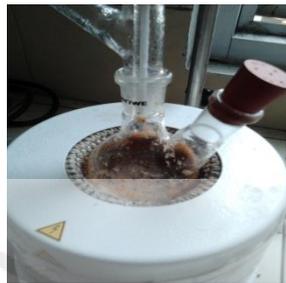
Gambar 11.5 Proses Sakarifikasi



Gambar 11.6 Proses fermentasi dalam suhu ruang



Gambar 11.7 *Shaker inkubator*



Gambar 11.8 Sampel dalam labu alas bulat



Gambar 11.9 Proses destilasi



Gambar 11.10 Destilat ditampung dalam gelas ukur 50 mL



Gambar 11.11 Destilat bioetanol



Gambar 11.12 Pengukuran kadar glukosa sampel

L12. Daftar Tabel t

t Table

cum. prob	$t_{.50}$	$t_{.75}$	$t_{.80}$	$t_{.85}$	$t_{.90}$	$t_{.95}$	$t_{.975}$	$t_{.99}$	$t_{.995}$	$t_{.999}$	$t_{.9995}$
one-tail	0.50	0.25	0.20	0.15	0.10	0.05	0.025	0.01	0.005	0.001	0.0005
two-tails	1.00	0.50	0.40	0.30	0.20	0.10	0.05	0.02	0.01	0.002	0.001
df											
1	0.000	1.000	1.376	1.963	3.078	6.314	12.71	31.82	63.66	318.31	636.62
2	0.000	0.816	1.061	1.386	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	22.327	31.599
3	0.000	0.765	0.978	1.250	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	10.215	12.924
4	0.000	0.741	0.941	1.190	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	7.173	8.610
5	0.000	0.727	0.920	1.156	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	5.893	6.869
6	0.000	0.718	0.906	1.134	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	5.208	5.959
7	0.000	0.711	0.896	1.119	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	4.785	5.408
8	0.000	0.706	0.889	1.108	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	4.501	5.041
9	0.000	0.703	0.883	1.100	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	4.297	4.781
10	0.000	0.700	0.879	1.093	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	4.144	4.587
11	0.000	0.697	0.876	1.088	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106	4.025	4.437
12	0.000	0.695	0.873	1.083	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055	3.930	4.318
13	0.000	0.694	0.870	1.079	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012	3.852	4.221
14	0.000	0.692	0.868	1.076	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	3.787	4.140
15	0.000	0.691	0.866	1.074	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	3.733	4.073
16	0.000	0.690	0.865	1.071	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921	3.686	4.015
17	0.000	0.689	0.863	1.069	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898	3.646	3.965
18	0.000	0.688	0.862	1.067	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878	3.610	3.922
19	0.000	0.688	0.861	1.066	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861	3.579	3.883
20	0.000	0.687	0.860	1.064	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845	3.552	3.850
21	0.000	0.686	0.859	1.063	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831	3.527	3.819
22	0.000	0.686	0.858	1.061	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819	3.505	3.792
23	0.000	0.685	0.858	1.060	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807	3.485	3.768
24	0.000	0.685	0.857	1.059	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797	3.467	3.745
25	0.000	0.684	0.856	1.058	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787	3.450	3.725
26	0.000	0.684	0.856	1.058	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779	3.435	3.707
27	0.000	0.684	0.855	1.057	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771	3.421	3.690
28	0.000	0.683	0.855	1.056	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763	3.408	3.674
29	0.000	0.683	0.854	1.055	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756	3.396	3.659
30	0.000	0.683	0.854	1.055	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750	3.385	3.646
40	0.000	0.681	0.851	1.050	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704	3.307	3.551
60	0.000	0.679	0.848	1.045	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660	3.232	3.460
80	0.000	0.678	0.846	1.043	1.292	1.664	1.990	2.374	2.639	3.195	3.416
100	0.000	0.677	0.845	1.042	1.290	1.660	1.984	2.364	2.626	3.174	3.390
1000	0.000	0.675	0.842	1.037	1.282	1.646	1.962	2.330	2.581	3.098	3.300
z	0.000	0.674	0.842	1.036	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576	3.090	3.291
	0%	50%	60%	70%	80%	90%	95%	98%	99%	99.8%	99.9%
	Confidence Level										