

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Etanol

Etanol atau etil alkohol mempunyai rumus senyawa $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ merupakan cairan encer tidak berwarna yang berbau menyengat, berasa pahit menyengat. Etanol mempunyai titik leleh sekitar $-114,1^\circ\text{C}$, titik didih $78,5^\circ\text{C}$ dan berat jenis $0,789 \text{ g/mL}$ pada 20°C ^[3, 4]. Karena titik bekunya yang rendah, maka etanol dapat dipakai untuk cairan termometer yang digunakan pada temperatur rendah (kurang dari -40°C).

Pembuatan Etanol ada 2 jenis metode^[3, 5], yakni :

1. Proses Sintesa

Pada proses sintesa etanol, metode yang sering dilakukan, yaitu :

- a. Hidrasi alkena
- b. Hidrolisa alkil Halogenida
- c. Reduksi senyawa karbonil

2. Proses Fermentasi

Alkohol, etanol khususnya, dapat dibuat dari berbagai bahan hasil pertanian.

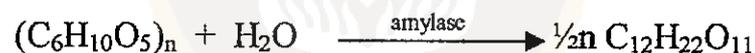
Secara umum bahan-bahan tersebut dapat dibagi dalam tiga golongan, yaitu :

1. Bahan yang mengandung turunan gula, seperti molase, gula tebu, gula bit, dan sari buah (umumnya anggur).

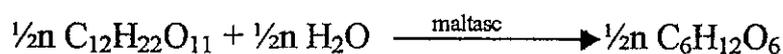
2. Bahan yang mengandung pati, seperti biji-bijian (misalnya gandum), kentang dan tapioka.
3. Bahan yang mengandung selulosa seperti kayu dan beberapa limbah pertanian.

Bahan-bahan yang mengandung monosakarida ($C_6H_{12}O_6$ sebagai glukosa) langsung dapat difermentasi, akan tetapi disakarida, pati ataupun karbohidrat kompleks harus dihidrolisa terlebih dahulu menjadi komponen sederhana, monosakarida. Oleh karena itu agar tahap proses fermentasi dapat berjalan dengan optimal, bahan-bahan tersebut di atas harus mengalami perlakuan pendahuluan sebelum masuk proses fermentasi.

Pati merupakan komponen yang kompleks sehingga proses pendahuluannya cukup panjang. Tahap pertama adalah pemecahan dengan menggunakan enzim amilase menjadi komponen disakarida yaitu maltosa.



Dengan menggunakan enzim lain yaitu maltase, maltosa akan dihidrolisa menjadi glukosa.

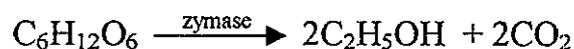


Terbentuknya glukosa berarti proses pendahuluan telah berakhir dan bahan selanjutnya siap untuk difermentasi. Bila digunakan selulosa sebagai bahan baku (kayu misalnya), maka bahan tersebut harus dimaserasi dengan asam terlebih dahulu

agar bahan selulosa dihidrolisa menjadi disakarida. Kemudian dengan suatu enzim, disakarida diubah menjadi monosakarida.

Secara kimiawi, reaksi dalam proses fermentasi ini berjalan cukup panjang, karena terjadi suatu deret reaksi yang masing-masing dipengaruhi oleh enzim khusus.

Tetapi secara sederhana dapat dituliskan sebagai berikut^[1, 6, 7] :



2.2. Ketela Pohon

Ketela pohon atau disebut juga ubi kayu atau singkong mempunyai nama latin *Manihot utilissima* termasuk dalam famili *Euphorbiaceae* merupakan spesies tanaman yang berasal dari daerah Amerika Selatan. Sejak ± 2000 tahun yang lalu suku bangsa Maya telah mengenalnya sebagai bahan pokok makanan dan mulai diteliti sekitar abad ke-17 di negara Brazil.^[3, 8]

Singkong sebagai tanaman bahan makanan mempunyai beberapa kelebihan, yaitu bisa tumbuh di tanah yang kurang subur dan kering, masa panen tidak diburu waktu, daun dan umbi bisa diolah untuk dimakan. Komposisi unsur nutrisi dalam singkong dibandingkan dengan bahan makanan lain ada dalam tabel 15.^[3]

2.3. Yeast^[7, 9]

Yeast atau disebut juga ragi merupakan sekumpulan mikroorganisme berupa fungi, kapang yang memproduksi enzim yang dibutuhkan dalam fermentasi. Mikroorganisme yang sering ditemui dalam yeast antara lain : *Candida*,

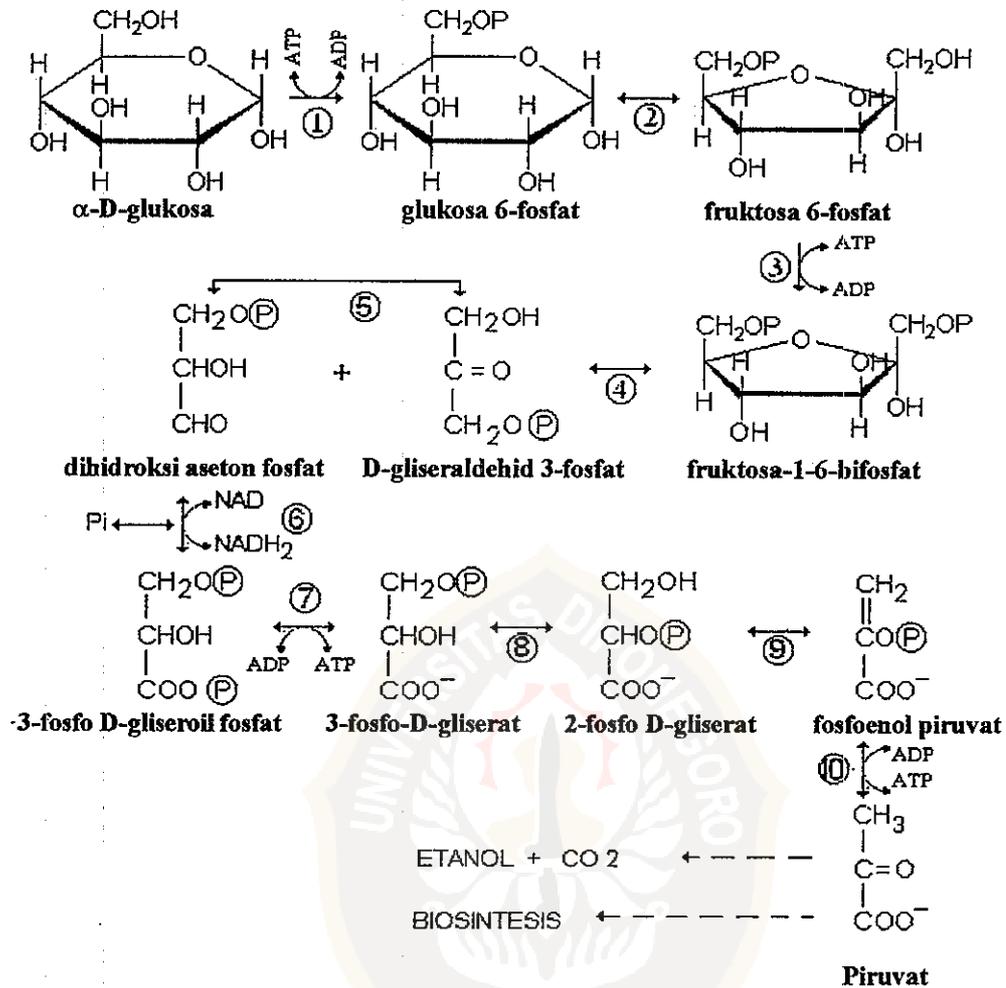
Saccharomyces, Endomycopsis, Hansenula, Amylomyces, Aspergillus fusarium, Mucor, Rhizopus.

Terdapat 4 pola umum pertumbuhan mikroorganisme yakni bakteri, khamir, kapang dan virus. Pada pertumbuhannya, bakteri berkembang dengan cara membelah diri. Bila perubahan lingkungan yang terjadi merintanginya, maka suatu enzim spesifik dalam sel tidak dapat disintesa. Pertumbuhan khamir umumnya dengan cara membelah diri dengan pertunasan, kecuali pada khamir yang tumbuh dengan pembentukan hifa. Sedangkan kapang yang merupakan salah satu jenis fungi tumbuh dengan pemanjangan (elongation) rantai dan percabangan.

2.3.1. Metabolisme Yeast

Metabolisme dapat dipahami sebagai semua reaksi enzimatik yang terjadi dalam sel, baik urutan maupun mekanismenya. Jalur atau jalan (pathways) metabolisme secara biokimia meliputi katabolik, anabolik, amphibolik atau anaplerotik. Katabolik merupakan proses degradasi suatu molekul senyawa organik menjadi senyawa yang lebih sederhana dan membebaskan sejumlah energi. Sedangkan Anabolik merupakan proses sintesa suatu molekul senyawa organik yang sederhana menjadi suatu makromolekul dan membutuhkan sejumlah energi. Amphibolik merupakan jalur yang terdiri dari katabolik maupun anabolik.

Selama fermentasi terjadi metabolisme glukosa yang dikenal sebagai jalur EMP (Embden-Meyerhof-Parnas Pathway) yang dapat di uraikan sebagai berikut^[3,9] :



Gambar 2.1. Skema jalur EMP, Enzim – enzim yang berperan adalah : 1. Heksokinase, 2. Glukosa-fosfat isomerase, 3. 6-fosfo fruktokinase, 4. Fruktosa-bifosfat aldolase, 5. Triosefosfat isomerase, 6. Gliseraldehid-fosfat dehidrogenase, 7. Fosfogliserat kinase, 8. Fosfogliseromutase, 9. Enolase, 10. Piruvat dekarboksilase.

2.4. Fermentasi^[7, 10, 11]

Fermentasi berasal dari bahasa latin yang secara sempit diartikan transformasi sari anggur menjadi minuman anggur (wine). Kata latin *fervere* sebenarnya berarti mendidih dan digunakan untuk menggambarkan penampakan menarik dari sari

anggur yang terfermentasi. Penjelasan ilmiah pertama kali diajukan oleh ahli kimia Louis Pasteur, yaitu proses peruraian gula menjadi alkohol dan karbondioksida yang disebabkan oleh aktivitas khamir yang tumbuh dan berkembang biak tanpa suplai udara dalam substrat fermentasi. Oleh Buchner penjelasan fermentasi disempurnakan dengan menunjukkan bahwa fermentasi dapat berlangsung dengan menggunakan cairan yang diekstrak dari sel-sel khamir yang sudah mati. Kemudian diketahui bahwa cairan ini mengandung suatu substansi aktif yang mampu memecah molekul gula dan diberi nama *ferment*, *enzym* atau *zymase*.

Istilah fermentasi sekarang berarti disimilasi anaerobik senyawa-senyawa organik yang disebabkan oleh aktivitas mikroorganisme atau ekstrak dari sel-sel tersebut. Tetapi umumnya kata ini sekarang juga mencakup aksi mikrobial yang terkontrol. Dengan arti yang lebih luas ini fermentasi tidak hanya melingkup proses-proses disimilasi seperti pembentukan alkohol, butanol-aseton, asam laktat dan lain-lain, tetapi juga industri produksi cuka, asam sitrat, enzim, penisilin dan antibiotik lainnya, serta riboflavin dengan vitamin-vitamin lainnya. Karena bahan-bahan ini hasil proses mikrobial maka disebut "produk fermentasi".

Seperti halnya dengan fermentasi, kata fermentor tidak hanya berlaku bagi wadah berlangsungnya fermentasi tanpa udara, tetapi juga bagi tangki-tangki tempat berlangsungnya oksidasi mikrobial aerobik atau juga bagi tangki-tangki propagasi dimana khamir dan organisme lainnya ditangkar dalam keadaan tanpa udara.

2.4.1. Proses Fermentasi^[10]

Fermentasi mencakup beberapa aktivitas mikrobial yang dikelompokkan, yang di dalamnya antara lain pertumbuhan, asimilasi, biosintesa dan disimilasi.

Pertumbuhan merupakan istilah untuk individu tunggal atau mikroorganisme yang membentuk koloni, mencakup peningkatan ukuran sel serta reproduksi sel secara langsung dengan pembelahan, pertunasan atau pembentukan badan khusus seperti spora dan konidia. Asimilasi adalah aktivitas yang mengubah berbagai komponen substrat menjadi substansi sel, sehingga memberikan pertumbuhan dan aktivitas hidup yang diperlukan. Biosintesa; yaitu pembentukan senyawa-senyawa kompleks dalam sel dalam jumlah yang lebih banyak daripada yang diperlukan untuk menjaga dan mempertahankan aktivitas normal sehari-hari. Senyawa biosintesa, yang umumnya adalah substansi aktif biokimia esensial (enzim, vitamin, antibiotik, toksin dan lain sebagainya) dapat tetap berada dalam sel tetapi lebih sering dikeluarkan dari sel dan masuk ke dalam substrat. Disimilasi; yaitu proses pengubahan senyawa substrat (yang merupakan sumber energi bagi organisme) atau senyawa-senyawa di dalam sel seperti glikogen dan ATP (yang merupakan cadangan energi) menjadi senyawa yang tingkat energinya lebih rendah, sedemikian rupa sehingga energi dibebaskan dalam proses ini. Disimilasi berlangsung di dalam sel dan produknya dikeluarkan ke media sekitarnya. Disimilasi terutama menghasilkan senyawa organik, sedikit senyawa anorganik dan beberapa unsur. Contohnya adalah karbohidrat, glikosida, alkohol, aldehide, asam keto dan hidroksi, hidrokarbon, asam amino,

amina; sejumlah garam Fe, Mn, As, C, S dan lain-lain. Proses-proses disimilasi bersifat oksidatif dan dapat berlangsung dengan :

1. Penambahan oksigen
2. Pelepasan hidrogen
3. Pelepasan elektron

Yang paling sering adalah pelepasan hidrogen / proses dehidrogenasi dari substansi induk yang disebut donor hidrogen.

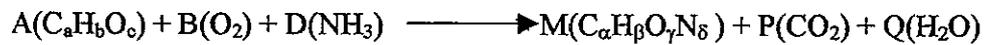
Hidrogen ini dibawa oleh suatu pembawa atau serangkaian pembawa seperti enzim, pigmen pernafasan ke suatu substrat yang dapat direduksi, yang disebut akseptor hidrogen.

2.4.2. Kinetika Fermentasi^[6, 10]

Kinetika fermentasi menggambarkan pertumbuhan dan pembentukan produk oleh mikroorganisme, bukan hanya pertumbuhan sel aktif, tetapi juga kegiatan-kegiatan sel-sel istirahat dan sel mati karena masih banyak produk-produk komersial diproduksi setelah pertumbuhan mikroorganisme terhenti.

Pertumbuhan mikroorganisme biasanya dicirikan dengan waktu yang dibutuhkan untuk menggandakan massa sel atau jumlah sel. Waktu yang dibutuhkan untuk menggandakan massa dapat berbeda dengan waktu penggandaan jumlah sel, karena massa sel dapat meningkat tanpa peningkatan jumlah sel.

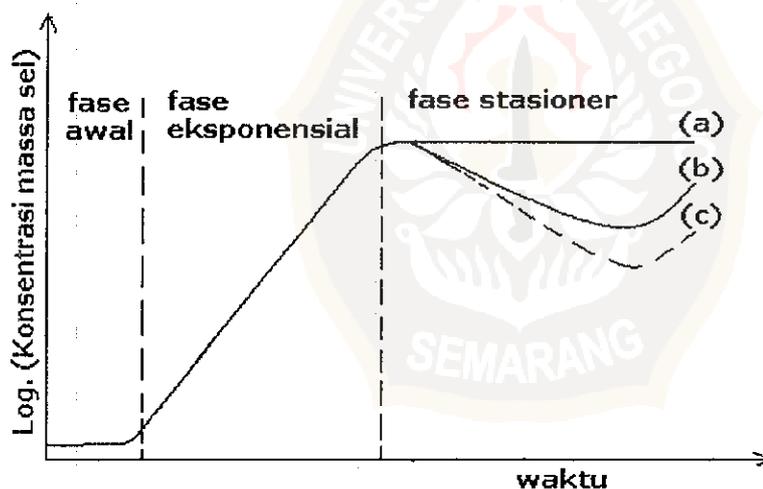
Pertumbuhan mikrobial dipandang sebagai suatu seri reaksi kimiawi ke arah sintesa massa sel, dapat dituliskan secara formula stoikiometri sebagai berikut :



Dimana A adalah mol senyawaan $C_aH_bO_c$ yang dianggap sebagai sumber energi karbon, dan M adalah mol sebuah unit sel ($C_\alpha H_\beta O_\gamma N_\delta$).

Salah satu cara pengukuran pertumbuhan mikrobial yang dapat dilakukan adalah dengan cara pengukuran massa sel metode tidak langsung. Pada pengukuran massa sel tersebut ada beberapa metode yang dapat dipakai, yakni komponen-komponen sel, pengambilan nutrisi, pembentukan produk, evolusi panas, volume sel terkemas, viskositas, pengukuran ATP.

Pertumbuhan mikroorganisme secara *batch* yang ditumbuhkan pada medium tertentu, memiliki kurva seperti yang ditunjukkan pada gambar berikut :



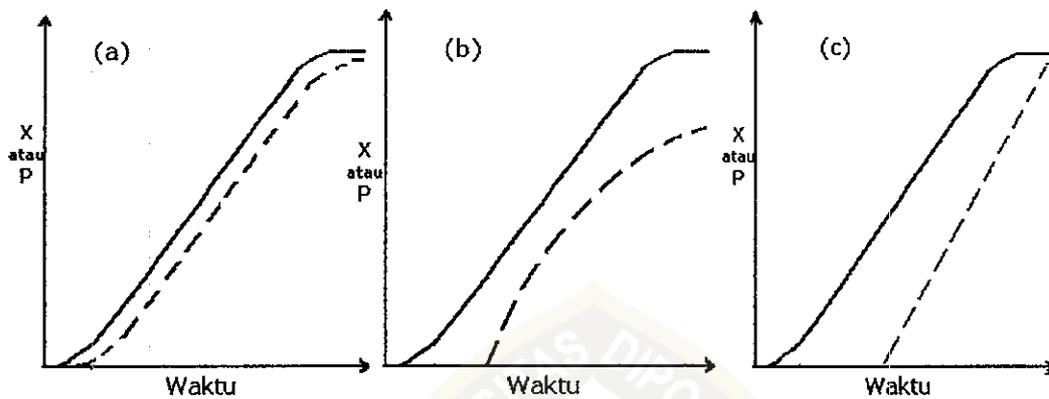
Gambar 2.2. Kinetika Fermentasi *Batch*. Kurva (a) memperlihatkan massa sel bila tidak terjadi lisis, (b) massa sel bila terjadi lisis dan diikuti pertumbuhan kriptik, sedang (c) "Viable Cell Count" bila terjadi lisis (Wang dkk., 1978).

Umumnya pertumbuhan diukur oleh pendekatan massa sel. Kurva pertumbuhan tersebut mempunyai tiga fase yang berbeda, yakni masing-masing fase

awal (lag phase), fase eksponensial dan fase stasioner. Fase awal adalah fase sejak inokulasi sel pada medium dan merupakan suatu periode adaptasi. Selama fase ini massa sel dapat berubah tanpa adanya suatu perubahan jumlah sel. Suatu saat bila perubahan-perubahan telah terjadi, maka sel-sel bergerak ke arah fase tumbuh. Fase ini biasanya disebut fase eksponensial atau bisa juga disebut fase logaritmik (Jika fase logaritmik, dicirikan oleh suatu garis lurus pada plot semilog antara $\ln X$ versus waktu). Periode ini adalah keadaan pertumbuhan yang seimbang atau mantap, dengan laju pertumbuhan spesifik, μ , konstan. Selama fermentasi, komposisi kimiawi cairan fermentasi berubah berhubung nutrisi terus menerus dikonsumsi dan produk metabolik disintesa. Sebagai akibatnya kondisi lingkungan tidak berada pada keadaan mantap. Laju pertumbuhan sangat tergantung pada konsentrasi. Fase stasioner terjadi bila seluruh sel berhenti membagi diri atau bila sel hidup telah mencapai keseimbangan dengan sel-sel mati. Pada saat pertumbuhan telah terhenti, metabolisme dan akumulasi produk masih terjadi di dalam sel atau di dalam cairan. Lisis sel akan menyebabkan terjadinya suatu medium yang kompleks dari produk-produk hasil lisis, karena itu suatu periode pertumbuhan yang sekunder, disebut pertumbuhan kriptik akan terjadi.

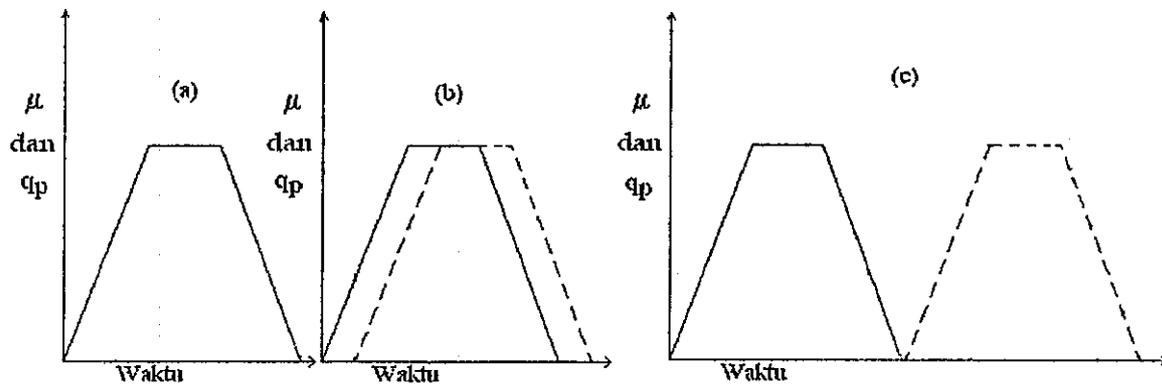
Hubungan kinetika di antara pertumbuhan dan pembentukan produk tergantung pada peranan produk dalam metabolisme sel. Dua buah kinetika yang umum digunakan adalah kinetika yang menggambarkan sintesa produk selama pertumbuhan, dan kinetika yang menggambarkan sintesa produk setelah pertumbuhan

terhenti. Suatu pola lain yang jarang diterapkan adalah bila pertumbuhan terjadi tanpa adanya pembentukan produk, tetapi setelah melalui selang waktu tertentu produk mulai muncul dan pertumbuhan terus berlangsung. Kinetika pola ini diperlihatkan gambar berikut :



Gambar 2.3. Pola kinetika pertumbuhan dan pembentukan produk (X atau P) versus waktu pada fermentasi *batch* : (a) pertumbuhan-berasosiasi dengan pembentukan produk, (b) campuran pertumbuhan-berasosiasi dengan pembentukan produk, dan (c) bukan pertumbuhan (pertumbuhan terhenti)-berasosiasi dengan pembentukan produk (Wang dkk., 1978).

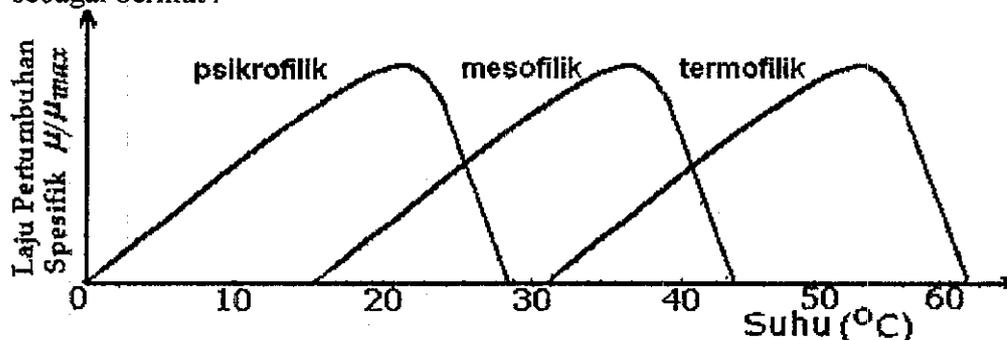
Produk-produk yang dihasilkan pada pola pertumbuhan berasosiasi dengan pembentukan produk biasanya merupakan produk-produk langsung dari suatu jalur katabolik seperti pada fermentasi anaerobik glukosa menjadi etanol. Atau produk-produk tersebut dihasilkan sebagai metabolit-metabolit antara seperti asam amino atau vitamin. Untuk mengilustrasikan profil kinetiknya diplotkan laju pembentukan spesifik (μ) serta laju spesifik pembentukan produk (q_p) versus waktu pada gambar berikut :



Gambar 2.4. Hubungan antara laju pertumbuhan spesifik μ dan sintesa produk spesifik q_p untuk (a) pertumbuhan – berasosiasi dengan pembentukan produk, (b) campuran (a), dan (c) pertumbuhan berhenti berasosiasi dengan fermentasi produk (Wang dkk., 1978).

Pada beberapa fermentasi, pertumbuhan dan pembentukan produk hanya mempunyai hubungan sebagian, atau disebut campuran pertumbuhan-berasosiasi dengan pembentukan produk. Suatu contohnya adalah fermentasi asam laktat yang digambarkan oleh Leudeking dan Piret (1959). Dengan demikian terdapat suatu batasan asosiasi pertumbuhan dan bukan pertumbuhan. Model ini mempunyai kegunaan umum untuk setiap fermentasi pertumbuhan campuran.

Ada tiga jenis kurva pertumbuhan mikroorganisme yang dapat digambarkan sebagai berikut :



Gambar 2.5. Kurva pertumbuhan psikrofilik, mesofilik dan termofilik berdasarkan fungsi suhu (Wang dkk., 1978).

Meskipun memiliki kekhususan tertentu, masing-masing mikroorganismenya dapat tumbuh pada suhu $20^{\circ} - 30^{\circ}\text{C}$. Mikroorganismenya yang kecepatan pertumbuhannya di bawah 20°C disebut psikrofilik, yang di antara $30 - 35^{\circ}\text{C}$ disebut mesofilik dan di atas 50°C adalah termofilik.^[10]

2.4.3. Sifat-Sifat Fermentasi Substrat Padat^[11]

Fermentasi dapat dilakukan dengan metode kultur permukaan dan kultur terendam (submerged). Medium kultur permukaan dapat berupa medium padat, semi padat atau cair. Sedangkan kultur terendam dilakukan dalam medium cair menggunakan bioreaktor yang dapat berupa labu yang diberi aerasi, labu yang digoyang dengan shaker atau fermentor. Fermentasi media padat ini sering disebut sebagai proses koji. Bahan padat yang banyak digunakan adalah hasil pertanian dan limbah pertanian. Fermentasi media padat mempunyai beberapa kelebihan, antara lain cara operasinya sederhana, kontaminasi bukan merupakan masalah penting, bahan untuk media atau substrat mudah diperoleh dan relatif murah. Sedangkan kelemahannya adalah antara lain memerlukan ruang yang luas, membutuhkan banyak tenaga, sulit mengatur komponen-komponen media dan meniadakan komponen yang berpengaruh negatif terhadap proses fermentasi, serta sulit mengatur kondisi lingkungan fermentasi.

Proses fermentasi media padat biasanya dilakukan pada suhu ruang yang relatif konstan dan merupakan kultur statis walaupun sekali-sekali dilakukan pengadukan. Salah satu masalah yang dihadapi dalam pengoperasian kultur padat dalam skala besar adalah kesulitan pemindahan panas dari substrat. Nagai (1979) mengutip Payne (1972) bahwa evolusi panas metabolisme/katabolisme dalam

pertumbuhan mikroba dapat dihitung dengan mengalikan jumlah mol oksigen yang dikonsumsi dengan 106 kkal/mol oksigen.

Masalah teknis yang timbul pada kultur statis seperti pemindahan panas metabolisme dan CO₂, pemberian oksigen yang merata, mempertahankan kelembaban substrat dapat diatasi dengan penerapan kultur dinamis. Oleh Lidenfelser dan Cielger (1975) dilakukan produksi mikotoksin (Ochratoxin A) dengan kapang *A. ochroceus* pada substrat gandum diperoleh data mengenai fungsi pengadukan.

Parameter-parameter yang paling mungkin mempengaruhi fungsi fisik dan aktivitas fisiologik selama fermentasi padat meliputi :

a. Variabel kontrol, yakni terdiri dari :

Ukuran partikel dan bentuk substrat, banyaknya substrat padat, kadar air awal substrat, kelembaban udara, suhu udara, kecepatan agitasi, laju aerasi, takaran inokulum spora

b. Fungsi-fungsi fisik, terdiri :

Pergerakan mekanis substrat padat, suhu substrat

c. Aktivitas fisiologis, meliputi :

Pertumbuhan, pembentukan produk, konsumsi oksigen, evolusi CO₂, evolusi panas metabolik, produksi air metabolik, kontaminasi bakteri.

2.5. Enzim

Enzim dapat didefinisikan sebagai suatu protein yang berfungsi sebagai biokatalisator yang mempercepat reaksi kimia dalam makhluk hidup atau dalam sistem

biologik. Dalam mengkatalisa reaksi, enzim bersifat sangat spesifik, sehingga meskipun jumlah enzim ribuan dalam sel dan substrat sangat banyak tidak akan terjadi kekeliruan ^[6].

2.5.1. Kinetika Reaksi Enzim ^[6, 12]

Penyatuan atau asosiasi enzim dengan substrat membentuk suatu kompleks enzim substrat telah lama diketahui tetapi sukar dideteksi.

Menurut Michaelis dan Menten reaksi enzimatik terdiri dari beberapa fase, yaitu :

1. Pembentukan kompleks enzim substrat (ES).
2. Modifikasi dari substrat membentuk produk (P) yang masih terikat dengan enzim atau (EP).
3. Pelepasan produk dari molekul enzim.

Ketiga fase tersebut dapat ditulis dengan persamaan reaksi sebagai berikut :



Pada reaksi yang irreversible dituliskan : $A \xrightarrow{k_1} P$

Dimana A adalah reaktan, P adalah produk dan k_1 adalah konstanta kecepatan reaksi yang spesifik untuk perubahan dari A menjadi P. Secara matematis dapat dituliskan sebagai berikut : $-\frac{\partial A}{\partial t} = k_1[A]$

Persamaan tersebut merupakan laju pengurangan konsentrasi A dan merupakan reaksi orde satu. Dapat pula dituliskan sebagai :

$$\frac{\partial P}{\partial t} = k_1[A]$$

2.5.2. Pengaruh Temperatur terhadap Kerja Enzim

Temperatur mempunyai pengaruh yang penting terhadap reaksi enzimatik. Penyimpanan pada suhu rendah akan menghambat enzim pada proses pelunakan (softening), pembentukan bau (flavour), pemasakan (maturation) dll. Pada temperatur tinggi akan merusak seluruh aktivitas enzim [10].

Perubahan temperatur pada reaksi enzim memberi efek-efek, yaitu perubahan stabilitas enzim, kelarutan dari gas, pH penyangga (buffer), afinitas enzim terhadap aktivator dan inhibitor, reaksi kompetitif, ionisasi dari grup prototropik dari sistem, afinitas Enzim-Substrat, laju perubahan substrat menjadi produk, serta tingkat asosiasi dari enzim multipolipeptida. [10].

Pada perubahan temperatur, pengaruh terhadap kecepatan reaksi atau konstanta laju reaksi (k), berlaku persamaan Arrhenius, yaitu :

$$k = A.e^{-E_a / RT}$$

Dimana T adalah suhu mutlak (K), A merupakan faktor arrhenius dan E_a adalah energi aktivasi.

Dari data mengenai laju pertumbuhan mikroba fermentasi serta laju pertumbuhan produk yang menunjukkan suatu kecenderungan linier (persamaan garis $y = mx + c$), dapat diasumsikan pola pembentukan etanol juga linier dan dapat digunakan regresi linier untuk menentukan pendekatan waktu dimana etanol mulai terbentuk.